

Maria do Carmo Dias Gontijo

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MACROPROLACTINEMIA EM AMOSTRAS
HIPERPROLACTINÊMICAS, ATRAVÉS DA CONCENTRAÇÃO DE PROLACTINA
MONOMÉRICA DOSADA APÓS PRECIPITAÇÃO COM POLIETILENO GLICOL

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto
Belo Horizonte – MG
2016

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MACROPROLACTINEMIA EM AMOSTRAS
HIPERPROLACTINÊMICAS, ATRAVÉS DA CONCENTRAÇÃO DE PROLACTINA
MONOMÉRICA DOSADA APÓS PRECIPITAÇÃO COM POLIETILENO GLICOL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do
Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior
Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo de Souza Vasconcellos
Colaborador: Prof. Dr. Pedro Guatimosim Vidigal

Belo Horizonte – MG

2016

G641a Gontijo, Maria do Carmo Dias.
Avaliação da presença de macroprolactinemia em amostras hiperprolactinêmicas, através da concentração de prolactina monomérica dosada após precipitação com polietileno glicol [manuscrito]. / Maria do Carmo Dias Gontijo. -- Belo Horizonte: 2016.
97f.
Orientador: Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior.
Coorientador: Leonardo de Souza Vasconcellos.
Área de concentração: Saúde do Adulto.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Hiperprolactinemia/sangue. 2. Hiperprolactinemia/diagnóstico. 3. Prolactina. 4. Imunoensaio. 5. Polietilenoglicóis. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Oliveira Júnior, Antônio Ribeiro de. II. Vasconcellos, Leonardo de Souza. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WK 515

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

Vice-reitora: Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-reitor de Pós-graduação: Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira

Pró-reitor de Pesquisa: Prof. Dr. Ado Jório

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-diretor: Prof. Dr. Humberto José Alves

Coordenador Geral do Centro de Pós-graduação: Prof. Dr. Luiz Armando Cunha de Marco

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto:

Profa. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Colegiado de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto:

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Prof. Paulo Caramelli

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Profa. Rosângela Teixeira

Profa. Gilda Aparecida Ferreira

Profa. Suely Meireles Rezende

Mônica Maria Teixeira (Representante Discente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial, agradeço:

Aos meus orientadores Antônio e Léo, pelo apoio, dedicação e pela confiança em meu potencial

Ao colaborador Pedro, pelas muitas horas dedicadas

Ao Dr. José Gilberto Vieira, pela enorme disponibilidade em realizar os testes de cromatografia

À Rosângela e Cleusa pelo incentivo, pelo carinho e aos amigos do Núcleo da Qualidade, TPI e Coordenação do laboratório

A todos os colegas e funcionários do laboratório que de alguma forma e a seu modo participaram desta jornada

Aos pacientes

Aos professores e aos colegas da pós-graduação

Às amigas Lú, Bê, Ana, Gláucia e Nelma, que acompanharam cada etapa com especial atenção

Aos meus pais, sempre presentes com amor

Aos queridos filhos Gustavo, Marcelo e Cecília, absolutamente essenciais em toda minha caminhada pela vida

Aos netos, noras e genro, pelo carinho, pela torcida

Ao Fernando, pelo apoio e compreensão

A todos os meus familiares, especialmente aos meus irmãos

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Amostras utilizadas nas dosagens de prolactina no equipamento <i>Architect</i> [®] (<i>Abbott</i>), nos experimentos do estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial (SML) do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). | 31 |
| Tabela 2 - Especificação desejável da qualidade para a prolactina ⁶⁶ | 34 |
| Tabela 3 - Estudo de precisão em duas amostras séricas com concentrações distintas de prolactina processadas no equipamento <i>Architect</i> [®] (<i>Abbott</i>), realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 43 |
| Tabela 4 - Estudo de linearidade da prolactina (ng/mL) no equipamento <i>Architect</i> [®] (<i>Abbott</i>) realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 44 |
| Tabela 5 - Estimativa dos coeficientes da equação de regressão linear. Estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 44 |
| Tabela 6 - Resultados de 20 dosagens séricas de prolactina (PRL) em ng/mL, processadas nos equipamentos <i>Architect</i> [®] e <i>Vitros 5600</i> [®] , no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 46 |
| Tabela 7 - Resultados de 40 prolactinas séricas processadas nos equipamentos <i>Architect</i> [®] (<i>Abbott</i>) e <i>Vitros</i> [®] 5600(<i>Ortho-Clinical Diagnostics</i>), no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 48 |
| Tabela 8 - Resultados de testes laboratoriais de 20 mulheres voluntárias. Os testes foram realizados no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 50 |
| Tabela 9 - Resultados de testes laboratoriais de 20 homens voluntários. Os testes foram realizados no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 51 |
| Tabela 10 - Resultado médio das dosagens de prolactina dos 112 pacientes do estudo, estratificado pelo tipo de prolactina. Estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 54 |
| Tabela 11 - Comparação dos métodos de interpretação da pesquisa de macroprolactina: intervalo de referência de prolactina (PRL) monomérica pós-polietileno glicol (pós-PEG) e % | |

| | |
|--|----|
| recuperação. Estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais | 55 |
| Tabela 12: Dados dos pacientes com hiperprolactinemia e resultado positivo na pesquisa de macroprolactina, em estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 59 |
| Tabela 13 - Resultados da prolactina (PRL) sérica (ng/mL) antes e após precipitação com polietileno glicol (PEG), da porcentagem de recuperação de prolactina pós-PEG e da cromatografia em coluna de gel filtração (GFC). | 61 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Síntese e estrutura da prolactina monomérica, <i>big</i> prolactina ou dímero e <i>big big</i> prolactina ou macroprolactina (Adaptado de Lippi G, Plebani M) | 17 |
| Figura 2 - Tratamento do soro com polietileno glicol (PEG) | 22 |
| Figura 3 - Ilustração esquemática do princípio do ensaio imunométrico tipo “sanduiche” para dosagem de prolactina. São usados dois anticorpos específicos para diferentes epítomos da molécula de prolactina. Um anticorpo de captura é ligado a uma fase sólida e um anticorpo de detecção é marcado com um gerador de sinal (Adaptado de Fahie-Wilson M, Smith TP). | 25 |
| Figura 4 - Total de dosagens de prolactina realizadas no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, entre maio de 2012 e abril de 2016. | 42 |
| Figura 5 - Comparação entre as médias das replicatas da prolactina sérica e a estimacão da regressão linear, frente à concentração relativa. Estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais | 45 |
| Figura 6 - Correlacão entre os resultados de 20 dosagens séricas de prolactina, processadas nos equipamentos <i>Architect</i> [®] (Abbott) e <i>Vitros</i> [®] 5600(<i>Ortho-ClinicalDiagnostics</i>), no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 47 |
| Figura 7 - Dispersão das diferenças de 40 dosagens séricas de prolactina em relacão à média das diferenças \pm dois desvios padrões (DP). As amostras foram processadas nos equipamentos <i>Architect</i> [®] (Abbott) e <i>Vitros</i> [®] 5600(<i>Ortho-Clinical Diagnostics</i>), no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 49 |
| Figura 8 - Dispersão das diferenças de 40 dosagens séricas de prolactina em relacão à média das diferenças \pm dois desvios padrões (DP), mais o limite do erro total permitido (ET). As amostras foram processadas nos equipamentos <i>Architect</i> [®] (Abbott) e <i>Vitros</i> [®] 5600(<i>Ortho-Clinical Diagnostics</i>), no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 49 |
| Figura 9 - Distribuicão por faixa etária das 96 mulheres e dos 14 homens do estudo, realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 52 |

| | |
|--|----|
| Figura 10 - Frequência (%) de macroprolactinemia em relação ao nível sérico de prolactina total em 21 amostras processadas no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais..... | 53 |
| Figura 11 - Distribuição da frequência de macroprolactinemia nas amostras de 96 mulheres e de 16 homens. Estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 54 |
| Figura 12 - Distribuição dos resultados de prolactina monomérica pós-PEG de 96 mulheres em relação a porcentagem (%) de recuperação. A linha pontilhada corresponde a 16,37 ng/mL, limite superior do intervalo de referência feminino. Estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 56 |
| Figura 13 - Distribuição dos resultados de prolactina monomérica pós-PEG de 16 homens em relação a porcentagem (%) de recuperação. A linha pontilhada corresponde a 10,80 ng/mL, limite superior do intervalo de referência masculino. Estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. | 57 |
| Figura 14 - Perfil de eluição de prolactina (PRL) obtido pela cromatografia em coluna de gel filtração (Superdex™ 200, 0,9x30cm, alíquotas de 0,7 mL) em soro com macroprolactinemia (a) e com hiperprolactinemia verdadeira (b). | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------|--|
| ALT | alanina aminotransferase |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AST | aspartato aminotransferase |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| CMIA | <i>Chemiluminescent Microparticle Immunoassay</i> (Imunoensaio Quimioluminescente por Micropartículas) |
| CV | coeficiente de variação |
| EDQ | especificações da qualidade analítica |
| <i>et al</i> | <i>and others</i> (e outros) |
| G | força gravitacional ou força centrífuga relativa |
| GFC | cromatografia em coluna de gel filtração |
| HC | Hospital das Clínicas |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alto Desempenho) |
| Ig | imunoglobulina |
| ITO | Instrução de Trabalho Operacional |
| kDa | kilo Daltons |
| µL | microlitro |
| min | minuto |
| mL | mililitro |
| mM | milimol |
| ng | nanograma |
| PBS | tampão fosfato salino |
| PEG | polietileno glicol |
| PRL | prolactina |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| RMN | ressonância nuclear magnética |
| SML | Serviço de Medicina Laboratorial |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| TSH | hormônio estimulante da tireoide |
| TRH | hormônio liberador de tireotrofina |

| | |
|-------|---|
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| UFPML | Unidade Funcional Patologia e Medicina Laboratorial |
| USA | Estados Unidos da América |
| VB | variação biológica |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---|------------------|
| ® | marca registrada |
| ≥ | maior ou igual |
| > | maior |
| < | menor |
| + | mais |
| ± | mais ou menos |
| % | porcentagem |

RESUMO

A macroprolactina é um interferente comum nas dosagens de prolactina por imunoensaios. A identificação da macroprolactinemia pode prevenir erros diagnósticos e condutas inadequadas em pacientes. A pesquisa de macroprolactina após precipitação com o polietileno glicol (PEG) é o método mais utilizado na prática dos laboratórios clínicos. O objetivo geral deste estudo foi avaliar a implantação da pesquisa de macroprolactina em amostras hiperprolactinêmicas, com a interpretação dos resultados baseada na comparação da concentração de prolactina monomérica pós-PEG com um intervalo de referência apropriado no Serviço de Medicina Laboratorial (SML) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG). Os objetivos específicos foram validar o reagente comercial para a dosagem de prolactina no sistema analítico *Architect*[®] (*Abbott*); validar os intervalos de referência para prolactina monomérica pós-PEG; comparar os dois critérios de interpretação da pesquisa de macroprolactina pós-PEG, comparar os resultados de algumas amostras com a cromatografia em coluna de gel filtração (GFC) e avaliar a prevalência de macroprolactinemia na população do estudo. Foi realizada a validação do reagente comercial para dosagem de prolactina com estudos de precisão, linearidade e exatidão. Para verificação dos intervalos de referência de prolactina monomérica pós-PEG, foram utilizadas amostras de 40 pessoas saudáveis. A pesquisa de macroprolactina pela precipitação com PEG foi realizada em 112 amostras hiperprolactinêmicas, 96 mulheres (18-80 anos, mediana 38 anos) e 16 homens, (21-65, 45). Um grupo de 25 amostras foi encaminhada para a GFC. Foi feita uma comparação entre duas abordagens de interpretação dos resultados da pesquisa de macroprolactina e foi calculada a prevalência de macroprolactinemia nas amostras hiperprolactinêmicas estudadas. As validações do reagente para prolactina e dos intervalos de referência foram adequadas às especificações da qualidade previamente estabelecidas. A interpretação dos resultados pela comparação da concentração de prolactina monomérica pós-PEG com um intervalo de referência apropriado apresentou maior especificidade do que o critério convencional de porcentagem de recuperação de prolactina pós-PEG, identificando amostras com excesso simultâneo de macroprolactina e de prolactina monomérica bioativa e reduzindo o número de resultados indeterminados. Houve concordância em 24 resultados da GFC com os encontrados neste estudo. A prevalência de macroprolactinemia encontrada foi de 19%. Recomenda-se a implantação da pesquisa de macroprolactina pela precipitação com o PEG no SML do HC/UFMG, como teste de triagem para as amostras hiperprolactinêmicas. A interpretação do teste pela comparação da concentração de prolactina monomérica pós-PEG, com um intervalo de referência adequado deve ser adotada.

Palavras chaves: prolactina, macroprolactina, hiperprolactinemia, imunoensaio, polietileno glicol

ABSTRACT

Macroprolactin interference is a common problem in the interpretation of immunoassays for prolactin. Identifying macroprolactinemia can prevent errors in diagnosis and subsequent delivery of treatment to patients. The search for macroprolactin after polyethylene glycol (PEG) precipitation is the most commonly used method in clinical laboratories. This study aimed to evaluate the implementation of macroprolactin assessment in hyperprolactinemic samples, with the interpretation of the results based on comparisons between the concentration of post-PEG monomeric prolactin with an appropriate reference range from the Serviço de Medicina Laboratorial (SML) of the Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG). Study objectives included validation of the commercial reagent for prolactin measurement in the analytical system Architect® (Abbott); checking of reference intervals for post-PEG monomeric prolactin; comparison of the two criteria of interpretation for post-PEG macroprolactin assessment, comparing the results to some samples processed by Gel filtration chromatography (GFC); and to assess the prevalence of macroprolactinemia in the study population. Validation of the commercial reagent for the prolactin assay was performed using tests of precision, linearity and accuracy. To check the post-PEG monomeric prolactin reference ranges, we used samples from 40 healthy people. The macroprolactin assessment by PEG precipitation was performed on 112 hyperprolactinemic samples, 96 women (18-80 years old, mean 38) and 16 men (21-65, 45). We compared both interpretations of the results from the macroprolactin test. A subset of 25 samples was sent to the GFC and compared with results from the PEG precipitation assessment. The validations of the commercial reagent for prolactin and of the reference range for prolactin post PEG were in agreement with the predetermined specifications of quality. Comparison of the post-PEG monomeric prolactin concentration with an appropriate reference range showed greater specificity than the conventional criterion percentage of post-PEG prolactin recovery by identifying samples with both excess macroprolactin and monomeric bioactive prolactin and reducing the rate of indeterminate outcomes. Furthermore, most of the results of samples sent to the GFC were in concordance with the results found in this study. The prevalence of macroprolactinemia found was 19%. Based on these results, we recommend the implementation of the macroprolactin assessment with PEG precipitation test at the SML of HC/UFMG, for all hyperprolactinemic samples. Further, the interpretation of the test by comparing post-PEG monomeric prolactin concentration with a suitable reference range should be adopted as it outperformed existing criteria.

Key words: prolactin, macroprolactin, hyperprolactinemia, immunoassay, polyethylene glycol

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1- INTRODUÇÃO | 13 |
| 2- OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 15 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 15 |
| 3- REVISÃO DA LITERATURA | 16 |
| 3.1 PROLACTINA | 16 |
| 3.2. MACROPROLACTINA | 19 |
| 3.3 A DOSAGEM LABORATORIAL DE PROLACTINA | 24 |
| 3.4 ESPECIFICAÇÕES DA QUALIDADE ANALÍTICA | 27 |
| 4- MATERIAIS E MÉTODOS | 30 |
| 4.1 ÉTICA | 30 |
| 4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO | 30 |
| 4.3 DOSAGENS LABORATORIAIS | 33 |
| 4.4 VALIDAÇÃO DO REAGENTE COMERCIAL DE PROLACTINA NO EQUIPAMENTO <i>ARCHITECT</i> [®] (<i>ABBOTT</i>) | 34 |
| 4.4.1 ESTUDO DA PRECISÃO | 35 |
| 4.4.2 ESTUDO DA LINEARIDADE | 35 |
| 4.4.3 ESTUDO DA EXATIDÃO (TESTES DE COMPARAÇÃO) | 36 |
| 4.5 VALIDAÇÃO DO INTERVALO DE REFERÊNCIA DE PROLACTINA MONOMÉRICA PÓS-PEG | 37 |
| 4.6. PESQUISA DE MACROPROLACTINA | 38 |
| 4.7 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO | 40 |
| 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 40 |
| 5- RESULTADOS | 42 |
| 5.1 DOSAGENS LABORATORIAIS | 42 |

| | |
|--|----|
| 5.2 VALIDAÇÃO DO REAGENTE COMERCIAL DE PROLACTINA NO EQUIPAMENTO <i>ARCHITECT</i> [®] (<i>ABBOTT</i>) | 43 |
| 5.2.1 ESTUDO DA PRECISÃO | 43 |
| 5.2.2 ESTUDO DA LINEARIDADE | 44 |
| 5.2.3 ESTUDO DA EXATIDÃO (TESTES DE COMPARAÇÃO) | 46 |
| 5.3 VALIDAÇÃO DO INTERVALO DE REFERÊNCIA DE PROLACTINA MONOMÉRICA PÓS-PEG | 50 |
| 5.4 PESQUISA DE MACROPROLACTINA | 52 |
| 5.5 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO (GFC) | 60 |
| 6 - DISCUSSÃO | 63 |
| 7- CONCLUSÕES | 72 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 73 |
| ANEXOS | 78 |
| ANEXO 1– APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG . . | 78 |
| ANEXO 2 – APROVAÇÃO DA DIRETORIA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DO HC, UFMG | 79 |
| ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE . | 80 |
| ANEXO 4 – FORMULÁRIO DE PESQUISA | 82 |
| ANEXO 5 – HOOK EFFECT AND LINEAR RANGE IN PROLACTIN ASSAYS: DISTINCT CONFOUNDING ENTITIES | 83 |
| ANEXO 6 – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO | 85 |
| ANEXO 7 – ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO | 86 |
| APÊNDICE A | 87 |
| APÊNDICE B | 90 |
| APÊNDICE C | 91 |

1- INTRODUÇÃO

A prolactina é um hormônio polipeptídico, sintetizado e secretado principalmente pelos lactotrofos, células especializadas da hipófise anterior. Este hormônio desempenha um papel essencial na lactação regulando o desenvolvimento das mamas e a produção de leite¹. A secreção da prolactina está sob o controle inibitório do hipotálamo através dos fatores de inibição da prolactina, sendo o principal a dopamina¹⁻³.

A dosagem sérica de prolactina é importante no diagnóstico de adenomas hipofisários secretores de prolactina, as desordens endócrinas mais comuns do eixo hipotálamo-hipófise⁴. A dosagem laboratorial deve representar com acurácia o nível sérico da prolactina monomérica, a fração biologicamente ativa do hormônio^{4,5}.

Laboratórios clínicos utilizam, para a quantificação do nível sérico de prolactina, a metodologia de imunoenaios imunométricos de grande sensibilidade, mas suscetíveis a interferentes como a macroprolactina, isoforma de alto peso molecular da prolactina⁵.

