

**PREVALENCIA DE MACROPROLACTINA Y SÍNTOMAS CLÍNICOS DE
HIPERPROLACTINEMIA EN PACIENTES CON FUNCIÓN TIROIDEA NORMAL Y EN
HIPOTIROIDEAS EN ESTADO DE EUTIROIDISMO**

Inchauspe ME., Cabral MF., Ghiglione F., Díaz Battán G., López Naranjo Y., de Elías R.,
Leszczynski M., Cano N., Kiener O., Arja AM., Ortiz G. y Andrada M.

Laboratorio central y Servicio de Endocrinología, Sanatorio Allende, Córdoba.

mariaelviainc@yahoo.com

RESUMEN

Macroprolactina es un complejo de prolactina de alto peso molecular que causa hiperprolactinemia. **OBJETIVOS:** Determinar prevalencia de macroprolactina en pacientes hiperprolactinémicas con función tiroidea normal (N) o hipotiroideas en estado de eutiroidismo (H), establecer prevalencia de síntomas clínicos de hiperprolactinemia en pacientes con macroprolactinemia y comparar valores de prolactina residual precipitando con polietilenglicol en buffer fosfato o en agua bidestilada. **PACIENTES Y MÉTODOS:** En 118 mujeres hiperprolactinémicas (72 N y 46 H) se midió prolactina sérica basal y luego de la precipitación con polietilenglicol-buffer o polietilenglicol-agua bidestilada. Se calculó porcentaje de prolactina recuperada en sobrenadante y se consideró evidencia de macroprolactinemia una recuperación <50%. Se valoró prolactina mediante electroquimioluminiscencia. **RESULTADOS:** Los niveles de prolactina de las pacientes variaron entre 30 y 330 ng/ml. La prevalencia de macroprolactina fue 25% en las 118 pacientes, 26% en el grupo N y 24% en el grupo H. EL 50% de las pacientes con macroprolactina (11 N y 4 H), presentó síntomas de hiperprolactinemia. Cinco mostraron alteraciones en la resonancia magnética nuclear hipofisaria. La correlación entre polietilenglicol-buffer fosfato y polietilenglicol-agua bidestilada fue excelente. **CONCLUSIONES:** La prevalencia de macroprolactina en hipotiroideas en estado de eutiroidismo fue similar a la de pacientes con función tiroidea normal implicando que en estas condiciones no hay variación en la composición de las isoformas de prolactina. La existencia de síntomas de hiperprolactinemia en mujeres con macroprolactina sugiere que la macroprolactinemia puede ser causa de morbilidad por lo que es necesario efectuar la pesquisa de macroprolactina con polietilenglicol para investigar si la hiperprolactinemia puede deberse o no a la presencia de macroprolactina, pudiendo utilizarse polietilenglicol-buffer fosfato o polietilenglicol-agua bidestilada en forma indistinta para precipitar el complejo macroprolactina.

PALABRAS CLAVE

Hiperprolactinemia, macroprolactina, hipotiroidismo, polietilenglicol.

INTRODUCCIÓN

La prolactina (PRL) sérica humana presenta una heterogeneidad molecular en circulación que puede ser identificada por cromatografía de filtración en gel (CFG). En la población general la forma predominante es el monómero de 23 kDa que representa aproximadamente el 85% de la PRL circulante. Las otras formas incluyen el dímero de la PRL nativa o *big*-PRL (50 kDa), presente en un 10-15% y una cantidad pequeña pero variable de macroprolactina (MPRL) (150-170 kDa). La presencia de MPRL en plasma es una de las principales causas de hiperprolactinemia. Se estima que entre un 15 a 28 % de las hiperprolactinemias detectadas son debidas a esta variedad molecular. La MPRL consiste en un complejo de PRL de etiología heterogénea y de alto peso molecular. Está constituido principalmente por el monómero de PRL unido a IgG, pero se han reportado también uniones de PRL a otros anticuerpos como IgA, polímeros de PRL monomérica unidos por puentes disulfuro, agregados del monómero con uniones covalentes y no covalentes y complejos de PRL glicosilada (1,2-4). Como consecuencia de estas uniones, la MPRL es depurada de la circulación más

lentamente que el monómero y por lo tanto se acumula en suero produciendo una hiperprolactinemia aparente. Se han estudiado cambios postraduccionales, como fosforilación y desfosforilación en sitios serina, que serían responsables del cambio de antigenicidad de la molécula de PRL y de la generación de autoanticuerpos contra PRL. Si bien las subclases de IgG específicas para PRL son heterogéneas, algunos pacientes con macroprolactinemia mostraron predominio de IgG4; la respuesta de esta subclase ocurre en estimulación antigénica crónica y juega un rol importante en condiciones alérgicas (5).

