



Universitat Autònoma
de Barcelona

MACROPROLACTINEMIA: IDENTIFICACIÓN Y ASPECTOS CLÍNICOS

Tesis Doctoral

CRISTINA VANRELL BARBAT

Directores

PROF. JOAQUIM CALAF I ALSINA

PROF. JUAN JOSÉ ESPINÓS GÓMEZ

DOCTORADO DE MEDICINA

**Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología,
y Medicina Preventiva**

Universidad Autónoma de Barcelona

Noviembre 2015

Joaquim Calaf Alsina, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Obstetricia y Ginecología de la Universitat Autònoma de Barcelona y Director del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,

y

Juan José Espinós Gómez, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universitat Autònoma de Barcelona y Coordinador de Endocrinología Reproductiva del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,

en calidad de DIRECTORES,

CERTIFICAN que:

La tesis titulada: **“MACROPROLACTINEMIA: IDENTIFICACIÓN Y ASPECTOS CLÍNICOS”** ha sido escrita por Cristina VANRELL BARBAT y realizada bajo nuestra dirección y tutela.

Lo firmamos para que conste a los efectos oportunos en Barcelona a 25 de noviembre de 2015.

Prof. Dr. J Calaf

Prof. Dr. JJ Espinós

AGRADECIMIENTOS

Los proyectos de investigación médica son posibles con las ideas, el esfuerzo y las contribuciones de muchas personas y recursos. Y que aunque en algún momento pueda destacar un protagonismo individual, generalmente las cosas que hacemos son suma de circunstancias y de trabajo en equipo. Esta tesis no es ninguna excepción.

En primer lugar quiero mencionar a los dos directores, los profesores Joaquim Calaf y Juanjo Espinós, del Servicio de Obstetricia y Ginecología, por tener la idea inicial, por confiar en mi para su desarrollo, por sus consejos, por su apoyo, por la perseverancia en continuar con el proyecto a pesar de diversas vicisitudes y por la inestimable ayuda en su fase final con horas de correcciones y sugerencias.

Le agradezco al Dr. Rodríguez Espinosa, del Servicio de Bioquímica, su transmisión conocimientos y el soporte metodológico y técnico para entender los conceptos fisiopatológicos y realizar los estudios biológicos de laboratorio inherentes a esta tesis. Sus enseñanzas y contribución es muy importante para poder entender gran parte del contenido del proyecto, y por esto le estoy muy agradecida.

Al Dr. Ignasi Gich, nuestro estimado epidemiólogo de cabecera, le quiero manifestar mi reconocimiento por su disponibilidad, su paciencia y por hacer fácil lo difícil cuando explica si se debe aplicar tal o cual análisis estadístico, y cómo se deben interpretar las bases de datos.

No puedo prescindir de agradecer muy sinceramente la colaboración de muchos compañeros del Hospital, en particular del Servicio de Obstetricia y Ginecología, que a fuerza de consejos, pequeñas acciones y amabilidad, contribuyen, no sólo a un gran ambiente de trabajo, sino a que proyectos como este puedan fluir de forma más fácil y productiva. En especial, quiero mencionar a las enfermeras y comadronas de la sala de partos, cuya ayuda desinteresada en la extracción de muestras de sangre y en la coordinación de las exploraciones, resulta crucial en este proyecto. A todos y todas mi agradecimiento y mis disculpas por no mencionaros una a una, pero los que me

conocéis sabéis que me daría demasiado miedo dejarme a alguien, y confío que quienes me ayudaron se den así por aludidas.

Por supuesto, agradezco de antemano la predisposición del tutor y las personas del tribunal a participar en el seguimiento y evaluación final de esta tesis doctoral, momento en el que espero estar a la altura de las circunstancias.

A Marta Fabra le quiero agradecer su apoyo, su calma, su orden y unas cuantas horas de ordenar el texto y las referencias, así como el trabajo editorial para que la tesis tenga el aspecto final que presenta y que yo sola hubiese sido incapaz de otorgarle.

En el ámbito personal, mis padres y mis abuelos son determinantes. Su pasión por la medicina, su amor a la Ginecología, su capacidad de esfuerzo, su sentido de la profesionalidad, su integridad personal y su continuo apoyo en mis posibilidades, constituyen el mejor sustento que se puede tener de perseverancia en los retos de la vida, como es completar un proyecto de tesis.

A mi marido Alfons, y a mis hijos Armand, Humbert y Octavi, por su apoyo, sus sonrisas y su comprensión con el hecho de que las últimas semanas “mamá ha estado menos horas en casa porque necesita acabar su tesis”. Gracias por entenderme, ayudarme tanto y hacerme sentir feliz. Als meus 4 homes, us estimo molt.

Quiero agradecer con afecto especial al grupo de voluntarias sanas, todas amigas, compañeras e incluso familiares, que movidas por el afecto hacia mi, se prestaron a sacarse sangre, tomar medicamentos y perder horas de tiempo. Ellas constituyen el imprescindible grupo control de la segunda parte de la tesis y os doy mil gracias. Ellas saben quienes son.

Finalmente, quiero destacar también que los estudios clínicos como éste no son posibles sin los pacientes, nuestras queridas pacientes. En este caso mujeres que acuden al hospital para buscar nuestro consejo y tratar de curarse o de mejorar sus problemas. Los investigadores damos un giro a la situación utilizando su enfermedad y sus datos para realizar estudios y proyectos como éste, con la finalidad de intentar

responder alguna pregunta, de avanzar el conocimiento, de mejorar el currículum propio e institucional, y de que ojalá el valor traslacional de los resultados redunde de forma positiva en futuras pacientes. Envié pues mi agradecimiento a todas las pacientes anónimas que a pesar de su enfermedad, se muestran receptivas y confianzas en los profesionales sanitarios para realizar este tipo de estudios, sin que generalmente reciban ninguna recompensa ni beneficio directo por participar en los mismos, aunque sí hoy les envío mi mayor respeto y sincero reconocimiento.

Cristina Vanrell Barbat

•

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Química y biología molecular de la PRL	3
1.2. Bioquímica de la PRL.....	5
1.2.1. Síntesis y liberación.....	5
1.2.2. Regulación.....	7
1.2.3. Acciones biológicas	9
1.2.4. Receptores	11
1.3. Alteraciones de la concentración de PRL.....	13
1.3.1. Hiperprolactinemia	13
1.3.1.1. Definición	13
1.3.1.2. Epidemiología	13
1.3.1.3. Etiología	14
1.3.1.4. Clínica: alteraciones menstruales y galactorrea	15
1.3.2. Macroprolactinemia.....	17
1.3.2.1. Definición	17
1.3.2.2. Caracterización bioquímica.....	17
1.3.2.3. Epidemiología	18
1.3.2.4. Etiología	18
1.3.2.5. Presentación clínica	19
1.4. Metodología para la medida de la concentración de PRL en suero.....	20
1.4.1. Condiciones pre-analíticas	20
1.4.2. Métodos de medida.....	20

2. MOTIVACIÓN	25
3. OBJETIVOS	31
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO	33
5. DISEÑO/METODOLOGÍA	35
5.1. Estudio observacional	36
5.1.1. Selección de pacientes.....	36
5.1.2. Tamaño muestral	36
5.1.3. Recogida de datos.....	36
5.1.3.1. Datos de anamnesis dirigida:	37
5.1.3.2. Datos de exploraciones complementarias realizadas:.....	37
5.2. Estudio dinámico.....	38
5.2.1. Selección de pacientes.....	38
5.2.2. Estudio muestral	39
5.2.3. Recogida de datos.....	39
5.3. Determinaciones de laboratorio	40
5.3.1. Inmunoanálisis de PRL	40
5.3.2. Precipitación con polietilenglicol 6000	40
5.4. Análisis estadístico	43
5.4.1. Estudio observacional	43
5.4.2. Estudio dinámico.....	43
6. RESULTADOS	45

6.1. Estudio observacional	46
6.1.1. Características antropométricas:	46
6.1.2. Tratamiento dopaminérgico previo	47
6.1.2.1. Duración del tratamiento (Figs. 13 y 14).....	47
6.1.2.2. Tiempo sin tratamiento (Figs. 15 y 16)	48
6.1.3. Motivo de consulta	50
6.1.4. Fertilidad	51
6.1.4.1. Causas de esterilidad	51
6.1.4.2. Causas de esterilidad femenina	52
6.1.5. Pruebas de imagen hipofisaria.....	54
6.1.6. Etiología de la hiperPRL	56
6.1.7. Clínica.....	58
6.1.7.1. Alteraciones menstruales +/-galactorrea.....	58
6.1.7.2. Galactorrea	60
6.1.8. Niveles de PRL y relación con la clínica y etiología	61
6.1.8.1. PRL total y etiología (Figs. 29, 30 y 31).....	61
6.1.8.2. PRL total y clínica	63
6.1.8.3. Clínica en relación a los niveles de PRL post-PEG	65
6.1.9. Relación con patología autoinmune	70
6.2. Resultados estudio dinámico	71
6.2.1. Parámetros basales y clínicos	71
6.2.2. Niveles de PRL basal, total y post-PEG.....	72

6.2.3. Incremento de PRL tras administrar antidopaminérgico	73
6.2.4. Áreas bajo la curva.....	76
7. DISCUSIÓN	78
7.1. Discusión del estudio observacional	79
7.2. Discusión del estudio dinámico	84
8. CONCLUSIONES	88
8.1. Conclusiones estudio observacional	89
8.2. Conclusiones estudio dinámico	89
9. BIBLIOGRAFÍA.....	90

1. INTRODUCCIÓN

La existencia de la prolactina (PRL) en especies de rumiantes como la oveja o la vaca estaba reconocida e identificada desde el primer cuarto del siglo XX. Sin embargo hasta el inicio de los años 70 no se identificó la PRL humana como una hormona distinta del resto de hormonas lactogénicas: hormona de crecimiento (GH) y lactógeno placentario. Esta dificultad en la individualización de la PRL fue consecuencia de su similitud en la actividad biológica con estas hormonas, así como la pobre disponibilidad tecnológica en aquellos momentos.

Cuando tan solo se disponía de bio-ensayos que se basaban en la actividad mamogénica o lactogénica de estas hormonas, los materiales biológicos en los que supuestamente estas abundaban, inducían respuestas similares independientemente de la hormona (GH o PRL) que contuvieran.

Con la llegada de la inmunología aplicada a las determinaciones hormonales (inmuno ensayos) estas diferencias se pusieron de manifiesto ya que, independientemente de la similitud en la respuesta biológica, la capacidad inmunogénica de cada una de ellas era completamente distinta y despertaba la creación de anticuerpos específicos.

Cuando se pudieron realizar estudios de secuenciación de aminoácidos quedó claro que la similitud estructural primaria de estas hormonas no se correspondía con una equivalencia paralela en la composición química.

El grado de identidad entre PRL y hormona de crecimiento es tan solo del 16 % y con el lactógeno placentario humano del 13%, lo que no deja de sorprender vista la alta similitud en la respuesta biológica inducida, que había comportado el anonimato de la PRL humana hasta 1970.

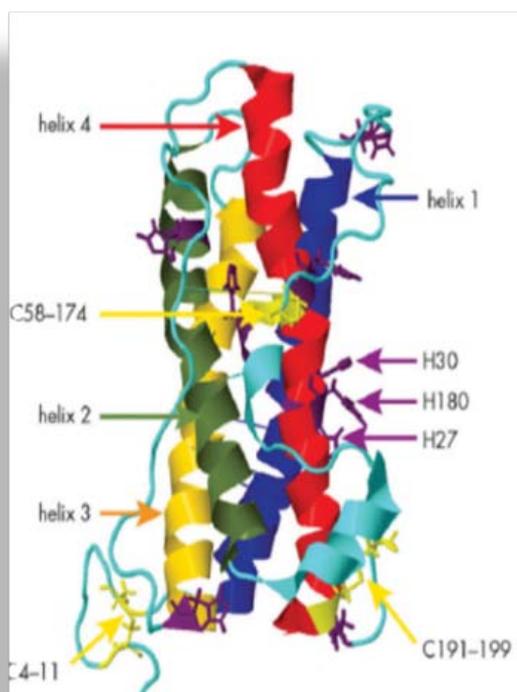
En este momento y desde dos laboratorios distintos (1,2) se publicó la identificación y purificación de la PRL humana como un primer paso clave en el desarrollo de técnicas inmunológicas para su determinación y la exploración de su papel en la función reproductiva en la normalidad y la patología.

1.1. QUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA PRL

El gen que codifica para la PRL en el genoma humano, se encuentra localizado en el cromosoma 6 (3), tiene un tamaño de 10 Kb y está compuesto de 5 exones y 5 intrones (4). Su transcripción está regulada por dos regiones promotoras independientes, una proximal que dirige la expresión hipofisaria específica, y otra más alejada responsable de la expresión extrahipofisaria (5–7).

El gen de la PRL humana esta compuesto por un ADNc de 914 nucleótidos y contiene una zona de lectura de 681 nucleótidos que codifican para una pre-hormona de 227 aminoácidos y peso molecular aproximado de 26 KDa, tras el procesamiento intracelular de la cual, se obtiene una isoforma monomérica de PRL de peso molecular de 23 KD(8).

Figura 1. Molécula de PRL en 3D



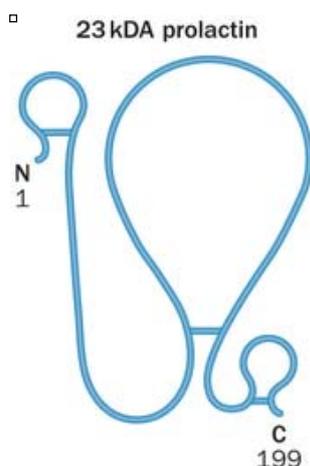


Figura 2.

Esta isoforma monomérica es la forma molecular mayoritaria de PRL: una única cadena polipeptídica de 199 aminoácidos con tres puentes disulfuro intramoleculares y un peso molecular de 23 KDa, con una estructura terciaria formada por 4 hélices alfa dispuestas de forma antiparalela (9).

A parte de esta forma monomérica (PRL-mo) se han caracterizado diferentes variantes en cuanto a formas y tamaños moleculares, que pueden provenir de cambios en la regulación de la transcripción de la expresión de PRL, aunque la mayoría se deben a modificaciones postranscripcionales o al *splicing* alternativo del ARNm. La presencia de éstas variantes es probablemente la responsable de algunas de las acciones pleiotrópicas y de los diferentes efectos de ésta hormona (10).

Las variantes de la PRL monomérica más frecuentes son (11):

- Formas diméricas ("*big-PRL*"): peso molecular aproximado de 45-60 KDa
- Formas poliméricas ("*big-big-PRL*"): 150-170 KDa, también denominada macroPRL.

En los sueros de individuos normales estas formas circulan conjuntamente en sangre periférica y en proporción más o menos constante, con predominio de las formas monoméricas que constituyen del 80-95% de la PRL sérica total. Le siguen las formas diméricas, del 15-30%, y finalmente las macroPRLs que conforman del 0-10% de la PRL total (12-14).

1.2. BIOQUÍMICA DE LA PRL

1.2.1. Síntesis y liberación

La PRL es una hormona sintetizada y liberada principalmente por las células lactotropas de la hipófisis anterior.

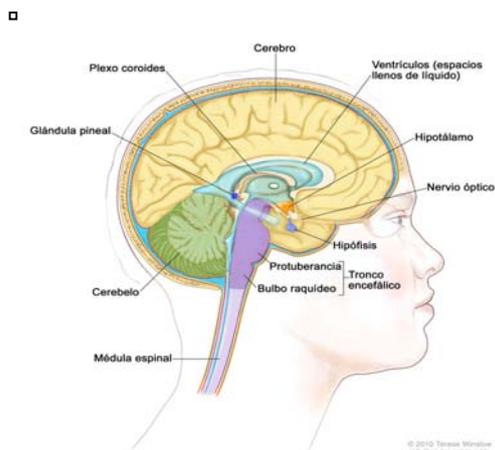
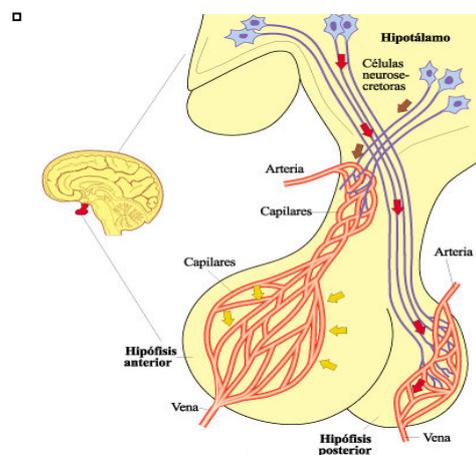


Figura 3. Anatomía interna del sistema nervioso central. La hipófisis está ubicada en el diencéfalo, en la silla turca del esfenoides. Encyclopaedia Britannica. www.global.britannica.com

Figura 4. Posee dos zonas. Hipófisis anterior o adenohipófisis e hipofófisis posterior o neurohipófisis.

NIH Instituto Nacional del Cáncer. © 2010 Teres Winslow.



En los periodos previos a la inmuno histoquímica, la distinción entre las distintas estirpes de células adenohipofisarias se basaba en su reacción a la tinción convencional. En función de las características químicas de las hormonas sintetizadas, se las clasificaba en acidofilas, basofilas o cromóforas. Tanto las células secretoras de GH como las de PRL se teñían como acidofilas, lo que reforzaba la idea sostenida durante mucho tiempo de que se trataba de la misma hormona. La inmuno-histoquímica permitió identificar ambas hormonas como segregadas en células distintas, aunque en algunos casos tumorales puede haber secreción de ambas (15).

Según modelos animales, la PRL se sintetiza en los polisomas ligados a la membrana y se “empaqueta” en gránulos de 600 a 1000 nm de diámetro que se fijan a la pared citoplasmática de la membrana (16).

El desencadenamiento de la secreción puede producirse de modo distinto en función del tipo de estímulo. Se sabe que tanto TRH, calcio o la adición de extractos de hipotálamo a los medios de cultivo, inducen la liberación de PRL por vías potencialmente distintas. La TRH se fija directamente al receptor de membrana e induce la liberación sin pasar por la vía del AMP cíclico, lo que sí haría el calcio o la respuesta a estímulos hipotalámicos (17).

Lo que puede ser relevante para esta tesis es el mecanismo de exocitosis de los gránulos intracelulares de PRL.

Según Nicoll (18):

“Existen evidencias que sugieren que la PRL intracelular existe en al menos dos formas: una forma de almacenamiento sería como molécula monomérica de bajo peso molecular y la otra estaría agregada o ligada formando macromoléculas. La forma grande sería tanto presecretora como precursora de la forma pequeña. Ambas son detectables por inmuno-ensayo, pero el bioensayo o los métodos de migración electroforética detectan solo las formas “pequeñas” de almacenamiento”.

Desde el inicio se sugirió la posibilidad de que la macroPRL fuera segregada directamente como tal. Sin embargo, ya en 1979 Jordan (19) puso en duda esta opción basándose en la ausencia de macroPRL en espacios como el líquido cefalo-raquídeo en pacientes que sí tenían complejos de macroPRL en plasma circulante.

Finalmente, estudios con aminoácidos tritiados (H3) en células lactotropas de ratón, demostraron que la creación de estos gránulos que empaquetan PRL, es un proceso dinámico que regula el tráfico desde el retículo endoplasmático a la zona de Golgi. Estas agrupaciones en gránulos pequeños, pasan a grandes y se rodean de una membrana que acaba fundiéndose con la membrana celular, consolidando la exocitosis y liberando las moléculas individuales de PRL monomérica (20).

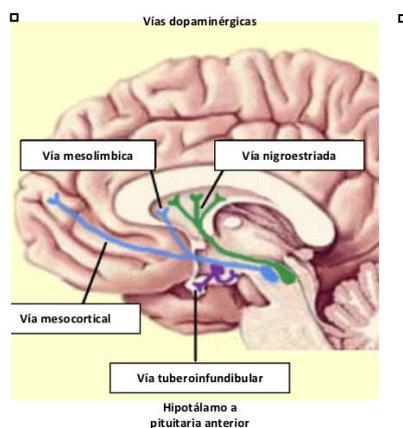
Otras localizaciones extrapituitarias productoras de PRL son: hipotálamo, placenta, decidua, glándula mamaria, sistema inmunitario (linfocitos), fibroblastos de la dermis, próstata y tejido adiposo (21,22)

1.2.2. Regulación

El hipotálamo es el principal centro regulador de la secreción de PRL, así como de todas las otras hormonas de la hipófisis anterior. Sin embargo, a diferencia del resto de hormonas hipofisarias, el control primario es inhibitorio. En condiciones basales la producción y secreción de PRL están inhibidas por unos factores (factores inhibidores de la PRL: PIF), el más importante y mejor conocido es la dopamina (DA), sintetizada en el núcleo arcuato y paraventricular del hipotálamo (10).

Las vías dopaminérgicas son rutas neuronales que transmiten dopamina de una a otra región cerebral. Una de éstas rutas es la vía tubero-infundibular: desde el núcleo arcuato los axones neuronales alcanzan el hipotálamo donde se libera la DA que, vía circulación portal, llega a las células lactotropas hipofisarias, inhibiendo la formación y secreción de PRL.

Figura 5.



Hay cuatro vías dopaminérgicas principales en el SNC: mesocortical, mesolímbica, nigroestriada y túberoinfundibular.

psicologia.sispedia.com

Hay muchas otras moléculas que regulan la secreción de PRL, tanto inhibiéndola como estimulándola. Algunas actúan directamente sobre las células lactotropas o bien sobre la vía dopaminérgica. Entre las moléculas que pueden estimular la liberación de PRL encontramos principalmente: TRH (hormona liberadora de tirotropina), polipéptido intestinal vasoactivo (PIV), angiotensina II, estradiol, opioides endógenos y grelina, así como serotonina, vasopresina, neurotensina, bombesina, sustancia P, oxitocina, neuropéptido Y, galanina y calcitonina. Como inhibidoras de la PRL, además de la

dopamina, está también la noradrenalina, el ácido gamma-amino butírico, la serotonina, la histamina, y la somatostatina entre otros (10).

La PRL regula su propia síntesis y liberación actuando en los sistemas dopaminérgicos hipotalámicos. Esta retroalimentación es la principal responsable de mantener el control de la PRL, que tiene lugar principalmente a través de un mecanismo inhibidor dopaminérgico.

Ritmo circadiano: La liberación de PRL es pulsátil y presenta un ritmo nictameral, con un ascenso entre los 10 y 60 minutos después de iniciarse el sueño y un descenso rápido, que es máximo a las 2-4 horas tras despertar. Esta secuencia es independiente de los ciclos de luz/oscuridad y parece estar generada por el núcleo supraquiásmático del hipotálamo. El mantenimiento de este ritmo está modulado tanto por el tono inhibitorio dopaminérgico, como por la oxitocina (23,24).

Variaciones de los niveles de PRL con la edad (25): En la hipófisis fetal están aumentados tanto el número de células lactotropas como su contenido de PRL, por ello los niveles de PRL se encuentran elevados desde la vida intrauterina.

Las altas concentraciones de estrógenos durante el parto, son probablemente la causa de la hiperPRL fisiológica en el feto en ese momento.

No hay diferencias en los niveles de PRL entre ambos sexos hasta la pubertad, momento en el que, al iniciar su actividad el ovario y producir estrógeno, se incrementarían las concentraciones de PRL en la mujer. En cambio, al llegar a la menopausia se produce el fenómeno contrario: La caída de los estrógenos se asocia a un ligero descenso de las concentraciones de PRL.

Patrón secretor durante gestación y lactancia: Los dos principales momentos en la vida de la mujer en que se produce una hiperPRL fisiológica son la gestación y la lactancia.

Los cambios de concentración sérica de PRL más llamativos tienen lugar durante la gestación. El estado de hiperestrogenismo fisiológico en este momento produce una hipertrofia e hiperplasia de las células lactotropas que conlleva una hiperproducción de PRL. Las concentraciones de esta hormona comienzan a aumentar alrededor de las 5-6

semanas de embarazo y alcanzan un máximo durante el tercer trimestre. Tras el parto, si no se realiza lactancia materna, la concentración de PRL disminuye rápidamente y vuelve a valores normales al cabo de 1 ó 2 semanas (26).