A macroprolactina é um complexo formado, na grande maioria das vezes, por autoanticorpos IgG antiprolactina e prolactina monomérica^{6,7}. É um interferente comum nas dosagens de prolactina, com reatividade variável nos diversos sistemas de imunoenaios^{5,8}.

A macroprolactinemia é a condição onde a hiperprolactinemia é causada pelo excesso de macroprolactina circulante, na presença de concentração normal de prolactina monomérica bioativa^{5,9}. Os sintomas da hiperprolactinemia são comuns e inespecíficos e podem ocorrer coincidentemente em pacientes com macroprolactinemia^{5,7,10}. A literatura revela que a macroprolactinemia não identificada leva a erro de diagnóstico, investigações desnecessárias e tratamentos inadequados. É recomendável a pesquisa de macroprolactina nos pacientes com hiperprolactinemia, especialmente nos assintomáticos^{11,12}. A prevalência de macroprolactinemia em pacientes com hiperprolactinemia varia entre 15 a 35%¹⁰.

O método de pesquisa de macroprolactina mais utilizado é o da precipitação com polietileno glicol (PEG), tecnicamente simples, de baixo custo, além de ter boa reprodutibilidade e correlação com o método de referência, a cromatografia em coluna de gel filtração (GFC, do

inglês, *Gel Filtration Chromatography*)^{5,13}. A interpretação do teste através da comparação da concentração de prolactina monomérica pós-PEG com um intervalo de referência de amostras de indivíduos saudáveis tratadas com PEG é mais específica do que a abordagem convencional, a porcentagem de recuperação de prolactina pós-PEG. Esse novo critério de interpretação mais exigente para o diagnóstico da macroprolactinemia possibilita distinguir a condição onde a macroprolactinemia é a forma dominante, mas há excesso concomitante de prolactina monomérica¹⁴. É importante que o laboratório informe ao clínico as características e limitações do ensaio em uso para a dosagem de prolactina. A interpretação adequada do resultado laboratorial pode ser um suporte importante para a abordagem médica ao paciente.

Uma consulta aos dados informatizados do Serviço de Medicina Laboratorial (SML) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG) mostrou que 35% dos 1070 resultados gerados por ano do ensaio de prolactina estavam acima dos valores de referência. A verificação da prevalência de macroprolactinemia na população do estudo pode contribuir para avaliar a viabilidade da implantação do teste da pesquisa de macroprolactina no Serviço de Medicina Laboratorial do HC, UFMG.

O custo adicional associado a esse procedimento na rotina laboratorial evitaria custos mais elevados em testes de imagem e tratamentos farmacológicos⁷, além de evitar preocupação desnecessária à pacientes¹⁵. Portanto, a implantação da pesquisa de macroprolactina pela precipitação com PEG utilizando a nova abordagem de interpretação dos resultados poderia trazer, com simplicidade, segurança para identificar este interferente na dosagem de prolactina e conseqüentemente maior benefício ao diagnóstico e tratamento dos pacientes com hiperprolactinemia¹⁰.

2- OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a implantação da pesquisa de macroprolactina em amostras hiperprolactinêmicas, através da comparação da concentração de prolactina monomérica pós-polietileno glicol (PEG) com um intervalo de referência de amostras de indivíduos saudáveis tratadas com o PEG, no Serviço de Medicina Laboratorial (SML) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a demanda de solicitações de dosagens séricas de prolactina no SML do HC/UFMG, entre maio de 2012 e abril de 2016;
- Validar o reagente comercial para dosagem de prolactina no equipamento *Architect*[®] (Abbott) com estudos de precisão, linearidade e exatidão;
- Validar o intervalo de referência para prolactina sérica monomérica pós-PEG;
- Comparar as duas abordagens de interpretação dos resultados da pesquisa de macroprolactina: o critério convencional de porcentagem de recuperação de prolactina pós-PEG e o critério de comparação da concentração de prolactina monomérica pós-PEG com um intervalo de referência adequado;
- Comparar os resultados de concentração de prolactina monomérica pós-PEG de um grupo de amostras com a cromatografia em coluna de gel filtração (GFC);
- Avaliar a prevalência de macroprolactinemia na população estudada.

3- REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PROLACTINA

No início do século XX foram feitas as primeiras observações de alterações histológicas na hipófise anterior de mulheres grávidas e a prolactina foi identificada em espécies animais em 1933¹⁶. A prolactina humana foi isolada por Friesen *et al* em 1971¹. A prolactina, o hormônio do crescimento e o hormônio lactogênio placentário possuem grande semelhança estrutural e provavelmente resultaram da evolução de um peptídeo ancestral comum por uma série de reduplicações genéticas¹⁶.

A prolactina é codificada, no ser humano, por um único gene localizado no cromossoma seis. Existe um pré-hormônio de 227 aminoácidos que é clivado e a configuração da molécula madura é uma cadeia única de 199 aminoácidos¹.

A prolactina é sintetizada e secretada principalmente por células especializadas da hipófise anterior, os lactotrofos. No entanto, não é sintetizada somente na hipófise como foi descrito originalmente, mas também no sistema nervoso central, no sistema imune, no útero e tecidos associados à concepção e em células epiteliais da glândula mamária¹. Além do soro, a prolactina pode ser encontrada no líquido, líquido amniótico, lágrimas, leite, líquido folicular e suor. A prolactina é produzida por diferentes tipos de células fora da hipófise. Por isso, além de agir como um hormônio pelo caminho endócrino clássico atua de maneira mais direta, autócrina ou parácrina, como um fator de crescimento, um neurotransmissor ou um imunorregulador¹⁶.

A prolactina desempenha um papel essencial na lactação regulando o desenvolvimento e o crescimento das mamas e a produção do leite. Em concentrações fisiológicas, a prolactina também regula a esteroidogênese e conseqüentemente, a função gonadal. A prolactina tem uma função imunogênica ao estimular a maturação de linfócitos¹⁷. É um hormônio multifuncional que participa da manutenção da homeostase do organismo pela regulação da resposta imune, balanço osmótico e angiogênese¹.

A prolactina é um hormônio heterogêneo que circula numa variedade de formas com diferentes pesos moleculares. A ação biológica da prolactina está associada à fração monomérica, que tem 23 kDa e representa 60% a 90% da prolactina total em circulação. A *big* prolactina ou dímero (40-60 kDa) e a *big big* prolactina ou macroprolactina (>100-150 kDa) estão em proporções menores e variáveis de 15% a 30% e <8% respectivamente, conforme apresentado na Figura 1.

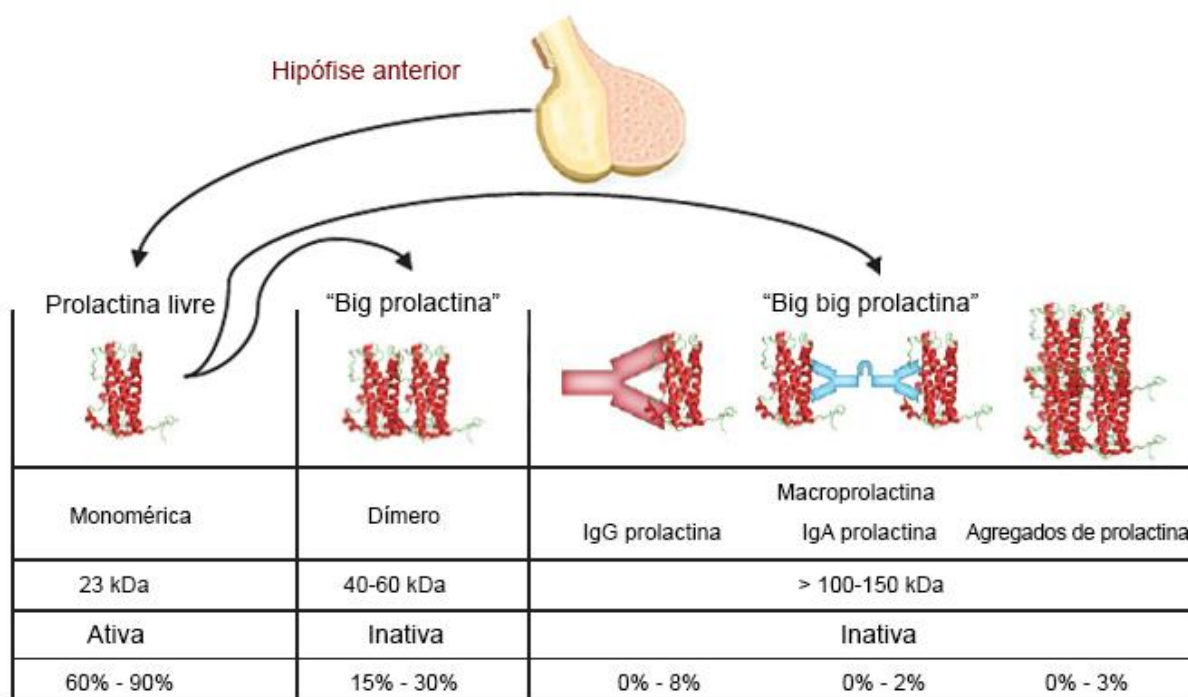


Figura 1 -Síntese e estrutura da prolactina monomérica, *big* prolactina ou dímero e *big big* prolactina ou macroprolactina (Adaptado de Lippi G, Plebani M¹²)

A prolactina também está sujeita a formas variantes, resultantes de clivagem proteolítica 14 kDa, 16 kDa e 22 kDa e modificações pós-translacionais como fosforilação e glicosilação³. Há pouca informação sobre o significado clínico ou sobre a reatividade das formas clivadas ou fosforiladas da prolactina nos imunoenaios. A prolactina glicosilada (25 kDa) exibe reduzida bioatividade e reatividade variável nos imunoenaios, o que pode contribuir para o *bias* (viés) inter-ensaio⁵.

A secreção de prolactina é episódica e tem um ritmo circadiano, com maiores concentrações durante o sono^{1,18}. Durante a gravidez, o número de células lactotróficas se eleva e o nível sérico de prolactina aumenta aproximadamente dez vezes⁵. Por isso, recém-nascidos têm a

prolactina sérica bastante elevada, normalizando em três meses. Situações que induzem um estresse agudo também elevam o nível sérico de prolactina, porém doenças graves prolongadas reduzem sua secreção pulsátil a níveis basais¹⁹.

A secreção da prolactina, ao contrário dos outros hormônios da adenohipófise, está sob controle inibitório do hipotálamo, através dos fatores de inibição de prolactina, como a dopamina²⁰. Um *feedback* negativo com a prolactina circulante estimula a secreção da dopamina hipotalâmica que por sua vez, inibe a liberação de prolactina da hipófise⁵. Alguns fatores hipotalâmicos estimulam a síntese e a liberação de prolactina, mas esses agentes estimulantes exercem um papel secundário no controle da secreção de prolactina. Os principais são o hormônio liberador de tireotrofina (TRH), a ocitocina e o peptídeo intestinal vasoativo²⁰. O estrógeno estimula a transcrição do gene da prolactina e a secreção do hormônio e por isto os níveis de prolactina são mais altos em mulheres em idade fértil²¹.

O receptor de prolactina é uma única proteína, ligada à membrana, classe 1 da família das citocinas e está presente em diversos órgãos como hipófise, pulmão, coração, timo, fígado, baço, pâncreas, glândula adrenal, rim, útero, músculo esquelético e pele¹.

A redução ou aumento da concentração sérica de prolactina podem estar relacionados a alterações clínicas importantes. Os principais sintomas da hiperprolactinemia em mulheres são galactorreia, distúrbios menstruais e infertilidade. Nos homens, são infertilidade, redução da libido e galactorreia³. Os sintomas em crianças são atraso da puberdade, galactorreia, ginecomastia e amenorreia primária¹⁰.

A prolactina em excesso na circulação inibe a secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina, o que resulta em uma supressão da atividade gonadal e consequente infertilidade²².

As causas da hiperprolactinemia se localizam em três categorias: fisiológicas (gravidez e aleitamento são as principais), farmacológicas (medicamentos antipsicóticos e antidepressivos são os mais frequentes) e causas patológicas. As principais causas da hiperprolactinemia patológica são os adenomas hipofisários, condições que aumentam o TRH como o hipotireoidismo, condições que diminuem a ação da dopamina como os tumores hipofisários ou hipotalâmicos, drogas antagonistas do receptor da dopamina, ou condições de redução do

clareamento da prolactina como a insuficiência renal^{3,20}. A hiperprolactinemia pode estar relacionada ao aumento da imunorreatividade da prolactina sérica, devido ao excesso de macroprolactina circulante^{23,24}. As desordens endócrinas mais frequentes do eixo hipotálamo-hipófise são os adenomas hipofisários secretores de prolactina. A dosagem laboratorial demonstrando a hiperprolactinemia é essencial para o diagnóstico³.

A hiperprolactinemia já foi descrita em pacientes com doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, esclerose sistêmica, psoríase e outras, mas não há uma associação consistente entre o nível sérico de prolactina e a atividade da doença²⁵.

A deficiência de prolactina pode ocorrer isolada ou associada à deficiência de outros hormônios produzidos na hipófise anterior. A deficiência combinada é a mais frequente e é causada por problemas adquiridos ou genéticos. A deficiência adquirida de prolactina pode ocorrer em várias situações de dano à região da hipófise anterior, como lesões vasculares, tumores, condições inflamatórias e infecções e pode ser um marcador de hipopituitarismo severo. Já a deficiência isolada de prolactina é extremamente rara e pode se manifestar com a ausência de produção de leite no puerpério²⁶.

3.2. MACROPROLACTINA

A primeira descrição de um caso de hiperprolactinemia por predominância de macroprolactina (90%) foi feita por Whittaker *et al*²⁷, em 1981.

A macroprolactina pode ser definida como a fração correspondente às isoformas da prolactina com peso molecular >100 kDa. A composição da macroprolactina é heterogênea e a forma mais encontrada na GFC tem o peso molecular entre 150-170 kDa e corresponde a um complexo de prolactina e IgG, principalmente autoanticorpos antiprolactina²⁴. A subclasse dominante de IgG na macroprolactina é a IgG4, que é produzida a partir de estimulação antigênica crônica²⁸. Estudos que incluíram grande número de pacientes não revelaram uma associação específica entre macroprolactinemia e desordens autoimunes^{6,29}. Formas não usuais de alto peso molecular (200-669 kDa) já foram descritas e são raros os casos de complexos prolactina-IgA⁵.

O mecanismo de desenvolvimento de autoanticorpos antiprolactina é desconhecido. Modificações pós-translacionais como fosforilação ou glicosilação da molécula de prolactina podem estar envolvidas num aumento de sua antigenicidade, levando à produção dos anticorpos^{10,11}. Após um estudo experimental de estimulação de produção de autoanticorpos em ratos, foi sugerido pelos pesquisadores que uma inflamação hipofisária assintomática de origem viral poderia estar associada à liberação de prolactina fosforilada na circulação, induzindo a produção de autoanticorpos antiprolactina³⁰.

Hattori *et al*³¹, em trabalho recente, mostraram evidências da presença de macroprolactina tipo não-IgG de até 30%, quantidade maior do que presumido anteriormente.

A macroprolactina é uma macromolécula que fica restrita ao compartimento intravascular devido ao seu alto peso molecular, e a prolactina complexada não atinge os receptores celulares^{3,5,6,10,11,32}. A meia vida da prolactina monomérica varia de 26 a 47 minutos, ao passo que a macroprolactina se acumula no sangue devido ao clareamento renal diminuído¹³.

Há evidências que a macroprolactina é biologicamente inativa³³ mas reage em diferentes graus, em todos os imunoensaios para prolactina⁵. A variabilidade depende dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos do ensaio que já estejam ligados aos autoanticorpos antiprolactina³⁴. Smith *et al*⁸ enviaram amostras de pacientes com macroprolactinemia para 18 laboratórios clínicos que utilizavam nove diferentes sistemas de imunoensaios e as variações nas dosagens de prolactina oscilaram entre 2,3 a 7,8 vezes. Os imunoensaios para a dosagem de prolactina são classificados em relação à reatividade à macroprolactina como pouco, médio ou muito reativos³⁵.

Em 2009, um grande estudo epidemiológico no Japão mostrou uma prevalência de macroprolactinemia na população em geral de 3,68%³⁶. Recentemente, outro estudo também no Japão demonstrou prevalência semelhante, de 4%, apesar de ter sido conduzido exclusivamente com mulheres²⁹. A macroprolactinemia é encontrada em ambos os sexos, apesar de mais frequente em mulheres³⁷.

Alguns trabalhos demonstraram a presença de macroprolactinemia na infância e na adolescência, mas não se sabe ao certo quando a macroprolactinemia começa nem quando termina. É uma condição crônica que pode ter início antes da meia idade³⁸. Uma prevalência

aumentada de macroprolactinemia em pessoas mais velhas sugere que a idade pode estar relacionada a uma alteração na antigenicidade da prolactina ou à perda da tolerância imunológica, o que poderia facilitar a produção de autoanticorpos antiprolactina³⁶.

Já em pacientes com hiperprolactinemia, a prevalência de macroprolactinemia varia entre 15% a 35%¹⁰. Os principais fatores desta variabilidade são a reatividade do imunoensaio em relação à macroprolactina e a natureza da população estudada³.

A maioria dos pacientes com macroprolactinemia é assintomática^{33,39} Vallette-Kasic *et al*⁴⁰ encontraram uma proporção considerável de mulheres com macroprolactinemia e sintomas clínicos normalmente associados à hiperprolactinemia: distúrbios menstruais, infertilidade ou galactorreia. Distúrbios menstruais e infertilidade são sintomas relativamente comuns em mulheres, que podem apresentar macroprolactinemia simultaneamente, sem uma relação de causa-efeito^{7,36}.

É controversa a questão sobre a relevância clínica da macroprolactinemia. Olukoga⁴¹ sugeriu a possibilidade de uma atividade biológica mínima da macroprolactina pela dissociação intermitente do complexo prolactina-IgG e questionou se a macroprolactina seria simplesmente um artefato analítico.

O método de referência para a determinação de macroprolactina é a GFC. É uma técnica inadequada para a rotina de laboratórios clínicos, porquanto demorada, complexa e de elevado custo. Mais recentemente, foi descrita a determinação de macroprolactina por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*). Técnicas alternativas são baseadas em imunoensaios de prolactina antes e após a remoção da macroprolactina por ultrafiltração, imunoadsorção de IgG ou por precipitação com PEG⁵.

A precipitação pelo PEG é uma técnica que separa proteínas de acordo com a solubilidade. O PEG age como uma “esponja” inerte que absorve água de hidratação das proteínas, reduzindo sua solubilidade e levando à sua precipitação. Quando adicionado ao soro, o PEG é relativamente específico para imunoglobulinas e seus complexos, mas precipita também o dímero de prolactina e aproximadamente 20% da prolactina monomérica sérica⁵. (Figura 2)

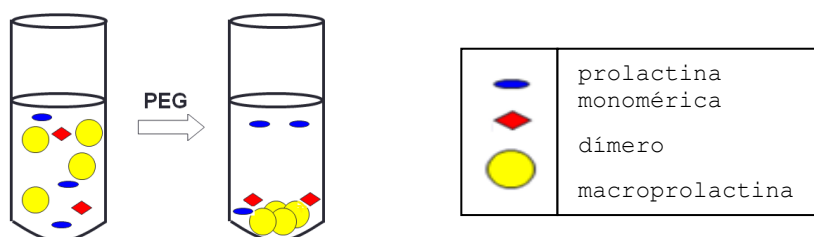


Figura 2 - Tratamento do soro com polietileno glicol (PEG)

A dosagem de prolactina no soro é feita antes e após o procedimento de precipitação com o PEG¹⁴.