El método patrón para el estudio de esta macromolécula es la CFG. Esta técnica consume mucho tiempo, es de alto costo y no está disponible en los laboratorios clínicos de rutina (6). La precipitación con polietilenglicol (PEG), que utiliza PEG en buffer fosfato pH 7,4, demostró ser una técnica útil para detectar MPRL, de bajo costo, fácil de implementar en la rutina y que guarda buena correlación con la CFG (7,8). La heterogeneidad molecular de MPRL produce importantes diferencias en la reactividad de PRL en los distintos inmunoensayos, hecho que puede inducir a errores en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con hiperprolactinemia (9). Por esta razón, se aconseja la detección de MPRL en el estudio de todos los pacientes con niveles elevados de PRL y considerar el valor de PRL residual de los sueros pre-tratados con PEG (10,11).

La elevación de la PRL es frecuente en pacientes con hipotiroidismo primario, especialmente si la hipofunción tiroidea es de prolongada evolución. La hiperprolactinemia está presente en el 20% de pacientes con hipotiroidismo subclínico y puede llegar hasta un 40% en los casos de hipotiroidismo clínico (12-15); sin embargo, son muy escasas las publicaciones sobre la prevalencia de MPRL en estos pacientes.

Los pacientes con predominio de MPRL no deberían presentar manifestaciones típicas de hiperprolactinemia como galactorrea o síntomas asociados a hipogonadismo (oligomenorrea, amenorrea o infertilidad en mujeres, disminución de la libido o disfunción eréctil en hombres) ya que se cree que la MPRL tiene reducida actividad al estar unida al anticuerpo (16-18), pero se han reportado casos de pacientes con aumento de MPRL que presentaron esos síntomas (4,19-21).

OBJETIVOS

- Determinar la prevalencia de MPRL en pacientes hipotiroideas con hiperprolactinemia y compararla con la de mujeres hiperprolactinémicas con función tiroidea normal.
- Establecer la prevalencia de síntomas clínicos de hiperprolactinemia en las pacientes con MPRL.
- Comparar los niveles de PRL residual después de precipitar con PEG preparado en buffer fosfato pH 7,4 ó con PEG disuelto en agua bidestilada.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 118 mujeres con niveles de PRL sérica superiores a 30 ng/ml, que fueron atendidas en el Sanatorio Allende de Córdoba por el Servicio de Endocrinología y posteriormente derivadas al Laboratorio Central. De ellas, 72 con edades entre 12 y 56 años, tenían función tiroidea normal y habían realizado consultas médicas por presentar uno o más síntomas de

hiperprolactinemia (oligomenorrea, polimenorrea, galactorrea, amenorrea y dificultad para lograr el embarazo). Otras 46 pacientes con edades entre 18 y 56 años que eran hipotiroideas, se hallaban bajo medicación con L-Tiroxina y en condiciones de eutiroidismo al momento del estudio.

Para la extracción de sangre fue necesario que las pacientes cumplieran estrictamente con las condiciones requeridas para la valoración de PRL: ayuno de 8 hs, abstinencia sexual, 2 hs de vigilia y reposo de 30 minutos previo a la extracción. En las pacientes que menstruaban regularmente se extrajo sangre entre los días 3° y 5° del ciclo menstrual. Fueron excluidas las pacientes bajo tratamiento con fármacos que producen aumento de los niveles de PRL. Las muestras de sangre fueron centrifugadas y se valoró la PRL en suero (PRL basal). Para el estudio de MPRL los sueros obtenidos fueron almacenados en freezer a -70°C hasta su procesamiento. La pesquisa de MPRL se realizó en las 118 muestras de suero mediante la precipitación con PEG 6000 (Anedra), para lo cual se tomaron 2 alícuotas de suero de 150 ul. Se agregaron 150 ul de PEG (250g/l) preparado en buffer fosfato pH 7,4 (PEG B) a una de ellas y a la otra 150 ul de PEG (250 g/l) disuelto en agua bidestilada (PEG A). Las muestras se mezclaron en un agitador vórtex, se dejaron reposar 10 minutos y se centrifugaron a 1500 g durante 30 minutos a 4°C. Se separaron los sobrenadantes y en ellos se midió nuevamente la PRL. El valor obtenido de PRL en el sobrenadante se expresó como porcentaje de PRL recuperada (PRL%) y como PRL residual o libre (ng/ml). Una recuperación menor al 50% se consideró evidencia de macroprolactinemia (22).

La valoración de PRL en el suero y los sobrenadantes se realizó mediante un inmunoensayo inmunométrico basado en electroquimioluminiscencia (Elecsys 2010 ROCHE).