Durante la lactancia materna las concentraciones basales de PRL se mantienen elevadas las primeras semanas después del parto y experimentan aumentos bruscos con cada episodio de succión del pezón. A pesar de la prolongación del periodo de lactancia materna, a los pocos meses, tanto la concentración basal como las descargas bruscas por succión disminuyen progresivamente hasta alcanzar concentraciones pregestacionales (27,28).

1.2.3. Acciones biológicas

Es en el proceso reproductivo donde se atribuyen la mayor parte de las acciones de la PRL.

La principal y mejor conocida acción de la PRL es lactotrófica. Durante la gestación ejerce un efecto mamotrófico que se manifiesta con un crecimiento y desarrollo mamario y en el post-parto es lactogénica (inicia la síntesis de leche materna) y galactopoyética (inicia la secreción láctica mamaria) (29).

Durante la gestación el aumento en la secreción de estrógenos estimula la proliferación de células lactotropas, que comporta un aumento de la secreción de PRL. Junto con el estradiol, la progesterona, el lactógeno placentario, la insulina y el cortisol, la PRL estimulará el crecimiento de la glandula mamaria, preparándola para la lactancia post parto. Al mismo tiempo durante la gestación, los elevados niveles de estrógenos inhiben el efecto lactogénico de la PRL sobre la glándula mamaria, y es la caída de los estrógenos en el post parto, lo que comporta el inicio de la lactancia (30).

Otra importante acción de la PRL es sobre las gónadas, donde influye tanto directa como indirectamente. Su acción directa consiste en disminuir la sensibilidad de los receptores de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH) en el ovario (31). El efecto indirecto se ejerce mediante una reducción de la secreción de la

gonadoliberina (GnRH). Como consecuencia de la supresión de FSH y LH se inhibe la ovulación (32).

El descubrimiento de múltiples localizaciones extrapituitarias de secreción de PRL ha aumentado la identificación de muchas otras funciones de esta hormona. Este tema ha sido revisado de forma completa por Ignakak y más recientemente por Bernard y Marano. (10,33,34).

Efecto osmorregulador (35): La PRL es un mediador dentro de la red immuno-neuro-endocrina en la cual los tres sistemas se comunican entre si (36), y está concretamente implicada en la regulación de la osmolaridad. Se ha demostrado que aumenta la absorción de agua y sales a través de la membrana epitelial intestinal y reduce la excreción renal de Na^+ y K^+ (10,37).

Influencia en el sistema inmunológico: La PRL juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune tanto humoral como celular, en situaciones fisiológicas y patológicas. Se han descrito varios defectos inmunitarios asociados a déficit de PRL (38,39). Los linfocitos y otras células del sistema inmunológico son productoras de PRL (40). Las células T activadas secretan localmente PRL que actúa sobre la proliferación celular mediante un circuito positivo recíproco (41). El efecto de la PRL sobre los linfocitos T parece promover las acciones de las células T helpers y estimular su participación en reacciones inflamatorias (42). Además algunos estudios muestran la correlación entre hiperprolactinemia y diversas enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia o síndrome de Sjögren)(43), y se ha detectado mayor presencia de autoanticuerpos en pacientes con hiperprolactinemia que en controles sanos (44).

Efecto en la regeneración del sistema nervioso central: Se ha observado que tanto la PRL como la hormona del crecimiento intervienen, en condiciones experimentales, en el proceso de neurogénesis. Las dos hormonas lactogénicas pueden estimular la migración de las células madre nerviosas en un proceso mediado por los receptores de membrana. Teniendo en cuenta la posibilidad de que la GH se fije al receptor de PRL, se supone que esta última es la más involucrada en el proceso.

También se ha demostrado una influencia positiva en la reparación de lesiones en la mielina inducidas químicamente en el ratón.

La PRL activa también la proliferación de las neuronas progenitoras del SNC y específicamente de las células gliales junto con otras etapas de la neurogénesis abriendo una puerta al posible tratamiento de enfermedades neurodegenerativas demielinizantes (45).

Influencia en el sistema cardiovascular: Se han demostrado efectos vasoconstrictores de la PRL por una vía alternativa a la del óxido nítrico en animales de investigación, tanto en el cobaya como en la aorta aislada de rata,. La acción hipotensora de un dopaminérgico como la bromocriptina sugiere que el sistema dopaminérgico podría intervenir en los mecanismos de elevación de la tensión arterial (46). Esto podría relacionarla con el origen de la enfermedad hipertensiva del embarazo aunque la relación entre niveles elevados de PRL y la aparición de pre eclampsia todavía es objeto de controversia (47).

También se ha establecido una relación entre la PRL y la miocardiopatía puerperal dado que la administración de dopaminérgicos, tanto bromocriptina como cabergolina, contribuye a la mejoría de esta entidad (48).

Existen también indicios de que la PRL juega un papel en la respuesta inflamatoria sistémica de las pacientes con enfermedad isquémica coronaria. Se han descrito modificaciones en los niveles de PRL en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica y se ha postulado su uso como factor pronóstico (49). Pero los resultados no han sido replicados en otras investigaciones (50).

1.2.4. Receptores

La PRL ejerce su acción a través de receptores localizados en la membrana de las células diana.

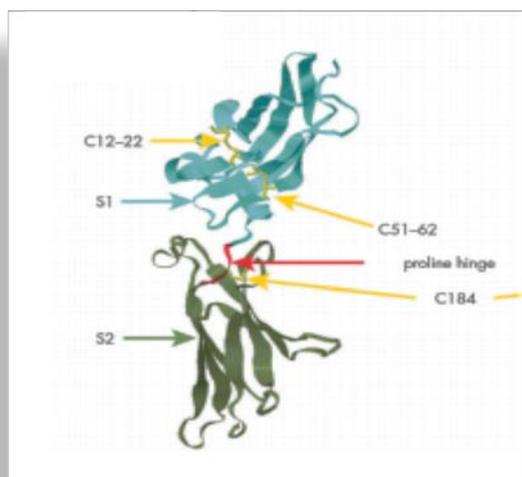
Además de en la mama, se han localizado receptores en la próstata, el ovario, los adipocitos, el hígado y otras.

El receptor es similar a los receptores de membrana típicos de las hormonas proteicas con un dominio extracelular, un dominio intramembrana localizado en el grosor de la membrana plasmática y un dominio intracelular que desencadena las vías de señalización para que se ejerza la acción biológica. Estas son básicamente la vía de la Janus quinasa (JK) o la STAT (Signal Transducers or Activators of Transcription) (10).

La acción de la PRL es sinérgica, especialmente en las acciones de lactogénesis, con diversos factores de crecimiento y esteroides que probablemente regulan su reposición en la membrana plasmática. Pero el desafío más importante es explicar como un único receptor puede ser activado por moléculas que primariamente son tan distintas, como la hormona de crecimiento o el lactógeno placentario. En la reciente revisión de Brooks (51) se propone, sobre diversas evidencias, la teoría de “geometría variable” en la que las tres hormonas serian capaces de ligarse a regiones del receptor distintas para desencadenar los efectos post receptor.

En el momento de la vinculación los dominios extracelulares se ligan de forma dimérica, es decir, los receptores se aparejan de forma que sus regiones extracelulares se ofrezcan haciendo disponibles epitopos diversos de su composición (Fig. 6).

Figura 6



Representación tridimensional de la región extracelular del receptor de PRL.

Numeradas las zonas susceptibles de vincularse al agonista e inducir la respuesta celular.

Las estructuras cuaternarias de los ligandos ofrecerían distintas conformaciones que favorecerían la formación de complejos triméricos (dos proteínas de los receptores y uno

del ligando) que serían distintos para las tres hormonas pero que darían lugar a una señalización intracelular similar.

De este modo se resuelve el enigma que durante tanto tiempo ha mantenido a la PRL en la sombra de la hormona de crecimiento y que explica que más de una hormona induzca el mismo efecto biológico.

1.3. ALTERACIONES DE LA CONCENTRACIÓN DE PRL

1.3.1. Hiperprolactinemia

1.3.1.1. Definición

El incremento patológico de la PRL es la alteración más frecuente del eje hipotalámico-hipofisario en la mujer. Hasta un tercio de las pacientes con amenorrea secundaria presentan una hiperPRL como causa del trastorno menstrual (52).

Inicialmente, estos cuadros eran catalogados de forma genérica como síndromes amenorrea-galactorrea descritos inicialmente por Chiari-Frommel o Argonz-Del Castillo (53). Posteriormente, en la década de los 80, se desarrollaron los inmunoensayos que, al estar comercialmente disponibles para uso clínico, permitieron cuantificar la PRL facilitando la detección de los casos de hiperPRL.

1.3.1.2. Epidemiología

La hiperPRL bioquímica, definida como un exceso de PRL por encima de los valores de referencia determinados en cada laboratorio, se puede identificar hasta en un 10% de la población.

Al referimos a la hiperPRL clínicamente aparente, la prevalencia varía en función de los estudios: desde un 0,4% en una población de adultos jóvenes en Japón (54), a un 5% entre las personas que asisten a una consulta de planificación familiar (55). La frecuencia es mayor cuando nos centramos en pacientes con síntomas específicos atribuibles a hiperPRL: se estima en un 9% de las mujeres con amenorrea, 25% de las que presentan galactorrea, y hasta en un 70% entre las mujeres con amenorrea y galactorrea (52).

1.3.1.3. Etiología

Aunque la hiperPRL puede ser debida a un hiperestímulo productor de PRL, generalmente es la consecuencia de una pérdida del control inhibitorio, hecho que comporta un aumento incontrolado de la PRL (56). El mecanismo específico de esta alteración depende de cada causa:

Tumoral: La causa más frecuente de hiperPRL son los adenomas hipofisarios, secretores de PRL, siendo más infrecuentes otros tumores mixtos, productores de GH o de TSH, que además segreguen PRL (57). También existe la posibilidad de que cualquier tumoración (incluso no productora), al comprimir el tallo hipotálamo-hipofisario y dificultar la llegada del efecto inhibitor de la DA, puede causar una hiperPRL. Un ejemplo de ello serían los craneofaringiomas.

Yatrogénica: Existen un gran número de fármacos que provocan hiperPRL. Destacan aquellos con actividad antidopaminérgica, que pueden actuar por diferentes vías (58):

- Alterando el metabolismo de la DA en el hipotálamo, como por ejemplo los antihipertensivos derivados de la reserpina o de la metildopa.
- Inhibiendo la liberación de DA, como los opiáceos.
- Bloqueando la unión de la DA al receptor H2 hipofisario, como los antihistamínicos ranitidina y cimetidina.
- Antagonizando con la DA a nivel hipofisario, desplazándola del receptor de la célula lactotropa. Estos últimos son los más efectivos y entre ellos destacan antieméticos tales como la metoclopramida o la domperidona, o sedantes centrales como fenotiacinas (clorpromacina) o butirofenonas (haloperidol).

Refleja: La liberación de PRL se produce como consecuencia del estímulo anómalo del arco reflejo que conecta directamente la glándula mamaria y el eje hipotálamo-hipofisario y que es responsable del pico de PRL que se genera cuando se produce la succión del pezón. La alteración patológica de éste arco es infrecuente y puede se

secundaria a lesiones torácicas, entre las más características encontraríamos cicatrices posquirúrgicas, lesiones medulares o procesos infecciosos como el Herpes Zoster (56).

Tiroidea: Del 10 al 40% de los casos de hipotiroidismo se acompañan de hiperPRL. Si bien en condiciones normales la TRH no es un importante regulador de la PRL, en el hipotiroidismo el exceso de TRH comporta un aumento de la sensibilidad de las células secretoras de PRL a la TRH (56).

Secundaria: Diversas patologías se acompañan de hiperestrogenismo y por tanto pueden cursar con hiperPRL: como el síndrome de ovarios poliquísticos, o bien situaciones de déficit de metabolización estrogénica como sucede en hepática o renal avanzada. Además en el hipogonadismo hipogonadotropo, como los que se dan en mujeres sometidas a ejercicios extremos (atletas de alta competición) o a estrés crónico también se asocian a hiperPRL (59).

Idiopática: Se considera no diagnosticada o funcional aquella hiperPRLs que no podemos incluir en ninguna de las categorías previas. El porcentaje de este grupo va disminuyendo con el aumento de sensibilidad de las técnicas de imagen para la detección de microprolactinomas (56).

1.3.1.4. Clínica: alteraciones menstruales y galactorrea

La presentación clínica de la hiperPRL es muy variable, se puede presentar como cuadro florido de amenorrea y galactorrea o bien ser totalmente asintomática, siendo la hiperPRL un diagnóstico casual en un análisis de rutina.

La anovulación o disovulación tiene un origen hipotalámico. Es la pérdida de la secreción pulsátil de la GnRH la que impide la secreción de gonadotrofinas responsables del desarrollo folicular (60). El cuadro resultante será el de un hipogonadismo hipogonadotrópico hipoestrogénico.

Es el hipertono dopaminérgico presente en la hiperPRL, secundario a un funcionamiento correcto aunque excesivo del feed-back negativo de rama corta, el que inhibe la secreción de GnRH. El sistema dopaminérgico tubero-infundibular tiene estructuralmente dos ramas distintas: una considerada central, aboca directamente la producción de dopamina

a los capilares eferentes del sistema porta hipotálamo hipofisario y aporta la dopamina a la hipófisis con la pretensión de controlar la secreción anómala de PRL. Y un segundo sistema denominado de la “empalizada lateral” aboca sus terminaciones en el recorrido de los axones de las células de la eminencia media que neuro-segregan GnRH. La acción axo-axónica de la dopamina impide la progresión de los gránulos de GnRH y, en consecuencia, su llegada a los capilares que los deberían llevar hasta las células gonadotropas. Ello comporta unos niveles bajos, o en los límites inferiores de la normalidad, de gonadotrofinas y estrógenos con un perfil similar al que se presenta en la amenorrea hipotalámica: con un cociente LH/FSH invertido, así como la pérdida de la pulsatilidad de la secreción de FSH y LH, responsables del desarrollo folicular, todo ello parece ser la principal causa de anovulación (10,61).

La reaparición del ciclo ovárico depende más de la recuperación de la pulsatilidad de la GnRH que del descenso de la PRL en sí misma. Este hipoestrogenismo asociado a los niveles normales o ligeramente disminuidos de gonadotrofinas indica una falta de sensibilidad del sistema de feed-back positivo como consecuencia de la alteración a nivel hipotálamo-hipofisario. Se trata de una situación hipogonadotropa hipoestrogénica con abolición de la función del control hipotalámico (33).

Esto se traduce clínicamente alteraciones menstruales que van desde la ataxia menstrual (con ciclos cortos por fases lúteas inadecuadas o cuadros de oligomenorrea por desarrollos foliculares sostenidos sin ovulación) hasta la amenorrea (por ausencia de desarrollo folicular). En general, existe una cierta correlación entre la concentración de PRL y el grado de severidad de las alteraciones del ciclo: con concentraciones superiores a 75 ng/ml prácticamente la totalidad de las pacientes presentarán una amenorrea; cuando los niveles de PRL están entre 30 y 60 ng/ml, es frecuente la ataxia menstrual. En un 30% de los casos las concentraciones plasmáticas de PRL son menores y las pacientes tienen ciclos regulares y están asintomáticas (62).

La presencia de galactorrea solo se objetiva en un 50% de los casos de hiperPRL sintomática (63). La glándula mamaria necesita una preparación estro-gestagénica que favorezca la hiperplasia e hipertrofia de las células lactotropas y las prepare para la lactogénesis. Sin este estímulo previo, la PRL se muestra ineficaz en su papel estimulador

de la lactogénesis y lactopoyesis. Dado que la anovulación asociada a estos casos es hipoestrogénica, en cuadros de larga evolución la glándula mamaria no estará preparada para responder al estímulo de la PRL y por lo tanto no presentará clínica de galactorrea (29,30).

1.3.2. Macroprolactinemia

1.3.2.1. Definición

Desde la década de los 80 se sabe que en 15-35% de los casos de hiperPRL, el exceso de PRL se produce principalmente a expensas de un incremento de las formas poliméricas, siendo acuñado el término de “macroprolactinemia” cuando más del 40 al 60% de la PRL circulante lo hace en forma de agregados (55,64–67). El término de macroprolactinemia se usó por primera vez en 1985 para definir una nueva causa de hiperPRL (68).

Ambas situaciones, hiperPRL monomérica y macroprolactinemia, son indistinguibles mediante el radioinmunoanálisis convencional e incluso en algunos casos la sintomatología acompañante es similar. Sin embargo, parecen corresponder a procesos de etiología, fisiopatología, evaluación, pronóstico y abordaje completamente diferentes (69).

1.3.2.2. Caracterización bioquímica

La “big-big” PRL o macroPRL es un complejo de más de 100 kDa de estructura heterogénea, que se origina de la unión no covalente de varias moléculas de PRL monomérica unidas a autoanticuerpos del tipo IgG formando un polímero (44,64). Ocasionalmente también se han detectado complejos de macroPRL no unidos a IgG, si no a IgA o IgM, sobretodo en sueros con niveles extremadamente elevados de PRL (13).

El origen de estos macrocomplejos se atribuye a un fenómeno extrahipofisario de agregación de varias moléculas de PRL monomérica.

Se desconocen las causas últimas de la generación de los anticuerpos anti-PRL aunque la mayoría de estudios sugieren fenómenos de autoinmunidad. Se ha apreciado que cambios post-traduccionales en algunas proteínas de la PRL podrían crear nuevos

epítomos en la molécula, promoviendo un estímulo antigénico crónico y su correspondiente respuesta autoinmune (12).

Estos autoanticuerpos IgG presentan poca afinidad pero gran capacidad y el seguimiento a largo plazo ha mostrado que la macroprolactinemia es una condición duradera (70–72).

La presencia de estos auto anticuerpos ha hecho pensar en la posibilidad de que la macroprolactinemia se asocie a otras patologías autoinmunes como el LES o patología tiroidea (38–40,73). Sin embargo otros estudios no han detectado esta asociación entre macroprolactinemia y alteraciones autoinmunes sistémicas (74–76). El descubrimiento de que un subtipo predominante de los autoaAC de PRL son IgG 4, apoya la teoría de que se produzcan por un estímulo antigénico crónico (77).

1.3.2.3. Epidemiología

La incidencia exacta de macroprolactinemia es desconocida. Se estima que en pacientes con hiperprolactinemia varía del 18 al 42 % (65,70), con una media del 28% (78), mientras que desciende a un 10% entre los pacientes con valores normales de PRL que consultan por patología endocrinológica (74). Junto con las causas tumorales y yatrogénicas la macroprolactinemia es una de las tres principales causas de hiperPRL (12,79).

De forma fisiológica durante la gestación se produce el aumento de la proporción de macroPRL por la unión de moléculas de PRL con anticuerpos específicos, tanto en mujeres normales como con macroprolactinemia (80). Sin embargo, el aumento de PRL durante el embarazo se acompaña de un cambio en la proporción de ambas moléculas, disminuyendo la macroPRL respecto a PRL monomérica (81).

1.3.2.4. Etiología

Se han detectado individuos con proporciones elevadas de macroPRL independientemente de la etiología de la hiperPRL. La causa tumoral es mucho menos frecuente que entre las hiperPRL monoméricas. Así, la mayoría de pacientes con macroprolactinemia presentan estudios de imagen del área hipotálamo-hipofisaria normales (66,82), aunque la presencia de macroPRL no excluye la posibilidad de una etiología tumoral (68,83,84) En este punto es importante considerar que en el 10% de la población sana hay evidencias radiográficas de adenoma hipofisario (85).

1.3.2.5. Presentación clínica

Estos macrocomplejos que presentan una actividad in vitro parecida a la PRL monomérica, parece que tienen la bioactividad in vivo disminuida (12,86).

Uno de los primeros en publicar estas diferencias con las hiperPRL monoméricas fue Whittaker 1981, describiendo un caso de paciente con macroprolactinemia y fertilidad mantenida (67).

Debido a su alto peso molecular parece que los complejos de macroPRL quedan confinados al compartimento intravascular sin poder acceder a los receptores de PRL en los efectores periféricos (70). Asimismo, los autoanticuerpos anti-PRL podrían competir con las propias moléculas de PRL por un mismo receptor. Como resultado, este complejo apenas se mostraría activo in vivo, aunque conservaría todas sus propiedades inmunorreactivas, lo que explicaría la ausencia de síntomas en estas pacientes y la falta de correlación entre las concentraciones de PRL y la sintomatología. (71,74,87,88).

Sin embargo, cuando los niveles de PRL monomérica libre son suficientemente elevados, a pesar del predominio de la macroPRL, las pacientes pueden presentar alteraciones clínicas típicas de hiperPRL (74,82,91). Por ello a pesar de que la oligomenorrea y amenorrea son más frecuentes en las hiperPRL monoméricas, hasta un 57% y 29% respectivamente, las pacientes con macroprolactinemia también las presentan (13,92).

Por otro lado, debido a su gran tamaño el aclaramiento de PRL es más lento, ya que su unión a otras moléculas limita la eliminación renal (89,90). Por ello se considera que la macroPRL se desarrolla más por un retraso en su eliminación que por un aumento de su producción (13) y serían situaciones estables a largo plazo (70). En un modelo animal, Hattori y cols (64) confirmaron que los inmunocomplejos de macroprolactinemia se eliminaban más lentamente que la PRL monomérica.

1.4. METODOLOGÍA PARA LA MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PRL EN SUERO

1.4.1. Condiciones pre-analíticas

Los niveles de PRL se modifican fácilmente ante diferentes situaciones tales como: el estrés, la manipulación mamaria, el período postnictameral, el postpandrial o el postcoital inmediato. Por ello, para una correcta interpretación de las concentraciones de PRL en suero es imprescindible prestar una cuidadosa atención a las condiciones de los pacientes en el momento de la obtención del espécimen. La extracción de PRL debe precederse de unos requisitos que disminuyan el riesgo de falsos positivos, entre ellos (59):

Realizarla tras un mínimo de 2-4 horas de vigilia

- a) Ayuno nocturno: no haber ingerido anteriormente comida rica en proteínas o grasas.
- b) Evitar realizar una exploración mamaria previa.
- c) Disminuir al máximo el estrés de la extracción: en pacientes con antecedentes de lipotimia durante venopunción o en los que la técnica es difícil y traumática, es conveniente esperar 30-40 minutos tras la colocación de la aguja heparinizada o catéter, antes de la extracción sanguínea.

Por este mismo motivo, si existen dudas, es aconsejable realizar más de una determinación de PRL antes de dar un diagnóstico definitivo de hiperprolactinemia, para disminuir al máximo el número de falsos positivos.

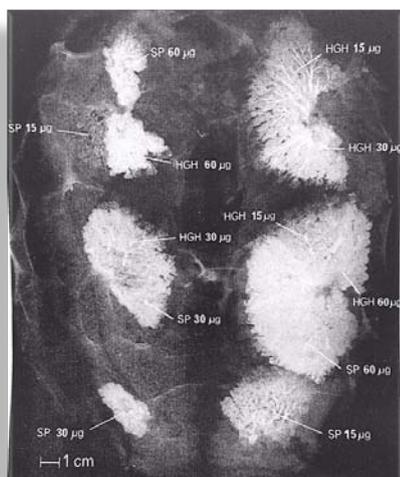
1.4.2. Métodos de medida

Los primeros métodos de medida de la PRL se basaban en la evaluación de la respuesta que inducían en órganos o tejidos supuestamente sensibles a la PRL, midiendo cambios histológicos, bioquímicos o la capacidad de secreción láctea. Como puede suponerse, a pesar de los esfuerzos realizados para disminuir la variabilidad inter e intra-ensayo, la sensibilidad y precisión de estos métodos eran muy bajas.

La actividad lactogénica en un líquido biológico y específicamente en el suero, se medía desde 1933 con el método del buche de paloma (93). Se trataba de inyectar “in vivo” la sustancia problema (suero, otros líquidos corporales) en concentraciones distintas y observar los cambios histológicos que se producían en la mucosa epitelial del buche. No hace falta decir que la especificidad era prácticamente nula, teniendo en cuenta el carácter lactogénico de la GH que contaminaba todas las muestras testadas.

En las etapas finales de este tipo de determinaciones se diseñaron sistemas semi automatizados que minimizaban estos inconvenientes dando resultados de reproductibilidad y precisión aceptables. Sin embargo precisaban una inversión de tiempo importante y una habilidad considerable.

Otra forma de bioensayo era la valoración de la respuesta “in vivo” o “in vitro” del tejido mamario de ratones en el periodo intermedio del embarazo o bien en conejos con “pseudo-preñez”. La precisión de estos métodos alternativos dejaban también mucho que desear (94).