Vários pesquisadores têm recomendado a comparação da concentração da prolactina monomérica pós-PEG com um novo intervalo de referência de amostras de indivíduos saudáveis tratadas igualmente com PEG^{4,7,9,13,14,42-44}. Se uma amostra hiperprolactinêmica tratada com PEG tiver a concentração de prolactina pós-PEG dentro do apropriado intervalo de referência a presença de macroprolactina é confirmada⁴. O resultado convencional, reportado como porcentagem de recuperação após o tratamento com PEG, é pouco específico e pode ser mal interpretado quando há excesso simultâneo de macroprolactina e prolactina monomérica^{4,7}. É mais importante que o laboratório determine o aumento da concentração de prolactina monomérica bioativa do que forneça o percentual de recuperação de prolactina⁴.

O teste da pesquisa de macroprolactina pela precipitação com o PEG tem algumas limitações:

- O PEG interfere positivamente em alguns sistemas de imunoenaios para a prolactina⁴.
- Uma porção da prolactina monomérica é precipitada junto com as macromoléculas. Esta questão pode ser minimizada com a interpretação do teste através da comparação da prolactina monomérica pós-PEG com um intervalo de referência de amostras tratadas com PEG, coletadas em pessoas saudáveis¹⁴.
- A concentração sérica muito elevada de gamaglobulina pode aumentar a quantidade de prolactina monomérica precipitada pelo PEG e gerar um resultado falso positivo para a macroprolactinemia⁴⁵.

- A precipitação de IgA pelo PEG é parcial e o teste pode não funcionar bem nos raros casos da presença do complexo prolactina-IgA⁴⁶.

O método de precipitação com o PEG é simples, de baixo custo e foi amplamente validado para a medida da prolactina monomérica bioativa clinicamente relevante⁹. O resultado do teste com o PEG, como qualquer teste bioquímico, deve ser interpretado dentro de um contexto clínico⁷.

Beltran *et al*⁴ estabeleceram intervalos de referência para prolactina sérica medida antes e após tratamento com PEG para seis sistemas de imunoensaios amplamente utilizados e validaram a acurácia diagnóstica desses intervalos de referência com a GFC.

McCudden *et al*¹³ recomendaram a triagem para macroprolactina nos pacientes com resultados de prolactina sérica moderadamente elevados e sem causas identificáveis de hiperprolactinemia.

Diretrizes da *Pituitary Society* para diagnóstico e conduta de prolactinomas estabeleceram que altas concentrações de prolactina (>150 ng/mL) são usualmente consistentes com adenomas e que é razoável determinar a presença de macroprolactina em pacientes com valores de prolactina entre 25 ng/mL a 150 ng/mL e sem sintomas típicos de hiperprolactinemia verdadeira⁴⁷.

Diversos pesquisadores foram favoráveis à triagem para macroprolactina em todas as amostras hiperprolactinêmicas a fim de ser fornecida uma medida clinicamente significativa da prolactina monomérica bioativa^{3,5,6,10,14,39,48,49}.

Alguns autores recomendaram a triagem de macroprolactina nas seguintes situações: indivíduos com elevada concentração sérica de prolactina e assintomáticos, quadro clínico atípico, resultados divergentes de prolactina em diferentes ensaios e demora no declínio do nível sérico de prolactina após doses usuais de agonistas dopaminérgicos⁵⁰.

Gibney *et al*⁷ mostraram que o custo adicional associado a este procedimento na rotina laboratorial é justificável, já que o teste pode acarretar uma economia substancial pela

diminuição de solicitações de exames de ressonância nuclear magnética (RMN) e de prescrições médicas de agonistas da dopamina.

Um estudo realizado em São Paulo mostrou que a triagem rotineira para macroprolactina não evita completamente outras investigações clínicas, mas o custo médio do paciente com hiperprolactinemia verdadeira é significativamente mais alto do que o custo médio do paciente com macroprolactinemia. É importante uma educação médica adequada e a divulgação do significado da macroprolactinemia⁵¹.

Mais estudos sobre a fisiopatologia da macroprolactina são necessários para maior compreensão sobre sua relevância clínica¹¹.

3.3 A DOSAGEM LABORATORIAL DE PROLACTINA

Inicialmente, a prolactina era estimada por meio de bioensaios *in vivo*, que mensuravam também os efeitos do hormônio do crescimento e do hormônio lactogênio placentário. Depois, surgiram os bioensaios *in vitro* que utilizavam linhagem de células Nb2, derivadas de linfoma de rato e eram melhores em sensibilidade e especificidade. Ensaios de receptores também estiveram disponíveis para a dosagem da prolactina, mas, assim como os bioensaios, não eram práticos à rotina de um laboratório clínico⁵².

As primeiras dosagens de prolactina por radioimunoensaio datam da década de 70⁵³. Eram ensaios competitivos onde antígenos endógenos e antígenos marcados com radioisótopos competiam por uma quantidade limitada de anticorpos. Com a evolução da tecnologia, chegaram os anticorpos monoclonais e os ensaios imunométricos, que têm anticorpos de captura imobilizados em uma fase sólida e anticorpos marcados com um gerador de sinal. Estes anticorpos se ligam a diferentes epítomos do antígeno a ser mensurado e formam com ele um “sanduíche”⁵⁴. Após a captura do analito no “sanduíche” de anticorpos e a remoção dos reagentes não ligados por uma etapa de lavagem, o sinal gerado é diretamente relacionado à quantidade de prolactina presente⁵ (Figura 3).

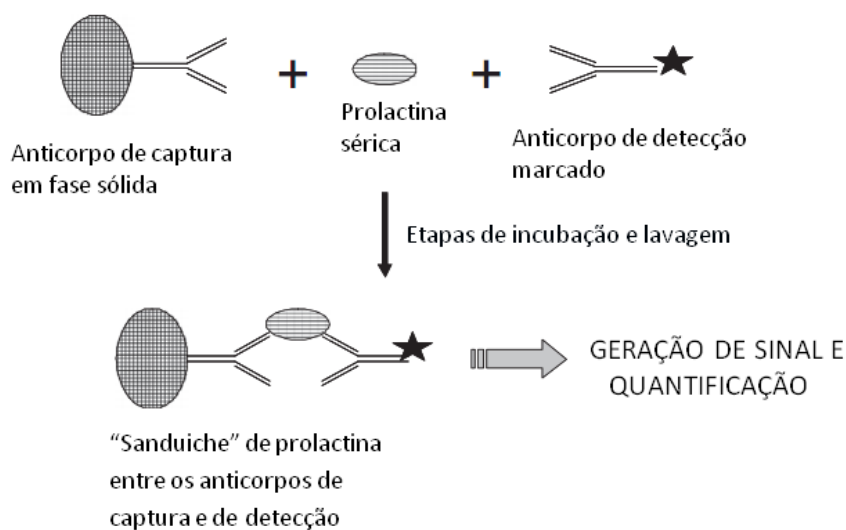


Figura 3 - Ilustração esquemática do princípio do ensaio imunométrico tipo “sanduíche” para dosagem de prolactina. São usados dois anticorpos específicos para diferentes epítomos da molécula de prolactina. Um anticorpo de captura é ligado a uma fase sólida e um anticorpo de detecção é marcado com um gerador de sinal (Adaptado de Fahie-Wilson M, Smith TP⁵).

Os níveis séricos de prolactina variam em um período de 24 horas. A amostra de sangue deve ser colhida, em geral, algumas horas após o despertar, de preferência após repouso de aproximadamente 30 minutos pois um estresse ocorrido próximo à hora da punção venosa pode provocar elevações moderadas na prolactina⁵⁵.

Uma dosagem de prolactina com um nível pouco acima do intervalo de referência deve ser repetida para confirmação de hiperprolactinemia, levando em conta a secreção pulsátil e o efeito do estresse sobre este hormônio. Níveis séricos de prolactina aumentados devido ao uso de medicamentos geralmente oscilam entre 25 a 100 ng/mL²¹. Porém, algumas drogas como risperidona e metoclopramida podem induzir elevações maiores⁵⁶. O nível sérico de prolactina dez vezes acima do limite superior de normalidade é mais compatível com a presença de um adenoma hipofisário⁵⁰.

Os interferentes analíticos nos imunoenaios se referem à interação entre constituintes da amostra e os anticorpos reagentes. Os interferentes podem levar a resultados de testes falsamente elevados ou diminuídos⁵⁷. Os principais problemas inerentes aos imunoenaios se aplicam à dosagem de prolactina e são a presença de anticorpos heterofílos, de autoanticorpos, o efeito gancho e a falta de concordância entre diferentes sistemas analíticos. Os anticorpos heterofílos são anticorpos endógenos que se ligam aos anticorpos da reação do ensaio

falseando resultados⁵⁸. Níveis extremamente altos de prolactina podem interferir no ensaio e produzir resultados falsamente baixos, constituindo o que se conhece como efeito gancho ou pré-zona. Este artefato deve ser levado em conta nos pacientes com grandes adenomas hipofisários e níveis séricos de prolactina dentro da faixa normal ou moderadamente elevados (<200 ng/mL)²⁰. Este efeito foi descrito em aproximadamente 5% dos pacientes com macroadenomas¹⁹.

A falta de concordância nas dosagens de prolactina em diferentes imunoenaios está relacionada às diferenças na reatividade dos anticorpos dos ensaios em relação às isoformas da prolactina⁴.

É útil ressaltar a importância do laboratório liberar a quantificação da concentração sérica de prolactina dentro da faixa analítica do teste, mesmo que precise recorrer a diluições manuais com potencial perda de acurácia do resultado. A faixa analítica corresponde ao intervalo de medição do ensaio, entre o menor valor detectável e o valor máximo. Só assim o clínico pode monitorar um tratamento prescrito (com um agonista dopaminérgico, por exemplo) baseado em determinações do nível sérico de prolactina antes e após o tratamento⁵⁹ (ANEXO 5).

Outras metodologias como a espectrometria de massa e a cromatografia líquida associada à espectrometria têm sido empregadas na determinação de hormônios, porém estão restritas a laboratórios de pesquisa, devido à alta complexidade técnica e ao custo elevado⁶⁰.

No SML do HC, UFMG, as dosagens de prolactina são realizadas com o teste *Prolactin Vitros Immunodiagnostic Products (Ortho-Clinical Diagnostics Inc, NY, USA)*, um imunoensaio imunométrico quimioluminescente. A viscosidade aumentada da solução de polietileno glicol inviabiliza a realização da pesquisa de macroprolactina neste equipamento. Por isto, a pesquisa de macroprolactina foi realizada no sistema analítico *Architect® (Abbott)*, onde o PEG não interfere na metodologia da dosagem de prolactina⁸

A dosagem laboratorial de prolactina é muito solicitada na rotina assistencial e é uma ferramenta importante no diagnóstico diferencial de desordens ginecológicas. A identificação das causas da hiperprolactinemia é essencial para a conduta médica adequada, no tempo correto³¹. A macroprolactinemia não identificada pode levar a erro diagnóstico e intervenções desnecessárias. A precipitação com PEG, utilizando um intervalo de referência de amostras de

indivíduos saudáveis e tratadas igualmente com PEG, fornece uma medida clinicamente significativa da concentração da prolactina monomérica bioativa⁵.

3.4 ESPECIFICAÇÕES DA QUALIDADE ANALÍTICA

A regulamentação dos ensaios diagnósticos iniciou-se no final da década de 1960, nos Estados Unidos, com o *Clinical Laboratory Improvement (CLIA'67)* e evoluiu para estabelecer diretrizes que embasaram os laboratórios na definição de requisitos de desempenho para seus métodos analíticos. No Brasil a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) editou a RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) n°302/2005 que regulamenta aspectos técnicos específicos para os laboratórios clínicos⁶¹.

As especificações da qualidade ou metas de desempenho analítico auxiliam na definição das práticas diárias dos laboratórios clínicos. Requisitos clinicamente relevantes devem ser atendidos para favorecer condutas clínicas adequadas aos pacientes. Na conferência "*Strategies to set Global Quality Specifications in Laboratory Medicine*", realizada em Estocolmo em 1999, uma hierarquia de modelos foi formatada para estabelecer as especificações da qualidade analítica:

- 1- Avaliação do efeito do desempenho analítico em decisões clínicas específicas
- 2- Avaliação do efeito do desempenho analítico em decisões clínicas gerais
 - Especificações gerais da qualidade baseadas na Variação Biológica (VB)
 - Especificações gerais da qualidade baseadas em opiniões médicas
- 3- Recomendações profissionais publicadas
- 4- Metas de desempenho analítico baseadas em comparações interlaboratoriais
- 5- Dados publicados com base no estado da arte

Nesta hierarquia, o modelo considerado o melhor para a definição das especificações da qualidade analítica (EDQ) é o da avaliação do efeito do desempenho analítico em decisões clínicas específicas. Porém este modelo tem aplicação difícil e abrangência limitada. Assim, a utilização dos componentes da variação biológica (VB) passa a ser o modelo de escolha. A VB consiste na flutuação fisiológica dos componentes dos fluidos orgânicos em torno dos seus pontos homeostáticos, ou pontos de equilíbrio. A partir dos dados da VB foram

estabelecidas as EDQ para imprecisão, *bias* (viés) e erro total permitido para os testes de laboratório⁶².

O erro aleatório é um erro cuja direção (positiva ou negativa) e dimensão não podem ser previstas com exatidão. É causado pela imprecisão metodológica e é estimado pelo desvio padrão expresso como desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV). *Bias* ou erro sistemático é a diferença entre a média de um número significativo de medições e o valor verdadeiro. O erro total é estimado com a soma dos efeitos do erro aleatório e do erro sistemático e representa o limite de erro analítico máximo aceitável⁶².

As características para a aplicação das EDQ baseadas nos componentes da VB são:

- definidas para imprecisão e *bias*;
- baseadas nas necessidades médicas;
- aplicáveis a todos os laboratórios;
- construídas a partir de modelos simples e facilmente compreensíveis.

O modelo de utilização dos componentes da VB tem flexibilidade para se adaptar às novas tecnologias e tem sido recomendado por especialistas para a definição das EDQ⁶².

Um sistema analítico é constituído por procedimentos de trabalho, equipamentos, reagentes e suprimentos utilizados na execução do exame laboratorial e na geração do seu resultado. O teste laboratorial é uma ferramenta importante para auxiliar o raciocínio clínico e a conduta terapêutica. No passado, os exames eram realizados de maneira artesanal através de técnicas manuais, com um componente maior de variação. A evolução dos métodos laboratoriais e a incorporação de novas metodologias como os analisadores automatizados têm contribuído para a obtenção de resultados com rapidez, boa reprodutibilidade e exatidão. Um grande desafio no laboratório clínico é minimizar o efeito das diversas variáveis que podem interferir no resultado do teste⁶¹.

A validação de um sistema analítico mostra se os erros encontrados atendem às especificações da qualidade, o que minimiza a liberação de resultados com erros clinicamente significativos⁶². A validação consiste na realização de experimentos para avaliar o seu desempenho em relação à precisão, linearidade e exatidão. A precisão é a concordância entre

resultados de sucessivas medidas do mesmo analito, sob condições estipuladas. A linearidade é a capacidade de geração de resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, dentro do intervalo de medição do teste. O intervalo de medição compreende o intervalo entre o menor valor detectável e o valor máximo. A exatidão é a concordância entre o valor medido e o valor verdadeiro⁶¹. O processo de validação fornece uma estimativa do erro presente no resultado do teste para que ele não afete a interpretação do resultado nem comprometa o cuidado com o paciente⁶³.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de estudo descritivo observacional do tipo transversal, com amostras não probabilísticas.

4.1 ÉTICA

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP (parecer CAAE nº 40340514.3.0000.5149 – ANEXO 1) e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão – DEPE do HC/UFMG (processo nº144/2014 – ANEXO 2). Foi garantido o sigilo das informações e dos resultados dos testes dos pacientes atendidos na rotina assistencial do SML do HC/UFMG e dos voluntários que participaram da validação dos intervalos de referência de prolactina monomérica pós-PEG. Todos os participantes incluídos no estudo concordaram em participar por meio da leitura e assinatura do TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 3). As amostras biológicas de todos os experimentos deste trabalho foram utilizadas exclusivamente para os propósitos da pesquisa, tendo recebido o mesmo tratamento e descarte das amostras biológicas processadas na rotina do SML do HC/UFMG. Não houve conflito de interesse entre os pesquisadores e o HC/UFMG.

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

As amostras utilizadas nos experimentos do presente estudo para dosagem de prolactina no equipamento *Architect*[®](*Abbott*) estão esquematizadas na Tabela 1

Tabela 1 - Amostras utilizadas nas dosagens de prolactina no equipamento *Architect*[®](*Abbott*), nos experimentos do estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial (SML) do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

| EXPERIMENTOS | NÚMERO DE AMOSTRAS | ORIGEM DAS AMOSTRAS |
|---|-------------------------------------|----------------------------|
| Teste de precisão | 2 | ControlLab |
| Teste de linearidade | 7 | ControlLab |
| Teste de comparação I | 20 | Pacientes do HC/UFMG |
| Teste de comparação II | 40 | Pacientes do HC/UFMG |
| Validação dos intervalos de referência de prolactina pós-polietileno glicol | 40 (20 mulheres e 20 homens) | Participantes voluntários |
| Pesquisa de macroprolactina | 112 (96 mulheres e 16 homens) | Pacientes do HC/UFMG |
| GFC | 25 | Pacientes do HC/UFMG |

GFC: cromatografia em coluna de gel filtração

Para o estudo da precisão, foram utilizadas duas amostras de soro humano liofilizado com concentrações distintas, uma dentro do intervalo de referência do fabricante (amostra “HOR 168”) e outra acima (amostra “HOR 164”). Ambas as amostras foram fornecidas pelo Programa de Excelência para Laboratórios Médicos (PELM), ligado à Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (SBPC/ML) e gerenciado pela empresa ControlLab. O material liofilizado foi mantido a -30°C e a reconstituição seguiu as recomendações disponibilizadas pela ControlLab⁶¹.

Para o estudo da linearidade foram utilizadas sete amostras de soro humano liofilizado, com concentrações decrescentes de prolactina numeradas de 1,0 a 7,0 (IT1 a IT7), fornecidas pelo Programa de Excelência para Laboratórios Médicos (PELM). O material liofilizado foi mantido a -30°C e a reconstituição seguiu as recomendações da ControlLab⁶¹.

Os dois testes de comparação (estudo da exatidão) foram conduzidos com amostras de pacientes coletadas no SML do HC/UFMG entre abril de 2015 e fevereiro de 2016. Os critérios de inclusão para as amostras dos estudos da comparação foram: amostras séricas com concentrações de prolactina distribuídas ao longo do intervalo de medição do ensaio no sistema *Architect*[®](*Abbott*) e sem sinais de hemólise, turbidez ou icterícia, potenciais

interferentes nos imunoenaios^{64,65}. As amostras de sangue venoso periférico foram colhidas pela manhã, após 30 minutos de repouso, em tubos Vacuette (5 mL, *z serum sep.clot activator*, ref.454071 e lote C160300L). Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos e depois centrifugados a 1500 G (força gravitacional ou força centrífuga relativa) por 10 minutos para a separação do soro. Os soros foram aliquotados no dia da coleta e foram armazenados em tubos secos, à temperatura de -30°C.