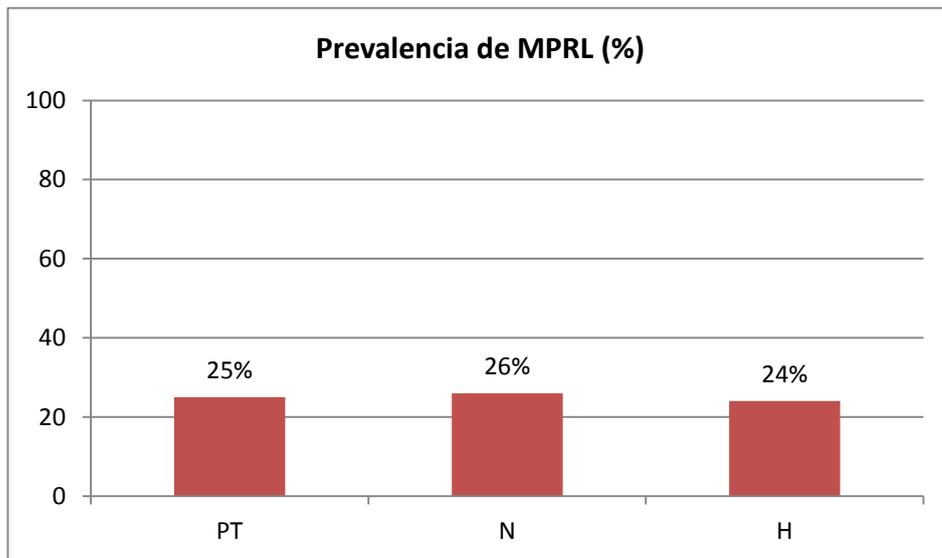
Análisis estadístico: se calcularon la prevalencia de MPRL en el total y en cada uno de los dos grupos de pacientes estudiadas, y la prevalencia de síntomas de hiperprolactinemia o alteraciones en la resonancia magnética nuclear (RMN) hipofisaria en las mujeres con predominio de MPRL.

Se utilizó análisis de regresión lineal simple para comparar la precipitación de las muestras tratadas con PEG A o PEG B. $p < 0.05$ se consideró significativa.

RESULTADOS

En el total de las 118 pacientes, 30 de ellas (25%) tuvieron un predominio de MPRL, 19 (26%) pertenecían al grupo N y 11 (24%) al grupo H (Fig I).

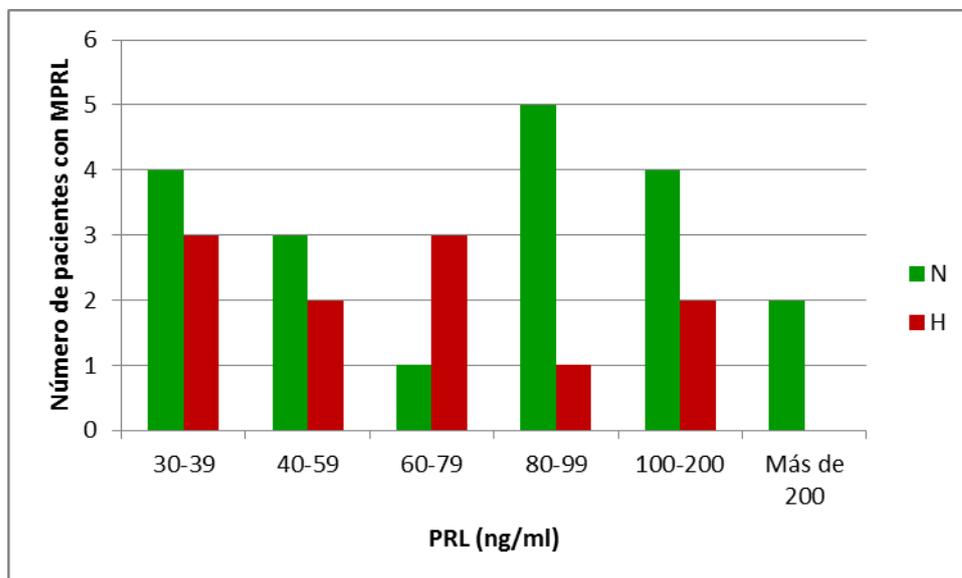
Figura I. Prevalencia de MPRL en pacientes con hiperprolactinemia.



PT: pacientes totales; N: pacientes con función tiroidea normal; H: pacientes hipotiroides.

Los niveles de PRL de las pacientes variaron entre 30 y 330 ng/ml. La figura II muestra la distribución de pacientes con MPRL de acuerdo al rango de la PRL basal. Hubo proporcionalmente mayor cantidad de pacientes N que tuvieron valores de PRL superiores a 80 ng/ml. En la mayoría de las pacientes H los niveles de PRL fueron inferiores a 100 ng/ml.