□ **Figura 7:** Disección de glándulas mamarias en conejos pseudo-gestantes, mostrando la diferente respuesta lactogénica en función de los sectores de la glándula mamaria que habían recibido previamente inyecciones de PRL de oveja o de Hormona de Crecimiento Humano.

Fotografía: Cortesía de Dra. Isabel A Forsyth (120).

Sin duda el paso decisivo en la incorporación de la PRL a la clínica fue el desarrollo de métodos inmunológicos. La reacción antígeno- anticuerpo constituye una forma muy específica de identificar la presencia, en un medio determinado, del antígeno problema. Por ello cualquier molécula hormonal capaz de despertar respuesta inmunológica en el animal de investigación, puede ser detectada por este tipo de determinaciones.

La base de los métodos inmunológicos es la competición que se establece en un medio determinado, entre una cantidad indeterminada contenida en un medio problema y una cantidad fija de la misma sustancia marcada para ocupar una cantidad fija de anticuerpo. Por tanto necesitamos que uno de los elementos que se aportan de forma fija esté marcado, para poder cuantificar el porcentaje que se ha desplazado por la presencia del antígeno en el medio problema.

En una primera etapa, en 1971, los sistemas eran desarrollados por los laboratorios a partir del material disponible para construir una curva patrón y con los anticuerpos dirigidos a animales fácilmente inmunógenos, como la oveja y el conejo.

El primer radio-inmuno-ensayo de PRL se construyó marcando con I-131 la PRL aislada por Lewis (95), que se enfrentaba a una solución con distintas concentraciones de un "pool" de sueros de madres lactantes, con niveles supuestamente elevados de PRL, compitiendo con un anticuerpo de conejo, generando contra la misma PRL de Lewis que les había sido inyectada. Era un sistema competitivo en medio líquido, es decir, las dos PRLs, la marcada y la contenida en el "pool" de suero, competían por el receptor en función de la concentración de las distintas diluciones. Después de una primera incubación se procedía a la adición de un segundo anticuerpo (ratón anti inmunoglobulina de conejo), se incubaba durante 12 horas y se centrifugaba decantando el sobrenadante y contando en un detector "ad hoc" la radioactividad restante en el precipitado, que sería mayor cuanto menor fuera la cantidad de hormona problema en el suero.

Estos métodos de gran sensibilidad, especificidad y precisión tenían el inconveniente de la utilización de radio-isótopos que exigía de los laboratorios la disponibilidad de "cámaras frías" en las que realizar todas las manipulaciones de marcaje de cada hormona que se deseara medir. Por ello se desarrollaron métodos que aplicaban marcadores no isotópicos, como los enzimas, marcadores quimioluminiscentes, electroluminiscentes o fluorescentes. Sin embargo, el desarrollo de anticuerpos específicos y estandarización de la técnica fue lento debido sobre todo a la alta reactividad cruzada de los anticuerpos utilizados y a la dificultad de purificación de PRL humana para calibración (96).

Una vez solucionados estos problemas, comenzaron a aparecer los primeros inmunoanálisis competitivos que permitían la medida de PRL en plasma (95) por sus buenas prestaciones analíticas. Estos inmunoanálisis fueron rápidamente validados por diferentes firmas comerciales con variaciones de procedimiento sobre todo en la etapa de separación de los complejos antígeno-anticuerpo de las fracciones libres de antígeno y anticuerpo. Además, con ello se pudieron automatizar los sistemas de detección y acortar los tiempos de incubación.

No obstante, el rendimiento de los diferentes procedimientos varía de uno a otro (97), por lo que para la elección de un determinado inmunoanálisis competitivo se deberían tener en cuenta los siguientes aspectos: 1) reactivos de origen humano; 2) intervalo analítico lineal al menos entre 100 y 4250 mUI/L, 3) ausencia de reactividad cruzada significativa con la hormona del crecimiento y 4) imprecisiones interseriales <15% (96).

Más recientemente, la aparición de inmunoanálisis no competitivos ha desplazado casi completamente a los inmunoanálisis competitivos del laboratorio clínico debido a que presentan límites de detección más bajos (4-20 mUI/L), menor imprecisión analítica y mayor especificidad (98).

Como se ha comentado anteriormente (98), la PRL presenta una gran heterogeneidad de formas moleculares en el suero humano. Este hecho provoca una fluctuación importante en el resultado de las medidas de PRL cuando se utilizan inmunoanálisis diferentes, ya que no todos los anticuerpos reconocen de igual modo las variantes de PRL. Para solucionar este problema, todos los procedimientos deben calibrarse con materiales de referencia.

Además, con ello se pudieron automatizar los sistemas de detección y acortar los tiempos de incubación.

Los estudios presentados en esta tesis se han realizado con un sistema de quimoluminiscencia Inmulite.

Este sistema ofrece determinaciones rápidas, sensibles y precisas en intervalos cortos de tiempo y de forma completamente automatizada.

2. MOTIVACIÓN

La PRL es una hormona que podríamos considerar como “atípica” al compararla con otras moléculas liberadas por la hipófisis anterior. A diferencia del resto de hormonas hipofisarias, no necesita que una molécula específica de origen hipotalámico acceda a su receptor hipofisario para estimular su síntesis y liberación al torrente circulatorio. En su caso, diferentes sustancias, tanto de origen central como periférico (TSH, oxitocina, estradiol, etc...), mantienen un tono positivo continuo que en situación basal genera una hiperproducción mantenida. Incluso en condiciones aisladas, como puede ser en explantes obtenidos de hipófisis fetal como en células dispersas en medios de cultivo, las células lactotropas continúan segregando PRL mientras las condiciones de cultivo mantienen su viabilidad. Por lo tanto, para que sus concentraciones permanezcan dentro de la normalidad, requiere también estar tónicamente inhibida por la dopamina de origen hipotalámico.

Otro aspecto destacable y diferencial es que su acción fisiológica se ejerce en condiciones de hiperproducción, ya sea la gestación o el puerperio, y que las situaciones de privación apenas se acompañan de sintomatología perceptible. Al existir un gran paralelismo entre valores de PRL y sus efectos periféricos, principalmente disovulación y anovulación y/o galactorrea, aquellas situaciones en las que esta relación se pierde, resultan de gran interés. Este es el caso de las pacientes con hiperPRL con predominio de macroPRL, en las que la discrepancia entre las concentraciones periféricas de PRL determinadas por inmunoensayo y la clínica, son notorias. Estas pacientes constituyen un porcentaje importante de casos del grupo genérico de hiperprolactinemias (en algunas series hasta un 40%).

La justificación que motiva la realización de esta tesis se sostiene en las dudas sobre la epidemiología y acción bioquímica de la macroPRL, así como sus diferencias con la PRL monomérica y específicamente su origen estructural, en la disyuntiva entre la posibilidad de que sea segregada en macroagregados por la célula lactotropa o estos agregados se creen “a posteriori” en el torrente circulatorio.

Dado que la incidencia de macroPRL depende de muchos factores los estudios observacionales poblacionales permiten conocer con mayor exactitud la incidencia en cada población y confirmar que se mantienen los parámetros de presentación clínica

descritos en la literatura. Por ello, consideramos importante estudiar en primer lugar la prevalencia de macroPRL en nuestra población y determinar su implicación clínica en nuestras pacientes.

En un estudio previo (99) y con el objetivo de conocer si la presencia de macroPRL en mujeres sanas era un fenómeno transitorio o persistente se valoraron muestras sucesivas en 25 mujeres identificadas como portadoras de macroPRL. El periodo de seguimiento fue de 15 a 60 meses (media de 40 meses). El número de sueros analizados en los 25 pacientes fue de 126, con un promedio de 5 por paciente (entre 3 y 15). En la Fig. 8 se representan las concentraciones de PRL total observadas en cada paciente durante el seguimiento. En todos los sueros, las recuperaciones de PRL fueron inferiores al 70% (10 – 69%) (Fig. 9) y la variabilidad interserial de las proporciones de macroPRL entre especímenes de los mismos pacientes se situó entre el 1,1 y el 23% (sólo en 6 superior al 15%) (Fig. 10).

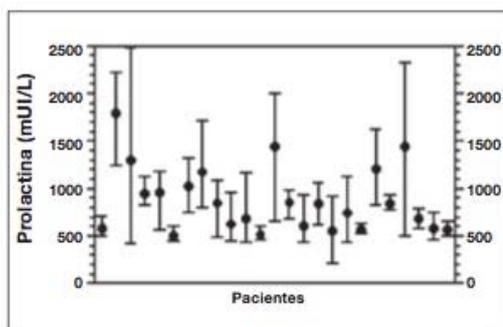


Figura 8. Concentraciones de PRL total en los sueros de 25 pacientes con macroprolactinemia, durante un período de seguimiento de 15 a 60 meses.

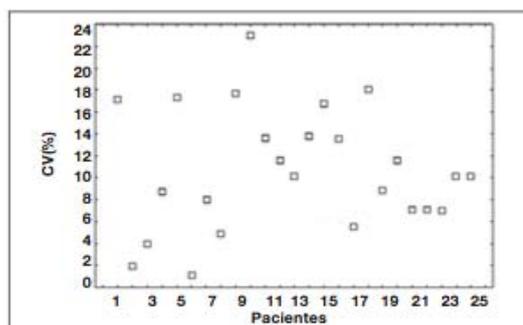


Figura 9. Variabilidad de las proporciones de macroPRL observadas en cada uno de los 25 pacientes con macroprolactinemia durante un período de seguimiento de 15 a 60 meses.

Durante el periodo de seguimiento, en ninguno de los pacientes se observaron cambios en las recuperaciones de PRL que implicaran modificaciones en su clasificación como portadores de maPRL, ya que en ningún caso aquellas fueron superiores al 75%.

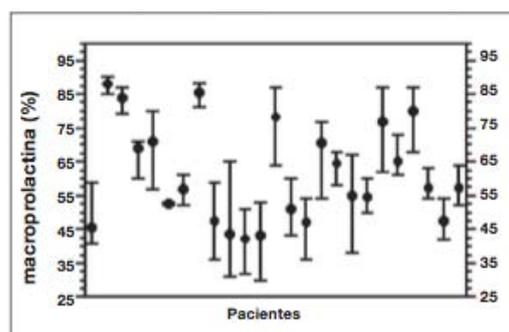


Figura 10. Proporciones de macroPRL precipitada con PEG 6000 en suero de 25 pacientes con macroprolactinemia durante un período de seguimiento de 15 a 60 meses.

Hay importantes lagunas de conocimiento en la farmacocinética de la macroprolactinemia, por lo que también quisimos abordar el estudio de la macroPRL desde un punto de vista fisiopatológico. Se sabe con certeza que la PRL ejerce autocontrol de su propia secreción, gracias al mecanismo de retroalimentación positiva que mantiene con el hipotálamo. Al aumentar los niveles circulantes de PRL y acceder al hipotálamo, se estimula la secreción de dopamina, que por vía porto hipofisaria, accede a

la adenohipófosis, uniéndose a su receptor en la célula lactotropa e inhibiendo a síntesis y liberación de PRL, restableciéndose así la situación de equilibrio.

Sin embargo en las pacientes con hiperPRL por macroprolactinemia, si los macrocomplejos no pudieran acceder al hipotálamo al estar confinados al torrente sanguíneo, su sistema de retroalimentación no debería estar activado. Por lo tanto, en estos casos, la producción de dopamina hipotálica y la pituitaria de PRL deberían ser similares a las de mujeres con concentraciones de PRL dentro de la normalidad.

La escasez de estudios que hayan tratado de probar la integridad del eje hipotálamo-hipofisario en pacientes con macroprolactinemia motivó la segunda parte de este trabajo. Se trata de un estudio dinámico, en el que se pretende estimular la liberación de PRL mediante la administración de un antidopaminérgico, y posteriormente detectar las concentraciones de PRL y macroPRL en tres grupos de pacientes: 1) mujeres sin hiperPRL, 2) con hiperPRL monomérica y 3) con predominio de macroPRL. Se comparará la cinética de formación de la PRL y macroPRL entre estos tres grupos con la intención de entender mejor sus diferencias y aportar información a la teoría de que los macroagregados de PRL no se secretan como tal, sino que se forman posteriormente en el torrente sanguíneo.

Finalmente esperamos que los resultados obtenidos en su conjunto aporten información relevante de la epidemiología y fisiopatología de la macroprolactinemia, con la finalidad de poder trasladar esta información a la práctica clínica.

3. OBJETIVOS

A) Evaluar en nuestra población, las diferencias entre las pacientes con hiperPRL monomérica y macroprolactemia, en relación a:

- Factores etiológicos.
- Relación con la patología tumoral hipofisaria.
- Sintomatología clínica.
- Concentraciones totales y posPEG de PRL.
- Frecuencia de asociación a patología autoinmune.

B) Profundizar en el conocimiento del eje hipotálamo hipofisario (respuesta hipofisaria) en las mujeres con predominio de macroPRL y evidenciar las probables diferencias con las pacientes con hiperPRL con predominio de PRL monomérica, en cuanto a la cinética de producción y secreción de la PRL; hecho que confirmaría que estamos ante dos entidades diferentes.

- Objetivar dinámica de producción de los complejos de macroPRL.
- Observar si se producen cambios en el porcentaje de PRL unida inmunocomplejos en relación a la producción de PRL.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se ha sugerido que la macroprolactinemia debería considerarse como una variante “benigna” de la hiperPRL (71).

Los datos actuales de la literatura (46) presentan evidencias de que las pacientes con predominio de macroPRL no presentan generalmente patología hipofisaria tumoral y la sintomatología es de menor intensidad o inexistente, cuando se comparan con pacientes con valores similares de PRL. Nuestra hipótesis de trabajo es demostrar que en nuestra población se detectan las mismas diferencias etiológicas y clínicas descritas en la literatura en las pacientes con hiperPRL en función del predominio de PRL monomérica o macroPRL.

En segundo lugar, existen dudas respecto al origen de la macroprolactinemia, si sería en la hipófisis como macroagregados de moléculas de PRL unidas entre sí, o el resultado de un fenómeno extrapituitario en el que anticuerpos del tipo IgG al no reconocer como tales a las moléculas de PRL, las captarían dando lugar a macrocomplejos. Si como señalan la mayoría de autores, ésta última fuera la opción más factible, deberíamos apreciar un desfase entre el incremento de la PRL monomérica de origen hipofisario y la de macrocomplejos que se producirían posteriormente, una vez que la PRL hubiera sido secretada al torrente circulatorio.

5. DISEÑO/METODOLOGÍA

5.1. ESTUDIO OBSERVACIONAL

5.1.1. Selección de pacientes

Estudio observacional y prospectivo de cohorte llevado a cabo durante 5 años en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

Se incluyeron en el estudio de forma consecutiva y según el orden cronológico en el que fueron atendidas en nuestro departamento, a todas aquellas pacientes diagnosticadas de hiperPRL que consultaban al Servicio de Ginecología por alguno de los siguientes motivos:

Sintomatología atribuible a hiperPRL.

Estudio de esterilidad. Todas las pacientes estériles son sometidas de forma rutinaria a una determinación de PRL, independientemente de la presencia o no de sintomatología atribuible a esta hormona.

Las pacientes eran visitadas por alguno de los dos especialistas de la Unidad de Endocrinología Ginecológica, y en esta parte del estudio no se interfería en el proceso asistencial llevado a cabo por el médico responsable de cada caso.

5.1.2. Tamaño muestral

El tamaño de la muestra se planteó para conseguir un mínimo de 100 casos, lo que comportaría una potencia suficiente para responder a las hipótesis que motivaron el estudio. Para conseguir este tamaño muestral se decidió incluir a todas las pacientes que acudían al Servicio de Ginecología por hiperPRL de forma cronológica y según orden de llegada, durante 3 años. La necesidad de contar con pacientes en situación basal, sin tratamiento y con una historia médica muy detallada, dificultó el reclutamiento de pacientes, lo que comportó que el estudio se ampliase a 5 años.

5.1.3. Recogida de datos

Se revisó la historia médica de las pacientes, especialmente enfocada a detectar sintomatología atribuible a hiperPRL así como la posible etiología de la misma. También

se procedió a la determinación de PRL y de macroPRL en condiciones basales, es decir, sin que hubiesen recibido tratamiento dopaminérgico, como mínimo un mes previo.

La información se recogió preservando el anonimato de las pacientes, a las que se asignó un número aleatorio en la base de datos, considerándose por tanto, innecesario disponer de consentimiento informado específico en esta parte del estudio.

5.1.3.1. Datos de anamnesis dirigida:

- Edad.
- Peso, altura e índice de masa corporal (IMC= Peso en Kg/altura² en metros).
- Historial reproductivo.
- En caso de esterilidad, causa de la misma.
- Antecedentes patológicos, especialmente aquellos relacionados con posibles alteraciones inmunológicas y/o patología de pared torácica previa.
- Sintomatología relacionada con la hiperPRL: alteraciones menstruales y galactorrea (tanto espontánea como a la expresión).
- Patología asociada, especialmente autoinmune.
- Tratamientos médicos administrados en el momento de la consulta y durante los 30 últimos días, que podrían haber influido en los resultados analíticos.
- En caso de haber realizado tratamiento dopaminérgico:
 - Tipo de tratamiento recibido (cabergolina o quinagolida).
 - Dosis del mismo (mg/semana).
 - Duración del tratamiento instaurado y continuidad del mismo.
 - Intolerancia o resistencia al tratamiento (especificando tipo de efectos secundarios).

5.1.3.2. Datos de exploraciones complementarias realizadas:

- Determinación de PRL.
- En todos los casos se realizó una determinación basal de PRL total.

- Las muestras se recogieron en el Servicio de extracciones del hospital de Sant Pau, siguiendo las instrucciones para la correcta determinación de PRL: realizar la extracción un mínimo de 2 horas después de despertarse, en ayunas, sin previa exploración mamaria y evitando al máximo el estrés de la propia extracción. En pacientes con antecedentes de lipotimia durante venopunción se esperó 30-40 minutos tras la colocación de la aguja.
- El estudio posterior de las muestras se realizó en el Departamento de Bioquímica del Hospital. Las técnicas empleadas se describen mas adelante en esta misma sección: en el apartado 5.3: Determinaciones de laboratorio.
- Niveles basales de gonadotropinas: Se determinaron la LH y FSH en los casos de alteraciones menstruales.
- Estudio de región hipofisaria mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

5.2. ESTUDIO DINÁMICO

5.2.1. Selección de pacientes

Fueron incluidas prospectivamente mujeres en edad reproductiva que acudieron al Departamento de Ginecología y Obstetricia y del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

Las mujeres fueron asignadas a algunos de los siguientes tres grupos:

- Grupo control: si las concentraciones basales de PRL se encontraban dentro del rango de la normalidad.
- Grupo de hiperPRL monomérica: pacientes con PRL basal elevada con predominio de las formas monoméricas.
- Grupo de macroprolactinemia: pacientes con hiperPRL con predominio de macroPRL.

Para esta parte del estudio se excluyeron los casos de hiperPRL secundaria o asociada a: fármacos, insuficiencia renal o hepática grave, hipotiroidismo primario, síndrome de ovario poliquístico y lesiones de la pared torácica. También se excluyeron las pacientes que estuvieran en tratamiento con agonistas dopaminérgicos en los últimos tres meses previos al inicio del estudio.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética y Ensayos Clínicos del hospital (Código G10 1E2000HSP). Se siguieron las pautas de la buena práctica clínica de acuerdo a las normas éticas vigentes (Declaración de Helsinki). Antes de ser incluidas se informó a todas las participantes de los objetivos del estudio y se obtuvo el consentimiento informado por escrito. Se entregó una hoja informativa describiendo el fundamento del estudio la naturaleza voluntaria de su participación y confidencialidad de los datos, así como los beneficios y riesgos de participar y el derecho a retirarse del estudio en cualquier momento, si lo juzgaba conveniente.

5.2.2. Estudio muestral

Se planteó la inclusión de un mínimo de 7 pacientes por grupo, siendo en estudios de cinética una muestra suficiente para comparar los patrones de secreción hipofisario entre ambos grupos. Se incluyó un grupo control.

5.2.3. Recogida de datos

La prueba se llevó a cabo entre el segundo y el sexto día del ciclo en mujeres con ciclos menstruales regulares.

Todos los sujetos acudieron las 8 horas A.M., momento en que se colocó un catéter endovenoso.

A las 10 A.M., se administró en 10 mg de metoclopramida por vía intravenosa en perfusión lenta (Primperan®). A continuación, se realizó la obtención de 6 muestras seriadas de 10 ml de sangre venosa periférica a los 0, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos para la determinación de la PRL antes y después la precipitación con PEG en cada uno de las muestras. La sangre fue extraída en tubos de vacío conteniendo citrato de sodio y ácido etildiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulantes. Suero y células fueron separados

mediante centrifugación siendo el primero almacenado a -20°C para su uso y procesamiento posterior.

5.3. DETERMINACIONES DE LABORATORIO

5.3.1. Inmunoanálisis de PRL

La determinación de PRL se realizó mediante enzimoanálisis quimioluminométrico automatizado (Immulin 2000®, Diagnostic Products Corp., Los Ángeles, CA, EEUU).

Se trata de un sistema automatizado que los tubos tiene en su interior una esfera de poliestireno que está cubierta con un anticuerpo monoclonal dirigido contra epitopos constantes de la molécula de PRL.

El suero problema se mezcla, en la fase líquida, con un anticuerpo policlonal y la solución de fosfatasa alcalina se incuban a 37º durante 50 minutos. Finalizada esta etapa los tubos se liberan de todo el contenido líquido por un sistema de centrifugado quedando únicamente adherido sobre la esfera el material fijado al anticuerpo y con la luminiscencia generada por la peroxidasa, que es leída por un lector óptico adecuado.

El sistema está calibrado frente al tercer estándar internacional 85/500, con un límite de detección de 3,4 mUI/L. Los coeficientes de variación intraseriales eran de 2,2 y 3,6% e interseriales entre 5,1% y 8,8% para concentraciones entre 270 y 970 mUI/L. El intervalo de trabajo del método fue 3,4 a 3.180 mUI / L. Sin modificar ni manipular las condiciones experimentales del ensayo aprobado comercialmente.

El inmunoanálisis de PRL se realizó en suero total, en las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel y en el sobrenadante de los precipitados con PEG 6000.

5.3.2. Precipitación con polietilenglicol 6000

El polietilenglicol 6000 (PEG 6000) es un polímero utilizado para la precipitación de moléculas de alto peso molecular según un mecanismo de exclusión estérica (100,98).

Sirviéndonos de esta característica, se ha utilizado para separar del suero de las pacientes con hiperPRL la fracción correspondiente a macroPRL (ma-PRL).

La precipitación con PEG (PEG 6000, Merk-Schuchardt, Hohenbrunn, Alemania) se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Hattori y cols (101): a 200 μ L de suero se añadieron 200 mL de PEG a una concentración de 250 g/L en agua desionizada. Después de agitar en vórtex, se centrifugó la mezcla a 1500xg durante 30 minutos a 4°C y en el sobrenadante se midió la concentración de PRL que, una vez corregida para el factor de dilución, fue asignada a PRL monomérica.

La reproducibilidad de la técnica de medida de PRL tras la precipitación con PEG había sido previamente evaluada con muestras de suero de concentración diferente, analizadas 6 veces cada una, en diferentes días y series analíticas (99). Las recuperaciones de PRL tras la precipitación con PEG fueron del 112% para muestras de 555 mIU/L, 108% para 1106 mIU/L, del 111% para 2073 mIU/L y 102% para 3643 mIU/L, y sus imprecisiones del 10%, 7%, 8% y 8%, respectivamente.