Para a validação do intervalo de referência para prolactina monomérica pós-PEG foram selecionados 40 adultos saudáveis, sendo 20 homens com idade entre 21 e 51 anos (mediana 28 anos) e 20 mulheres com idade entre 23 e 61 anos (mediana 34 anos). Os voluntários foram recrutados entre funcionários do Campus da Saúde da UFMG e estudantes da Faculdade de Medicina da UFMG e responderam a um formulário contendo informações sobre o seu estado geral de saúde (ANEXO 4). Amostras de sangue venoso periférico foram colhidas pela manhã, após 30 minutos de repouso, em tubos Vacuette (5 mL, *z serum sep.clot activator*, ref.454071, lote C160300L). Após a coleta, os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos e posteriormente centrifugados a 1500 G por 10 minutos para a separação do soro. Os soros foram aliquotados no dia da coleta e foram armazenados em tubos secos, à temperatura de -30°C. As amostras foram coletadas no período compreendido entre abril/2015 e fevereiro/2016. Os critérios de inclusão foram: adultos saudáveis, com idade entre 18 e 65 anos, elegíveis após avaliação médica baseada na análise de um questionário (ANEXO 4) e em resultados de testes laboratoriais para avaliação da função renal, hepática e tireoidiana dos voluntários. Os testes realizados foram: creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e hormônio estimulante da tireóide (TSH), realizados de acordo com as padronizações do SML do HC/UFMG.

Para a pesquisa de macroprolactina foram selecionadas amostras de pacientes coletadas no SML do HC/UFMG, no período compreendido entre dezembro/2014 e fevereiro/2016. Foram selecionadas amostras de 112 pacientes: 96 mulheres, com idade entre 18 e 80 anos (mediana 38 anos), e 16 homens, com idade entre 21 e 65 anos (mediana 45 anos). As amostras de sangue venoso periférico foram colhidas pela manhã, após 30 minutos de repouso, em tubos Vacuette (5 mL, *z serum sep.clot activator*, ref.454071, lote C160300L). Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos e depois centrifugados a 1500 G por 10 minutos para a separação do soro. Os soros foram aliquotados no dia da coleta e foram armazenados em tubos secos, à temperatura de -30°C. Os critérios de inclusão para a

pesquisa de macroprolactina foram: amostras séricas sem sinais de potenciais interferentes como hemólise, turbidez ou icterícia e com concentrações de prolactina superiores aos intervalos de referência do reagente comercial *Prolactin/Abbott Diagnostics* (mulheres: 5,18 a 26,53 ng/mL – homens: 3,46 a 19,40 ng/mL)⁶⁴.

Para a cromatografia em coluna de gel filtração (GFC) foram utilizadas 25 amostras armazenadas em duplicata para a pesquisa de macroprolactina. As amostras foram mantidas congeladas a -30°C. Foram enviadas para um laboratório de pesquisa da Escola Paulista de Medicina em gelo seco, com controle de temperatura, por empresa especializada em transporte de material biológico. Foram selecionadas amostras com indicação de macroprolactinemia pelos resultados do presente estudo, amostras com indicação de hiperprolactinemia verdadeira e amostras com resultados duvidosos ou discrepantes nas duas abordagens de interpretação do teste.

4.3 DOSAGENS LABORATORIAIS

Entre maio de 2012 e abril de 2016, todas as dosagens de prolactina do SML do HC/UFMG foram realizadas pelo teste *Prolactin Vitros Immunodiagnostic Products (Ortho-Clinical Diagnostics Inc, NY, USA)*, um imunoensaio imunométrico quimioluminescente, com intervalo de medição de 1,4 a 329,0 ng/mL, utilizando o analisador *Vitros® 5600 (Ortho-Clinical Diagnostics Inc, NY, USA)*

Neste teste automatizado, a prolactina presente na amostra reage com um anticorpo policlonal antiprolactina biotilado e com um conjugado de anticorpo monoclonal antiprolactina marcado com peroxidase de rábano. O complexo antígeno-anticorpo é captado pela estreptavidina e os materiais não ligados são removidos por lavagem. O conjugado ligado é medido por uma reação luminescente, sendo diretamente proporcional à concentração de prolactina presente⁶⁵. Por restrições técnicas, não é possível fazer a pesquisa de macroprolactina no equipamento *Vitros®5600*. A viscosidade aumentada da solução de polietileno glicol inviabiliza a realização da pesquisa de macroprolactina neste equipamento. Por isto, a pesquisa de macroprolactina foi realizada no sistema analítico *Architect®(Abbott)*, onde o PEG não interfere na metodologia da dosagem de prolactina⁸

As dosagens laboratoriais foram realizadas na Plataforma Hospitalar do SML do HC/UFMG. O levantamento dos dados da dosagem de prolactina nos últimos quatro anos foi obtido do banco de dados computadorizado do SML.

4.4 VALIDAÇÃO DO REAGENTE COMERCIAL DE PROLACTINA NO EQUIPAMENTO ARCHITECT® (ABBOTT)

A validação do reagente comercial de prolactina incluiu estudos de precisão, linearidade e exatidão.

O equipamento utilizado foi o *Architect*® (*Abbott*), modelo i1000sr, número de série i1SR02139. O reagente utilizado foi o *Prolactin* ref.7K76-25, lote 48902UI00, e o calibrador foi o *Prolactin calibrators* ref.7K76-01, lote 51301U100. O imunoensaio foi padronizado com o terceiro padrão internacional para prolactina, 84/500, da Organização Mundial de Saúde. A unidade de medida de prolactina utilizada foi ng/mL.

Para fins de validação, foram utilizados os parâmetros da especificação desejável da qualidade para a prolactina baseada na variação biológica (Tabela 2). A especificação da qualidade analítica visa garantir que os resultados dos testes produzidos atendam a critérios clínicos.

Tabela 2 - Especificação desejável da qualidade para a prolactina⁶⁶

| ANALITO | VARIAÇÃO BIOLÓGICA (%) | | ESPECIFICAÇÃO DESEJÁVEL (%) | | |
|-------------------|---------------------------|-----------------|--------------------------------|------|---------------|
| | CV _i | CV _g | IMPRECISÃO | BIAS | ERRO TOTAL |
| Prolactina (soro) | 23 | 35 | 11,5 | 10,5 | 29,4 |

CV_i – Coeficiente de Variação individual

CV_g – Coeficiente de Variação em grupo

Bias – Erro sistemático

4.4.1 ESTUDO DA PRECISÃO

O estudo de precisão foi elaborado com base no documento do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): EP05-A2 Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline (2004)*⁶⁷.

Para o estudo da precisão, foram utilizadas duas amostras de soro humano liofilizado com concentrações distintas, uma dentro do intervalo de referência do fabricante e outra acima.

Em cada uma das duas amostras utilizadas neste estudo foram feitas quatro dosagens por dia (precisão intradia) durante cinco dias consecutivos (precisão total), somando 20 medidas de cada amostra. Foi avaliado se a margem do erro aleatório, medida em termos de coeficiente de variação (CV), estava dentro do limite aceitável.

Para a variação intradia, foi considerado aceitável o CV <3,2% para a concentração de prolactina de 7,05 ng/mL e <2,3% para a concentração de 35,25 ng/mL. Para a variação total foi considerado aceitável o CV <4,4% para a concentração de prolactina de 7,05 ng/mL e <3,3% para a concentração de 35,25 ng/mL. Estes valores de CV foram informados nas instruções de uso do reagente comercial de prolactina do equipamento *Architect*⁶⁴. A especificação de qualidade clínica determinada para o estudo foi baseada na variação biológica, cujo coeficiente de variação desejável para a imprecisão é de no máximo 11,5%⁶⁶.

4.4.2 ESTUDO DA LINEARIDADE

O estudo de linearidade foi realizado com base no documento do CLSI: *EP6-A Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach, Approved Guideline (2004)*⁶⁸.

Para o estudo da linearidade foram utilizadas sete amostras de soro humano liofilizado, com concentrações decrescentes de prolactina numeradas de 1,0 a 7,0.

As dosagens nas sete amostras foram realizadas em duplicata e a imprecisão foi calculada pela diferença das duplicatas e comparada ao coeficiente de variação desejável para a prolactina de até 11,5%⁶⁶.

Foi feito um estudo de regressão linear e adotado o coeficiente de determinação mínimo de 0,99 como critério de aceitação. Foi avaliado se os resultados gerados foram linearmente proporcionais à concentração de prolactina, dentro da faixa analítica do teste.

4.4.3 ESTUDO DA EXATIDÃO (TESTES DE COMPARAÇÃO)

Para o estudo da exatidão (testes de comparação) foram usadas amostras de pacientes coletadas no SML do HC/UFMG entre abril de 2015 e fevereiro de 2016.

Em ambos os estudos, foi estimada a inexatidão do teste pela verificação da concordância/comparabilidade dos resultados das dosagens de prolactina realizados em dois sistemas analíticos: o reagente comercial *Prolactin*, ref.7K76-25, lote 53913UI01 e o equipamento *Architect*[®](*Abbott Diagnostics*), considerado como método teste e o método considerado comparativo, composto pelo reagente *Prolactin (Ortho-Clinical Diagnostic*, ref.184 9793, lote 2010) e o equipamento *Vitros*[®] 5600 (*Ortho-Clinical Diagnostics*). O sistema *Ortho-Clinical Diagnostics* foi previamente validado, quando entrou em uso no SML. As amostras foram processadas em paralelo nos dois sistemas analíticos, comparando-se os resultados obtidos, dentro de faixas de variação aceitáveis.

O primeiro estudo, utilizado na rotina do SML do HC/UFMG, seguiu a Instrução de Trabalho Operacional ITO 011 UFPML – Validação de Método Analítico. Foram realizadas simultaneamente nos dois sistemas analíticos (*Abbott* e *Ortho-Clinical*) 20 dosagens de prolactina durante quatro dias, cinco amostras por dia. Antes da realização dos testes, as amostras foram retiradas do freezer, deixadas em temperatura ambiente para o descongelamento e, em seguida, foram homogeneizadas por inversão, quatro a cinco vezes. A dosagem de prolactina foi executada segundo o protocolo proposto pelos respectivos fabricantes, respeitado o intervalo máximo de duas horas entre as dosagens das amostras nos dois equipamentos. Foi avaliada a correlação e o grau concordância entre os resultados da prolactina dosada como teste (*Abbott*) e da prolactina utilizada como comparativo (*Ortho-Clinical*) com base na variação biológica (erro total desejável para a prolactina: até 29,4%)⁶⁶.

O segundo estudo comparativo, mais utilizado na literatura científica internacional, foi feito com 40 amostras também dosadas simultaneamente nos dois equipamentos, cinco amostras por dia durante oito dias. A concordância dos resultados foi avaliada pela análise de dispersão das diferenças entre as duas dosagens e as respectivas médias, pelo método de *Bland-Altman*^{69,70}.

4.5 VALIDAÇÃO DO INTERVALO DE REFERÊNCIA DE PROLACTINA MONOMÉRICA PÓS-PEG

O estudo de validação dos intervalos de referência de prolactina monomérica pós-PEG (um intervalo para mulheres e um intervalo para homens) foi realizado com base no documento do CLSI: *Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline* (2008)⁷¹.

Para a validação do intervalo de referência para prolactina monomérica pós-PEG foram selecionados 40 adultos saudáveis, sendo 20 homens com idade entre 21 e 51 anos (mediana 28 anos) e 20 mulheres com idade entre 23 e 61 anos (mediana 34 anos).

A pesquisa de macroprolactina foi conduzida nas 40 amostras, 20 amostras de mulheres e 20 amostras de homens, para validar os respectivos intervalos de referência. O procedimento do teste está descrito abaixo, no item 4.6. Os resultados de prolactina monomérica pós-PEG das amostras dos 40 voluntários foram comparados aos intervalos de referência de prolactina monomérica pós-PEG, padronizados por Beltran *et al*⁴, para o sistema *Architect*[®]:

- Mulheres: 3,73 a 16,37 ng/mL

- Homens: 3,40 a 10,80 ng/mL

O critério de aceitabilidade da verificação, de acordo com o documento do CLSI, foi de no mínimo 90% dos resultados dentro dos referidos intervalos. Assim, tanto no grupo feminino, quanto no grupo masculino de 20 participantes cada, pelo menos 18 resultados de concentração de prolactina monomérica pós-PEG deveria estar dentro do respectivo intervalo de referência.

4.6. PESQUISA DE MACROPROLACTINA

As dosagens de prolactina foram realizadas pelo teste *Architect[®] Prolactin* (Abbott Diagnostics, IL, USA), um imunoensaio quimioluminescente por micropartículas em duas etapas (CMIA, do inglês *Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*), com intervalo de medição de 0,6 ng/mL a 200,0 ng/mL⁶⁴. A unidade de medida de prolactina utilizada foi ng/mL. As dosagens de prolactina foram realizadas no reagente comercial *Prolactin*, ref.7K76-25, lote 53913UI01 no equipamento *Architect[®]* (Abbott) antes e após o tratamento das amostras com polietileno glicol (PEG) 6000 *Sigma[®]-Aldrich*. Amostras de soro controle em três níveis (*Lyphochek Immunoassay Plus Control*, Bio-Rad lote 40300) foram ensaiadas antes de todas as corridas analíticas.

O princípio do teste no equipamento *Architect[®]* (Abbott) se fundamenta na combinação da prolactina presente na amostra a micropartículas paramagnéticas revestidas de anticorpos monoclonais antiprolactina. Após uma etapa de lavagem, um conjugado de anticorpos monoclonais antiprolactina marcados com acridínio é adicionado e se liga aos sítios não ocupados nas micropartículas revestidas por antiprolactina. Em seguida, soluções pré-ativadora e ativadora são adicionadas. A reação quimioluminescente resultante é medida em unidades de luz relativas, sendo diretamente proporcional à concentração de prolactina na amostra⁶⁴.

Para a pesquisa de macroprolactina foram selecionadas amostras hiperprolactinêmicas de pacientes coletadas no SML do HC/UFMG, no período compreendido entre dezembro/2014 e fevereiro/2016. Foram 112 amostras de pacientes, 96 mulheres, com idade entre 18 e 80 anos (mediana 38 anos), e 16 homens, com idade entre 21 e 65 anos (mediana 45 anos). As amostras tinham concentrações de prolactina superiores aos intervalos de referência do reagente comercial *Prolactin/Abbott Diagnostics⁶⁴*:

- Mulheres: 5,18 a 26,53 ng/mL
- Homens: 3,46 a 19,40 ng/mL.

As amostras dos pacientes foram retiradas do *freezer* até atingirem a temperatura ambiente. Foram homogeneizadas por inversão, quatro a cinco vezes e foi realizada a primeira dosagem de prolactina. O tratamento com o PEG foi feito de acordo com Suliman *et al*, 2003¹⁴. Foi

realizado em tubos de poliestireno (12x75mm), onde foram adicionados 250µL de soro e 250µL de solução de PEG 25%. O PEG (ref.81260, lote BCBL5491V) foi diluído em tampão fosfato salino - PBS - Scimedx (ref.1601, lote 5790, pH 7,2 ± 0,1) a 250g/L. O reagente foi armazenado entre 2 e 8°C, por um período de até 14 dias⁴. Após homogeneização em vortex, os tubos foram incubados por 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugados a 1800 G, a 6°C, por 30 minutos para separação do sobrenadante, no qual foi feita a segunda dosagem de prolactina.

Os resultados da concentração de prolactina nas amostras após o tratamento com PEG foram multiplicados por “dois” para corrigir a diluição com o PEG. Depois foram comparados com o intervalo de referência de prolactina monomérica (pós-PEG) padronizado por Beltran *et al*, 2008⁴. Resultados de prolactina monomérica (pós-PEG) dentro do intervalo de referência indicavam a presença de macroprolactinemia. Resultados de prolactina monomérica (pós-PEG) acima do intervalo de referência indicavam a presença de hiperprolactinemia verdadeira.

Os resultados também foram avaliados pelo critério de porcentagem de recuperação de prolactina, calculada a partir da equação (prolactina pós-PEG/prolactina pré-PEG) x 100%. Nesse cálculo, foram utilizados os valores de concentração de prolactina pós-PEG, após correção pelo fator de diluição (dois). Valores de recuperação <40% foram considerados indicativos de macroprolactinemia. Valores de recuperação >60% foram considerados indicativos hiperprolactinemia verdadeira. Valores de recuperação entre 40% e 60% foram considerados indeterminados^{20,43,44,72,73}. Foram comparados os resultados da pesquisa de macroprolactina obtidos pelas duas diferentes abordagens de interpretação.

A frequência de macroprolactina na população estudada foi calculada em percentual de amostras positivas em relação ao total de amostras hiperprolactinêmicas, com base nos resultados de prolactina monomérica pós-PEG comparada aos intervalos de referência apropriados.

Informações clínicas dos pacientes do estudo que tiveram resultado positivo para a pesquisa de macroprolactina foram coletadas dos seus prontuários de atendimento para verificação da presença de sintomas relacionados à hiperprolactinemia, de condutas terapêuticas e de investigação.

4.7 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO

Um grupo de 25 amostras da pesquisa de macroprolactina foram encaminhadas para a GFC e os resultados foram comparados com a interpretação da pesquisa de macroprolactina pelo intervalo de referência de prolactina monomérica pós-PEG deste estudo.

Para o processo de GFC foi empregada coluna de 0,9 cm de diâmetro por 30 cm de altura contendo a resina *Superdex*TM 200 e eluída com tampão fosfato 20 mM, com 15 mM de NaCl. As colunas foram calibradas com *Dextran Azul* e padrões de proteínas de peso molecular conhecido (*Pharmacia fine Chemicals*). A velocidade de eluição foi de 1,0 mL/min e alíquotas de 0,9 mL foram coletadas para a posterior medida de prolactina. As amostras classificadas com hiperprolactinemia verdadeira ou predominância de prolactina monomérica tiveram a área sob a curva correspondendo a prolactina monomérica >50% da área total da eluição. As cromatografias foram realizadas no laboratório de pesquisa do professor Dr. José Gilberto Vieira, na Escola Paulista de Medicina.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do presente trabalho foram expressos em números e proporções, em se tratando de variáveis discretas, e em medidas de tendência central e dispersão, em caso de variáveis contínuas. Foram adotados nível de significância de $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%.

O estudo da linearidade foi feito por regressão linear e o coeficiente de determinação (r^2) mínimo aceitável foi de 0,99. Foi feita a comparação entre as médias das replicatas e a estimação da regressão linear, frente à concentração relativa.

No primeiro estudo de comparação, os resultados de prolactina do sistema analítico *Architect*[®] e os do sistema *Vitros*[®] 5600 foram avaliados por meio de regressão linear simples (mínimos quadrados). Os critérios de aceitação especificados foram: coeficiente de correlação linear (r) mínimo de 0,975; a inclinação da reta próxima de 1,0 e índice de erro (a razão da diferença entre os dois métodos e o erro total permitido) entre -1 e +1 para 95% das amostras.