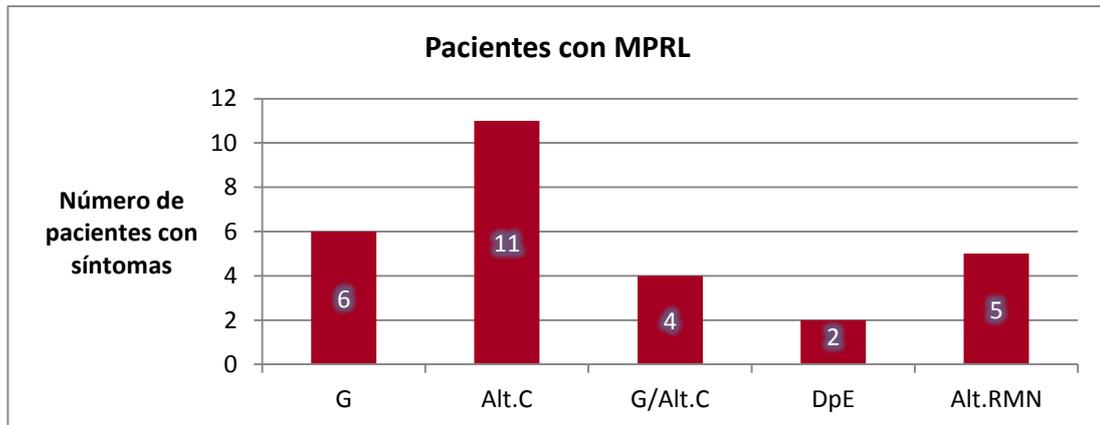
Figura II. Distribución de pacientes hiperprolactinémicas con MPRL según los valores de PRL basal.



N: pacientes con función tiroidea normal; H: pacientes hipotiroides.

EL 50% de las pacientes con MPRL (11 N y 4 H), presentó algunos síntomas de hiperprolactinemia como dificultad para lograr el embarazo, alteraciones del ciclo menstrual y/o galactorrea. En 5 de ellas (17%) se informaron alteraciones en las imágenes de RMN hipofisaria de las cuales 4 fueron prolactinomas y correspondieron a las pacientes N (Fig.III). Cinco de las pacientes con predominio de MPRL (1 H y 4 N), presentaron también PRL libre aumentada y de éstas, 4 evidenciaron síntomas de hiperprolactinemia.

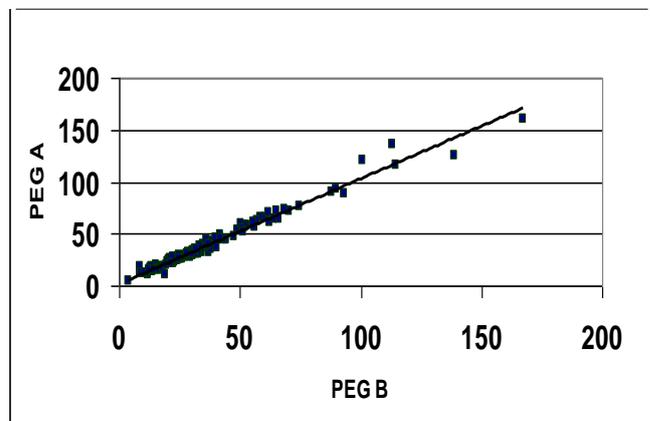
Figura III. Pacientes con MPRL que presentaron síntomas de hiperprolactinemia y/o alteraciones en la RMN de hipófisis.



G: galactorrea; Alt.C: alteraciones del ciclo menstrual; DpE: dificultad para lograr embarazo; Alt.RMN: alteraciones en la RMN hipofisaria.

Los resultados de las muestras precipitadas con PEG A y PEG B no tuvieron diferencia significativa y se observó muy poca dispersión de los datos. Como se observa en la Fig. IV, la curva de regresión lineal fue muy buena ($y=1.837+0.997x$) y el coeficiente de correlación obtenido fue excelente ($r=0.991$; $p<0.001$).

Figura IV. Comparación de las muestras de suero precipitadas con PEG en agua bidestilada y PEG en buffer fosfato pH 7,4.



PEG A: polietilenglicol en agua bidestilada; PEG B: polietilenglicol en buffer fosfato pH 7,4

DISCUSIÓN

La hiperprolactinemia es una condición común causada principalmente por desórdenes pituitarios, hipotiroidismo primario o el uso de medicaciones, pero algunas veces se considera idiopática o de causa desconocida. Los microprolactinomas que no pueden ser detectados por estudios de imágenes y las hiperprolactinemias a expensas de MPRL se incluyen dentro de las llamadas hiperprolactinemias idiopáticas (23). Dependiendo de las causas y consecuencias de la hiperprolactinemia, determinados pacientes requieren tratamiento específico.

La macroprolactinemia es una causa frecuente de hiperprolactinemia. Son numerosas las publicaciones que han reportado la prevalencia de MPRL en pacientes con niveles elevados de PRL.