La validez de la técnica de precipitación con PEG para detectar la presencia de macroPRL en el suero se comprobó con una técnica cromatográfica de filtración en gel descrita por Bjoro y cols (102) y que se detalla a continuación: Se utilizó una columna de Superosa 12[®] acoplada a un sistema cromatográfico (FPLC[®], Pharmacia, Uppsala, Suecia), usando como tampón de elución Tris 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 1,23 mM, MgCl₂ 0,5 mM a pH 7,4. Muestras y calibradores se eluyeron a 0,5 mL/min. La columna se calibró con diversas proteínas de diferente masa molecular [ribonucleasa A (17,3 KDa), quimotripsinógeno (25 KDa), ovoalbúmina (43 KDa), albúmina bovina (67 KDa), aldolasa (158 KDa), catalasa (232 KDa) y transferrina (440 KDa)], dentro de los intervalos de masa molecular de la mo-PRL (23 KDa) y la ma-PRL (150-170 KDa). Para cada una de estas proteínas se determinó el perfil de elución a una absorbancia de 280 nm. Tras la inyección 2 mg de cada una de las proteínas indicadas, se obtuvieron los volúmenes de elución siguientes (media \pm DE):

- Ribonucleasa A (13,7 kDa): 15,2 \pm 0,2 mL
- Quimotripsinógeno (25 kDa): 14,7 \pm 0,2 mL
- Ovoalbúmina (43 kDa) : 12,2 \pm 0,4 mL
- Albúmina bovina (67 kDa): 11,3 \pm 0,3 mL
- Aldolasa (158 kDa): 10,9 \pm 0,2 mL

- Catalasa (232 kDa): $10,4 \pm 0,4$ mL
- Ferritina (440 kDa): $10,2 \pm 0,4$ mL

La separación de formas de PRL de diferente masa molecular en los sueros de los pacientes se realizó inyectando 1 mL de suero total y recogiendo fracciones de 1 mL. En cada una de estas fracciones se midió la concentración de PRL y se consideró la presencia de macroprolactinemia cuando su proporción determinada por cálculo del área bajo la curva fue >25% del total de PRL eluida. Los sueros con proporción <25% se consideraron negativos para macroprolactinemia. Este valor discriminante se estableció para obviar el error en la medida de PRL en las fracciones eluidas, teniendo en cuenta además que la proporción de mo-PRL en la mayoría de individuos es >85%.

El uso de cromatografía de filtración en gel tuvo por objeto: 1) confirmar la validez de la técnica de precipitación con PEG 6000 para detectar ma-PRL, y 2) establecer un límite de decisión indicativo de la presencia de ma-PRL para la proporción determinada mediante la técnica de precipitación con PEG 6000 (103).

La concentración de PRL total se midió en mili unidades internacionales por litro (mUI/l) y los valores de referencia para PRL están establecidos entre 70 y 424 mUI/l.

La PRL monomérica, es decir la PRL recuperada después de añadir PEG (PRL-postPEG), se midió con los mismos valores (mUI/l), y la proporción de macroPRL se estimó a partir de la concentración de PRL total y PRLpostPEG con la siguiente fórmula:

$$\square \quad (\text{PRLpostPEG}) [100 \times (\text{PRL total} - \text{PRLpostPEG}) / \text{PRL total}]$$

El porcentaje de recuperación (%R) se define como: $100 \times \text{PRLpostPEG} / \text{PRL total}$, y se consideró macroprolactinemia cuando el porcentaje de macroPRL superaba el 60%.

5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.4.1. Estudio observacional

La descripción de las variables ha consistido en la media aritmética, así como el rango, para las variables cuantitativas. En las variables categóricas, se ha facilitado el porcentaje (frecuencia relativa) y el número de casos (frecuencia absoluta).

Las comparaciones (estadística inferencial) de variables cuantitativas, se han realizado mediante test de "t" para datos independientes. En las variables categóricas, descripción mediante tablas de contingencia e inferencia mediante test de chi-cuadrado o test exacto de Fisher, según fuera el contenido de las celdas.

En todos los casos el nivel de significación ha sido el usual del 5% ($\alpha=0,05$) aproximación bilateral.

Toso el análisis se realizó con el paquete estadístico IBM-SPSS (versión 22.0) (SPSS Inc.Chicago, IL).

5.4.2. Estudio dinámico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico IBM-SPSS (versión 22.0) (SPSS Inc., Chicago, IL).

Para el estudio de la evolución de los valores de las curvas se ha empleado un análisis de la varianza de dos factores, uno de ellos de medidas repetidas (evolución) y el otro de medidas independientes (grupo). Con ésta aproximación se obtendrán tres significaciones, una para cada factor de forma independiente así como significación de la interacción de ambos (tratamiento x tiempo), que nos indicará si la evolución a lo largo del tiempo ha sido diferente según sea el grupo. Para evitar algún problema de esfericidad (correlaciones entre las variables a largo tiempo) utilizamos la corrección de Greenhouse-Geisser.

Para comparar el efecto neto de la administración de metoclopramida sobre la producción y secreción de PRL, a cada punto de la curva se le resto el valor basal, calculándose posteriormente el área bajo la curva (AUC) mediante el método trapezoidal.

Así mismo se determinó el valor máximo (C_{max}) a partir de los puntos de tiempos/concentraciones y el tiempo en que dicho valor de C_{max} se producía, que sería el T_{max}, para cada caso de forma individual. La comparación de los valores de T_{max} se ha llevado a cabo mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (comparación de los tres grupos) y a continuación las correspondientes dos a dos, mediante test de Mann-Whitney.

En todos los casos se asumieron como significativos los valores de “p” < 0,05 aproximación bilateral.

6. RESULTADOS

6.1. ESTUDIO OBSERVACIONAL

Se incluyeron en el estudio 139 pacientes con hiperPRL, de las cuales 106 presentaban una hiperPRL a expensas de PRL monomérica y 33 hiperPRL secundaria a macroprolactinemia, lo que corresponde a una incidencia de macroprolactinemia del 23,74%.

6.1.1. Características antropométricas:

No se apreciaron diferencias significativas entre las pacientes con hiperPRL-mono y las HiperPRL-macro en relación a la edad (35,4 años y rango 19-59 vs 33,7 años, y rango: 19-53) ni en relación al IMC (25,4 kg/m² y rango 18 -39 vs 23,5 kg/m² y rango 17-33) (p=ns).

Tampoco se apreciaron diferencias significativas entre ambos grupos en relación al número de gestaciones (el 66% de las hiperPRL-mono eran nulíparas vs el 73 % de las HiperPRL-macro) o abortos. El 15% de las pacientes con hiperPRL-mono habían presentado algún aborto: en 9 casos un solo aborto, en 5 con dos consecutivos, y sólo dos pacientes tenían en su historial 3 abortos. Entre las pacientes con HiperPRL-macro la tasa de abortos era del 12% (p=ns): 3 pacientes tenían historia previa de un solo aborto y tan sólo un caso con 2 abortos previos (Fig. 11).

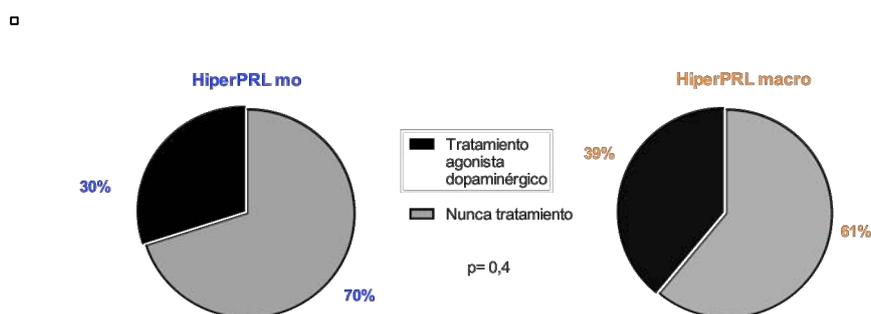
Figura 11.

	HiperPRLmo	HiperPRLmacro	p
Edad (años)	35,4	33,7	ns
IMC	25,4	23,5	ns
Nuliparidad	70 (66,03%)	24 (72,2%)	ns
Abortos:	16 (15,09%)	4 (12,12%)	ns
1	9	3	
2	5	1	
3	2	0	

6.1.2. Tratamiento dopaminérgico previo

La mayoría de las pacientes de ambos grupos no habían recibido tratamiento dopaminérgico previo a la determinación basal de PRL: de las 139 pacientes estudiadas, 74 pacientes con hiperPRL-mono (69,8%) y 20 (60,6%) con HiperPRL-macro. ($p=ns$) (Fig. 12).

Figura 12.



De las 45 pacientes restantes, en un caso no consta si había realizado tratamiento previo, y en las 44 que sí habían recibido tratamiento, todas habían superado un período mínimo de lavado de 1 mes, por lo que la determinación de PRL realizada se consideraba basal.

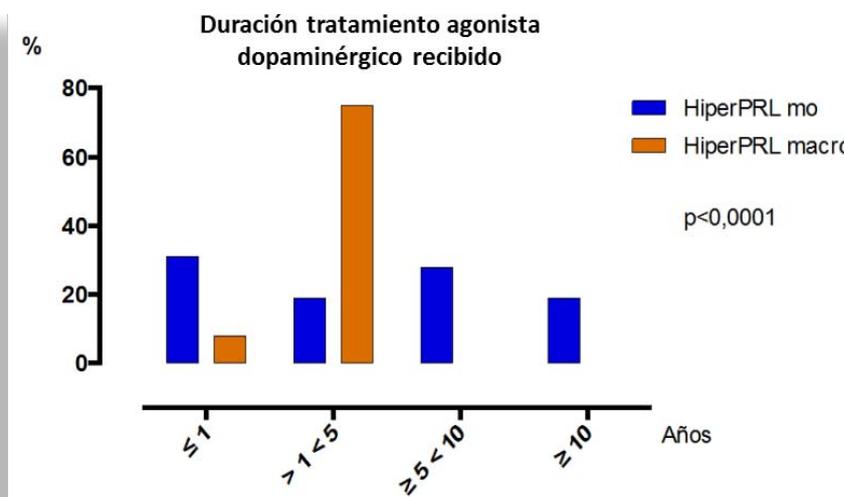
6.1.2.1. Duración del tratamiento (Figs. 13 y 14)

De las 44 mujeres que habían realizado tratamiento, las pacientes con hiperPRL-mono habían recibido medicación una media de 6 años (rango: 2 meses - 20 años), y de 3 años en las HiperPRL-macro (rango: 1 mes a 5 años) ($p=ns$)

Al estratificar los grupos en relación al tiempo observamos como sí que habían diferencias: todas las HiperPRL-macro habían recibido tratamiento 5 años o menos, mientras que de las hiperPRL-mono el 48% llevaban más de 5 años de tratamiento dopaminérgico ($p=0,0001$).

Figura 13. Duración del tratamiento dopaminérgico

	HiperPRLmo (n=32)	HiperPRLmacro (n=12)	p
Media (rango)	6a (2m-20a)	3a (1m-5a)	ns
< = 1 a	10 (31,2%)	1 (8,3%)	0,0001
>1a - 5a	6 (18,7%)	9 (75%)	
> 5 a < 10a	9 (28,1%)	0	
> =10 a	6 (18,7%)	0	
Desconocido	1 (3,12%)	2 (16,6%)	

Figura 14.

6.1.2.2. Tiempo sin tratamiento (Figs. 15 y 16)

En ambos grupos la media de tiempo sin tratamiento fue similar: 2 años en las hiperPRL-mono y 2 años y medio en las HiperPRL-macro. (p=ns)

El 56% de las hiperPRL-mono y el 57% de las HiperPRL-macro hacía 1 año o menos que no recibían tratamiento. En ambos grupos alrededor del 90% hacía menos de 6 años que estaban sin tratamiento. ($p=0,03$).

Figura 15.

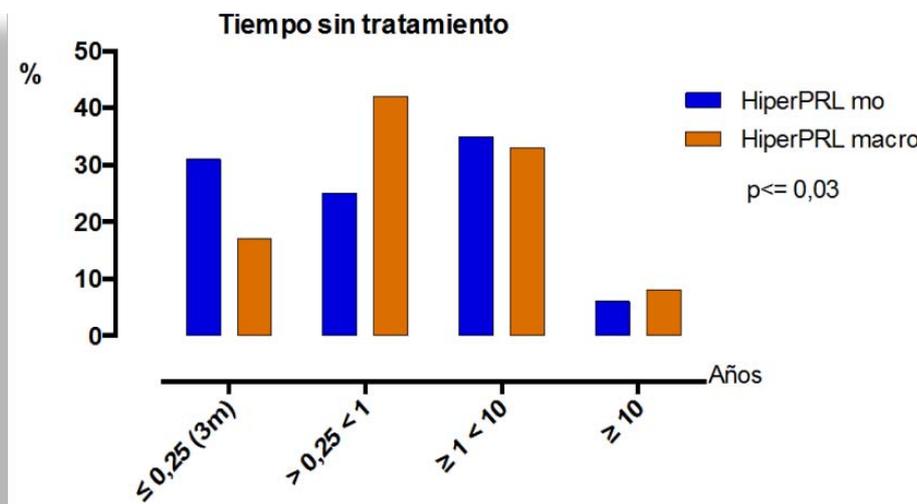


Figura 16.

Tiempo sin tratamiento	HiperPRLmo (n=32)	HiperPRLmacro (n=12)	p
Media (rango)	2 (1m-15a)	2,5 (1m-15a)	ns
>1 ≤ 3 m	10 (31,25%)	2 (16,6%)	0,03
4m – 1a	8 (25%)	5 (41,6%)	
2 -6 a	11 (34,3%)	4 (33,3%)	
≥ 10 a	2 (6,25%)	1 (8,3%)	
Desconocido	1 (3,1%)	0	

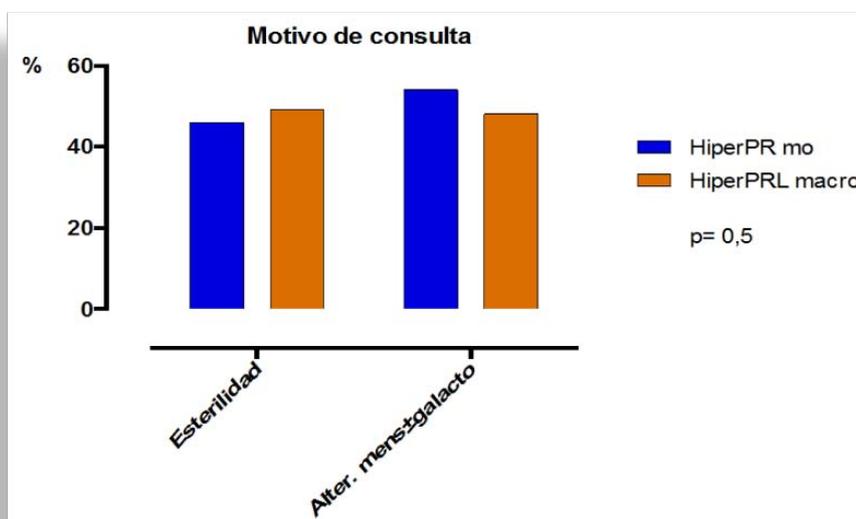
6.1.3. Motivo de consulta

El motivo por el que habían consultado al Servicio de Ginecología de nuestro Hospital era:

- Sintomatología atribuible a hiperPRL un total de 68 pacientes (48,9%): alteraciones menstruales (oligomenorrea o amenorrea) y/o galactorrea.
- Por estudio de esterilidad 64 mujeres (46%). En todas éstas pacientes se realizó una determinación de PRL por protocolo, independientemente de la presencia o no de síntomas.
- 5 pacientes consultaron por hipermenorrea.
- Una paciente consultó por hirsutismo.
- En un caso desconocemos el motivo de consulta inicial (correspondiente al grupo de las macroprolactinemias).

Las pacientes de ambos grupos de hiperPRL eran comparables ($p=ns$) en cuanto al motivo que las había llevado a consultar al Servicio de Ginecología de nuestro Hospital (Fig. 17).

Figura 17.

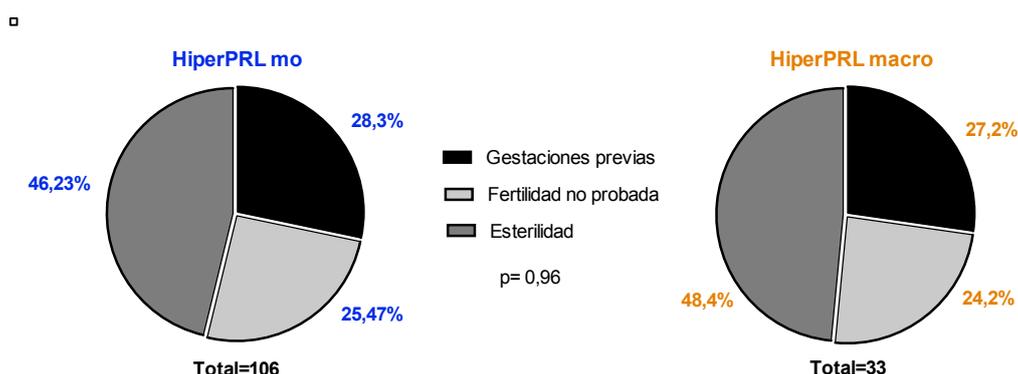


6.1.4. Fertilidad

Del total de pacientes estudiadas, un 46 % tenían un diagnóstico de esterilidad, 28% habían tenido alguna gestación y 25% de los casos se trataba de pacientes que aún no habían probado su fertilidad. Esta distribución se mantenía similar en cada grupo:

Del grupo de las pacientes con hiperPRL-mo, 30 (28,3%) habían tenido alguna gestación, 27 (25,4%) no habían probado su fertilidad y 49 (46,2%) presentaban esterilidad. Estos datos son similares ($p=ns$) a los del grupo de pacientes con HiperPRL-macro entre las cuales habían 9 pacientes (27,2%) con alguna gestación previa, 8 (24,2%) no habían buscado descendencia y 16 (48,4%) no conseguían un embarazo. Datos reflejados en la Fig. 18.

Figura 18.



6.1.4.1. Causas de esterilidad

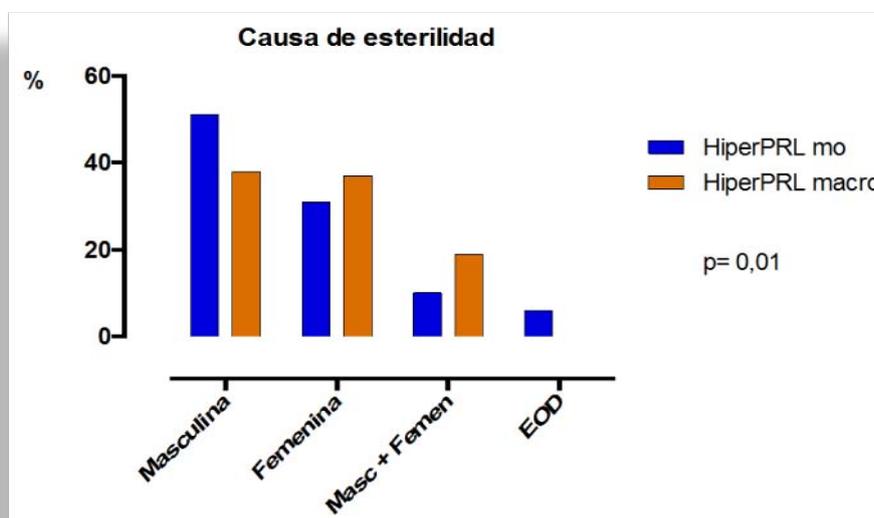
En el grupo de pacientes estériles apreciamos un ligero predominio de las causas masculinas entre la hiperPRL-mo ($p=0,01$) (Fig. 19).

- De las 49 pacientes estériles con hiperPRL-mo y esterilidad 25 (51%) se catalogaron de esterilidad por factor masculino al detectarse una patología seminal como probable causa de la misma. En 20 pacientes (40,8%) se detectó una causa femenina (5 de ellas asociadas a un factor masculino leve) y sólo en 3 (6,1%) no se determinó ninguna causa responsable de la esterilidad y se catalogaron de

esterilidad de origen desconocido o no filiado (EOD). Hay 1 caso del que desconocemos el resultado del estudio de esterilidad.

- De las 16 pacientes estériles y con HiperPRL-macro, los motivos de esterilidad fueron: 6 casos (37,5%) diagnosticados de factor masculino, 9 (56,2%) de causa femenina (3 asociados a factor masculino). Ninguna esterilidad de origen desconocido y una paciente de la que desconocemos el resultado del estudio de esterilidad.

Figura 19.



6.1.4.2. Causas de esterilidad femenina

Al estudiar la posible relación entre la esterilidad de origen femenino y la hiperPRL observamos que en la mayoría de pacientes ya existían otras causas que justificaban por sí mismas la esterilidad, por lo que no se podía atribuir ésta última en exclusiva a la presencia de hiperPRL. Esto ocurrió en ambos grupos:

A. De las 20 pacientes con hiperPRL-mo y esterilidad femenina:

La mayoría, 15 (75%), no presentaban alteraciones menstruales, y la causa principal de su esterilidad era otra:

- 4 casos de patología tubárica (2 hidrosálpinx, 1 oclusión tubárica)

- 7 pacientes con endometriosis
- 1 pacientes con un síndrome adherencial grave
- 1 paciente con patología miomatosa uterina grave
- 2 pacientes con abortos de repetición (más de 2 abortos espontáneos antes de las 20 semanas)

Las 5 pacientes restantes presentaban alteraciones menstruales siendo éstas probablemente la principal causa de su esterilidad. La etiología de este trastorno menstrual era diferente en cada caso:

- Un caso de amenorrea secundaria a un fallo ovárico prematuro (FOP).
- 3 amenorreas en pacientes con hiperPRL tumoral: 2 macroadenomas y un microadenoma (cuyo patrón menstrual se normalizó al descender los valores de PRL con tratamiento dopaminérgico, consiguiéndose entonces una gestación).
- Una paciente con amenorrea e hiperPRL idiopática (RMN normal), la alteración menstrual se corrigió al normalizar los valores de PRL con tratamiento dopaminérgico (no había conseguido gestación en el momento de cerrar el estudio).

Así pues, la mayoría de las pacientes estériles con hiperPRL-mo (16 mujeres, un 80%) presentaban otra causa diferente a la hiperPRL, que por si misma ya era causa de esterilidad.

B. De las 9 pacientes estériles con macroprolactinemia:

En 7 casos el motivo principal de la esterilidad femenina se atribuyó a otra causa a parte de la hiperPRL:

- 4 casos de patología tubárica
- 2 amenorreas por un FOP
- 1 oligomenorrea en el contexto de un SOPQ

Un caso presentaba 2 abortos espontáneos sin alteraciones menstruales ni otra patología excepto la hiperPRL.

Sólo una de las pacientes presentaba una ataxia menstrual sin otra posible etiología reconocible más que la hiperPRL. La RMN había sido normal, por lo que se catalogó de hiperPRL idiopática y al iniciar tratamiento dopaminérgico, se normalizó tanto clínica como analíticamente, obteniéndose entonces una gestación.

Entre las hiperPRL-macro también la mayoría de las mujeres con esterilidad femenina tenían otra causa que por si misma justificaba la esterilidad: 8 pacientes (88,8%).

6.1.5. Pruebas de imagen hipofisaria

Se realizaron 87 pruebas de imagen de la región hipofisaria en las 139 pacientes incluidas en el estudio. Se detectó patología en 46 pacientes (53%): 32 microadenomas (36,8%), 6 macroadenomas (6,9%), 8 síndromes de silla turca vacía (SSTV) (9,2%).

La distribución en función del tipo de hiperPRL fue la siguiente: (Fig. 20).

De las 59 RMN realizadas a pacientes con hiperPRL monoméricas se detectó patología hipofisaria en 40 pacientes (el 68% de las hiperPRL monoméricas a las que se realizó RMN): 27 microadenomas, 6 macroadenomas, 7 SSTV. En las macroprolactinemias se realizaron 28 RMN, que mostraron 5 casos de microprolactinoma, un SSTV y ningún prolactinoma.

Figura 20.

Resultados RMN	Total	HiperPRLmo	HiperPRLmacro	p
RMN realizadas	87	59	28	
Normal	41 (47,1%)	19 (32,2%)	22 (78,5%)	0,0001
Patología hipofisaria	46 (52,8%)	40 (67,7%)	6 (21,4%)	
Microadenoma	32 (36,7%)	27 (45,7%)	5 (17,8%)	
Macroadenoma	6 (6,8%)	6 (10,1%)	0	
SSTV (*)	8 (9,1%)	7 (11,8%)	1 (3,5%)	

Más del 50% de las RMN realizadas en pacientes con hiperPRL-monomérica mostraban alteraciones hipofisarias en forma de macro o microprolactinoma o bien SSTV, a diferencia de la mayoría (78,5%) de las RMN realizadas en pacientes con hiperPRL por macroPRL, que eran normales ($p < 0,001$). La proporción de RMN patológicas fue inferior en las macroprolactinemias y la presencia de macroprolactinomas exclusiva de las hiperPRL monoméricas, aunque no eran diferencias significativas (0,57). (Figs. 21 y 22).