No segundo estudo de comparação, pelo método de *Bland-Altman*, o critério de aceitação foi de 95% dos resultados dentro do intervalo: média das diferenças \pm dois desvios padrões.

A relação entre macroprolactinemia e gênero foi conduzida pelo teste do qui-quadrado.

Para a comparação das características dos pacientes do estudo, variáveis contínuas de distribuição não-gaussiana em amostras independentes, foi utilizado o teste Mann-Whitney.

As análises estatísticas dos dados foram conduzidas nos programas *Excel® Microsoft Office Professional Plus 2010* e *IBM® SPSS® Statistics*, (Chicago, IL, USA) versão 18.0.

5- RESULTADOS

5.1 DOSAGENS LABORATORIAIS

O número de dosagens de prolactina realizadas no SML do HC/UFG nos últimos quatro anos, entre maio de 2012 e abril de 2016, foi apresentado na Figura 4. A média de exames de prolactina realizados por ano foi de 1070 e 35% dos resultados estavam acima dos valores de referência do teste em uso *Prolactin Vitros Immunodiagnostic Products*⁶⁵.

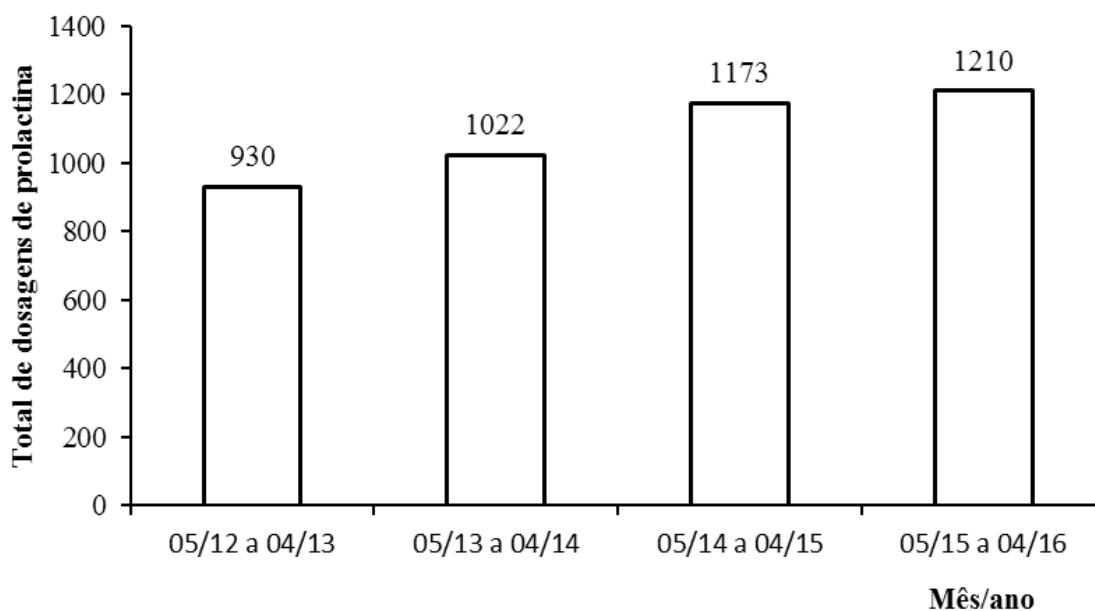


Figura 4 - Total de dosagens de prolactina realizadas no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, entre maio de 2012 e abril de 2016.

5.2 VALIDAÇÃO DO REAGENTE COMERCIAL DE PROLACTINA NO EQUIPAMENTO ARCHITECT®(ABBOTT)

5.2.1 ESTUDO DA PRECISÃO

Para os estudos de precisão intradia e precisão total de prolactina, foram realizadas dosagens das amostras “HOR 164” (valor alto) e “HOR 168” (valor normal), em quadruplicata, durante cinco dias consecutivos. Os valores médios obtidos foram 34,9 ng/mL e 9,7 ng/mL para as amostras HOR 164 e HOR 168, respectivamente. Os dados de variação intradia e total das duas amostras e os resultados fornecidos no manual de instruções do fabricante, *Abbott Diagnostics*⁶⁴ são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Estudo de precisão em duas amostras séricas com concentrações distintas de prolactina processadas no equipamento *Architect*®(Abbott), realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

| PARÂMETROS | AMOSTRA “HOR 164” | | AMOSTRA “HOR 168” | |
|--------------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| | PRECISÃO DO LABORATÓRIO | PRECISÃO DO FABRICANTE | PRECISÃO DO LABORATÓRIO | PRECISÃO DO FABRICANTE |
| Precisão intradia DP (CV) | 0,529 (1,5%) | 0,793 (2,3%) | 0,217 (2,2%) | 0,223 (3,2%) |
| Precisão total DP (CV) | 0,715 (2,0%) | 1,165 (3,3%) | 0,237 (2,4%) | 0,310 (4,4%) |

DP - Desvio Padrão: ng/mL

CV Coeficiente de Variação

5.2.2 ESTUDO DA LINEARIDADE

Os resultados das dosagens de prolactina para o estudo de linearidade estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Estudo de linearidade da prolactina (ng/mL) no equipamento *Architect*[®] (*Abbott*) realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

| AMOSTRAS | REPLICATAS 1 | REPLICATAS 2 | MÉDIA DAS REPLICATAS | DIFERENÇA DAS REPLICATAS (%) | CONCENTRAÇÃO RELATIVA |
|----------|-----------------|-----------------|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| IT1* | 214,31 | 213,29 | 213,80 | 1,02 (0,48%) | 1 |
| IT2 | 195,69 | 198,64 | 197,17 | 2,95 (1,50%) | 2 |
| IT3 | 154,12 | 156,28 | 155,20 | 2,16 (1,39%) | 3 |
| IT4 | 118,71 | 115,86 | 117,29 | 2,85 (2,43%) | 4 |
| IT5 | 84,10 | 80,17 | 82,14 | 3,93 (4,78%) | 5 |
| IT6 | 40,14 | 40,17 | 40,16 | 0,03 (0,07%) | 6 |
| IT7 | 4,80 | 4,77 | 4,79 | 0,03 (0,63%) | 7 |

* Foi necessária diluição da amostra

As amostras foram processadas em duplicata. As amostras IT2 à IT7 tiveram a leitura direta no intervalo de medição do teste. A leitura da amostra IT1 foi superior à linearidade (200,0 ng/mL)⁶⁴, sendo reprocessada seguindo o protocolo de diluição automática do fabricante (diluição 1/10).

Os resultados da estatística da linearidade estão representados na Tabela 5 e na Figura 5.

Tabela 5 - Estimativa dos coeficientes da equação de regressão linear. Estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

| POLINÔMIO | VARIÁVEIS | COEFICIENTES | ERRO PADRÃO | TESTE t | p* |
|-----------|-----------|--------------|----------------|----------|-------|
| Linear | b0 | 272,021 | 1,842 | 147,699 | 0,000 |
| | b1 | -38,348 | 0,383 | -100,219 | 0,000 |

* Teste t

Na análise de regressão, o modelo linear foi o que melhor se ajustou, com valor do índice de determinação (r^2) de 0,999, r^2 ajustado de 0,999 e erro padrão de 2,264.

De acordo com a equação da regressão linear: $y = b_0 + b_1 \cdot x_1$, a equação do experimento foi: **concentração média = 272,021 – 38,348*concentração relativa.**

Por meio da equação da regressão linear, foram calculadas as concentrações estimadas e foi construído o gráfico da comparação entre as médias das replicatas e a estimativa da regressão linear, frente à concentração relativa (Figura 5).

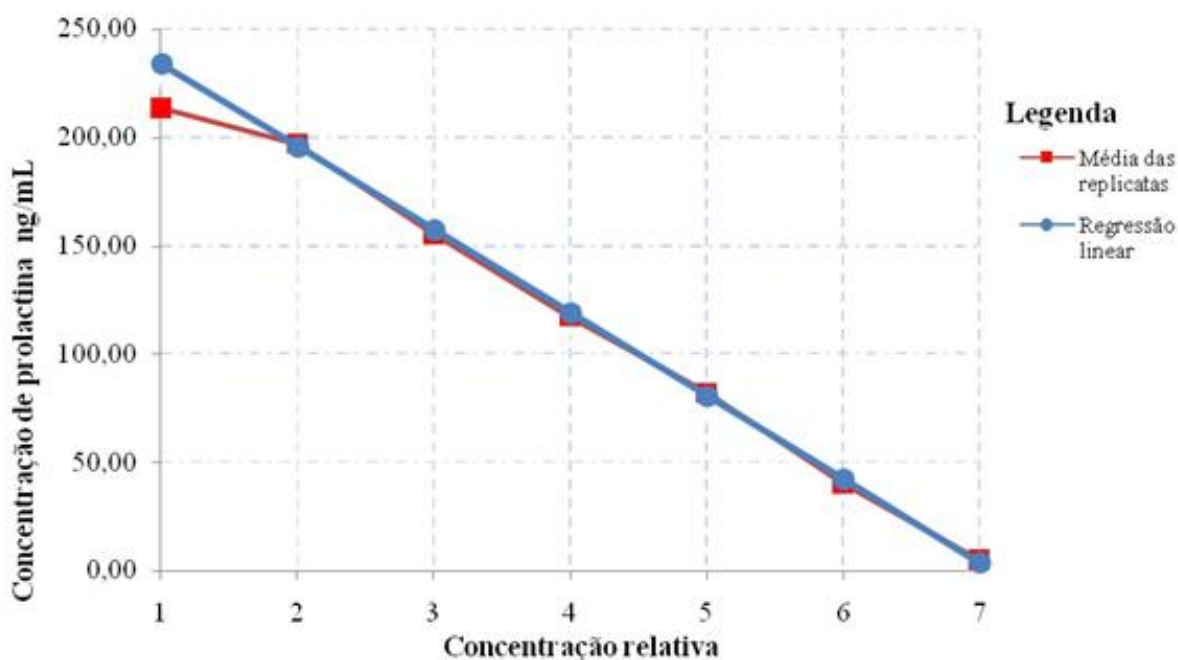


Figura 5 - Comparação entre as médias das replicatas da prolactina sérica e a estimativa da regressão linear, frente à concentração relativa. Estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

A análise visual do gráfico da Figura 5 demonstrou a proximidade dos pontos que representam a média das replicatas e os pontos correspondentes estimados pela regressão linear. O ponto mais alto da reta corresponde à amostra com concentração de prolactina superior à linearidade do teste. Esta amostra foi submetida a uma diluição e se apresentou distante do respectivo ponto estimado.

5.2.3 ESTUDO DA EXATIDÃO (TESTES DE COMPARAÇÃO)

• TESTE DE COMPARAÇÃO I

A análise de regressão foi utilizada para determinar a correlação entre os dois métodos, dentro do erro total permitido de 29,4%, critério padronizado na especificação desejável de qualidade para o teste de prolactina⁶⁶. O resultado das 20 dosagens de prolactina realizadas em paralelo nos equipamentos *Architect*[®] (Abbott) e *Vitros*[®] 5600 (Ortho-Clinical Diagnostics) e os dados da regressão linear estão apresentados na Tabela 6 e na Figura 6.

Tabela 6 - Resultados de 20 dosagens séricas de prolactina (PRL) em ng/mL, processadas nos equipamentos *Architect*[®] e *Vitros 5600*[®], no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

| AMOSTRA | PRL Teste (<i>Architect</i> [®]) | PRL Comparativo (<i>Vitros</i> [®] 5600) | PRL Comparativo - PRL Teste | ÍNDICE DE ERRO |
|----------------|--|---|--------------------------------|-------------------|
| 1 | 2,91 | 3,70 | 0,79 | -0,73 |
| 2 | 7,24 | 8,50 | 1,26 | -0,50 |
| 3 | 9,24 | 11,20 | 1,96 | -0,60 |
| 4 | 10,2 | 14,00 | 3,8 | -0,92 |
| 5 | 13,04 | 15,80 | 2,76 | -0,59 |
| 6 | 15,51 | 20,10 | 4,59 | -0,78 |
| 7 | 17,81 | 21,40 | 3,59 | -0,57 |
| 8 | 19,85 | 25,40 | 5,55 | -0,74 |
| 9 | 11,08 | 12,30 | 1,22 | -0,34 |
| 10 | 18,5 | 28,90 | 10,4 | -1,22 |
| 11 | 36,27 | 39,20 | 2,93 | -0,25 |
| 12 | 144,14 | 135,30 | -8,84 | 0,22 |
| 13 | 54,04 | 61,70 | 7,66 | -0,42 |
| 14 | 175,21 | 179,40 | 4,19 | -0,08 |
| 15 | 96,75 | 96,70 | -0,05 | 0,00 |
| 16 | 14,08 | 16,30 | 2,22 | -0,46 |
| 17 | 57,18 | 53,60 | -3,58 | 0,23 |
| 18 | 49,03 | 48,70 | -0,33 | 0,02 |
| 19 | 10,31 | 12,50 | 2,19 | -0,60 |
| 20 | 15,88 | 19,80 | 3,92 | -0,67 |
| Mínimo | 2,91 | 3,70 | -10,4 | |
| Máximo | 175,21 | 179,40 | 8,84 | |
| Média | 38,91 | 41,23 | 2,31 | |
| Inclinação | | 1,027 | | |
| Intercepto | | -3,41 | | |
| Correlação (r) | | 0,997 | | |

(r) - coeficiente de correlação de Pearson

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados das dosagens de prolactina nos dois equipamentos, a diferença entre os resultados e o índice de erro. Apenas a amostra número 10 apresenta um índice de erro fora do intervalo (+1/-1). O coeficiente de correlação de Pearson encontrado foi de 0,997.

Na Figura 6 estão representados os pontos que correspondem às diferenças entre as dosagens de prolactina (comparativo - teste) distribuídos ao longo da reta de regressão e apenas um ponto, o número 10 da Tabela 6, está fora do limite aceitável. Houve 95% de adequação.

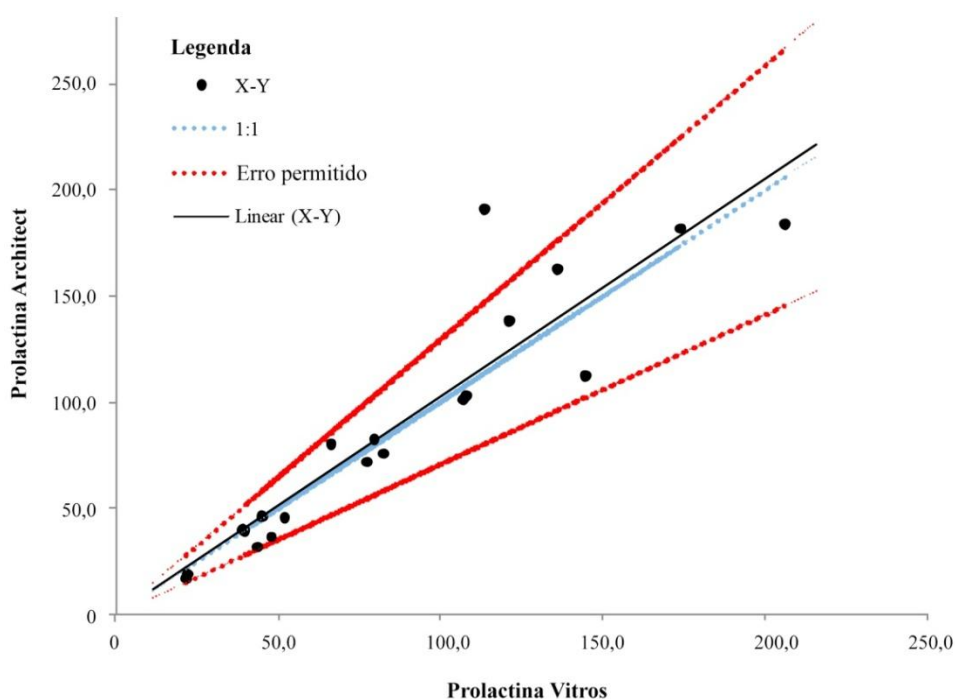


Figura 6 - Correlação entre os resultados de 20 dosagens séricas de prolactina, processadas nos equipamentos Architect® (Abbott) e Vitros® 5600 (Ortho-Clinical Diagnostics), no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

• TESTE DE COMPARAÇÃO II

O resultado de 40 dosagens de prolactina para verificação da concordância dos testes nos equipamentos Architect® (Abbott) e Vitros® 5600 (Ortho-Clinical Diagnostics) estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados de 40 prolactinas séricas processadas nos equipamentos *Architect*[®](Abbott) e *Vitros*[®]5600(*Ortho-Clinical Diagnostics*), no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

| AMOSTRA | PROLACTINA TESTE ng/mL | PROLACTINA COMPARATIVO ng/mL | DIFERENÇA DOS TESTES ng/mL |
|---------|------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 2,91 | 3,70 | -0,79 |
| 2 | 7,24 | 8,50 | -1,26 |
| 3 | 9,24 | 11,20 | -1,96 |
| 4 | 10,20 | 14,00 | -3,80 |
| 5 | 13,04 | 15,80 | -2,76 |
| 6 | 15,51 | 20,10 | -4,59 |
| 7 | 17,81 | 21,40 | -3,59 |
| 8 | 19,85 | 25,40 | -5,55 |
| 9 | 11,08 | 12,30 | -1,22 |
| 10 | 18,50 | 28,90 | -10,40 |
| 11 | 36,27 | 39,20 | -2,93 |
| 12 | 144,14 | 135,30 | 8,84 |
| 13 | 54,04 | 61,70 | -7,66 |
| 14 | 175,21 | 179,40 | -4,19 |
| 15 | 96,75 | 96,70 | 0,05 |
| 16 | 14,08 | 16,30 | -2,22 |
| 17 | 57,18 | 53,60 | 3,58 |
| 18 | 49,03 | 48,70 | 0,33 |
| 19 | 10,31 | 12,50 | -2,19 |
| 20 | 15,88 | 19,80 | -3,92 |
| 21 | 19,37 | 21,70 | -2,33 |
| 22 | 17,60 | 21,40 | -3,80 |
| 23 | 138,87 | 120,90 | 17,97 |
| 24 | 46,54 | 44,70 | 1,84 |
| 25 | 184,38 | 205,90 | -21,52 |
| 26 | 36,86 | 47,60 | -10,74 |
| 27 | 46,01 | 51,80 | -5,79 |
| 28 | 163,24 | 135,80 | 27,44 |
| 29 | 39,96 | 39,30 | 0,66 |
| 30 | 198,64 | 124,50 | 74,14 |
| 31 | 101,63 | 106,70 | -5,07 |
| 32 | 113,00 | 144,40 | -31,40 |
| 33 | 72,22 | 77,10 | -4,88 |
| 34 | 76,30 | 82,20 | -5,90 |
| 35 | 80,79 | 66,10 | 14,69 |
| 36 | 182,34 | 173,80 | 8,54 |
| 37 | 40,27 | 38,70 | 1,57 |
| 38 | 82,98 | 79,30 | 3,68 |
| 39 | 32,30 | 43,30 | -11,00 |
| 40 | 103,57 | 107,70 | -4,13 |
| Mínimo | 2,91 | 3,70 | -31,40 |
| Máximo | 198,64 | 205,90 | 74,14 |
| Média | 63,88 | 63,94 | -0,06 |

A média das diferenças entre os resultados das 40 dosagens de prolactina nos dois equipamentos foi de -0,06. Os resultados das dosagens de prolactina no equipamento *Architect*[®]apresentados variaram de 2,91 a 198,64 ng/mL e foram bem distribuídos ao longo do intervalo de medição do teste (0,6 a 200,0 ng/mL⁶⁴).