En la mayoría de los estudios se encontró MPRL en 15-28% de las muestras de sujetos hiperprolactinémicos (6,24-34). Sólo un trabajo reportó una prevalencia de 10% en 1106 pacientes hiperprolactinémicos. Es probable que esta cifra más baja se deba a que los autores se limitaron a investigar la presencia de MPRL sólo en los sujetos con hiperprolactinemia asintomática e idiopática y no en el total del grupo (35). Por otro lado, otras 2 publicaciones han informado prevalencias más elevadas de MPRL, de hasta 53% y 66% (30,33). En este último caso, el aumento de prevalencia puede deberse a que el estudio comprendía solamente mujeres con hiperprolactinemia asintomática. En el presente trabajo se estudiaron 118 mujeres con hiperprolactinemia y se halló MPRL en el suero de 32 de ellas, obteniéndose un prevalencia de 25%, similar a la reportada por la mayoría de las publicaciones. Cuando se analizaron por separado las pacientes con función tiroidea normal y las hipotiroideas, la prevalencia de macroprolactinemia fue semejante en ambos grupos (24% y 26% respectivamente). Esta similitud en los resultados podría atribuirse al estado de eutiroidismo de las pacientes hipotiroideas lo que implica que, en estas condiciones, la distribución de las isoformas circulantes de PRL es similar a la de sujetos sin patología tiroidea. Sin embargo, la única publicación que hallamos sobre prevalencia de hiperprolactinemia y macroprolactinemia en mujeres con patología tiroidea reportó que el 90% de las pacientes hiperprolactinémicas tenían predominio de MPRL. En este trabajo, Lewandowski y col. estudiaron 182 mujeres, de las cuales 92% tenían diagnóstico de Tiroiditis de Hashimoto. Todas estas pacientes se hallaban también en condiciones de eutiroidismo clínico y bioquímico y sólo el 40% recibía tratamiento con L-tiroxina. El número de pacientes hiperprolactinémicas reportado por estos autores fue muy escaso, de tan sólo 9 pacientes, lo que podría explicar la marcada diferencia en la proporción de pacientes con MPRL entre nuestro estudio y el de Lewandowski y col. (26% vs 90%) (36).

La PRL es considerada una hormona inmunomoduladora que estimula la proliferación y diferenciación de varias células del sistema inmune y tiene un rol muy importante en enfermedades autoinmunes (37,38). Existen datos contradictorios sobre la asociación de MPRL y autoinmunidad. Por un lado, Kavanagh-Wright y col. no hallaron diferencias en los niveles de anticuerpos antitiroideos cuando compararon sueros de sujetos normales, hiperprolactinémicos verdaderos y macroprolactinémicos; Lewandowski y col. encontraron similar prevalencia de MPRL en mujeres con patología tiroidea autoinmune y no autoinmune (36,38,39). En cambio, una publicación reciente halló un incremento significativo de autoanticuerpos tiroideos en pacientes hiperprolactinémicos en relación a controles sanos, si bien estos autores no investigaron la presencia de MPRL (40). En nuestro estudio no fue posible establecer relación entre autoinmunidad tiroidea y MPRL debido que no se poseían datos suficientes sobre el nivel de anticuerpos antitiroideos de las pacientes estudiadas.

Los pacientes con macroprolactinemia, hipotiroidismo, hiperprolactinemia farmacológica o microprolactinomas, presentan valores de PRL sérica que oscilan dentro de un rango similar, por lo que la medición del nivel de prolactina sérica no es suficiente para establecer la presencia de MPRL, y puede conducir a un falso diagnóstico de hiperprolactinemia. En la mayoría de los pacientes con MPRL se observan niveles de PRL <100 ng/ml, y sólo en pocos casos la prolactinemia pueden ser >100 ng/ml (41). Nuestros resultados fueron similares, el 73% de las pacientes macroprolactinémicas tuvo niveles de PRL <100 ng/ml y el 27% >100ng/ml. En el grupo de pacientes H, hubo predominio de

prolactinemias <100 ng/ml, en cambio, valores >100 ng/ml se observaron con mayor frecuencia en las mujeres N asociados a la presencia de prolactinomas.

La MPRL tiene un peso molecular elevado que dificulta su pasaje a través del endotelio vascular. Se ha postulado que no ejerce actividad biológica *in vivo* debido fundamentalmente a su incapacidad para atravesar la pared capilar y alcanzar los receptores de PRL (42). Esta confinación al espacio intravascular aumenta su vida media y disminuye su biodisponibilidad, lo que explica que la mayoría de las pacientes con macroprolactinemia no presente síntomas clínicos característicos del exceso de PRL como galactorrea, esterilidad o alteraciones del ciclo menstrual (16,17,43). Sin embargo, *in vitro*, la MPRL presenta una actividad biológica completa. El complejo macroprolactínico es estable *in vitro* y no parece ser fácilmente dissociable, por lo que es difícil de estudiar. No obstante, la bioactividad del complejo IgG-PRL medida en bioensayos Nb2 es normal, y se ha sugerido que las incubaciones prolongadas y las condiciones de mayor dilución del ensayo producirían disociación del complejo y liberación del monómero de PRL. En consecuencia, si bien la bioactividad de MPRL *in vivo* es baja debido a los autoanticuerpos anti-PRL, la PRL monomérica dissociada de los anticuerpos sería capaz de retener completamente su actividad biológica en pacientes con macroprolactinemia. (18,44). En el presente trabajo, el 50% de las pacientes con MPRL manifestaron tener oligomenorrea, galactorrea o dificultad para lograr embarazo y el 17% tuvo alguna alteración en los resultados de RMN de hipófisis. Es posible que la macroprolactina sufra disociaciones intermitentes dada la baja afinidad aunque alta capacidad de los anticuerpos IgG, incrementando la biodisponibilidad de la PRL monomérica (45). Esto explicaría el hallazgo de pacientes macroprolactinémicos con síntomas como galactorrea, amenorrea, e infertilidad (4,19-21). También se han reportado pacientes con macroadenoma hipofisario e hiperprolactinemia debida casi exclusivamente a MPRL, que presentaban signos y síntomas de hiperprolactinemia y que remitieron después del tratamiento, lo que da indicios de la bioactividad del complejo IgG-PRL (46,47). En 6 de nuestras pacientes con MPRL los niveles de PRL libre o residual estaban elevados, sin embargo, sólo 4 de ellas presentaban síntomas de hiperprolactinemia que eran precisamente las que mostraban asociación de MPRL y prolactinoma.