Figura 21.

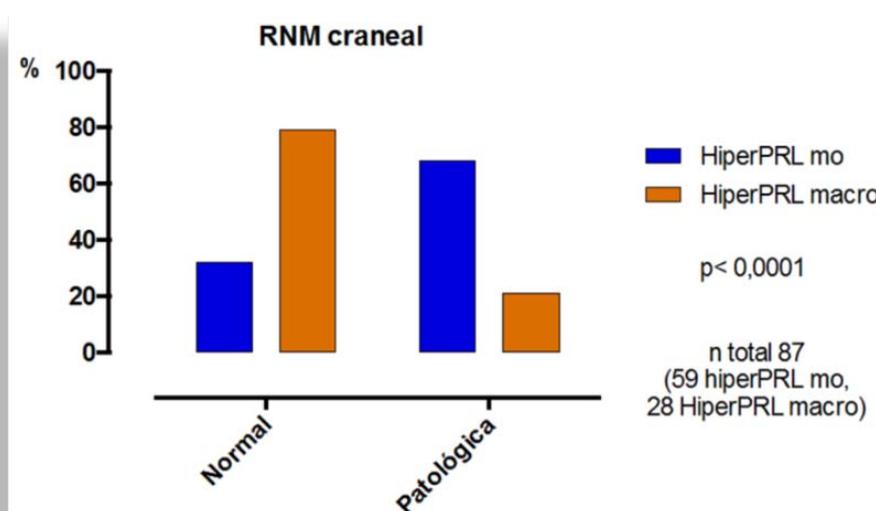
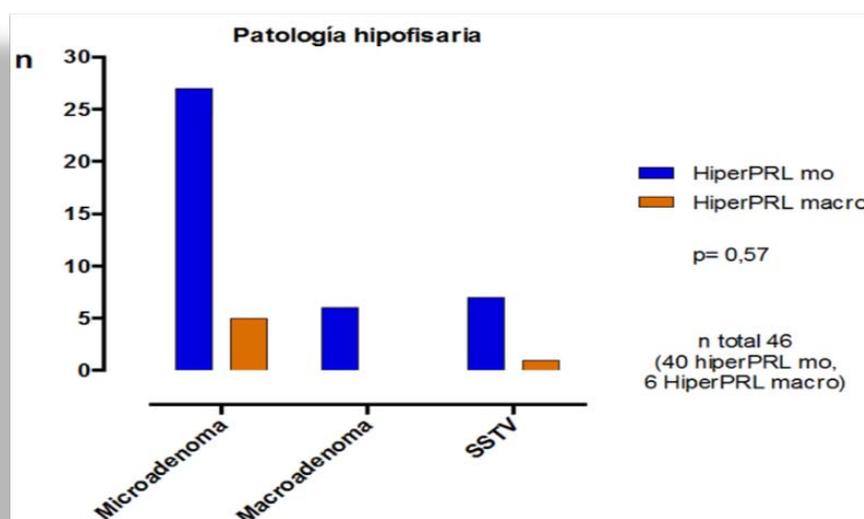


Figura 22.



6.1.6. Etiología de la hiperPRL

La hiperPRL fue de origen tumoral en 46 casos (33%). En 24 pacientes (17%) existían otras etiologías: farmacológica en 10 casos, 5 hipotiroidismos, 5 casos atribuibles a SOPQ, y 4 pacientes con hiperPRL refleja.

En las 69 pacientes restantes (50%) no se apreció ningún factor etiológico por lo que la hiperPRL se catalogó de idiopática. 34 de ellas tenían RMN normal que descartaba patología hipofisaria. Las 35 restantes se catalogaron de idiopáticas aunque no contaban con RMN ya que ni por la clínica ni por los valores de PRL que presentaban se consideró necesario descartar patología tumoral hipofisaria (no presentaban ni alteraciones menstruales ni galactorrea). Los valores medios de PRL en estas pacientes fueron de 545 mUI/l, (con un valor de PRL mínimo de 424 mUI/l y uno máximo de 885 mUI/l).

Al comparar las diferentes etiologías en función del tipo de hiperPRL (Fig. 23) se observa:

- De las 46 hiperPRL tumorales, tal y como ya se ha comentado: 40 eran hiperPRL monoméricas y 6 macroprolactinemias
- Entre las hiperPRL no tumorales: las 10 hiperPRL farmacológicas se detectaron entre las hiperPRL monoméricas; en las reflejas 2 eran hiperPRL monoméricas y 2

macroPRLs; y tanto las tiroideas como las secundarias a SOPQ eran 4 hiperPRL monoméricas y 1 macroPRL.

- De las 69 hiperPRL consideradas idiopáticas: 46 eran hiperPRL monoméricas y 23 macroPRLs.

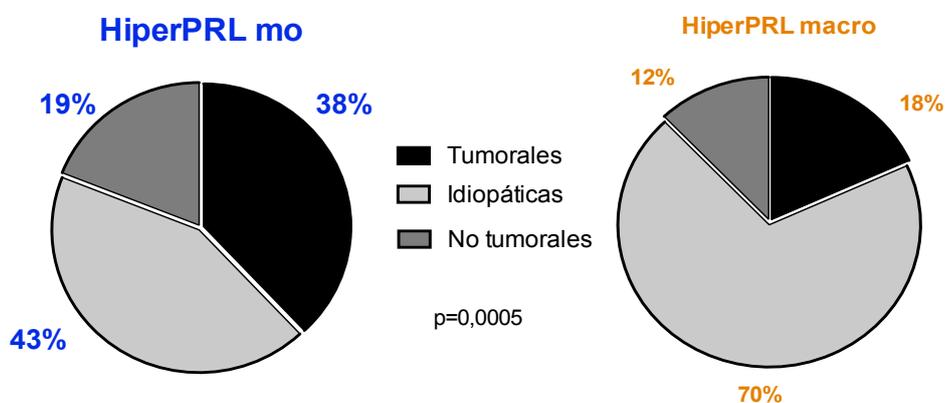
Figura 23.

Etiología de la hiperPRL	HiperPRLmo (n= 106)	HiperPRLmacro (n= 33)	p
Tumorales	40 (38%)	6 (18%)	0,0005
Idiopáticas	46 (43%)	23 (70%)	
No tumorales	20 (19%)	4 (12%)	
Farmacológicas	10 (9%)	0	
Reflejas	2 (2%)	2 (6%)	
Tiroideas	4 (4%)	1 (3%)	
2ª a SOPQ	4 (4%)	1 (3%)	

Entre las hiperPRL por macroPRL predominó la etiología idiopática (70%) siendo las otras causas mucho menos frecuentes. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,0005$) al compararlas con las hiperPRL monoméricas en las que las causas tumorales son casi tan frecuentes como las idiopáticas. No detectamos causas farmacológicas entre las macroprolactinemias. Las causas tiroideas, reflejas y secundarias a SOPQ supusieron una cifra pequeña en esta serie y aunque parecen similares en ambos grupos no permitieron establecer diferencias (Fig. 24).

Figura 24.

□



6.1.7. Clínica

6.1.7.1. Alteraciones menstruales +/-galactorrea

De las 106 pacientes con hiperPRL monomérica:

- 43 (40,5%) presentaban sintomatología atribuible a la hiperPRL: 12 (11,3%) galactorrea, 15 (14,15%) oligomenorrea y 16 (15,09%) amenorrea.
- 48 pacientes no mostraban sintomatología de alteración menstrual ni galactorrea (45,2%), y en 6 casos la alteración menstrual que presentaban se atribuyó a otras causas diferentes a la hiperPRL (1 sdOPQ, una disovulación perimenopausica, un FOP, 3 en contexto de la menopausias)
- No se pudieron valorar 9 casos (8,4%): 3 por estar en tratamiento con anovulatorios, 2 con tratamiento hormonal substitutivo, 3 histerectomizadas, y en 1 caso no había información sobre el patrón menstrual.

De las 33 pacientes con hiperPRL a expensas de macroPRL:

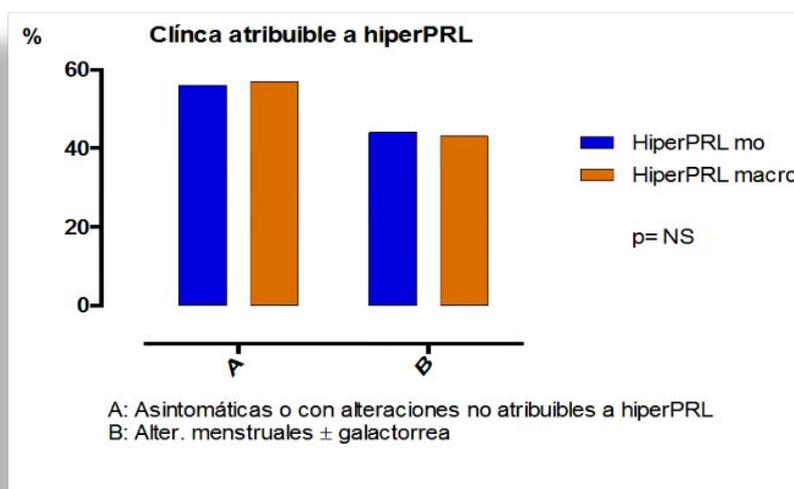
- 13 (39,3%) mostraban clínica atribuible a hiperPRL: 10 oligomenorreas (2 con galactorrea) y 3 casos sólo galactorrea, ningún caso de amenorrea se atribuía directamente a la hiperPRL
- 10 casos (30,3%) estaban asintomáticos y 9 (27,2%) presentaban alteraciones menstruales que no se consideraron secundarios a la hiperPRL: 2 oligomenorreas en el contexto de un SdOPQ, de las 9 amenorreas, 4 eran FOP, 4 casos se diagnosticaron de menopausia y en un caso era una amenorrea hipotalámica.
- 3 casos no valorables o dato desconocido.

A diferencia de lo que indica la literatura, donde encontramos que las hiperPRL por macroPRL son menos sintomáticas, en nuestro estudio no hay diferencias significativas entre la presencia de sintomatología atribuible a hiperPRL (alter. menstruales +/- galactorrea)(Figs. 25 y 26).

Figura 25.

Clínica atribuible a hiperPRL	HiperPRLmo	HiperPRLmacro	p
No	54 (50,9%)	19 (57,57%)	ns
Si	43 (40,5%)	13 (39,39%)	

Figura 26.



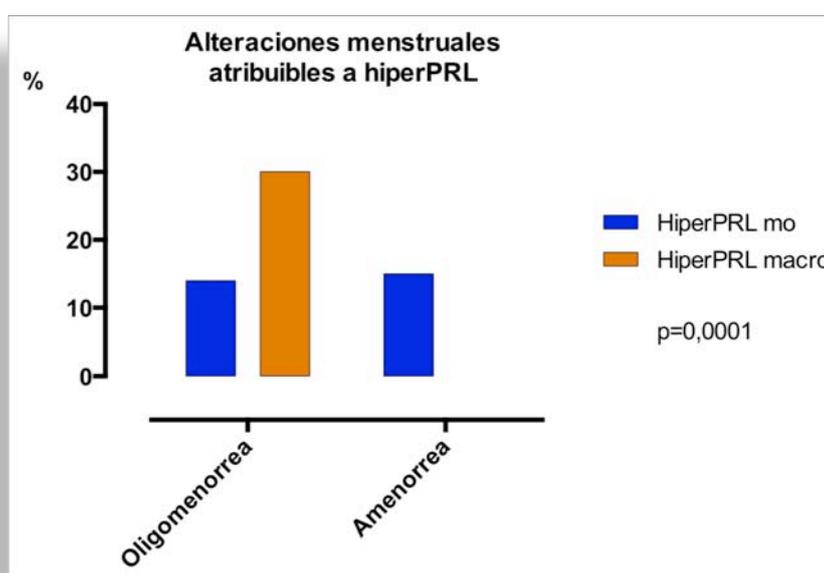
Al

desglosarlo

en relación al tipo de alteración menstrual, si que habían diferencias significativas a expensas de un claro predominio de la oligomenorrea entre las pacientes con macroprolactinemia ($p=0,003$).

Todas las amenorreas inicialmente detectadas entre las macroPRL tenían otra causa que por sí sola era responsable de la alteración menstrual. Los resultados mostraron que habían diferencias significativas ($p<0'001$), fundamentalmente a expensas del claro predominio de amenorrea entre las hiperPRL monoméricas. (Fig. 27).

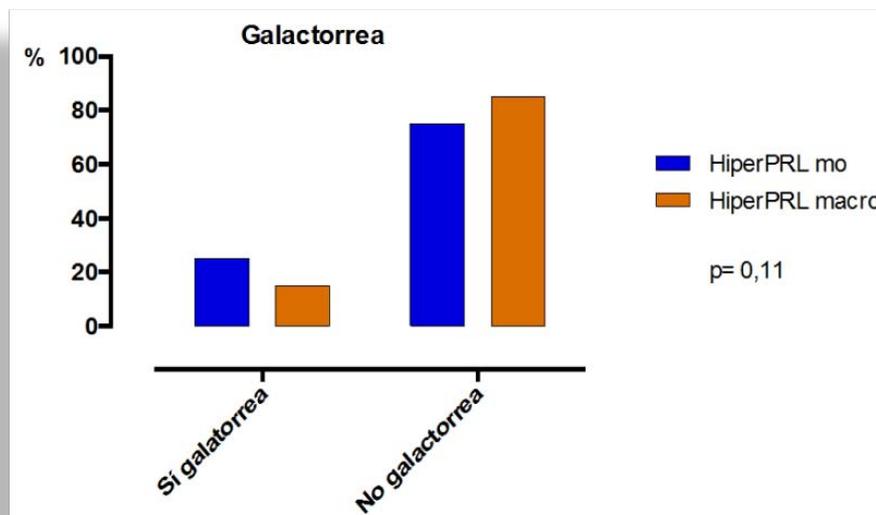
Figura 27.



6.1.7.2. Galactorrea

Aunque predominaba la presencia de galactorrea entre las hiperPRL-mo con 25 pacientes (23,58%) frente a 5 (15,5%) entre las HiperPRL-macro, estas diferencias no fueron significativas, ($p=0,11$). (Fig. 28).

Figura 28.



6.1.8. Niveles de PRL y relación con la clínica y etiología

6.1.8.1. PRL total y etiología (Figs. 29, 30 y 31)

No se apreciaron diferencias significativas entre los valores de PRL total en las pacientes con HiperPRL monoméricas respecto a las macroPRLs (1146 ± 144 mUI/L vs 1076 ± 188 mUI/l).

Tampoco hubo diferencias en la PRL total entre los dos grupos ni cuando la etiología de la hiperPRL fue tumoral, ni en función del tipo de patología hipofisaria que presentaban.

En cambio, la PRL de las pacientes con hiperPRL monomérica idiopática fue significativamente inferior (657 mUI/l $\pm 52,9$, vs 1169 mUI/L $\pm 266,5$) ($p=0,013$).

Figura 29. Niveles de PRL basal en función de la etiología y tipo de hiperPRL.

Niveles de PRL (mUI/l)	HiperPRLmo	HiperPRLmacro	p
Idiopáticas	657(±52)	1169 (±266)	0,013
Tumorales	1666 (±339)	951(±78)	0,42
Microadenomas	1664	1931	
Macroadenomas	2501	-----	

Figura 30.

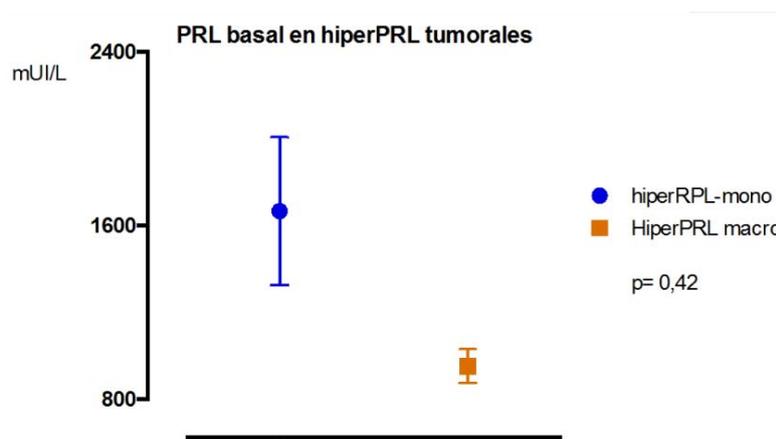
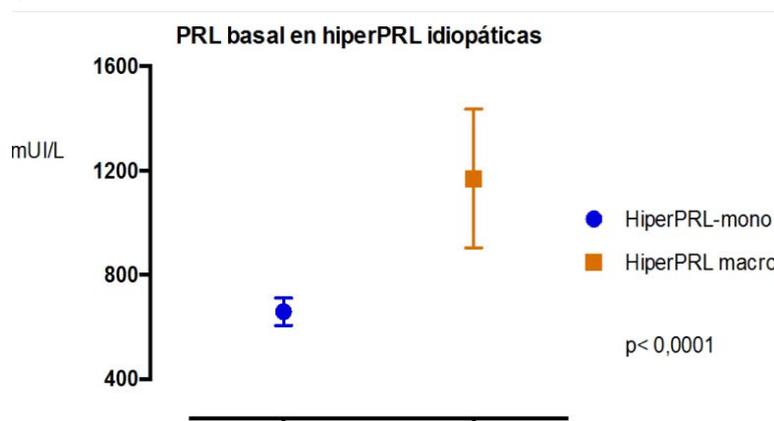


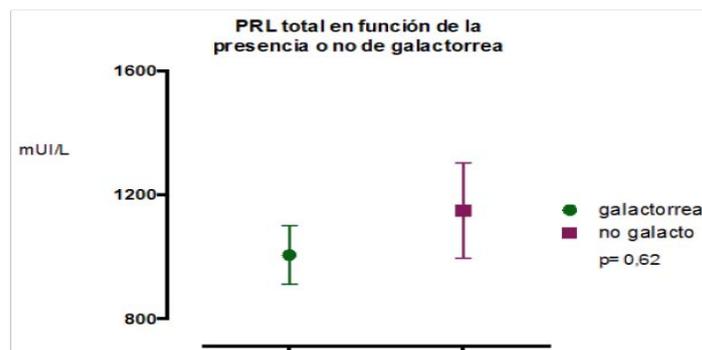
Figura 31.



6.1.8.2. PRL total y clínica

Al comparar los grupos de pacientes en relación a la presencia o no de galactorrea, no se apreciaron diferencias significativas entre ellos (1006 ± 94 mUI/L vs $1148 \pm 153,6$ mUI/L) (Fig. 32).

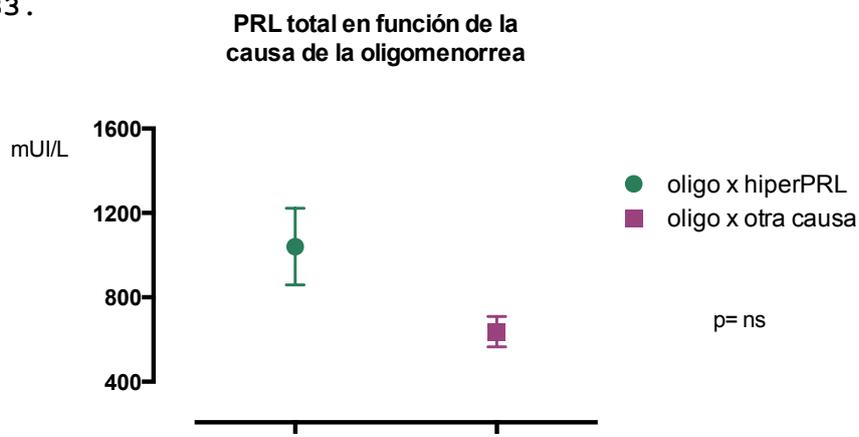
Figura 32.



Se detectaron niveles más elevados de PRL total en las pacientes con oligomenorrea o amenorrea causadas por la hiperPRL. Sin embargo, al compararlas con las pacientes con alteraciones menstruales secundarias a otros factores, estas diferencias no fueron singificativas. ($p=ns$).

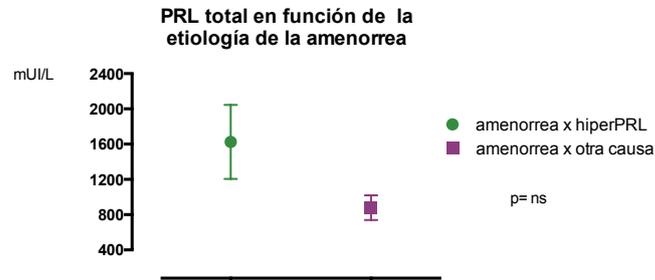
La PRL total fue de 1041 ± 182 mUI/L en el las pacientes con oligomenorrea por hiperPRL y de 637 ± 72 en las oligomenorreas de otra causa (Fig. 33).

Figura 33.



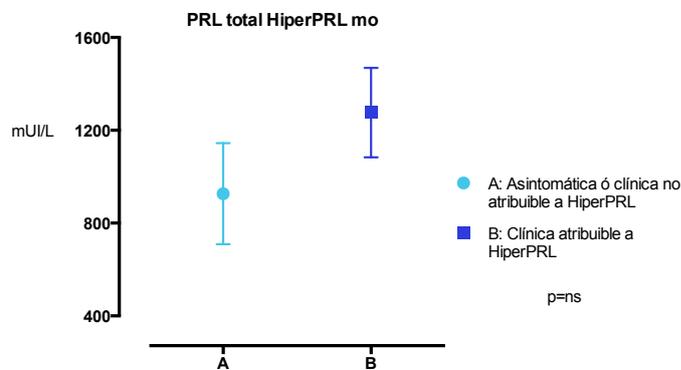
En los casos de amenorrea secundarios a hiperPRL la PRL fue de 1625 ± 419 , siendo de 879 ± 140 en las amenorreas de otra causa (Fig. 34).

Figura 34.



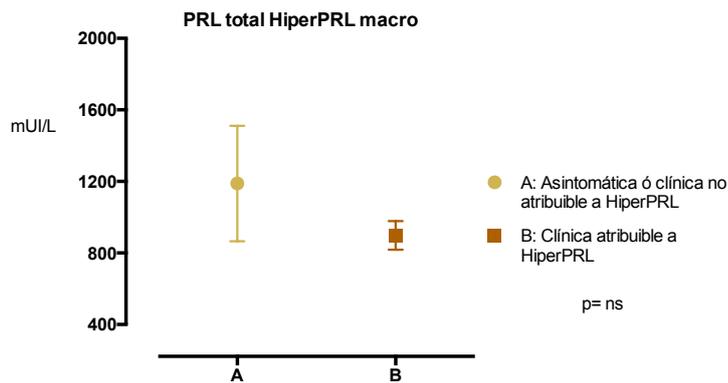
Al agrupar la sintomatología (oligomenorrea/amenorrea \pm galactorrea) en las hiperPRL-monoméricas, también hay una tendencia aunque no significativa, a mostrar niveles de PRL superiores en el grupo sintomático ($1276 \text{mUI/L} \pm 192$) que en las pacientes sin clínica o con clínica no atribuible a hiperPRL ($926 \text{mUI/L} \pm 217$) (Fig. 35).

Figura 35.



En cambio en las macroprolactinemias, los niveles de PRL son incluso más altos en las mujeres sin clínica ($1188 \text{mUI/L} \pm 322$) que aquellas con oligo/amenorrea \pm galactorrea secundaria a niveles elevados de PRL ($897 \text{mUI/L} \pm 80$) (Fig. 36).

Figura 36.

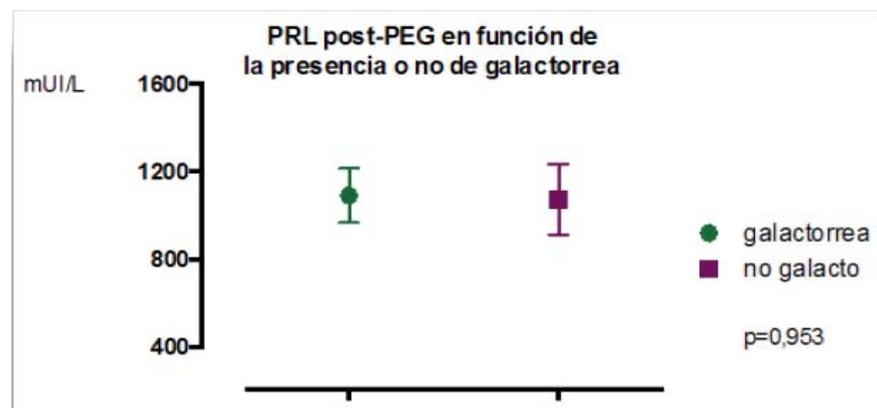


6.1.8.3. Clínica en relación a los niveles de PRL post-PEG

No se detectaron niveles superiores de PRL libre entre las pacientes con galactorrea ($p=0,95$), ni en aquellas con oligomenorrea secundaria a hiperPRL o debida a otra causa ($p=0,2$).