A concordância foi avaliada a partir da dispersão das diferenças entre as duas dosagens de prolactina e a média das diferenças \pm dois desvios padrões, por *Bland-Altman* (Figura 7).

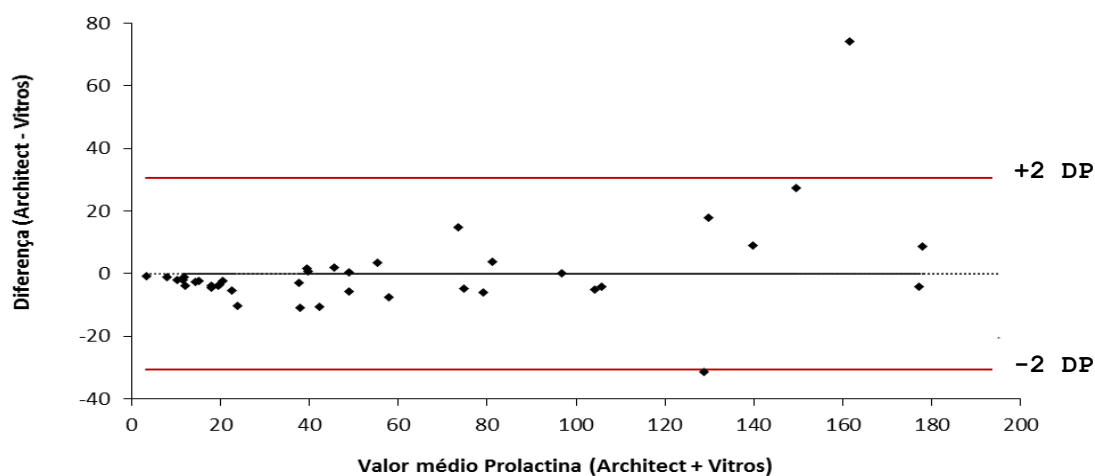


Figura 7 - Dispersão das diferenças de 40 dosagens séricas de prolactina em relação à média das diferenças \pm dois desvios padrões (DP). As amostras foram processadas nos equipamentos *Architect*[®](Abbott) e *Vitros*[®]5600(Ortho-Clinical Diagnostics), no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Associando o requisito do erro total permitido para prolactina (até 29,4%)⁶⁶ ao gráfico de dispersão das diferenças das 40 dosagens de prolactina, foi mantido o número de duas amostras fora dos limites de aceitação.(Figura 8).

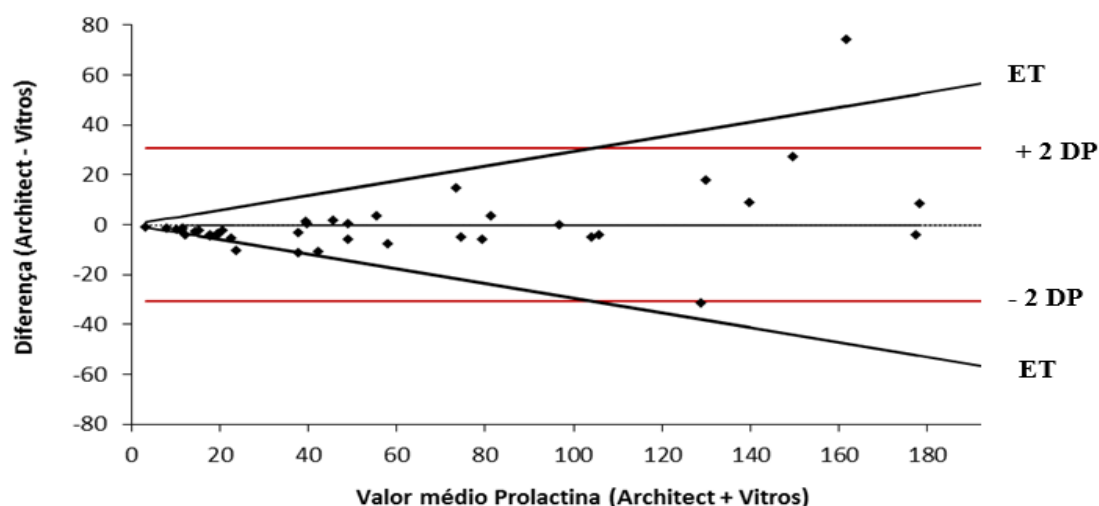


Figura 8 - Dispersão das diferenças de 40 dosagens séricas de prolactina em relação à média das diferenças \pm dois desvios padrões (DP), mais o limite do erro total permitido (ET). As amostras foram processadas nos equipamentos *Architect*[®](Abbott) e *Vitros*[®]5600(Ortho-Clinical Diagnostics), no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

5.3 VALIDAÇÃO DO INTERVALO DE REFERÊNCIA DE PROLACTINA MONOMÉRICA PÓS-PEG

Os resultados dos testes laboratoriais dos 40 participantes (20 mulheres e 20 homens) nessa etapa do trabalho estão apresentados nas Tabelas 8 e 9. Esses dados, juntamente com as informações clínicas dos voluntários foram utilizados para avaliar a inclusão dos mesmos na pesquisa.

Tabela 8 - Resultados de testes laboratoriais de 20 mulheres voluntárias. Os testes foram realizados no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

| MULHERES | IDADE | TSH mUI/mL | CREATININA mg/dL | AST U/L | ALT U/L | PRL ng/mL | PRL pós- PEG ng/mL |
|---------------|-------|---------------|---------------------|------------|------------|--------------|--------------------------|
| 1 | 23 | 2,57 | 0,78 | 22,0 | 33,7 | 17,03 | 11,30 |
| 2 | 25 | 3,02 | 0,75 | 30,5 | 35,6 | 12,86 | 7,40 |
| 3 | 26 | 2,03 | 0,88 | 33,3 | 41,4 | 7,98 | 5,38 |
| 4 | 28 | 3,33 | 0,85 | 18,5 | 25,8 | 13,12 | 9,02 |
| 5 | 29 | 1,92 | 0,72 | 24,2 | 23,3 | 9,00 | 6,30 |
| 6 | 29 | 3,41 | 0,85 | 23,3 | 20,2 | 10,52 | 6,14 |
| 7 | 32 | 2,15 | 0,65 | 19,8 | 30,0 | 13,32 | 8,58 |
| 8 | 32 | 2,01 | 0,73 | 20,4 | 35 | 8,85 | 6,06 |
| 9 | 33 | 3,04 | 0,67 | 24,2 | 41,9 | 7,42 | 5,12 |
| 10 | 34 | 2,25 | 0,56 | 20,4 | 30,6 | 9,81 | 6,72 |
| 11 | 34 | 2,94 | 0,74 | 23,4 | 20,5 | 13,86 | 8,70 |
| 12 | 34 | 1,04 | 0,62 | 23,5 | 19 | 10,58 | 7,24 |
| 13 | 38 | 1,68 | 0,93 | 24,6 | 29,2 | 13,93 | 10,20 |
| 14 | 41 | 1,06 | 0,84 | 20,6 | 26,8 | 10,77 | 7,80 |
| 15 | 42 | 1,52 | 0,58 | 17,7 | 18,4 | 7,53 | 5,02 |
| 16 | 44 | 1,82 | 0,85 | 24,9 | 44,1 | 9,06 | 6,48 |
| 17 | 49 | 1,48 | 0,49 | 24,6 | 31,5 | 7,15 | 5,14 |
| 18 | 55 | 2,10 | 0,70 | 21,2 | 32,8 | 19,54 | 13,94 |
| 19 | 55 | 1,79 | 0,86 | 26,3 | 39,4 | 5,22 | 3,88 |
| 20 | 61 | 1,91 | 1,03 | 27,1 | 30,0 | 4,83 | 3,66 |
| Mínimo | 23 | 1,04 | 0,49 | 17,7 | 18,4 | 4,83 | 3,66 |
| Máximo | 61 | 3,41 | 1,03 | 33,3 | 44,1 | 19,54 | 13,94 |
| Média | 37 | 2,15 | 0,75 | 23,5 | 30,5 | 10,62 | 7,20 |
| Desvio padrão | 11 | 0,70 | 0,14 | 3,8 | 7,8 | 3,78 | 2,55 |

TSH - hormônio estimulante da tireóide; AST –aspartato aminotransferase; ALT –alanina aminotransferase; PRL – prolactina; PEG – polietileno glicol. Valores de referência: TSH: 0,465 a 4,680 mUI/mL; Creatinina: 0,52 a 1,04 mg/dL; AST: 15 a 46 U/L; ALT: 13 a 69 U/L; PRL: 5,18 a 26,53 ng/mL.

Tabela 9 - Resultados de testes laboratoriais de 20 homens voluntários. Os testes foram realizados no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

| HOMENS | IDADE | TSH mUI/mL | CREATININA mg/dL | AST U/L | ALT U/L | PRL ng/mL | PRL pós- PEG ng/mL |
|------------------|-------|---------------|---------------------|------------|------------|--------------|--------------------------|
| 1 | 21 | 1,91 | 0,80 | 21,4 | 28,6 | 5,66 | 3,66 |
| 2 | 21 | 1,22 | 0,94 | 21,9 | 27,1 | 8,27 | 5,94 |
| 3 | 21 | 1,57 | 0,74 | 19,4 | 21,8 | 7,60 | 5,26 |
| 4 | 22 | 1,96 | 0,86 | 20,5 | 24,7 | 5,15 | 3,60 |
| 5 | 22 | 1,80 | 0,83 | 28,4 | 26,4 | 8,25 | 5,48 |
| 6 | 22 | 1,28 | 0,85 | 50,0 | 42,0 | 5,12 | 3,40 |
| 7 | 23 | 1,40 | 0,86 | 39,8 | 41,4 | 8,23 | 5,50 |
| 8 | 26 | 0,81 | 0,84 | 16,0 | 23,1 | 12,51 | 8,44 |
| 9 | 26 | 2,63 | 1,11 | 31,2 | 84,7 | 6,86 | 4,72 |
| 10 | 27 | 2,03 | 0,84 | 44,7 | 70,6 | 6,93 | 4,62 |
| 11 | 28 | 1,01 | 0,93 | 18,3 | 23,5 | 6,51 | 4,50 |
| 12 | 32 | 0,80 | 1,18 | 26,7 | 45,9 | 7,17 | 4,36 |
| 13 | 39 | 1,03 | 0,86 | 26,3 | 40,0 | 7,40 | 4,66 |
| 14 | 42 | 1,62 | 1,04 | 27,7 | 31,1 | 7,78 | 5,12 |
| 15 | 45 | 1,79 | 1,08 | 24,3 | 20,9 | 5,77 | 3,96 |
| 16 | 45 | 1,70 | 0,81 | 51,7 | 61,4 | 7,23 | 4,78 |
| 17 | 47 | 0,71 | 0,98 | 20,0 | 28,8 | 4,77 | 3,42 |
| 18 | 50 | 1,18 | 0,75 | 34,1 | 40,2 | 8,48 | 6,04 |
| 19 | 51 | 1,48 | 0,86 | 23,0 | 27,3 | 5,37 | 3,54 |
| 20 | 51 | 1,12 | 1,00 | 26,1 | 48,6 | 3,73 | 2,72 |
| Mínimo | 21 | 0,71 | 0,74 | 16,0 | 20,9 | 3,73 | 2,72 |
| Máximo | 51 | 2,63 | 1,18 | 51,7 | 84,7 | 12,51 | 8,44 |
| Média | 33 | 1,45 | 0,91 | 28,6 | 37,9 | 7,05 | 4,69 |
| Desvio padrão | 12 | 0,49 | 0,12 | 10,4 | 17,4 | 1,88 | 1,27 |

TSH - hormônio estimulante da tireóide; AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase; PRL – prolactina; PEG – polietileno glicol. Valores de referência: TSH: 0,465 a 4,680 mUI/mL; Creatinina: 0,66 a 1,25mg/dL; AST: 15 a 46 U/L; ALT: 13 a 69 U/L; PRL: 3,46 a 19,40ng/mL

Os resultados de prolactina monomérica pós-PEG dos dois grupos acima representados foram comparados com os respectivos intervalos de referência padronizados por Beltran *et al*⁴:

- Mulheres: 3,73 a 16,37 ng/mL

- Homens: 3,40 a 10,80 ng/mL

Dois voluntários, um do sexo feminino e outro do sexo masculino, apresentaram concentração de prolactina pós-PEG mais baixa do que os limites inferiores dos valores de referência.

5.4 PESQUISA DE MACROPROLACTINA

Amostras de três níveis de soro controle *Lyphochek Immunoassay Plus Control, Bio-Rad* lote 40300, foram ensaiados antes de todas as corridas analíticas e se mantiveram dentro dos intervalos de referência padronizados pelo fabricante.

Os soros de 112 pacientes com hiperprolactinemia foram submetidos à pesquisa de macroprolactina pela técnica de precipitação com PEG. Foram 96 mulheres (86%) com idade entre 18 e 80 anos (mediana 38 anos), e 16 homens (14%), com idade entre 21 e 65 anos (mediana 45 anos).

A prevalência de macroprolactinemia nas amostras hiperprolactinêmicas do estudo foi de 19%. Num total de 112 pacientes estudados, 21 tiveram o resultado do teste positivo pela avaliação da concentração de prolactina monomérica pós-PEG comparada ao intervalo de referência validado, sendo 19 mulheres e dois homens.

Os resultados referentes à idade, sexo, níveis séricos de prolactina basal e pós-PEG e o percentual de recuperação de cada participante se encontram no APÊNDICE A e no APÊNDICE B.

A faixa etária dos pacientes estudados foi apresentada na Figura 9.

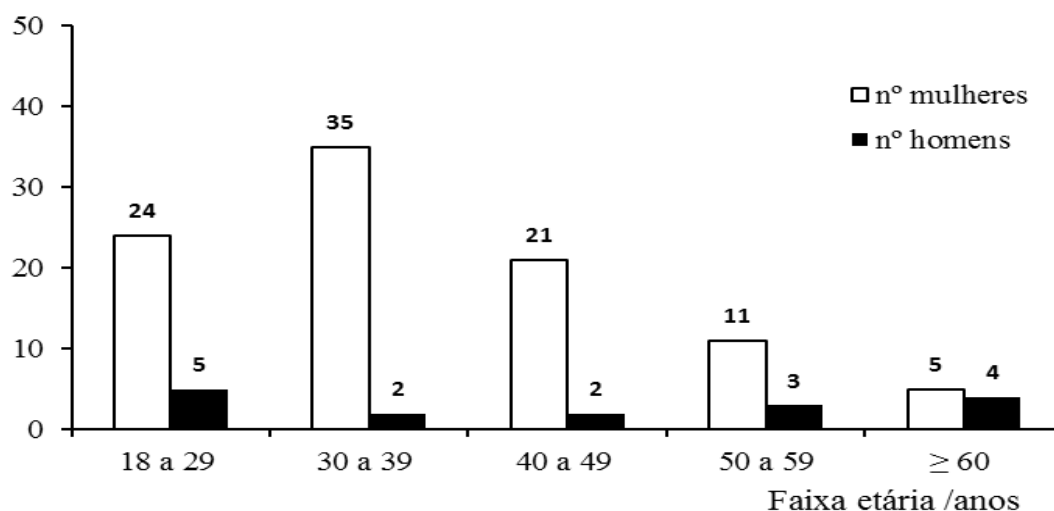


Figura 9 - Distribuição por faixa etária das 96 mulheres e dos 14 homens do estudo, realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

O número de pacientes do sexo feminino no estudo foi maior do que o do sexo masculino. A distribuição por faixa etária feminina mostrou uma menor frequência com o aumento da idade. Já a distribuição dos homens foi diferente, com número maior de participantes nos dois extremos de faixas etárias: 18 a 29 anos e ≥ 60 anos.

A Figura 10 mostra a distribuição da frequência de macroprolactinemia em relação ao nível de prolactina total.

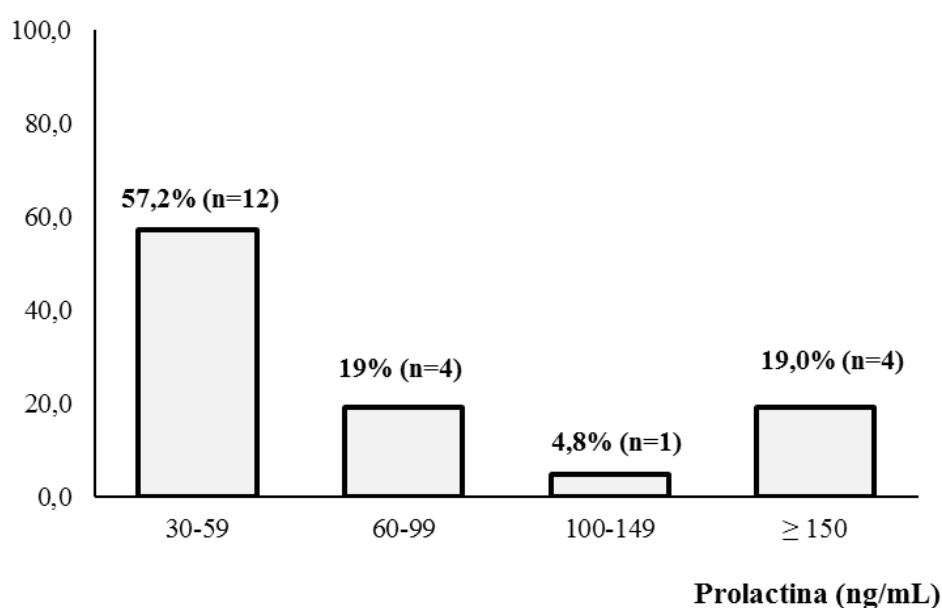


Figura 10 - Frequência (%) de macroprolactinemia em relação ao nível sérico de prolactina total em 21 amostras processadas no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

A maioria dos pacientes com macroprolactinemia (76,2%) tinha o nível sérico de prolactina total abaixo de 100 ng/mL. Um paciente (4,8%) tinha a concentração sérica de prolactina total entre 100 e 149 ng/mL e quatro pacientes (19%), ≥ 150 ng/mL.

A distribuição da frequência de macroprolactinemia em mulheres e em homens foi apresentada nas Figura 11 e não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,488$).