La composición de MPRL es muy variable, tanto en el contenido y tipo de inmunoglobulinas como en el grado de glicosilación. Esta heterogeneidad molecular produce importantes diferencias en la reactividad de PRL en los distintos inmunoensayos, lo que puede inducir a errores en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con hiperprolactinemia (48,49). Por esta razón, la mayoría de los investigadores aconsejan la detección de MPRL en el estudio de todos los pacientes con niveles elevados de PRL (31). Algunos consideran que la pesquisa de MPRL debe realizarse en todos los pacientes con valores de PRL 2 veces por encima del límite superior del valor de referencia (8,19,20, 31,34,47,49-53), mientras que otros sugieren investigar MPRL solamente en casos de hiperprolactinemias idiopáticas o asintomáticas (23,54). La precipitación con PEG es una técnica de bajo costo y fácil de implementar en el laboratorio de rutina cuando se quiere estudiar la presencia de MPRL (6). Se ha comprobado que PEG precipita no sólo MPRL sino también el dímero de PRL nativa o *big*-PRL y cantidades variables del monómero, por lo cual, los valores de la PRL residual o libre obtenidos con PEG son más bajos que los de CFG (alrededor de un 77%), sin embargo, la

correlación con CFG es buena (55,56). El método original utiliza PEG 8000 en buffer fosfato pH 7,4 (23,31) mientras que otros trabajos precipitan con PEG 6000 (22). Nosotros comparamos los valores de PRL libre después de precipitar con PEG 6000 que fue diluido en buffer fosfato pH 7,4 o en agua bidestilada. La comparación entre ambos resultó muy buena por lo que consideramos que la preparación de PEG en agua bidestilada es más sencilla y puede utilizarse de igual manera que PEG-buffer en la precipitación de MPRL.

CONCLUSIONES

La prevalencia de MPRL en mujeres hipotiroideas en estado de eutiroidismo resultó similar a la de pacientes con función tiroidea normal lo que sugiere que en estas condiciones de hipotiroidismo no habría variación en la composición de las isoformas circulantes de PRL. Sería importante en un futuro ampliar el estudio a sujetos hipotiroideos que no se hallen en estado de eutiroidismo para establecer si niveles disminuidos de hormona tiroidea pueden afectar la distribución de las formas moleculares de PRL.

Las pacientes con hiperprolactinemia pueden presentar una gran variabilidad en la expresión clínica. El 50% de nuestras pacientes con MPRL tuvieron síntomas como oligomenorrea, galactorrea o dificultad para lograr embarazo y el 17% tuvo alguna alteración en los resultados de RMN de hipófisis. Considerando que la relevancia clínica de la macroprolactinemia es todavía motivo de controversia, estos resultados toman gran importancia porque implican que la macroprolactinemia puede ser causa de morbilidad. De esto surge la necesidad de efectuar la pesquisa de MPRL con PEG a fines de establecer la causa de hiperprolactinemia para su correcto tratamiento, pudiendo utilizarse PEG en agua bidestilada o PEG en buffer fosfato en forma indistinta para precipitar el complejo MPRL.

REFERENCIAS

1. 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* 2010;73:792-7.
2. Jackson RD, Wortsman J, Malarkey WB. Characterization of a large molecular weight prolactin in women with idiopathic hyperprolactinemia and normal menses. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:258-64.
3. Carlson HE, Markoff E, Lee DW. On the nature of serum prolactin in two patients with macroprolactinemia. *Fertil Steril* 1992;58:78-87.
4. Hattori N. The frequency of macroprolactinemia in pregnant women and the heterogeneity of its etiologies. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:586-90.
5. 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* 2005;90:3036-44.