Los niveles de PRL post-PEG en la pacientes con galactorrea fueron de $1091 \text{ mUI/L} \pm 124$ y de $897 \text{ mUI/L} \pm 183$ en las mujeres sin galactorrea (Fig. 37).

Figura 37.



Tampoco había cambios en función de si era uno u otro grupo de hiperPRL (Figs.. 38 y 39).

Figura 38. hiperPRL-monomérica: PRL post-PEG con galactorrea: 1241 mUI/L±129 y sin galactorrea: 111 mUI/L±241.

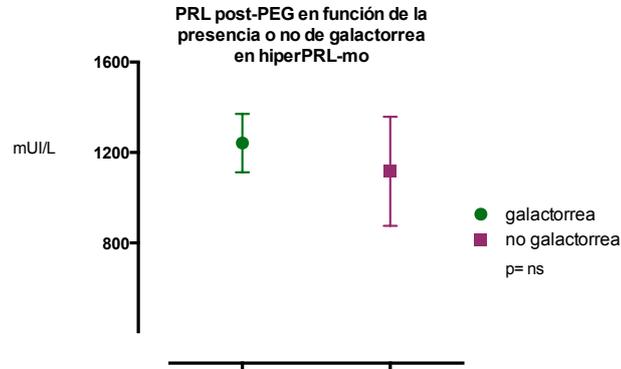
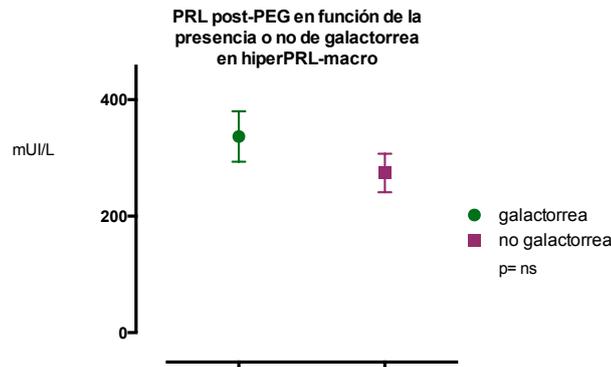
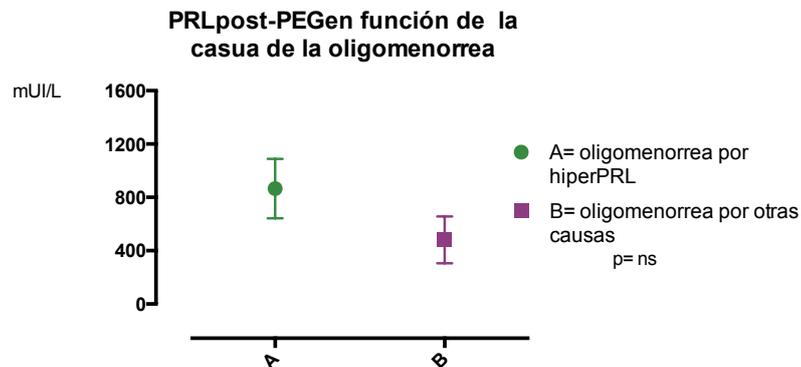


Figura 39. Macroprolactinemia: PRL post-PEG con galactorrea: 336 mUI/L±43 y sin galactorrea de 274 mUI/L±32.



En relación a la presencia de oligomenorrea, también hubo una tendencia a detectarse niveles de PRL post-PEG superiores en los casos de oligomenorrea secundaria a hiperPRL (865,6 mUI/L±222) que en los debidos a otras causas (481 mUI/L± 175) pero sin ser significativo (Fig. 40).

Figura 40.



Nuevamente, no hay diferencias si estratificamos por grupos: hiperPRL-mo con oligomenorrea por hiperPRL vs no por hiperPRL; ni en los casos de las hiperPRL macros que presentan PRL de 34 mUI/L±39 si tienen oligomenorrea atribuible a la hiperPRL y 306 mUI/L±92 en los casos de oligomenorrea por otras causas.

Figura 41. hiperPRL-monomérica: PRL post-PEG con oligomenorrea: 1193 mUI/L±348 y sin oligomenorrea: 832 mUI/L.

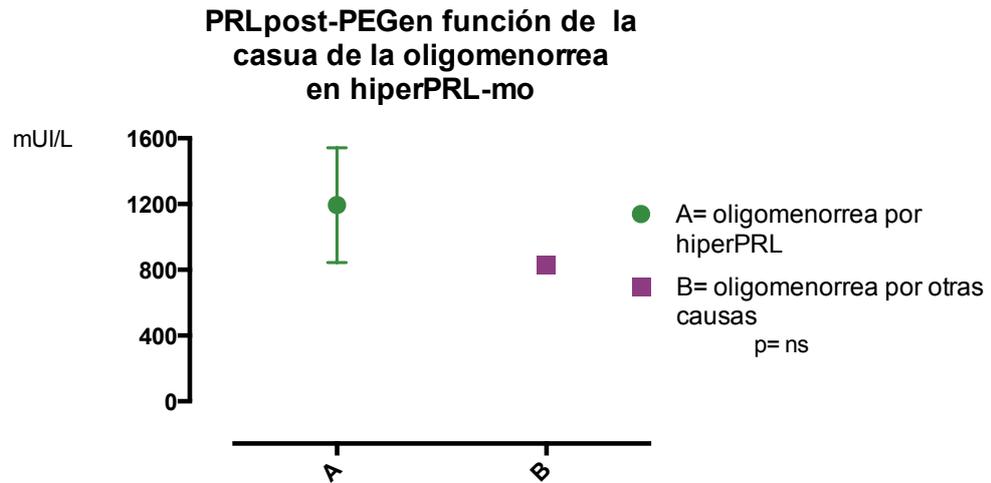
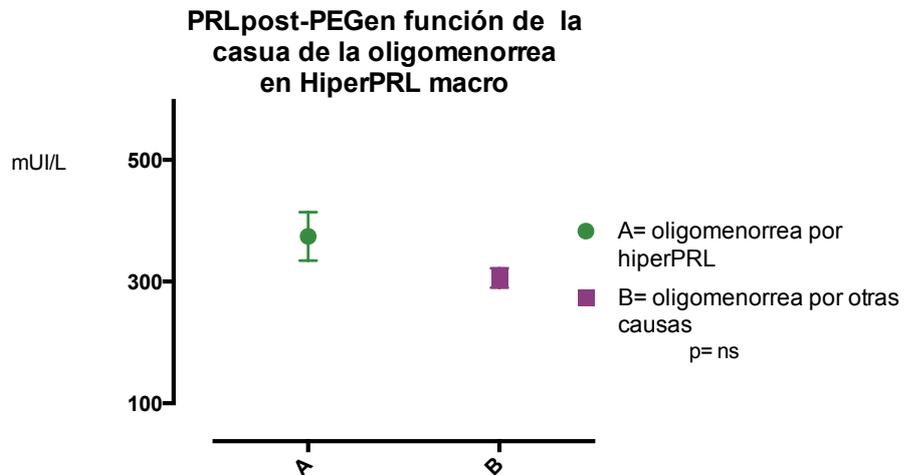
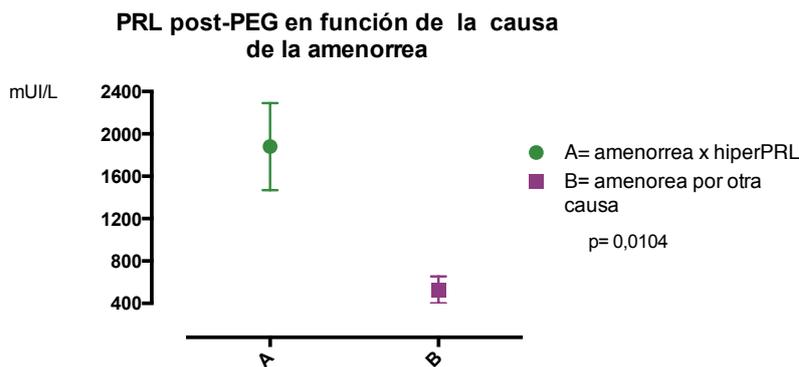


Figura 42. Macroprolactinemia: PRL post-PEG con oligomenorrea: 34 mUI/L±39 y sin oligomenorrea de 306 mUI/L±92.



Sin embargo sí que habían diferencias significativas ($p=0,0104$) entre los niveles de PRL post-PEG en función de la presencia de amenorrea secundaria a hiperPRL. Como era de esperar, los niveles de PRL post-PEG fueron superiores ($1880 \text{ mUI/L} \pm 411$) en las pacientes con amenorrea secundaria a hiperPRL, que los de las mujeres cuya amenorrea parecía deberse a otra causa ($527 \text{ mUI/L} \pm 126$) (Fig. 43).

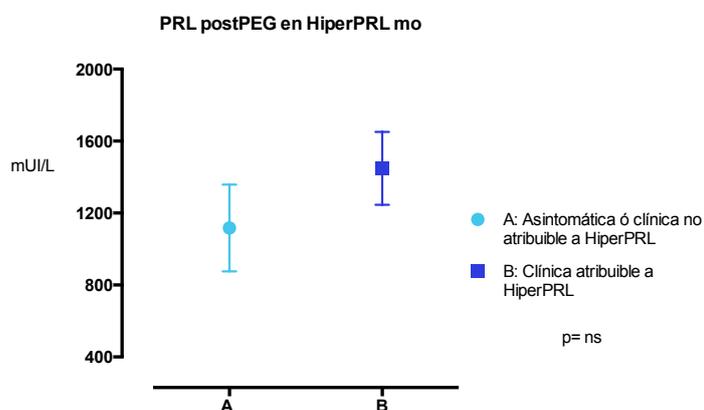
Figura 43.



No estratificamos en función de tipo de hiperPRL ya que no hubo amenorreas por hiperPRL en el grupo de las macroprolactinemias.

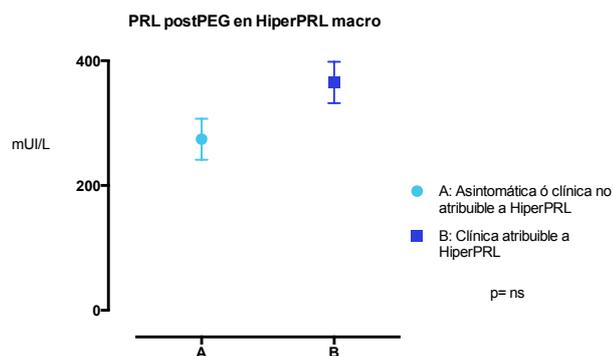
Al agrupar la sintomatología secundaria a hiperPRL, en las pacientes con hiperPRLmonomérica observamos una tendencia a presentar niveles PRL post-PEG superiores en las pacientes con clínica que en las asintomáticas: $1117 \text{ mUI/L} \pm 241$ vs $1449 \text{ mUI/L} \pm 202$ (Fig. 44).

Figura 44.



Lo mismo ocurre en las macroprolactinemias: las pacientes sintomáticas presentan niveles de PRL post-PEG superiores a las asintomáticas: 365 mUI/L \pm 33 vs 274 mUI/L \pm 32 (Fig. 45).

Figura 45.

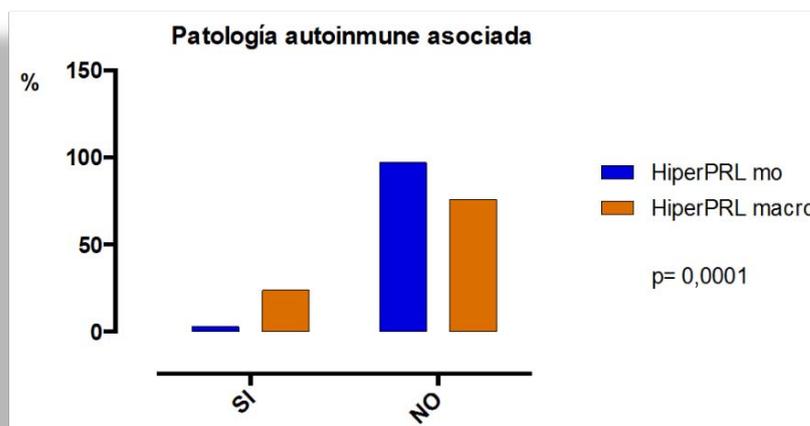


6.1.9. Relación con patología autoinmune

Un 2,91% de las pacientes con hiperPRL monomérica y el 24,24 % de las macroprolactinemias presentaron patología autoinmune, siendo la diferencia entre ambos grupos significativa ($p=0,0001$).

En las pacientes con hiperPRL monomérica los 3 casos correspondieron a un lupus eritematoso sistémico, un hipertiroidismo de Graves-Basedow y un FOP. Los 8 casos de patología autoinmune entre las macroprolactinemias correspondían a cuatro FOP (una de ellas con eritema nodoso), dos casos de tiroiditis de Hashimoto, un hipotiroidismo y una artritis reumatoide (Figura 46).

Figura 46.



6.2. RESULTADOS ESTUDIO DINÁMICO

6.2.1. *Parámetros basales y clínicos*

El estudio incluyó 25 mujeres, 9 de ellas con concentraciones de PRL basal normal (grupo control), 8 casos con hiperPRL monomérica (grupo hiperPRLmo) y 8 pacientes con hiperPRL con predominio de macroprolactinemia (grupo hiperPRLmacro). Como se aprecia en la Fig. 47, tanto la edad como el IMC fueron comparables entre los tres grupos estudiados.

Figura 47.

	Control (n=9)	HiperPRLmo (n=8)	HiperPRLmacro (n=8)	p
IMC (kg/m ²)	22,9±3,4	24,9±5,2	21,2±2,3	ns
Edad (años)	31,6±4,9	35,8±4,4	30,7±6,5	ns

Todas las mujeres del grupo control presentaban ciclos menstruales regulares mientras que en el 75% de las pacientes con hiperPRL monomérica y en el 37,5% de las macroprolactinemias existía algún tipo de alteración menstrual. La galactorrea se corroboró sólo en el 25% de las pacientes con hiperPRL monomérica. En el 50% de las hiperPRL monoméricas se detectó patología hipofisaria mientras que sólo hubo un caso de microadenoma (12,5%) entre las hiperPRLmacro (Fig. 48).

Figura 48.

	Control	HiperPRLmo (n=8)	HiperPRLmacro (n=8)	p
Ciclo menstrual				
Regular	9	2	5	
Amenorrea	0	1	1	
Ciclos irregulares	0	5	2	
Galactorrea				
Si	0	2	0	
NO	9	6	8	
RMN hipofisaria				
Normal	-	4	7	
Adenoma	-	3	1	
Other (SSTV)	-	1	0	

6.2.2. Niveles de PRL basal, total y post-PEG.

Como era de esperar, la concentración basal de PRL total en el grupo control fue significativamente inferior a la de los grupos con hiperPRL monomérica y macroprolactinemia, sin que se apreciaran diferencias entre estos últimos ($255,5 \pm 137$ mIU/L vs $1188,7 \pm 660$ mIU/L y $1597,4 \pm 1633$ mIU/L, respectivamente) ($p=0,037$).

La concentraciones de PRL tras el PEG fueron superiores en las mujeres hiperprolactinémicas ($1262,5 \pm 777$ mIU/L), cuando se compararon con el grupo control ($290,56 \pm 111$ mIU/L) o las macroprolactinemias ($317,6 \pm 203$ mIU/L), sin diferencia entre estos últimos.

El porcentaje de PRL monomérica recuperado tras el PEG fue significativamente menor en el grupo de mujeres con macroprolactinemia ($28,5 \pm 17\%$), que en los otros dos grupos (grupo control: $129,5 \pm 37\%$, grupo hiperPRL: $93,1 \pm 28\%$) (Fig, 49).

Figura 49. Niveles de PRL total post PEG y % de recuperación.

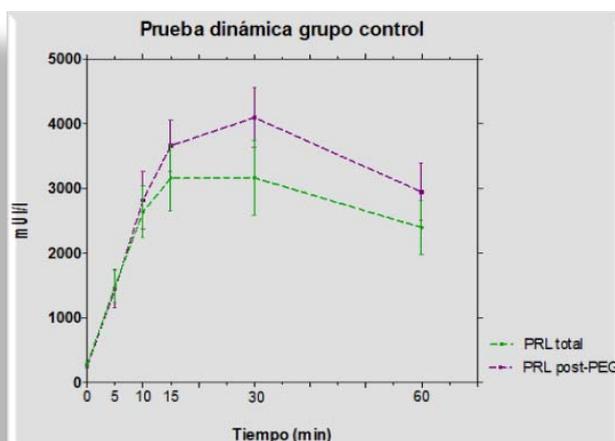
	Control	HiperPRLmo	HiperPRLmacro	p
PRL total (mUI/L)	255±137 ^a	1188 (±660) ^b	1597 (±1633) ^b	^{ab} p<0,001
PRLpostPEG (mUI/L)	290 ± 111 ^b	1262 (±777) ^a	317 (±203) ^b	^{ab} p<0,01
% recuperación	129 ± 37	93 (±28)	28 (±17)	p <0,0001

6.2.3. Incremento de PRL tras administrar antidopaminérgico

Tras la administración de metoclopramida se apreció un incremento significativo de las concentraciones de PRL total ($p < 0,0001$) y PRL monomérica recuperada post PEG en todos los grupos ($p = 0,013$). Sin embargo se detectaron diferencias en la evolución de las curvas entre los grupos tal y como se describe a continuación:

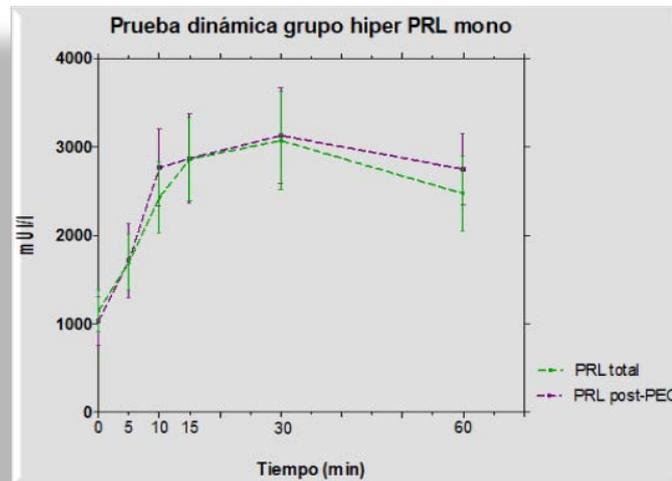
Si comparamos la evolución de la PRL total y PRL post PEG para cada grupo observamos que no hay diferencias entre ellas en el grupo de las hiperPRL monoméricas, en el grupo control hay una tendencia pero no significativa y en cambio en el grupo de las Macroprolactinemias sí que hay diferencias significativas en la evolución ($p < 0,00$), tal y como se aprecia en las gráficas (Figs. 50, 51 y 52):

- *Incremento PRL total y postPEG en el grupo Control tras administración de antagonista dopaminérgico: ($p = 0,05$)*

Figura 50.

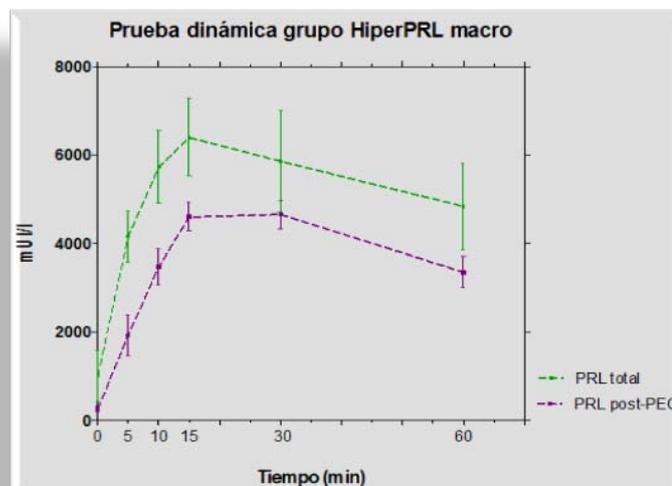
- Incremento RPL total y post-PEG en el **grupo de hiperPRL monomérica** tras administración de antagonista dopaminérgico: ($p=ns$).

Figura 51.



- Incremento RPL total y post-PEG en el **grupo de macroprolactinemias** tras administración de antagonista dopaminérgico: ($p<0,00$).

Figura 52.



Al comparar la evolución entre los tres grupos observamos como tanto para la PRL total como la PRL post-PEG, en el grupo control y en las macroprolactinemias el ascenso de la PRL se produjo de forma significativa hasta los 15 minutos, momento a partir del cual las PRL ya no ascendió mas; entre los 30 y 60 minutos posteriores se observó un descenso de la misma. En cambio en las hiperPRL monoméricas el ascenso fue significativo sólo hasta los 10 minutos, momento en que se estabilizó para descender, como en los otros grupos, a partir de los 30 minutos (Figs. 53 y 54).

Figura 53.

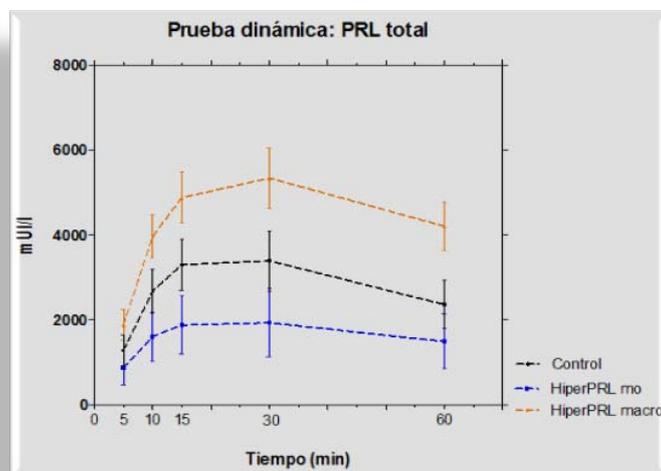
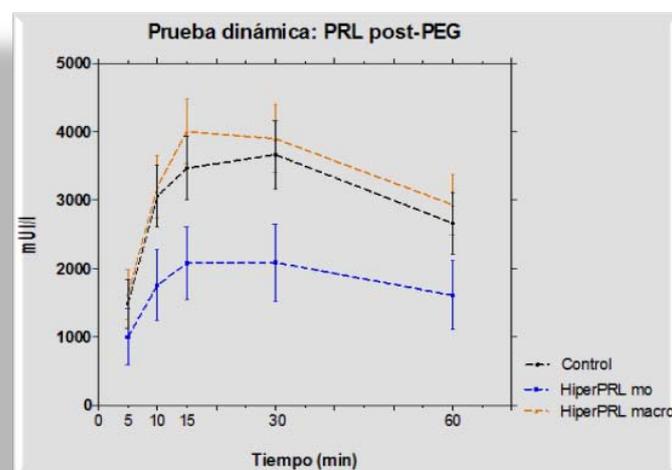


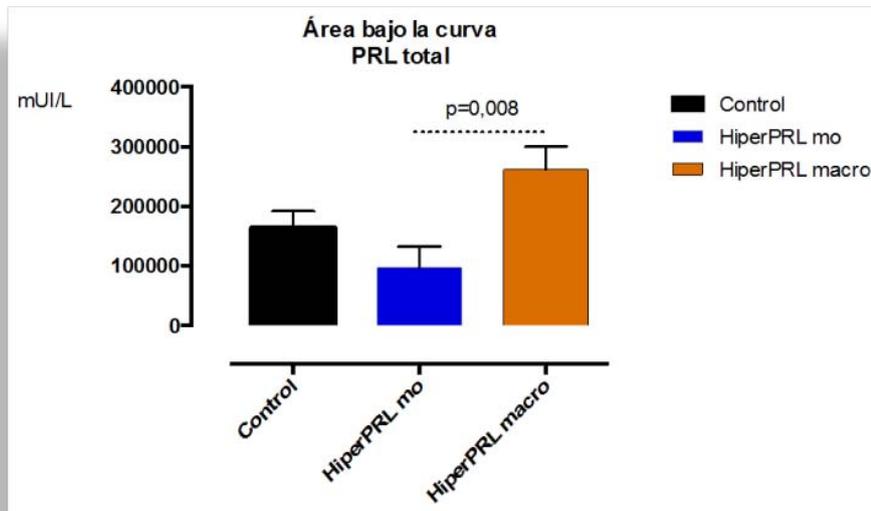
Figura 54.