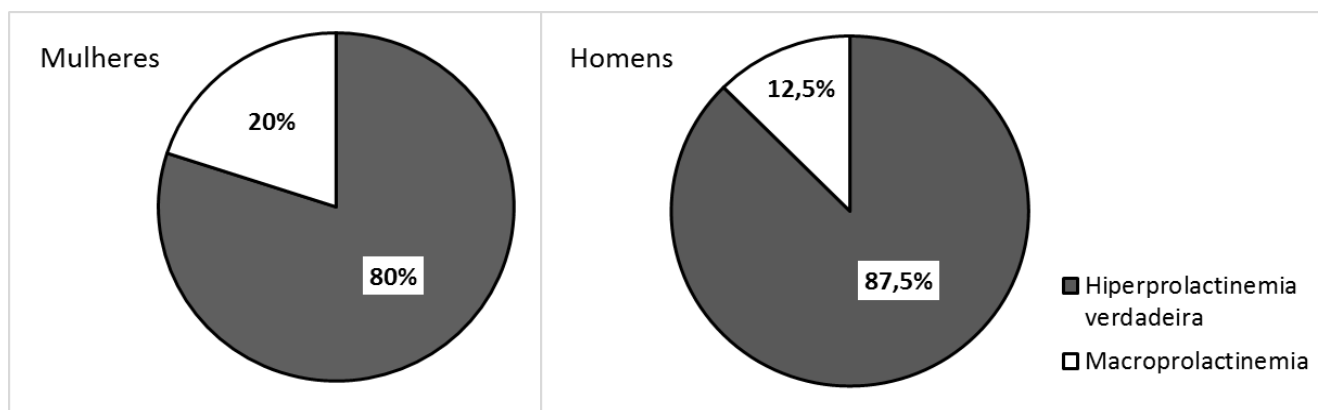


Figura 11 - Distribuição da frequência de macroprolactinemia nas amostras de 96 mulheres e de 16 homens. Estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os resultados médios das dosagens de prolactina dos pacientes do estudo estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultado médio das dosagens de prolactina dos 112 pacientes do estudo, estratificado pelo tipo de prolactina. Estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

| PARÂMETROS | HIPERPROLACTINEMIA VERDADEIRA (n = 91) | MACROPROLACTINEMIA (n = 21) | p* |
|-----------------------------|---|--------------------------------|--------|
| Idade (anos) | 39 ± 13 | 40 ± 13 | 0,715 |
| Sexo: | | | |
| Mulheres [número(%)] | 77 (85%) | 19 (90%) | |
| Homens [número(%)] | 14 (15%) | 2 (10%) | |
| PRL Total : | | | |
| Média ± DP (ng/mL) | 77,9 ± 71,8 | 82,8 ± 72,6 | |
| Mediana (ng/mL) | 54,3 | 49,0 | 0,961 |
| PRL monomérica pós-PEG : | | | |
| Média ± DP (ng/mL) | 46,3 ± 39,0 | 8,6 ± 4,0 | |
| Mediana (ng/mL) | 33,8 | 7,6 | <0,001 |
| Porcentagem de recuperação: | | | |
| Média (%) | 62 ± 11 | 15 ± 10 | |
| Mediana (%) | 65 | 14 | <0,001 |

* Teste de Mann Whitney; PRL – prolactina; PEG – polietileno glicol; DP – Desvio Padrão

Os resultados da comparação entre as duas abordagens de interpretação do teste de pesquisa da macroprolactina foram apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Comparação dos métodos de interpretação da pesquisa de macroprolactina: intervalo de referência de prolactina (PRL) monomérica pós-polietileno glicol (pós-PEG) e % recuperação. Estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

| CRITÉRIOS | PRL MONOMÉRICA elevada pós-PEG | PRL MONOMÉRICA normal pós-PEG | TOTAL |
|-----------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| > 60% de recuperação | 63 (56%) | 0 | 63 (56%) |
| 40-60% de recuperação | 23(21%) | 0 | 23 (21%) |
| < 40% de recuperação | 5 (4%) | 21 (19%) | 26 (23%) |
| TOTAL | 91 (81%) | 21 (19%) | 112 (100%) |

Todas as 21 amostras que tiveram o resultado de prolactina pós-PEG dentro do intervalo de referência estudado, tiveram a confirmação de macroprolactinemia pela porcentagem de recuperação, <40%. As amostras que tiveram resultado de prolactina pós-PEG acima do intervalo de referência estudado, ou seja, com indicação de hiperprolactinemia verdadeira, tiveram interpretação divergente, pela porcentagem de recuperação, em 28 amostras.

A distribuição dos resultados de prolactina monomérica pós-PEG das 96 pacientes do sexo feminino em relação à porcentagem de recuperação foi apresentada na Figura 12.

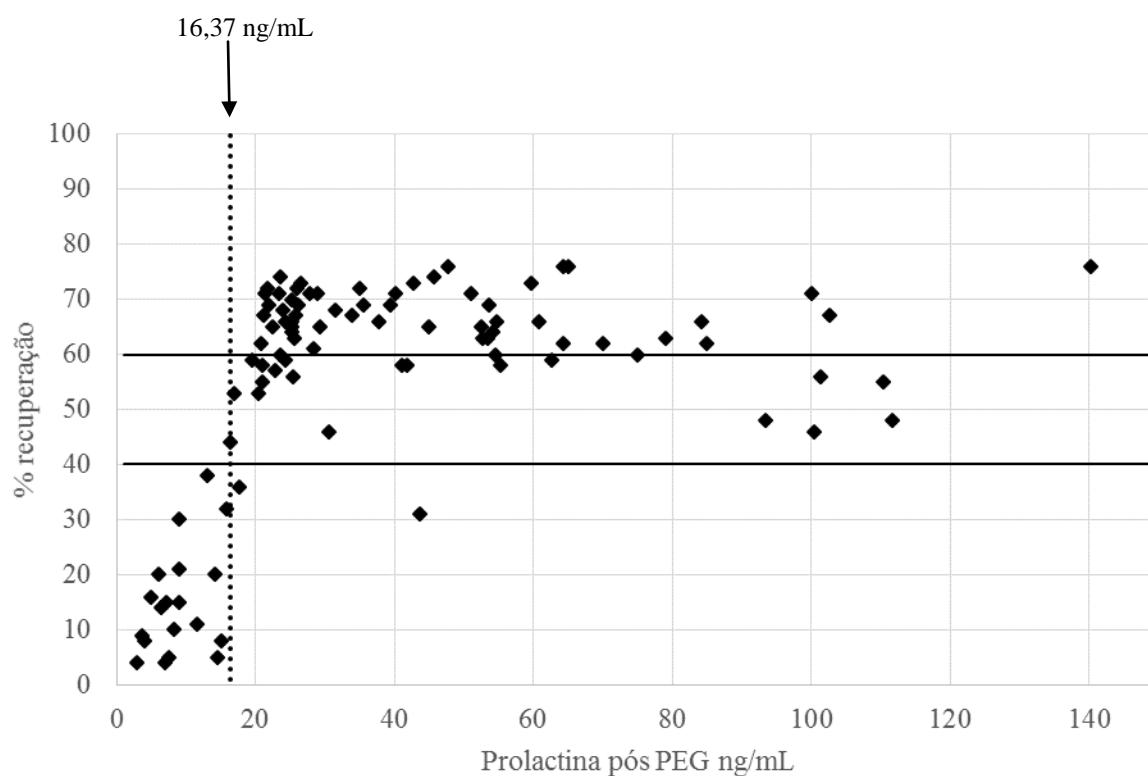


Figura 12 - Distribuição dos resultados de prolactina monomérica pós-PEG de 96 mulheres em relação a porcentagem (%) de recuperação. A linha pontilhada corresponde a 16,37 ng/mL, limite superior do intervalo de referência feminino. Estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

A distribuição dos resultados de prolactina monomérica pós-PEG dos 16 pacientes do sexo masculino em relação à porcentagem de recuperação foi apresentada na Figura 13.

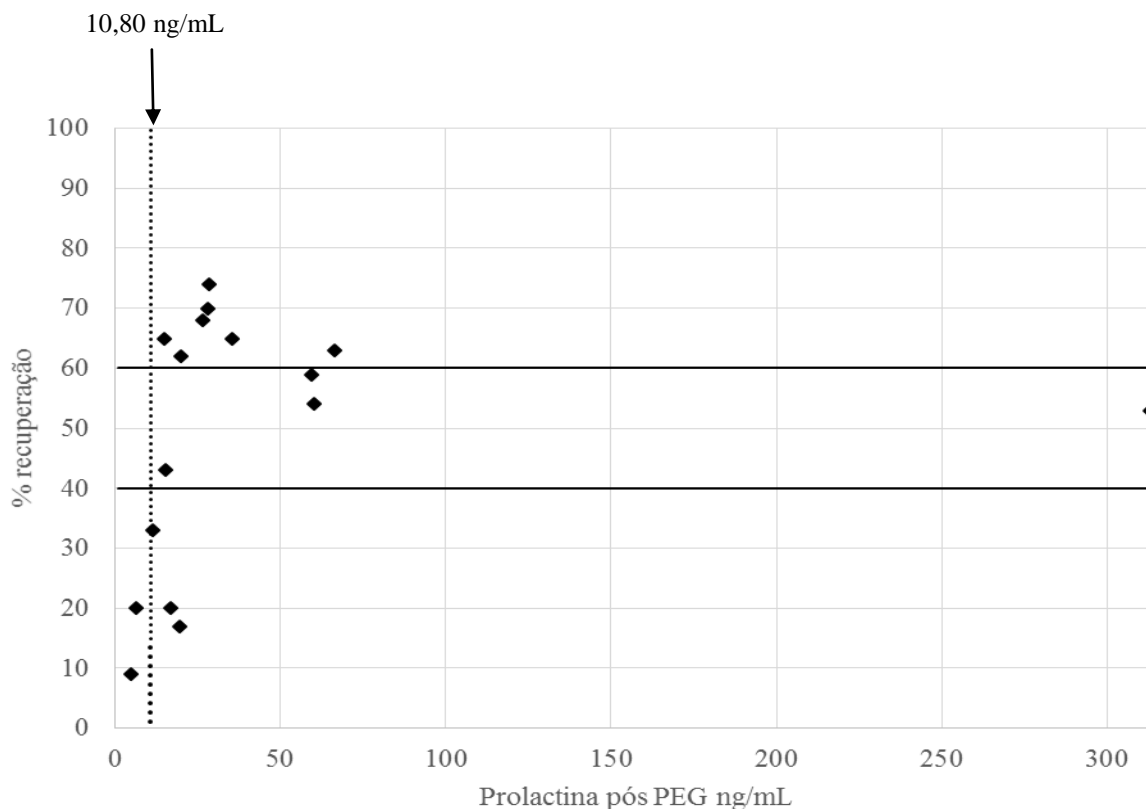


Figura 13 - Distribuição dos resultados de prolactina monomérica pós-PEG de 16 homens em relação a porcentagem (%) de recuperação. A linha pontilhada corresponde a 10,80 ng/mL, limite superior do intervalo de referência masculino. Estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Em ambos os gráficos, no quadrante inferior esquerdo estão representados os testes com resultado de prolactina pós-PEG dentro do intervalo de referência e porcentagem de recuperação <40%, indicativo de macroprolactinemia pelas duas abordagens de interpretação da pesquisa de macroprolactina. No quadrante superior direito estão representados os testes com resultado de prolactina pós-PEG acima do intervalo de referência e porcentagem de recuperação >60%, indicativo de hiperprolactinemia verdadeira pelas duas abordagens de interpretação da pesquisa de macroprolactina.

Resultados mostrando excesso de macroprolactina e de prolactina monomérica foram representados no quadrante inferior, à direita. Resultados de prolactina pós-PEG acima do intervalo de referência (excesso de prolactina monomérica) e porcentagem de recuperação entre 40% e 60% (indeterminados) foram representados do quadrante médio, à direita. Alguns resultados de prolactina pós-PEG ficaram próximos aos valores de corte nos respectivos gráficos (mulheres: 16,37 ng/mL; homens: 10,80 ng/mL)⁴ e correspondem às amostras 33, 41, 43, 45, 55, 56 e 79 do apêndice A e à amostra 11 do apêndice B

O resultado da pesquisa de macroprolactina com a interpretação do teste pela comparação da prolactina pós-PEG com o intervalo de referência validado mostrou 21 casos de macroprolactinemia (19%) e 91 de hiperprolactinemia verdadeira (81%). Três amostras foram identificadas como macroprolactinemia + excesso de prolactina monomérica.

Alguns dados clínicos dos pacientes com resultado positivo na pesquisa de macroprolactinemia deste estudo foram apresentados na Tabela 12. As informações foram buscadas nos prontuários dos pacientes e tem possível relação com a concentração sérica elevada de prolactina. Os medicamentos relatados por paciente não foram, necessariamente, usados simultaneamente.

Tabela 12: Dados dos pacientes com hiperprolactinemia e resultado positivo na pesquisa de macroprolactina, em estudo realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

| Pacientes (sexo, idade) | Características clínicas | Medicamentos | Testes de imagem | Diagnóstico |
|-------------------------|--|--|---|---|
| 1- (F/18) | | Risperidona, olanzapina | | Distúrbio psiquiátrico grave |
| 8 - (M/44) | Infertilidade | | | Em tratamento de infertilidade |
| 11- (F/24) | Abortamento de repetição Parto: out/2015 | | TC e RMN de sela túrcica normais | Hipotireoidismo controlado |
| 13- (F/25) | Infertilidade 1ª com ciclos regulares | | | Em tratamento de infertilidade |
| 14- (F/26) | Infertilidade 1ª por azoospermia obstrutiva | | | Em tratamento de infertilidade |
| 15- (M/64) | Disfunção erétil | Tacrolimus, lamivudina e anlodipina, | | Cirrose, hepatite B |
| 31- (F/32) | Dismenorreia, infertilidade 2ª, abortamento de repetição | | | Em tratamento de infertilidade |
| 43- (F/35) | Infertilidade 1ª | | | Em tratamento de infertilidade |
| 45- (F/36) | Amenorréia, infertilidade | | | Ovário policístico, Em tratamento de infertilidade |
| 46- (F/36) | Infertilidade 1ª | | | Hipotireoidismo, em tratamento de infertilidade |
| 51- (F/38) | Amenorreia | Prednisona | | Esclerose sistêmica, LES, fibrose pulmonar menopausa precoce? |
| 55- (F/39) | Abortamento de repetição, Ciclos regulares | | | Em tratamento de infertilidade |
| 56- (F/39) | Cefaleia bifrontal Ciclos regulares | | RMN de sela túrcica normal | Trombose carótida |
| 57- (F/39) | Galactorreia, distúrbios visuais | Venlafaxina, (cabergolina) | RMN de sela túrcica microadenoma | Depressão, Hipotireoidismo |
| 60- (F/40) | Amenorreia 1ª | Risperidona, imipramina, ácido valpróico, (bromocriptina) | RMN de sela túrcica normal | Hipotireoidismo, esquizofrenia, Nefropatia diabética |
| 62- (F/41) | Infertilidade 1ª | (bromocriptina) | TC de sela túrcica normal | Em tratamento de infertilidade |
| 65- (F/42) | Sem alterações menstruais | Fluoxetina, nifedipina, hidroclorotiazida (bromocriptina, cabergolina) | TC de sela túrcica normal RMN de sela túrcica microadenoma | Hipotireoidismo pós radioiodo (controlado) |
| 70- (F/43) | Infertilidade 2ª (fator tubário) com ciclos regulares | | | Em tratamento de infertilidade |
| 72- (F/44) | Ciclos regulares | | | Anemia falciforme |
| 84- (F/52) | | | RMN: sela túrcica vazia | Acromegalia, adenoma hipofisário secretor GH |
| 95- (F/75) | | | | Depressão, ansiedade, |

TC: tomografia computadorizada; RMN: ressonância nuclear magnética

5.5 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO (GFC)

Registros gráficos de cromatografia obtidos em coluna Superdex™ 200, característicos de macroprolactinemia (a) e de hiperprolactinemia verdadeira (b) foram apresentados na Figura 14.

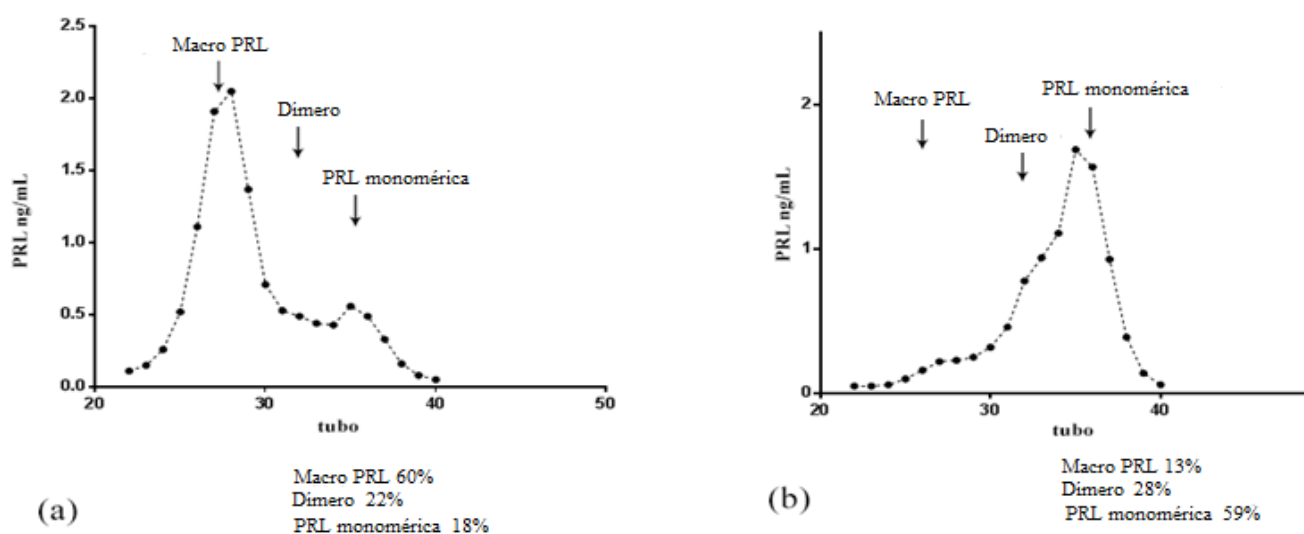


Figura 14 - Perfil de eluição de prolactina (PRL) obtido pela cromatografia em coluna de gel filtração (Superdex™ 200, 0,9x30cm, alíquotas de 0,7 mL) em soro com macroprolactinemia (a) e com hiperprolactinemia verdadeira (b).

A amostra da Figura 14(a) apresentou um pico na fração correspondente à macroprolactina (60%) e apenas 18% de prolactina monomérica. A amostra da Figura 14(b) apresentou um pico com área >50% de prolactina monomérica, indicando hiperprolactinemia verdadeira.

Os registros gráficos das 25 GFC realizadas se encontram no APÊNDICE C.

Os resultados e a interpretação da GFC de 25 pacientes foram apresentados na Tabela 13, junto os com valores de prolactina antes e após a precipitação com PEG e a porcentagem de recuperação. Apenas o resultado da GFC da amostra 55(F), macroprolactinemia associada à hiperprolactinemia verdadeira, foi diferente do resultado encontrado neste estudo, macroprolactinemia isolada.