6. Fahie-Wilson MN, Soule SG. Macroprolactinemia: contribution to hyperprolactinemia in a district general hospital and evaluation of a screening test based upon precipitation with polyethylene glycol. *Ann Clin Biochem* 1997;34:252–8.
7. Kavanagh L, McKenna TJ, Fahie-Wilson M, Gibney J, Smith TP. Specificity and clinical utility of methods for the detection of macroprolactin. *Clin Chem* 2006;52:1366-72.
8. Shimatsu A, Hattori N. Macroprolactinemia: diagnostic, clinical, and pathogenic significance. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:1-7.
9. Ellis G. Degradation of crystalline polyethylene glycol 6000 and its effect on assays for macroprolactin and other analytes. *Clin Biochem* 2006;39:1035-40.
10. Suliman AM, Smith TP, Gibney J, McKenna TJ. Frequent misdiagnosis and mismanagement of hyperprolactinemic patients before the introduction of macroprolactin screening: application of a new strict laboratory definition of macroprolactinemia. *Clin Chem* 2003;49:1504-9.
11. 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* 2008;54:1673-81.
12. Notsu K, Ito Y, Furuya H, Ohguni S, And Kato Y. Incidence of hyperprolactinemia in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Endocr J* 1997;44:89-94.
13. Hekimsoy Z, Kafesçiler S, Güçlü F and Özmen B. The prevalence of hyperprolactinaemia in overt and subclinical hypothyroidism. *Endocr J* 2010;57:1011-15.
14. Sharma N, Baliarsingh S, Kaushik GG. Biochemical association of hyperprolactinemia with hypothyroidism in infertile women. *Clin Lab* 2012;58:805-10.
15. Emokpae MA, Osadolor HB, Omole Ohonsi A. Sub-clinical hypothyroidism in infertile nigerian women with hyperprolactinaemia. *Niger J Physiol Sci* 2011;26:35-8.
16. Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, And Kurahachi H. Correlation of the antibody titers with serum prolactin levels and their clinical course in patients with antiprolactin autoantibody. *Eur J Endocrinol* 1994;130:438–45.
17. Hattori N and Inagaki C. Anti-prolactin (PRL) autoantibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia: bioassay and clearance studies of PRL-immunoglobulin G complex. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3107–10.
18. Glezer A, Soares CR, Vieira JG, Giannella-Neto D, Ribela MT, Goffin V, Bronstein MD. Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1048-55.
19. Fahie-Wilson M. In hyperprolactinemia, testing for macroprolactin is essential. *Clin Chem* 2003;49:1434-6.
20. Thirunavakkarasu K, Dutta P, Sridhar S, Dhaliwal L, Prashad GR, Gainer S, Sachdeva N, Bhansali A. Macroprolactinemia in hyperprolactinemic infertile women. *Endocrine* 2013;44:750-5.
21. Can M, Guven B, Atmaca H, Acikgoz S, Mungan G. Clinical characterization of patients with macroprolactinemia and monomeric hyperprolactinemia. *Kaohsiung J Med Sci* 2011;27:173-6.

22. Fahie-Wilson M, Brunnsden P, Surrey J, and Everitt A. Macroprolactin and the Roche Elecsys prolactin assay: Characteristics of the reaction and detection by precipitation with polyethylene glycol. *Clin Chem* 2000;46:1993-5.
23. Hattori N, Ishihara T, Ikekubo K, Moridera K, Hino M, And Kurahachi H. Autoantibody to human prolactin in patients with idiopathic hyperprolactinemia. *J Clin End Metab* 1992;75:1226-9.
24. Bjoro I, Morkrid K, Wereland R, Turter A, Kvistborg A, Sand T, Torjesen P. Frequency of hyperprolactinemia due to large molecular weight prolactin (150–170 kDa PRL). *Scand J Clin lab Invest* 1995;55:139–47.
25. Olukoga AO, Kane JW. Macroprolactinemia: validation and application of the polyethylene glycol precipitation test and clinical characterization of the condition. *Clin Endocrinol* 1999;51:119–26.
26. Gilberto J, Vieira H, Tachibana TT, Obara LH, Maciel RMB. Extensive experience and validation of polyethylene glycol precipitation as a screening method for macroprolactinemia. *Clin Chem* 1998;44:1758–89.
27. Toldy E, Locsei Z, Szabolcs I, Goth MI, Kneffel P, Szoke D, Kovács GL. Macroprolactinemia: the consequences of a laboratory pitfall. *Endocrine* 2000;22:267-73.
28. Leslie H, Courtney CH, Bell PM, Hadden DR, McCance DR, Ellis PK, Sheridan B, Atkinson AB. Laboratory and clinical experience in 55 patients with macroprolactinemia identified by a simple polyethylene glycol precipitation method. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2743-6.
29. Strachan MW, Teoh WL, Don-Wauchope AC, Seth J, Stoddart M, Beckett GJ. Clinical and radiological features of patients with macroprolactinaemia. *Clin Endocrinol* 2003;59:339-46.
30. Amadori P, Dilberis C, Marcolla A. All the studies on hyperprolactinemia should not forget to consider the possible presence of macroprolactinemia. *Europ J Endocrinol* 2004;150:93-4.
31. Gibney J, Smith T, Mckenna TJ. Clinical relevance of macroprolactin. *Clin Endocrinol* 2005;62:633-43.
32. Theunissen C, De Schepper J, Schiettecatte J, Verdood P, Hooghe-Peeters EL, Velkeniers B. Macroprolactinemia: clinical significance and characterization of the condition. *Acta Clin Belg* 2005;60:190-7.
33. Gezer A, Atasu T, Hekim C, Stenman UH, Hekim N. Hyperprolactinaemia does not always mean 'hyperprolactinaemia'!. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;118:206-8.
34. Radavelli-Bagatini S, Lhullier FL, Mallmann ES, Spritzer PM. Macroprolactinemia in women with hyperprolactinemia: a 10-year follow-up. *Neuro Endocrinol Lett* 2013;34:207-11.
35. Vallette-Kasic S, Morange-Ramos I, Selim A, Gunz G, Morange S, Enjalbert A, Martin PM, Jaquet P, Brue T. Macroprolactinemia revisited: a study on 106 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:581-8.
36. Lewandowski KC, Gaşior-Perczak D, Kowalska A, Lewiński A. Prevalence of macroprolactinaemia in regularly menstruating women with non-toxic goitre or autoimmune thyroid disease. *Thyroid Res* 2012;5:20.
37. Leañes Miranda A, Quintal Alvarez MG, Cervera Castillo H, Blanco Favela F. Prolactin as an immunomodulator. *Rev Alerg Mex* 1997;44:116-23.