6.2.4. Áreas bajo la curva

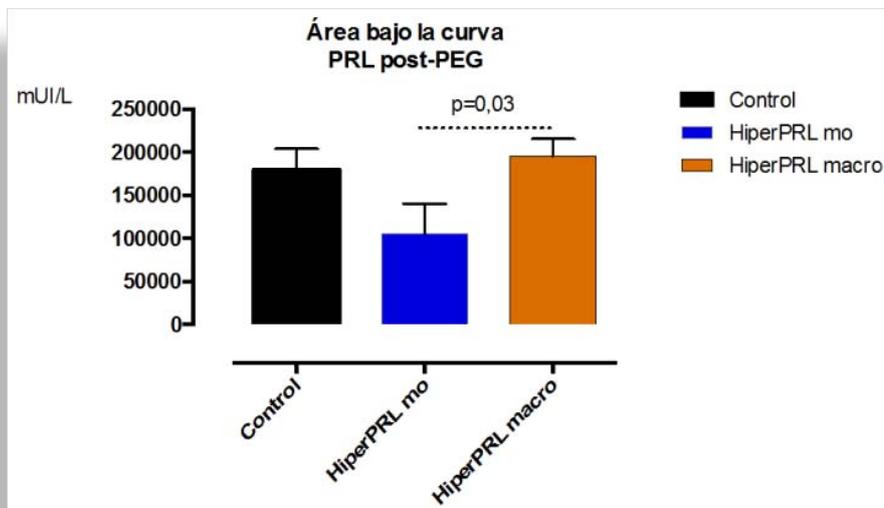
El área bajo la curva (AUC) y la concentración máxima (C_{max}) de la PRL total fueron significativamente superiores en las pacientes con macroprolactinemia (261163 ± 115634 y 5510 ± 2462 , respectivamente) que en las hiperPRLs monoméricas (96930 ± 92587 y $2144,8 \pm 1966$, respectivamente) sin diferencias de ambos grupos con el grupo control (164396 ± 81823 y $3528,8 \pm 1732$, respectivamente) (Fig. 55).

Figura 55.



Lo mismo ocurrió en la AUC y la C_{max} para la PRL post-PEG (Fig. 56):

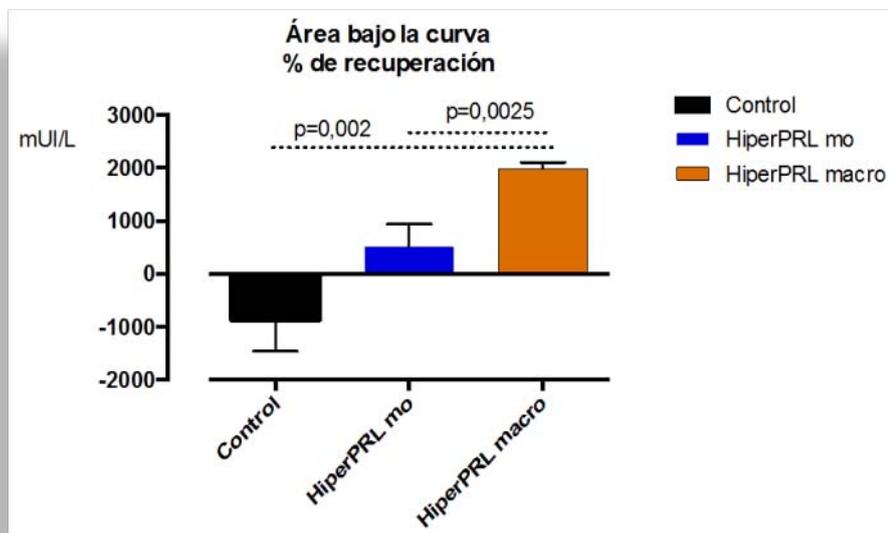
Figura 56.



No hubo diferencias entre los tres grupos en relación al momento (tiempo) en que se alcanzó la concentración máxima de PRL total (Tmax). (p=ns).

El AUC del porcentaje de recuperación fue negativo en el grupo control (-872±1771) y significativamente diferente al del las mujeres con macroprolactinemia (1986±361) (p<0,001). (Fig. 57).

Figura 57.



7. DISCUSIÓN

7.1. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO OBSERVACIONAL

La hiperprolactinemia constituye la causa más frecuente de anovulación o disovulación y esterilidad secundaria de origen hipotalámico-hipofisario en la vida reproductiva de la mujer. Como tal, la normalización de los niveles de PRL restablecería los ciclos ovulatorios y la capacidad fértil de las mujeres afectas. No obstante, a concentraciones equiparables de PRL, no todas las pacientes hiperprolactinémicas tienen el mismo impacto clínico, sin que hasta hace unas décadas conociéramos el porqué de esta discrepancia. Ello nos parece en la actualidad en gran parte atribuible a las diferencias en la bioactividad de las diferentes “formas de PRL”, por lo que ante el predominio de una u otra, nos podemos encontrar desde pacientes con el típico síndrome de amenorrea-galactorrea hasta mujeres asintomáticas. Los primeros hallazgos de mujeres con elevadas concentraciones de PRL sin apenas sintomatología acompañante correspondían a casos en los que la hiperprolactinemia se producía principalmente a expensas de un predominio de macrocomplejos de PRL (lo que hoy conocemos como macroprolactinemia), por lo que se extendió el concepto de que estas pacientes eran esencialmente asintomáticas (67,104). No obstante, en nuestra población se demuestra que hasta un tercio de los casos de macroprolactinemia existe clínica atribuible al exceso de PRL, hecho también constatado en estudios más recientes (74,88). De estos casos, aunque la amenorrea y la galactorrea fueron más comunes en pacientes con hiperprolactinemia monomérica, y en cambio, las alteraciones menores del ciclo menstrual (oligomenorreas) predominaron en las pacientes macroprolactinémicas, no hemos encontrado otros parámetros clínicos o fenotípicos que pudieran diferenciar ambas poblaciones. De ello podemos deducir que la única forma objetiva de determinar estas situaciones consiste en la determinación sistemática de macroPRL en todas las pacientes con clínica sugestiva y en especial, como sugiere la “Endocrine Society” en los casos con síntomas mínimos o asintomáticos (105,106).

La prevalencia de macroprolactinemia del 23,7% de nuestra población es algo inferior al 28%, que es la media obtenida de la revisión de 8 estudios que incluían casi 4000 pacientes con hiperprolactinemia (78). Muy probablemente esté condicionada por diferentes factores como las características de la población estudiada, las peculiaridades de nuestro centro o como se ha determinado y definido la macroprolactinemia. Los

estudios con prevalencias más bajas, entre el 15 y el 20%, suelen incluir a pacientes con sintomatología sugestiva de hiperprolactinemia, mientras que en nuestra población hasta un 50% de los casos eran asintomáticos (65,69). Ello está en consonancia con datos de la literatura que evidencian que entre la población de mujeres con hiperprolactinemia, las atribuibles a macroPRL, presentan una frecuencia menor de sintomatología. Este hecho no se ha podido constatar en nuestro estudio en el que el porcentaje de mujeres asintomáticas fue el mismo en los dos grupos. Algunos autores con resultados comparables han argumentado que en esta población los síntomas podrían tener otra etiología, y por lo tanto, tratarse de una coincidencia, sin existir una relación causa efecto con la macroprolactinemia. De hecho, todas las pacientes de nuestro grupo con macroprolactinemia y amenorreicas presentaban otra causa a la que pudiera atribuirse la alteración menstrual, siendo en la mayoría de estos casos un fallo ovárico (107). También ha podido influir en nuestros resultados el constituir un centro de referencia de pacientes hiperprolactinémicas, y en consecuencia, que hubiera un sesgo de selección al haber sido derivadas un mayor número de casos en los que existía una discrepancia entre los valores de PRL y la clínica. Hauache y cols atribuyen a este hecho el apreciar una frecuencia de hiperprolactinemia del 46% (66).

Un tercer aspecto que ha generado controversia es el relacionado con los métodos de determinación de la PRL total y monomérica, así como los límites para considerar que estamos ante una macroprolactinemia. Kelly y cols utilizando el ensayo Tosoh AIA y una precipitación con PEG obtuvo una prevalencia de un 24,6% de macroprolactinemias, pero cuando las muestras se volvieron a estudiar con el ensayo Roche Elecsys II esta cayó a un 11,8% (108). En nuestro caso utilizamos el enzimoimmunoanálisis quimioluminométrico automatizado calibrado para el tercer estándar internacional y las concentraciones de PRL se han expresado en unidades internacionales. Este método presenta una reactividad intermedia hacia la macroPRL, a diferencia de los otros métodos utilizados por Kelly y cols que son de alta y baja reactividad. También vale la pena mencionar que la estandarización de la PRL puede contribuir a la confusión cuando se comparan los resultados entre los distintos métodos debido a las preparaciones de referencia y a las unidades en uso. Varios estudios han de mostrar que la precipitación mediante polietilenoglicol (PEG) es un método simple, accesible y reproducible para la determinación de la

macroprolactinemia (109,110). Kavanagh y cols comparando la especificidad y utilidad clínica de varios métodos concluyó que el PEG era superior y proporcionaba resultados que se correlacionaban mejor con la cromatografía de exclusión (111). Sin embargo, la precipitación con PEG presenta una serie de limitaciones que pueden haber condicionado nuestros resultados, como el hecho de que aproximadamente hasta un 25% de la PRL monomérica en suero pudiera co-precipitar con los macrocomplejos. Ello llevaría a subestimar y a mal interpretar los niveles de PRL libre reales.(110,112).

Por ello, se ha recomendado que cada laboratorio, establezca intervalos de referencia de la PRL post-PEG en sueros de individuos sanos (112). En este sentido, Beltran y cols analizando diferentes plataformas de inmunoanálisis, entre las que figuraba la utilizada en nuestro estudio (Immulite), apreció una interferencia positiva del PEG sobre la PRL monomérica, estableciendo los intervalos de referencia de la PRL libre entre 85 y 394 mIU/L (110). Esto es particularmente importante cuando co-existen macroPRL junto a concentraciones elevadas de PRL monomérica y podría explicar la presencia de sintomatología en las pacientes macroprolactinémicas de nuestro grupo, a pesar de que las concentraciones de PRL postPEG estuvieran dentro del rango de la normalidad. También se ha apreciado que el aumento de las concentraciones de gamma globulina en el suero puede aumentar la cantidad de PRL monomérica precipitada por PEG, dando lugar a una estimación falsa de la misma y a la impresión errónea de que estamos ante una macroprolactinemia (113). En cambio cuando la macroprolactinemia se produce a expensa de compuesto de PRL e IgA puede dar lugar a falsos negativos (114). A pesar de todo lo mencionado anteriormente, la precipitación con PEG sigue siendo la técnica más ampliamente utilizada para la detección de macroPRL y es el método de elección para la mayoría de laboratorios.

En nuestro estudio se escogió el valor de corte para el diagnóstico de macroprolactinemia en función de lo que la mayoría de autores han aceptado (una relación de PEG-precipitación > 60% o una recuperación de PRL monomérica inferior 40%), aunque los umbrales puedan variar de un 30 a un 50% .Esto se debe a que no hay ningún valor específico que delimite claramente los casos de hiperPRL monomérica de las macroprolactinemias.

Los resultados de pruebas de precipitación PEG tradicionalmente han sido reportados como PRL total de ciento recuperado después del tratamiento con PEG. Sin embargo, existen evidencias de que el enfoque de "recuperación", aunque de aplicación general, es erróneo, ya que no identifica a aquellos casos en que la macroPRL es la forma presente predominante pero PRL monomérica también está elevada, y este último hallazgo, como ya se ha comentado puede tener significación patológica (82). Ha quedado claro que las investigaciones de laboratorio deben centrarse en proporcionar una medida de bioactivo - PRL monomérica, es decir la PRL que proporciona la información más útil para los clínicos (78,115). La concentración de PRL después de precipitación con PEG proporciona una medida relativamente precisa de la PRL monomérica bioactiva. Sin embargo, debido a la amplia variación en la reactividad ensayo de PRL y las características de precipitación con PEG que se discutieron anteriormente, los rangos de referencia para la PRL monomérica después de la precipitación de PEG deberían ser específicos de cada laboratorio.

En la realidad, la detección de la macroPRL y el conocimiento adquirido de las interferencias con los métodos de análisis, se debe a las discrepancias apreciadas entre los resultados de laboratorio y la sintomatología clínica.

Las pruebas de bioactividad sugieren que la macroPRL es poco probable que sea responsable de sintomatología propia de la hiperprolactinemia. Sin embargo, el hecho de que algunos de nuestros pacientes con macroprolactinemia tengan síntomas compatibles sin que hayamos sido capaces de detectar otra patología responsable, nos ha llevado a pensar que en estos casos la PRL libre bioactiva estaría más elevada. Gibney y cols en su revisión que incluía 310 pacientes apreció una gran variabilidad entre los estudios incluidos respecto al porcentaje de pacientes macroprolactinémicas sintomáticas que iba desde el 0 y el 45% para la galactorrea, de un 6-40% subfertilidad y del 15 al 80% oligomenorrea o amenorrea (78). Nuestros resultados no difieren de los anteriormente señalados para la galactorrea (15,15%) y la oligo/amenorrea (30%). Sin embargo nuestra tasa de esterilidad es superior (48,4%) hecho condicionado por las características de nuestra población. Sin embargo, no hay pruebas convincentes de que estos síntomas sean causados por la macroPRL. Dado que la medición de la PRL se lleva a cabo cuando existe sintomatología atribuible a la hiperprolactinemia, y estos síntomas no son específicos, no

es sorprendente que tales síntomas y macroPRLemia ocasionalmente coincidan, como se ha demostrado en pacientes con hiperprolactinemias asociadas al embarazo (2,7%), a tratamientos farmacológicos (4,8%), prolactinomas (2,7%), lupus eritematoso sistémico (5%) y en la población sana (1,1%) (69,81,116,117).

La prevalencia de alteraciones en los hallazgos de la RMN ha sido claramente inferior en las pacientes con macroprolactinemia en relación a las pacientes con hiperprolactinemias monoméricas. De hecho, en población general, cuando se ha llevado a cabo una exploración radiológica por otras causas distintas a la hiperprolactinemia, en un 10-20% de los casos se ha constatado la presencia de un adenoma hipofisario (85). Datos similares se han apreciado en autopsias de cadáveres (118). De ello deducimos que la coincidencia de adenoma hipofisario y macroprolactinemia es casual y no causal ya que además no existen evidencias de que los prolactinomas sean capaces de producir complejos de macroPRL.

Aunque hoy sabemos que la macroprolactinemia tiene su origen en la existencia de autoanticuerpos anti-PRL, su relación con la autoinmunidad es controvertida. Nuestros datos, en los que se apreciaron diferencias significativas de patología autoinmune a favor del grupo de macroprolactinemias está en consonancia con otros estudios que muestran una incidencia superior de trastornos tiroideos autoinmunes, tales como la enfermedad de Graves y la tiroiditis de Hashimoto o el LES. (38,75-77). Sin embargo, otros estudios que examinan un gran número de pacientes no revelaron ninguna asociación específica entre macroprolactinemia y trastornos autoinmunes (29).

Para finalizar, queremos destacar que un 60,6% de nuestras pacientes con macroprolactinemia habían sido tratadas con agonistas dopaminérgicos, tasas ligeramente inferiores a las publicadas por otros autores que están entre el 76.5 to 86.7% (82). Ello es justificable en base al alto porcentaje de pacientes con macroprolactinemia que presentan clínica asociada (39,9%). No obstante, el diagnóstico diferencial entre pacientes sintomáticas y tratadas (aproximadamente del 20%) indica que había un porcentaje de nuestra población que lo estaba injustificadamente. Sabemos que la macroprolactinemia es una anomalía benigna que en los casos asintomáticos no requiere un abordaje específico tanto diagnóstico como terapéutico.

7.2. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DINÁMICO

La PRL está producida por las células galactotropas y liberada de la hipófisis en diferentes formas o complejos, siendo las estructuras monoméricas las más frecuentes. Esta producción está tónicamente inhibida por la dopamina de origen hipotalámico, por lo que una supresión del tono dopaminérgico permite a la hipófisis liberarse de su freno fisiológico y desarrollar su máxima capacidad de producción y liberación de PRL.

Esto ha quedado demostrado en el estudio tras la administración de metoclopramida, que al bloquear la unión de la dopamina a su receptor D2 hipofisario, condujo a un aumento de las concentraciones de PRL en todos los grupos estudiados.

No obstante, el perfil de respuesta hipofisario tras la administración del antagonista dopaminérgico se ha mostrado cuantitativa y cualitativamente diferente para cada uno de los grupos, siendo mayor el incremento de PRL total en las mujeres con macroprolactinemia, intermedio en el grupo control y menor en los casos de hiperPRL monomérica. De ello se podría deducir que el número o la actividad de las células lactotropas bajo control dopaminérgico endógeno varía entre estos tres grupos.

Sin embargo, cuando analizamos los cambios en las concentraciones de la PRL post-PEG se aprecia como la respuesta hipofisaria en las mujeres con macroprolactinemia es superponible a la del grupo control y superior a las pacientes con hiperPRL con predominio de formas monoméricas. Las diferencias en la PRL total entre las hiperPRL monoméricas y los dos otros grupos, se produce a fundamentalmente a expensas de la macroPRL. Esto no es un fenómeno inmediato, y el desplazamiento de las curvas, sólo es apreciable a partir de los 10'. Esto se explicaría por el hecho de que hay evidencias de que la PRL incorporada a los macrocomplejos tiene un aclaramiento plasmático menor (89,90) y en consecuencia una vida media más larga. La PRL monomérica se iría incorporando progresivamente a los macrocomplejos, que al ser metabolizados más lentamente, se irían acumulando en el torrente vascular.

De todo ello se puede deducir que la macroPRL constituye un fenómeno extrahipofisario y no el resultado de cambios en el perfil hipofisario de producción de PRL.

Bjoro (102) en un experiencia similar apreció que inicialmente la mayor parte de la PRL producida era de bajo peso molecular, sin incrementos iniciales de las formas de 150 a 170 Kd, que sólo se apreciaba a las 2-3 horas. El gran tamaño de los macrocomplejos de PRL, limitaría su acceso al compartimento extravascular, sin poder acceder por lo tanto al hipotálamo, no existiendo en estos casos un hipertono dopaminérgico central (13). Esta ausencia de hipertono central también ha sido probada de forma indirecta por Pinto y cols tras obtener una respuesta normal de la TSH a la administración de domperidona (119). Por lo tanto, el funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisario de una mujer con macroprolactinemia no diferiría del de las mujeres normoprolactinémicas, hecho que además justifica que estas pacientes cursen con poca sintomatología secundaria a hiperPRL.

Otro aspecto destacable de nuestros resultados es la baja respuesta obtenida tras la desinhibición con metocropramida en las mujeres con hiperPRL monomérica. Este resultado podría explicarse por la existencia de un menor número de células hipofisarias lactotropas normales bajo control dopaminérgico o por un cierto grado de insensibilidad de la célula lactotropa, debida a una disminución del número de receptores D2 o de su afinidad a la dopamina. Otra posibilidad es que las células lactotropas sometidas durante un largo período de inhibición, se muestren hipoactivas a corto plazo y requieran un período de impregnación más o menos prolongado.

Existen varias limitaciones que podrían condicionar la interpretación de los resultados.

En primer lugar, el tamaño muestral podría haber sido insuficiente para que algunos parámetros analizados, mostraran diferencias estadísticamente significativas.

En segundo lugar, el método escogido para la determinación de la macroPRL presenta algunas limitaciones como lo demuestra que hayamos apreciado porcentajes de recuperación superiores al 100% tras la precipitación, sinónimo de interferencia con otros ensayos. En este sentido se ha demostrado que la precipitación mediante polietilenglicol es una técnica simple, de bajo costo, accesible, rápida y reproducible para el cribado de

estas pacientes, y además, estudios comparativos muestran un alto grado de correlación con los datos obtenidos mediante cromatografía tras filtración en gel.

Por último, no existe un consenso unánime de cuál debería ser el punto de corte óptimo que permita diferenciar claramente la hiperPRLs monoméricas de las macroprolactinemias, con valores que fluctúan del 30 a 60% de la PRL en forma de macrocomplejos. Por ello, aunque hemos optado por el 60%, ha sido con el objetivo de maximizar las diferencias entre las pacientes con macroprolactinemia y las hiperPRLs monoméricas. Sin embargo, ello no excluye que pacientes con porcentajes de recuperación superiores presenten un comportamiento similar. De hecho, nuestros propios datos confirman una variabilidad intraindividual de hasta un 20%, que condicionan la correcta catalogación de cada caso.

8. CONCLUSIONES

8.1. CONCLUSIONES ESTUDIO OBSERVACIONAL

- En una cuarta parte de nuestras pacientes hiperprolactinemicas, esta es atribuible a la presencia de macrocomplejos de PRL.
- Las pacientes con macroprolactinemia presentan una frecuencia de sintomatología asociada similar a las pacientes con hiperprolactinemia monomérica.
- Las alteraciones menstruales en estas pacientes son de una intensidad menor.
- Las pacientes sintomáticas con macroPRL no tienen valores de PRL postPEG superiores a las asintomáticas.
- Las pacientes con hiperprolactinemia monomérica presenta una frecuencia más alta de patología tumoral hipofisaria.
- Las pacientes con macroprolactinemia presentan una mayor probabilidad de patología autoinmune.

8.2. CONCLUSIONES ESTUDIO DINÁMICO

- Tanto la PRL total como la postPEG aumentan significativamente tras la administración de metoclopramida en todos los grupos estudiados.
- La respuesta de la PRL total y la postPEG fueron similares en los grupos de hiperprolactinemia monomérica y control y diferente en las macroprolactinemias.
- El AUC y la Cmax de la PRL total y postPEG en el grupo de macroprolactinemias fue superior a las hiperprolactinemias monoméricas, sin diferencias con el grupo control.
- El porcentaje de recuperación de PRL fue diferente entre los tres grupos estudiados.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Lewis UJ, Singh RN, Seavey BK. Human prolactin: isolation and some properties. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1971 Sep [cited 2015 Nov 16];44(5):1169–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5168561>
2. Hwang P, Robertson M, Guyda H, Friesen H. The purification of human prolactin from frozen pituitary glands. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1973 Jun [cited 2015 Nov 16];36(6):1110–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4706200>
3. Owerbach D, Rutter WJ, Cooke NE, Martial JA, Shows TB. The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science* [Internet]. 1981 May 15 [cited 2015 Nov 20];212(4496):815–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7221563>
4. Truong AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell GI, et al. Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J* [Internet]. 1984 Feb [cited 2015 Nov 20];3(2):429–37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=557362&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Gellersen B, Kempf R, Telgmann R, DiMattia GE. Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol Endocrinol* [Internet]. 1994 Mar [cited 2015 Nov 6];8(3):356–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8015553>
6. Berwaer M, Martial JA, Davis JR. Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. *Mol Endocrinol* [Internet]. 1994 May [cited 2015 Nov 6];8(5):635–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8058071>
7. Berwaer M, Monget P, Peers B, Mathy-Hartert M, Bellefroid E, Davis JR, et al. Multihormonal regulation of the human prolactin gene expression from 5000 bp of its upstream sequence. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 1991 Sep [cited 2015 Nov 20];80(1-3):53–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1955081>
8. Shome B, Parlow AF. Human pituitary prolactin (hPRL): the entire linear amino acid sequence. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1977 Nov [cited 2015 Nov 20];45(5):1112–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/925136>
9. de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* [Internet]. 1992 Jan 17 [cited 2015 Nov 20];255(5042):306–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1549776>
10. Ignacak A, Kasztelnik M, Sliwa T, Korbut RA, Rajda K, Guzik TJ. Prolactin - Not only lactotrophin a “new” view of the “old” hormone. *J Physiol Pharmacol*. 2012;63(5):435–43.
11. Suh HK, Frantz AG. Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1974 Nov [cited 2015 Nov 20];39(5):928–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4213557>
12. Kasum M, Oreskovic S, Zec I, Jezek D, Tomic V, Gall V, et al. Macroprolactinemia: new insights in

- hyperprolactinemia. *Biochem medica* [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Nov 4];22(2):171–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4062336&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Kasum M, Pavičić-Baldani D, Stanić P, Orešković S, Sarić J-M, Blajić J, et al. Importance of macroprolactinemia in hyperprolactinemia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2014;183C:28–32. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301211514005375>
 14. Smith CR, Norman MR. Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. *Ann Clin Biochem* [Internet]. 1990 Nov [cited 2015 Nov 20];27 (Pt 6):542–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2080857>
 15. Horrobin DF. *Prolactin (Annual Research Reviews)* vol. 8. St. Albans, Vermont: Eden Press; 1980. 152 p.
 16. Nicholl CS. Synthesis and release of adenohipophyseal hormones (biochemical endocrinology series). In: Jutisz M, McKerns K, editors. *General and Comparative Endocrinology*, Vol 45, Is 4. New York: Plenum Press; 1980. p. 538.
 17. van den Pol AN. Excitatory neuromodulator reduces dopamine release, enhancing prolactin secretion. *Neuron* [Internet]. 2010 Jan 28 [cited 2015 Nov 23];65(2):147–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2839927&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 18. Nicoll CS. Some observations and speculation on the mechanism of “depletion,” “repletion,” and release of adenohipophyseal hormones. *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. 1972 Jan [cited 2015 Nov 16];3:86–96. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0016648072901360>
 19. Jordan RM, Kendall JW. Dissociation of plasma and CSF prolactin heterogeneity. *Acta Endocrinol (Copenh)* [Internet]. 1978 Sep [cited 2015 Nov 16];89(1):38–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/696175>
 20. Farquhar MG, Reid JJ, Daniell LW. Intracellular transport and packaging of prolactin: a quantitative electron microscope autoradiographic study of mammothrophs dissociated from rat pituitaries. *Endocrinology* [Internet]. 1978 Jan [cited 2015 Nov 16];102(1):296–311. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/743954>
 21. DiMattia GE, Gellersen B, Bohnet HG, Friesen HG. A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin. *Endocrinology* [Internet]. 1988 Jun [cited 2015 Nov 6];122(6):2508–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2836165>
 22. Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* [Internet]. 1996 Dec [cited 2015 Nov 6];17(6):639–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8969972>
 23. Linkowski P, Spiegel K, Kerkhofs M, L’Hermite-Balériaux M, Van Onderbergen A, Leproult R, et al.

- Genetic and environmental influences on prolactin secretion during wake and during sleep. *Am J Physiol* [Internet]. 1998 May [cited 2015 Nov 6];274(5 Pt 1):E909–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9612250>
24. Parker DC, Rossman LG, Vander Laan EF. Sleep-related, nyctothermeral and briefly episodic variation in human plasma prolactin concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1973 Jun [cited 2015 Nov 6];36(6):1119–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4706201>
25. Yen SSC. Prolactin in human reproduction. In: Yen SSC, Jaffe RB, editors. *Reproductive Endocrinology*. 2nd. ed. Philadelphia: WB Saunders Co.; 1986. p. 237–63.
26. Egli M, Leeners B, Kruger THC. Prolactin secretion patterns: basic mechanisms and clinical implications for reproduction. *Reproduction* [Internet]. 2010 Nov [cited 2015 Nov 23];140(5):643–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20733016>
27. Díaz S, Serón-Ferré M, Cárdenas H, Schiappacasse V, Brandeis A, Croxatto HB. Circadian variation of basal plasma prolactin, prolactin response to suckling, and length of amenorrhea in nursing women. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1989 May [cited 2015 Nov 23];68(5):946–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2715293>
28. Stern JM, Reichlin S, Díaz S, Serón-Ferré M, Cárdenas H, Schiappacasse V, et al. Prolactin circadian rhythm persists throughout lactation in women. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1989 May [cited 2015 Nov 23];68(5):946–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2715293>
29. Imegawa W. Control of mammary gland growth and development. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press; 1994. p. 1033–63.
30. Brisken C, Kaur S, Chavarria TE, Binart N, Sutherland RL, Weinberg RA, et al. Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev Biol* [Internet]. 1999 Jun 1 [cited 2015 Nov 23];210(1):96–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364430>
31. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* [Internet]. 1998 Jun [cited 2015 Nov 9];19(3):225–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9626554>
32. Calogero AE, Weber RF, Raiti F, Burrello N, Moncada ML, Mongioì A, et al. Involvement of corticotropin-releasing hormone and endogenous opioid peptides in prolactin-suppressed gonadotropin-releasing hormone release in vitro. *Neuroendocrinology* [Internet]. 1994 Sep [cited 2015 Nov 23];60(3):291–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7969787>
33. Bernard V, Young J, Chanson P, Binart N. New insights in prolactin: pathological implications. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2015;11(5):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25781857>
34. Marano RJ, Ben-Jonathan N. Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2014;28(5):622–33. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24694306>
35. Horseman ND, Gregerson KA. Prolactin actions. *J Mol Endocrinol* [Internet]. 2013;52(1):R95–106. Available from: <http://jme.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1530/JME-13-0220>
 36. Goffin V, Bouchard B, Ormandy CJ, Weimann E, Ferrag F, Touraine P, et al. Prolactin: a hormone at the crossroads of neuroimmunoendocrinology. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1998 May 1 [cited 2015 Nov 23];840:498–509. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9629276>
 37. Breves JP, Serizier SB, Goffin V, McCormick SD, Karlstrom RO. Prolactin regulates transcription of the ion uptake Na⁺/Cl⁻ cotransporter (ncc) gene in zebrafish gill. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2013 Apr 30 [cited 2015 Nov 17];369(1-2):98–106. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3664226&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 38. Buskila D, Shoenfeld Y. Prolactin, bromocriptine and autoimmune diseases. *Isr J Med Sci* [Internet]. 1996 Jan [cited 2015 Nov 23];32(1):23–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8550342>
 39. Walker SE, Allen SH, McMurray RW. Prolactin and autoimmune disease. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 1993 Jul [cited 2015 Nov 23];4(5):147–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18407149>
 40. Vera-Lastra O, Jara LJ, Espinoza LR. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2002 Dec [cited 2015 Nov 6];1(6):360–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12848992>
 41. Chavez-Rueda K, Hernández J, Zenteno E, Leaños-Miranda A, Legorreta-Haquet MV, Blanco-Favela F. Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. *Clin Immunol* [Internet]. 2005 Aug [cited 2015 Nov 6];116(2):182–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15993365>
 42. Tomio A, Schust DJ, Kawana K, Yasugi T, Kawana Y, Mahalingaiah S, et al. Prolactin can modulate CD4⁺ T-cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2008 Oct [cited 2015 Nov 6];86(7):616–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18414429>
 43. Imrich R. The role of neuroendocrine system in the pathogenesis of rheumatic diseases (minireview). *Endocr Regul* [Internet]. 2002 Jun [cited 2015 Nov 10];36(2):95–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12207559>
 44. Buskila D, Berezin M, Gur H, Lin HC, Alosachie I, Terryberry JW, et al. Autoantibody profile in the sera of women with hyperprolactinemia. *J Autoimmun* [Internet]. 1995 Jun [cited 2015 Nov 10];8(3):415–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7576002>
 45. Pathipati P, Gorba T, Scheepens A, Goffin V, Sun Y, Fraser M. Growth hormone and prolactin regulate human neural stem cell regenerative activity. *Neuroscience* [Internet]. 2011 Sep 8 [cited

- 2015 Nov 23];190:409–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21664953>
46. Stumpe KO, Kolloch R, Higuchi M, Krück F, Vetter H. Hyperprolactinaemia and antihypertensive effect of bromocriptine in essential hypertension. Identification of abnormal central dopamine control. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1977 Jul 30 [cited 2015 Nov 23];2(8031):211–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/69827>
47. Chen BL, Zhang ZH, Liu NB, Huang KS. [Prolactin in normal pregnancy and severe pregnancy-induced hypertension]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* [Internet]. 2001 Feb 28 [cited 2015 Nov 23];26(1):67–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12536622>
48. Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, Bonda T, Schaefer A, Sliwa K, et al. A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* [Internet]. 2007 Feb 9 [cited 2015 Oct 27];128(3):589–600. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17289576>
49. Parissis JT, Farmakis D, Fountoulaki K, Rigas A, Nikolaou M, Paraskevaidis IA, et al. Clinical and neurohormonal correlates and prognostic value of serum prolactin levels in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* [Internet]. 2013 Oct [cited 2015 Nov 23];15(10):1122–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23639781>
50. Landberg E, Dahlström U, Alehagen U. Serum prolactin and macroprolactin in heart failure: no relation to established laboratory or clinical parameters. *Ann Clin Biochem* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Nov 23];48(Pt 1):51–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115571>
51. Brooks CL. Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocr Rev* [Internet]. 2012 Aug [cited 2015 Nov 23];33(4):504–25. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3410225&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
52. Kałuzny M, Bolanowski M. [Hyperprolactinemia: etiology, clinical symptoms, and therapy]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* [Internet]. 2005 Jan [cited 2015 Nov 23];59:20–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761382>
53. ARGONZ J, DEL CASTILLO EB. A syndrome characterized by estrogenic insufficiency, galactorrhea and decreased urinary gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1953 Jan [cited 2015 Nov 13];13(1):79–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13022752>
54. Miyai K, Ichihara K, Kondo K, Mori S. Asymptomatic hyperprolactinaemia and prolactinoma in the general population--mass screening by paired assays of serum prolactin. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 1986 Nov [cited 2015 Nov 23];25(5):549–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3621622>
55. Josimovich JB, Lavenhar MA, Devanesan MM, Sesta HJ, Wilchins SA, Smith AC. Heterogeneous distribution of serum prolactin values in apparently healthy young women, and the effects of oral contraceptive medication. *Fertil Steril* [Internet]. 1987 May [cited 2015 Nov 4];47(5):785–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3569555>
56. Biller BM. Hyperprolactinemia. *Int J Fertil Womens Med* [Internet]. Jan [cited 2015 Nov

- 25];44(2):74–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338264>
57. Mancini T, Casanueva FF, Giustina A. Hyperprolactinemia and prolactinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* [Internet]. 2008 Mar [cited 2015 Nov 23];37(1):67–99, viii. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18226731>
58. Torre D La, Falorni A. Pharmacological causes of hyperprolactinemia. *Ther Clin Risk Manag* [Internet]. 2007 Oct [cited 2015 Nov 23];3(5):929–51. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2376090&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
59. Calaf J, Rodríguez-Espinosa J. Exploración bioquímica del eje hipotálamo-hipofisario ovárico. In: González Sastre F, editor. *Bioquímica Clínica*. Barcelona: Editorial Barcanova S.A.; 1994. p. 453–81.
60. Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Griffin ML, Kelch RP. GnRH pulses--the regulators of human reproduction. *Trans Am Clin Climatol Assoc* [Internet]. 1993 Jan [cited 2015 Nov 23];104:31–46. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2376610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
61. Capozzi A, Scambia G, Pontecorvi A, Lello S. Hyperprolactinemia: pathophysiology and therapeutic approach. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2015 Jul [cited 2015 Oct 28];31(7):506–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26291795>
62. Verhelst J, Abs R. Hyperprolactinemia: pathophysiology and management. *Treat Endocrinol* [Internet]. 2003 Jan [cited 2015 Nov 23];2(1):23–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15871552>
63. Godo G, Koloszar S, Daru J, Falkay G, Sas M. Variations in prolactin secretion in hyper- and normoprolactinaemia with or without galactorrhoea. *Acta Med Hung* [Internet]. 1989 Jan [cited 2015 Nov 23];46(1):43–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2771583>
64. Hattori N, Inagaki C. Anti-prolactin (PRL) autoantibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia: bioassay and clearance studies of PRL-immunoglobulin G complex. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1997 Sep [cited 2015 Nov 4];82(9):3107–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9284753>
65. 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* [Internet]. 1997 May [cited 2015 Nov 4];34 (Pt 3):252–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9158821>
66. Hauache OM, Rocha AJ, Maia ACM, Maciel RMB, Vieira JGH. Screening for macroprolactinaemia and pituitary imaging studies. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2002 Sep [cited 2015 Nov 4];57(3):327–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12201824>
67. Whittaker PG, Wilcox T, Lind T. Maintained fertility in a patient with hyperprolactinemia due to big, big prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1981 Oct [cited 2015 Nov 4];53(4):863–6. Available

from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7287870>

68. Jackson RD, Wortsman J, Malarkey WB. Macroprolactinemia presenting like a pituitary tumor. *Am J Med* [Internet]. 1985 Feb [cited 2015 Nov 17];78(2):346–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3918443>
69. Leaños-Miranda A, Ramírez-Valenzuela KL, Campos-Galicia I, Chang-Verdugo R, Chinolla-Arellano LZ. Frequency of Macroprolactinemia in Hyperprolactinemic Women Presenting with Menstrual Irregularities, Galactorrhea, and/or Infertility: Etiology and Clinical Manifestations. *Int J Endocrinol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Nov 10];2013:478282. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3806165&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
70. Hattori N, Ishihara T, Saiki Y, Shimatsu A. Macroprolactinaemia in patients with hyperprolactinaemia: composition of macroprolactin and stability during long-term follow-up. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2010 Dec [cited 2015 Nov 10];73(6):792–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20874771>
71. Wallace IR, Satti N, Courtney CH, Leslie H, Bell PM, Hunter SJ, et al. Ten-year clinical follow-up of a cohort of 51 patients with macroprolactinemia establishes it as a benign variant. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2010 Jul [cited 2015 Nov 10];95(7):3268–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20427494>
72. Radavelli-Bagatini S, Lhullier FL, Mallmann ES, Spritzer PM. Macroprolactinemia in women with hyperprolactinemia: a 10-year follow-up. *Neuro Endocrinol Lett* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Nov 23];34(3):207–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685418>
73. Kramer CK, Tourinho TF, de Castro WP, da Costa Oliveira M. Association between systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, hyperprolactinemia and thyroid autoantibodies. *Arch Med Res* [Internet]. Jan [cited 2015 Nov 17];36(1):54–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777996>
74. Vallette-Kasic S, Morange-Ramos I, Selim A, Gunz G, Morange S, Enjalbert A, et al. Macroprolactinemia revisited: a study on 106 patients. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2002 Feb [cited 2015 Nov 4];87(2):581–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11836289>
75. Kavanagh-Wright L, Smith TP, Gibney J, McKenna TJ. Characterization of macroprolactin and assessment of markers of autoimmunity in macroprolactinaemic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2009 Apr [cited 2015 Nov 17];70(4):599–605. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18771565>
76. Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med* [Internet]. 2001 Aug [cited 2015 Nov 17];7(8):899–905. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11479621>
77. Hattori N, Ikekubo K, Nakaya Y, Kitagawa K, Inagaki C. Immunoglobulin G subclasses and prolactin (PRL) isoforms in macroprolactinemia due to anti-PRL autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2005 May [cited 2015 Nov 23];90(5):3036–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15687336>

78. Gibney J, Smith TP, McKenna TJ. Clinical relevance of macroprolactin. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2005 Jun [cited 2015 Nov 23];62(6):633–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15943822>
79. Melmed S, Kleinberg d KH. Anterior Pituitary. In: Melmed S; Polonsky K S, editor. *Williams text book of endocrinology*. Philadelphia: PAWB Saunders; 2003. p. 177–279.
80. Larrea F, Escorza A, Valero A, Hernandez L, Cravioto MC, Diaz-Sanchez V. Heterogeneity of serum prolactin throughout the menstrual cycle and pregnancy in hyperprolactinemic women with normal ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1989 May [cited 2015 Nov 23];68(5):982–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2715295>
81. Hattori N. The frequency of macroprolactinemia in pregnant women and the heterogeneity of its etiologies. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1996 Feb [cited 2015 Nov 23];81(2):586–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8636272>
82. Isik S, Berker D, Tutuncu YA, Ozuguz U, Gokay F, Erden G, et al. Clinical and radiological findings in macroprolactinemia. *Endocrine* [Internet]. 2012 Apr [cited 2015 Nov 10];41(2):327–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22187359>
83. Mounier C, Trouillas J, Claustrat B, Duthel R, Estour B. Macroprolactinaemia associated with prolactin adenoma. *Hum Reprod* [Internet]. 2003 Apr [cited 2015 Nov 4];18(4):853–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660284>
84. Elenkova A, Genov N, Abadzhieva Z, Kirilov G, Vasilev V, Kalinov K, et al. Macroprolactinemia in patients with prolactinomas: prevalence and clinical significance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* [Internet]. 2013 Apr [cited 2015 Nov 10];121(4):201–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23595795>
85. Aron DC, Howlett TA. Pituitary incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* [Internet]. 2000 Mar [cited 2015 Nov 4];29(1):205–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10732272>
86. Glezer A, Soares CRJ, Vieira JG, Giannella-Neto D, Ribela MTCP, Goffin V, et al. Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2006 Mar [cited 2015 Nov 17];91(3):1048–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16384849>
87. 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 simple polyethylene glycol precipitation method. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2001 Jun [cited 2015 Nov 4];86(6):2743–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11397880>
88. Vilar L, Naves LA, Freitas MC, Lima M, Canadas V, Albuquerque JL, et al. Clinical and laboratory features greatly overlap in patients with macroprolactinemia or monomeric hyperprolactinemia. *Minerva Endocrinol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2015 Nov 10];32(2):79–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17557033>

89. Fraser IS, Lun ZG, Zhou JP, Herington AC, McCarron G, Caterson I, et al. Detailed assessment of big big prolactin in women with hyperprolactinemia and normal ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1989 Sep [cited 2015 Nov 10];69(3):585–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2503534>
90. Carlson HE, Markoff E, Lee DW. On the nature of serum prolactin in two patients with macroprolactinemia. *Fertil Steril* [Internet]. 1992 Jul [cited 2015 Nov 10];58(1):78–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1624027>
91. Lewandowski KC, Gasior-Perczak D, Kowalska A, Lewinski A. Coexistence of macroprolactinaemia and hyperprolactinaemia in women with oligo-/amenorrhoea is associated with high risk of pituitary adenomas. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2014 May [cited 2015 Nov 23];30(5):385–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24533748>
92. Olukoga AO. Macroprolactinemia is clinically important. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2002 Oct [cited 2015 Nov 23];87(10):4833–4; author reply 4834. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12364483>
93. Nicoll CS. Bio-assay of prolactin. Analysis of the pigeon crop-sac response to local prolactin injection by an objective and quantitative method. *Endocrinology* [Internet]. 1967 Apr [cited 2015 Nov 20];80(4):641–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6022052>
94. Cowie AT, Tindal JS. Prolactin and related amyotrophic hormones. In: *The physiology of lactation*. London: Arnold, E Pub.; 1971. p. 53–83.
95. Sinha YN, Selby FW, Lewis UJ, VanderLaan WP. A homologous radioimmunoassay for human prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1973 Mar [cited 2015 Nov 20];36(3):509–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4631065>
96. Ashby D. Prolactin. In: *Pesce A, Kaplan L, editors. Methods in clinical chemistry*. St. Louis: CV Mosby Co.; 1987. p. 258–65.
97. Jeffcoate SL, Bacon RR, Beastall GH, Diver MJ, Franks S, Seth J. Assays for prolactin: guidelines for the provision of a clinical biochemistry service. *Ann Clin Biochem* [Internet]. 1986 Nov [cited 2015 Nov 20];23 (Pt 6):638–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3541770>
98. Kricka LJ, Phil D, Path FRC. Principles of immunochemical Techniques. In: *Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1999. p. 209–10.
99. Rodríguez Espinosa J, Vanrell C, Sánchez Quesada JL, Espinós JJ, Calaf J GSF. Prevalencia de macroprolactinemia en mujeres hiperprolactinémicas. Implicaciones clínicas. In: *Gestión del Laboratorio Clínico Prevención de Riesgos*. Madrid: Fundación Mapfre Medicina Ed.Editorial Mapfre SA; 2003. p. 137–52.
100. Schulte HE, Heremans JF. *Molecular biology of human proteins*. Amsterdam: Elsevier; 1966. 256 p.

101. Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. A normal ovulatory woman with hyperprolactinemia: presence of anti-prolactin autoantibody and the regulation of prolactin secretion. *Acta Endocrinol (Copenh)* [Internet]. 1992 Jun [cited 2015 Nov 20];126(6):497–500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1642083>
102. Bjørø T, Mørkrid L, Wergeland R, Turter A, Kvistborg A, Sand T, et al. Frequency of hyperprolactinaemia due to large molecular weight prolactin (150-170 kD PRL). *Scand J Clin Lab Invest* [Internet]. 1995 Apr [cited 2015 Nov 10];55(2):139–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7667607>
103. Zapico E, Rodríguez-Espinosa J. Evaluación analítica y clínica de la técnica de precipitación con polietilenglicol para el escrutinio de macroprolactinemia en pacientes hiperprolactinémicos. Trabajo de investigación del Programa de Master en Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Universitat Autònoma de Barcelona; 2001.
104. 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* [Internet]. 1982 Nov [cited 2015 Nov 23];38(5):625–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7128848>
105. Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, et al. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2011 Feb [cited 2015 Oct 22];96(2):273–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296991>
106. Koch L. New Endocrine Society guidelines for hyperprolactinemia-piecing together the pituitary puzzle. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2011 May [cited 2015 Nov 23];7(5):247. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21502938>
107. 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* [Internet]. 2003 Sep [cited 2015 Nov 23];49(9):1504–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12928232>
108. Fahie-Wilson M, Smith TP. Determination of prolactin: The macroprolactin problem. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2013;27(5):725–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2013.07.002>
109. Espinoza JR, Trigos-Landa A, Bocanegra-Garcia V, et als. Assessment of macroprolactin after polyethylene glycol precipitation in two commercial immunoassay. *Bioquimia*. 2006;31:140–5.
110. Beltran L, Fahie-Wilson MN, McKenna TJ, Kavanagh L, Smith TP. Serum total prolactin and monomeric prolactin reference intervals determined by precipitation with polyethylene glycol: evaluation and validation on common immunoassay platforms. *Clin Chem* [Internet]. 2008 Oct [cited 2015 Nov 24];54(10):1673–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719199>
111. Kavanagh L. Specificity and Clinical Utility of Methods for the Detection of Macroprolactin. *Clin Chem* [Internet]. 2006;52(7):1366–72. Available from:

<http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2005.065854>

112. McCudden CR, Sharpless JL, Grenache DG. Comparison of multiple methods for identification of hyperprolactinemia in the presence of macroprolactin. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2010 Feb [cited 2015 Nov 4];411(3-4):155–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2957292&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
113. Ram S, Harris B, Fernando JJR, Gama R, Fahie-Wilson M. False-positive polyethylene glycol precipitation tests for macroprolactin due to increased serum globulins. *Ann Clin Biochem* [Internet]. 2008 May [cited 2015 Nov 24];45(Pt 3):256–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18482912>
114. Kilvington F, Rahim A, Kavanagh L, Et A. False negative PEG precipitation test in a case of hyperprolactinemia with an IgA macroprolactin. *Ann Clin Biochem*. 2006;43:35.
115. Smith TP, Kavanagh L, Healy M-L, McKenna TJ. Technology insight: measuring prolactin in clinical samples. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* [Internet]. 2007 Mar [cited 2015 Nov 24];3(3):279–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17315036>
116. Hattori N, Ishihara T, Saiki Y. Macroprolactinaemia: prevalence and aetiologies in a large group of hospital workers. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2009 Nov [cited 2015 Nov 24];71(5):702–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19486017>
117. 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* [Internet]. 1994 May [cited 2015 Nov 24];130(5):438–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8180669>
118. Molitch ME, Russell EJ. The pituitary “incidentaloma”. *Ann Intern Med* [Internet]. 1990 Jun 15 [cited 2015 Nov 24];112(12):925–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2187392>
119. Pinto LP, Hanna FWF, Evans LM, Davies JS, John R, Scanlon MF. The TSH response to domperidone reflects the biological activity of prolactin in macroprolactinaemia and hyperprolactinaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2003 Nov [cited 2015 Nov 10];59(5):580–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14616880>
120. Cowie AT FS. *Scientific Foundations of Obstetrics and Gynaecology*. Heinemann Medical Books. London: Ed. Philipp EE, Barnes J & Newton M.; 1970. 423-432 p.