38. Vera-Lastra O, Jara LJ, Espinoza LR. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2002;1:360-4.
39. Kavanagh-Wright L, Smith TP, Gibney J, Mckenna TJ. Characterization of macroprolactin and assessment of markers of autoimmunity in macroprolactinaemic patients. *Clin Endocrinol* 2009;70:599-605.
40. Sayki Arslan M, Sahin M, Topaloglu O, Tural E, Karakose M, Gungunes A, Cakal E, Ozbek M, Delibasi T. Hyperprolactinaemia associated with increased thyroid volume and autoimmune thyroiditis in patients with prolactinoma. *Clin Endocrinol* 2013;79:882-6.
41. Vilar L, Moura E, Canadas V, Gusmão A, Campos R, Leal E, Teixeira L, Santos V, Gomes B, Lima M, Paiva R, Albuquerque JL, Egito CS, Botelho CA, Azevedo M, Casulari LA, Naves LA. Prevalence of macroprolactinemia among 115 patients with hyperprolactinemia. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51:86-91.
42. Leños-Miranda A, Pascoe-Lira D, Chávez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Persistence of macroprolactinemia due to antiprolactin autoantibody before, during, and after pregnancy in a woman with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metabol* 2001;86:2619-24.
43. Hattori N, Ishihara T, Ikekubo K, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Autoantibody to human prolactin in patients with idiopathic hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metabol* 1992;75:1226-9.
44. Hattori N, Nakayama Y, Kitagawa K, Ishihara T, Saiki Y, Inagaki C. Anti-prolactin (PRL) autoantibodies suppress PRL bioactivity in patients with macroprolactinaemia. *Clin Endocrinol* 2008;68:72-6.
45. Olukoga AO. Macroprolactinemia is clinically important. *J Clin Endocrinol Metabol* 2002;87:4833-4.
46. Elenkova A, Abadzhieva Z, Genov N, Vasilev V, Kirilov G, And Zacharieva S. Macroprolactinemia in a patient with invasive macroprolactinoma: a case report and minireview. *Case Rep Endocrinol* 2013; 2013:634349.
47. Elenkova A, Genov N, Abadzhieva Z, Kirilov G, Vasilev V, Kalinov K, Zacharieva S. Macroprolactinemia in patients with prolactinomas: prevalence and clinical significance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2013;121:201-5.
48. Smith TP, Suliman AM, Fahie-Wilson MN, And Mckenna TJ. Gross variability in the detection of prolactin in sera containing big big prolactin (macroprolactin) by commercial immunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5410-5.
49. John R, McDowell IF, Scanlon MF, Ellis AR. Macroprolactin reactivities in prolactin assays: an issue for clinical laboratories and equipment manufacturers. *Clin Chem* 2000;46:884-5.
50. Schlechte JA. Editorial: the macroprolactin problem. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5408-9.
51. Glezer A, D'alva CB, Bronstein MD, Vieira JGH. Macroprolactina e incidentaloma hipofisário. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2001;45:190-8.
52. Vieira JG. Macroprolactinemia. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2002;46:45-50.
53. Veloza A, Prazeres S. Prolactin and the laboratory. *Acta Med Port* 2011;24:1029-34.

54. Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, Wass JA. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:273-88.
55. Fahie-Wilson. Polyethylene glycol precipitation as a screening method for macroprolactinemia. *Clin Chem* 1999;45:436-7.
56. Vieira JG, Tachibana TT, Obara LH, Maciel RM. Extensive experience and validation of polyethylene glycol precipitation as a screening method for macroprolactinemia. *Clin Chem* 1998;44:1758-9.