Tabela 13 - Resultados da prolactina (PRL) sérica (ng/mL) antes e após precipitação com polietileno glicol (PEG), da porcentagem de recuperação de prolactina pós-PEG e da cromatografia em coluna de gel filtração (GFC).

| PACIENTE (sexo) | RESULTADO | | | GFC | INTERPRETAÇÃO |
|--------------------|-----------|--------------------------|-------------|---|-------------------------------|
| | PRL | Pós-precipitação com PEG | | | |
| | | PRL pós-PEG | Recuperação | | |
| 2 (F) | 38,0 | 20,9 | 55% | Macroprl: 9% Dímero: 18% PRL monomérica: 73% | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 3 (F) | 195,7 | 93,5 | 48% | Macroprl: 15% Dímero: 7% PRL monomérica: 78% | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 3 (M) | 40,4 | 28,2 | 70% | Macroprl: 5% Dímero: 18% PRL monomérica: 77% | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 5 (F) | 40,9 | 29,0 | 71% | Macroprl: 6% Dímero: 16% PRL monomérica: 78% | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 7 (F) | 77,7 | 53,5 | 69% | Macroprl: 6% Dímero: 17% PRL monomérica: 77% | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 10 (M) | 38,5 | 28,4 | 74% | Macroprl: 4% Dímero: 16% PRL monomérica: 80% | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 12 (F) | 38,5 | 20,3 | 53% | Macroprl: 27% Dímero: 17% PRL monomérica: 56% | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 14 (F) | 80,8 | 8,3 | 10% | Macroprl: 51% Dímero: 20% PRL monomérica: 29% | Macroprolactina positivo |
| 15 (M) | 55,6 | 4,8 | 9% | Macroprl: 48% Dímero: 29% PRL monomérica: 23% | Macroprolactina positivo |
| 21 (F) | 125,6 | 74,9 | 60% | Macroprl: 5% Dímero: 9% PRL monomérica: 86% | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 25 (F) | 84,3 | 53,4 | 63% | Macroprl: 10% Dímero: 10% PRL monomérica: 80% | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 31 (F) | 46,0 | 6,4 | 14% | Macroprl: 30% Dímero: 31% PRL monomérica: 39% | Macroprolactina positivo |
| 33 (F) | 32,3 | 17,0 | 53% | Macroprl: 13% Dímero: 28% PRL monomérica: 59% | Hiperprolactinemia verdadeira |

| PACIENTE (sexo) | RESULTADO | | | GFC | INTERPRETAÇÃO |
|--------------------|-----------|----------------------|-------------|---|---|
| | PRL | Pós-precipitação PEG | | | |
| (...continuação) | | PRL pós-PEG | Recuperação | | |
| 35 (F) | 234,3 | 111,6 | 48% | Macroprl: 4% Dímero: 6% PRL monomérica: 90% | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 46 (F) | 46,5 | 7,1 | 15% | Macroprl: 59% Dímero: 14% PRL monomérica: 27% | Macroprolactina positivo |
| 49 (F) | 72,2 | 41,8 | 58% | Macroprl: 7% Dímero: 12% PRL monomérica: 81% | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 55 (F) | 310,2 | 14,5 | 5% | Macroprl: 58% Dímero: 7% PRL monomérica: 35% | Macroprolactinemia + Hiperprolactinemia verdadeira |
| 60 (F) | 47,5 | 3,9 | 8% | Macroprl: 60% Dímero: 22% PRL monomérica: 18% | Macroprolactina positivo |
| 61 (F) | 184,4 | 140,3 | 76% | Macroprl: 5% Dímero: 7% PRL monomérica: 88% | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 65 (F) | 191,4 | 7,0 | 4% | Macroprl: 79% Dímero: 7% PRL monomérica: 14% | Macroprolactina positivo |
| 66 (F) | 83,5 | 54,7 | 66% | Macroprl: 5% Dímero: 10% PRL monomérica: 85% | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 67 (F) | 81,6 | 59,6 | 73% | Macroprl: 3% Dímero: 9% PRL monomérica: 88% | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 79 (F) | 36,9 | 16,4 | 44% | Macroprl: 27% Dímero: 26% PRL monomérica: 47% | Macroprolactina positivo (?) |
| 84 (F) | 40,0 | 3,6 | 9% | Macroprl: 59% Dímero: 21% PRL monomérica: 20% | Macroprolactina positivo |
| 86 (F) | 39,0 | 27,7 | 71% | Macroprl: 5% Dímero: 16% PRL monomérica: 79% | Hiperprolactinemia verdadeira |

F: sexo feminino; M: sexo masculino; PRL: prolactina (ng/mL); PEG: polietileno glicol; macroprl: macroprolactina; GFC: cromatografia em coluna de gel filtração

GFC: PRL monomérica > 50%: hiperprolactinemia verdadeira

Valores de referência de PRL pós-PEG
(Beltran *et al*, 2008)⁴

Mulheres: 3,73 - 16,37 ng/mL

Homens: 3,40 - 10,80 ng/mL

% de recuperação

< 40%: macroprolactina positivo

> 60%: hiperprolactinemia verdadeiro

40 - 60%: indeterminado

6 - DISCUSSÃO

A macroprolactina é um interferente comum nas dosagens de prolactina e deve ser identificado, já que pode representar uma causa relevante de erro diagnóstico e levar a investigações desnecessárias e tratamentos inadequados^{5,20,24}. A solicitação da dosagem de prolactina pelos serviços especializados é frequente na prática clínica e um resultado com acurácia é importante para um encaminhamento seguro do paciente.

A prevalência de macroprolactinemia nas amostras hiperprolactinêmicas estudadas foi de 19%, valor que está de acordo com os dados da literatura^{10,43,44}. A pesquisa de macroprolactina pela precipitação com PEG com avaliação da concentração de prolactina monomérica pós-PEG comparada a intervalos de referência adequados^{4,14} deve ser o método de escolha para a rotina assistencial nos laboratórios clínicos por ser sensível e específico. A identificação de pacientes com excesso simultâneo de macroprolactina e prolactina monomérica bioativa foi o diferencial encontrado na abordagem de interpretação dos resultados pelo critério de concentração de prolactina monomérica pós-PEG comparada a um intervalo de referência de amostras de indivíduos saudáveis tratadas com PEG. O critério convencional de interpretação pela porcentagem de recuperação de prolactina pós-PEG identificou apenas macroprolactinemia isolada nestes pacientes.

O reagente comercial para a dosagem de prolactina em uso no SML faz parte do sistema *Vitros*[®]5600 (*Ortho Clinical Diagnostics*), uma plataforma automatizada que reúne várias metodologias para a quantificação de diversos analitos. Devido à viscosidade aumentada da solução de polietileno glicol, não é possível realizar a pesquisa de macroprolactina neste equipamento. Por isto, a pesquisa de macroprolactina foi realizada no sistema analítico *Architect*[®](*Abbott*), onde o PEG não interfere na metodologia da dosagem de prolactina⁸.

Um novo sistema ou produto deve atender às especificações de desempenho analítico do laboratório para assegurar que ele funcione conforme esperado e proporcione resultados confiáveis⁶¹. Desta forma, foi realizada a validação do reagente comercial de prolactina do sistema *Architect*[®](*Abbott*) para verificação, nas condições locais, do seu desempenho em relação à precisão (reprodutibilidade), linearidade (geração de resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, dentro do intervalo de medição) e exatidão (teste de comparabilidade). O estudo da verificação desses parâmetros faz parte das boas práticas em

laboratórios clínicos e deve sempre ser realizado na rotina do serviço. O processo de validação fornece uma estimativa do erro presente no resultado do teste para que ele não afete a interpretação do resultado nem comprometa o cuidado com o paciente⁶³. Para alguns experimentos deste estudo, foram adotados os requisitos da especificação desejável de qualidade para a prolactina, que é baseada na variação biológica: erro sistemático de 10,5%, erro aleatório de 11,5% e erro total de 29,4%⁶⁶.

A interpretação dos resultados dos testes laboratoriais é feita pela comparação do resultado da amostra do paciente com um intervalo de referência. Este intervalo é estabelecido com amostras de um grupo de indivíduos clinicamente saudáveis, com características demográficas próprias, selecionados por critérios cuidadosamente definidos⁶³. A validação dos intervalos de referência para prolactina monomérica pós-PEG propostos por Beltran *et al*⁴ foi importante para verificar sua aplicabilidade na nossa população e sua adequação à interpretação clínica.

No estudo de precisão, foram utilizadas duas amostras com concentrações distintas de prolactina, uma com valor alto e outra com valor normal, conforme preconizado pelo CLSI⁶⁷. A imprecisão intradia e a imprecisão total foram menores do que a imprecisão declarada pelo fabricante e ambas foram consideradas adequadas. A imprecisão total também atendeu ao critério clínico para as concentrações de prolactina nas duas amostras testadas e os coeficientes de variação (CV) ficaram abaixo do parâmetro de imprecisão máxima aceitável (2,0% e 2,4% frente a 11,5%)⁶⁶.

No estudo da linearidade, a imprecisão estimada foi de 1,61% e ficou abaixo do valor máximo admitido de 11,5%⁶⁶, o que garantiu que a imprecisão presente esteve sob controle e não reduziu a capacidade do teste para a identificação de uma não linearidade. O coeficiente de determinação r^2 de 0,999, ficou acima do mínimo aceitável, 0,99. Portanto, o teste foi considerado adequado, dentro da linearidade do reagente, 200 ng/mL⁶⁴.

No estudo de comparação I, a concordância das dosagens de prolactina nos dois sistemas analíticos foi avaliada pela regressão linear e a diferença aceitável entre os resultados foi baseada no erro total desejável para a prolactina, até 29,4%⁶⁶. No estudo de comparação I, o coeficiente de correlação linear (r) foi 0,997 ($>0,975$), a inclinação da reta foi 1,027 (próxima de 1,0) e índice de erro foi adequado para 95% das amostras

No estudo de comparação II e no estudo II associado ao erro total, 95% dos resultados ficaram dentro dos limites estabelecidos. Portanto, não foi encontrada diferença significativa, do ponto de vista clínico, entre os dois equipamentos [*Architect*[®] (*Abbott*) e *Vitros*[®]5600 (*Ortho Clinical Diagnostics*)] com relação à dosagem de prolactina. O ponto que ficou mais distante do limite de +2 desvios padrões na Figura 7 corresponde a um paciente que teve resultado positivo na pesquisa de macroprolactina. Esta amostra apresentou grande variação na concentração de prolactina nas dosagens realizadas nos dois equipamentos devido à presença de um interferente importante. Isto mostrou que os dois sistemas analíticos utilizados para a dosagem de prolactina *Architect*[®] (*Abbott*) e *Vitros*[®]5600 (*Ortho Clinical*) reconhecem de forma diferente a macroprolactina. Ambos os testes foram padronizados com o terceiro padrão internacional para prolactina, 84/500, da Organização Mundial de Saúde⁵, mas cada imunoensaio utiliza diferentes anticorpos, o que resultou na variação dos resultados⁵⁸. Em todos os imunoensaios para dosagem de prolactina, a macroprolactina pode ser detectada, em diferentes graus^{4,5,44,48,74}.

No presente estudo, optou-se pelos intervalos de referência de amostras de indivíduos saudáveis tratadas com PEG, padronizados para o sistema *Architect*[®] (*Abbott*) e propostos por Beltran *et al*⁴. Para estabelecer estes intervalos, eles utilizaram um número maior de participantes (93 mulheres e 53 homens) do que os outros pesquisadores que também estabeleceram intervalos de referência de prolactina monomérica pós-PEG para o mesmo sistema analítico: Germano *et al*⁴⁴ (46 mulheres e 4 homens) e Whitehead *et al*⁴³ (49 mulheres e 52 homens). Além disso, Beltran *et al*⁴ validaram os resultados de seu trabalho com o método de referência para a pesquisa de macroprolactina, a GFC, o que não foi feito nos outros dois estudos citados. A faixa etária dos voluntários que participaram da validação dos intervalos de referência do presente estudo foi de 23 a 61 anos no grupo feminino e de 21 a 51 anos no grupo masculino, valores próximos às idades dos participantes do trabalho de Beltran *et al*⁴ (19 a 59 anos no grupo feminino e 20 a 64 anos no grupo masculino).

Dois participantes, um do sexo masculino e outro feminino tiveram o resultado de prolactina monomérica pós-PEG fora dos respectivos intervalos propostos. As concentrações mais baixas de prolactina sérica foram encontradas nos participantes com a idade mais alta, o que corrobora os dados da literatura^{17,19,20}. As faixas de referência foram consideradas válidas já que 95% dos resultados de prolactina pós-PEG dos participantes de ambos os sexos estiveram dentro dos respectivos intervalos. Porém, constatamos que a maioria dos resultados de

prolactina pós-PEG do grupo de mulheres e do grupo de homens estava abaixo dos valores médios dos respectivos intervalos de referência. A média dos resultados de prolactina monomérica pós-PEG encontrados no grupo das mulheres voluntárias deste estudo (7,20 ng/mL) ficou abaixo da média do intervalo proposto por Beltran *et al*⁴ (intervalo de 3,73 a 16,37 ng/mL, média 10,05 ng/ml). A média dos resultados de prolactina monomérica pós-PEG encontrados no grupo dos homens voluntários deste estudo (4,69 ng/mL) também ficou abaixo da média do intervalo proposto por Beltran *et al*⁴ (intervalo de 3,40 a 10,80 ng/mL, média 7,10 ng/ml). Isto pode ter ocorrido devido à diversidade das populações estudadas e à repadronização do reagente comercial do imunoensaio de prolactina pela Abbott em 2013, quando foi informado pela empresa que valores mais baixos de prolactina poderiam ser encontrados a partir daquela data⁴³.

A prevalência de macroprolactinemia encontrada nas amostras hiperprolactinêmicas dos pacientes do presente trabalho foi de 19%, valor consistente com os dados da literatura. Estudos que fizeram a pesquisa da macroprolactina em amostras hiperprolactinêmicas apresentaram uma prevalência entre 15% e 35%¹⁰. Esta ampla variação pode ser explicada pelas diferenças das populações estudadas e pelos diferentes imunoensaios utilizados nas dosagens de prolactina. Um programa de ensaio de proficiência no Reino Unido mostrou uma prevalência de macroprolactinemia em amostras hiperprolactinêmicas no sistema Architect[®](Abbott) entre 16-17%²⁴. Dois estudos que utilizaram o imunoensaio do sistema Architect[®] apresentaram os resultados de prevalência de macroprolactinemia em amostras hiperprolactinêmicas de 21,5%⁴⁴ e 14,9%⁴³.

A idade das pacientes do sexo feminino do presente estudo variou de 18 e 80 anos (mediana 38 anos). Observou-se maior número de dosagens alteradas de prolactina na idade reprodutiva da mulher. Já no grupo masculino, idade entre 21 e 65 anos (mediana 45 anos), houve mais dosagens com valores elevados de prolactina nas faixas etárias abaixo de 30 e acima de 60 anos de idade. A hiperprolactinemia é reconhecidamente uma condição mais prevalente em mulheres^{17,19}.

Nos resultados do presente estudo, a presença de macroprolactinemia não se relacionou ao gênero. A porcentagem de macroprolactinemia nos pacientes estudados, 20% no grupo feminino e 12,5% no grupo masculino, foi semelhante aos resultados encontrados por Gibney *et al*⁹, 24% no grupo feminino e 12% no grupo masculino.

As amostras hiperprolactinêmicas do presente estudo foram aliquotadas e armazenadas ao longo de 15 meses (entre dezembro/2014 e fevereiro/2016) de forma consecutiva. Um critério utilizado para a seleção das amostras foi a concentração sérica de prolactina total acima dos limites superiores dos intervalos de referência fornecidos nas instruções de uso do reagente comercial de prolactina do equipamento *Architect*[®] (*Abbott*): 19,4 ng/mL para homens e 26,5 ng/mL para mulheres⁶⁴. Alguns autores selecionaram, para seus estudos, amostras com concentração de prolactina acima dos valores de referência^{7,49} ou com concentração >28 ng/mL¹⁴ ou ≥ 30 ng/mL^{35,75,76} ou >33 ng/mL^{8,43,44}. Vieira⁷⁷ sugeriu que um valor igual ou maior que o dobro do limite superior do intervalo de referência poderia ser considerado como francamente anormal e ser o valor de corte para seleção de amostras hiperprolactinêmicas a serem estudadas. Se este critério sugerido por Vieira fosse adotado no presente estudo, 53% das amostras identificadas com presença de macroprolactinemia não teriam sido incluídas no trabalho.

Dos 21 pacientes com resultado positivo na pesquisa de macroprolactina, 16 (76,2%) tinham a concentração sérica de prolactina total inferior a 100 ng/mL, um (4,8%) apresentava o nível sérico de prolactina total entre 100 e 149 ng/mL e quatro pacientes (19%) apresentavam o nível sérico de prolactina total superior a 150 ng/mL. Alguns estudos mostraram que a maioria dos pacientes com macroprolactinemia tinha a concentração sérica de prolactina total inferior a 100 ng/mL^{40,49,73}. Vallette-Kasic S *et al*⁴⁰ encontraram 91% dos 106 pacientes estudados com macroprolactinemia com prolactina sérica total <100 ng/mL. Vale ressaltar que grandes variações nos resultados das dosagens de prolactina em diferentes imunoenaios podem ocorrer⁸. Dos quatro pacientes deste estudo com resultado de prolactina sérica total superior a 150 ng/mL e teste positivo para macroprolactinemia, apenas dois tinham amostras suficientes para serem encaminhadas para a GFC. O resultado de macroprolactinemia isolada do paciente com prolactina sérica total de 191,4 ng/mL foi confirmado pela GFC. O resultado de macroprolactinemia isolada do paciente com prolactina sérica total 310,2 ng/mL foi diferente do resultado de excesso simultâneo de macroprolactina e prolactina monomérica evidenciado pela GFC. Este paciente tinha concentração sérica de prolactina total acima da linearidade do teste (>200 ng/mL) e prolactina pós-PEG próxima ao limite superior do intervalo de referência (valor de corte).

Ambos os grupos de pacientes, com hiperprolactinemia verdadeira e com macroprolactinemia, apresentaram alguns parâmetros semelhantes: não houve diferença

significativa na média de idade dos dois grupos nem nos valores médios de prolactina total. Os valores médios de prolactina total sugerem que a maior parte dos pacientes com hiperprolactinemia verdadeira do presente estudo não eram portadores de prolactinoma. Já o valor médio de prolactina monomérica pós-PEG foi maior no grupo de pacientes com hiperprolactinemia verdadeira em relação ao grupo dos pacientes com macroprolactinemia.

Nos pacientes com hiperprolactinemia verdadeira a maior porcentagem de recuperação de prolactina pós-PEG encontrada foi 76%. Não seria esperado encontrar um valor acima de 80%, já que aproximadamente 20% da prolactina monomérica pode ter sido precipitada pelo PEG, junto com as isoformas de alto peso molecular da prolactina, conforme relatos da literatura^{4,43}.

A abordagem de interpretação da pesquisa de macroprolactina pela comparação da concentração de prolactina monomérica pós-PEG com intervalos de referência de amostras de indivíduos saudáveis tratadas com o PEG possibilitou a identificação de três pacientes com macroprolactinemia concomitante ao excesso de prolactina monomérica pós-PEG. Estes três pacientes teriam resultado de macroprolactinemia isolada, caso os testes fossem interpretados pelo critério convencional de porcentagem de recuperação de prolactina pós-PEG. Um quarto paciente com excesso concomitante de macroprolactina e prolactina monomérica deste estudo foi identificado pela GFC. A macroprolactina pode ser a forma circulante em maior proporção, porém a prolactina monomérica bioativa pode estar presente em excesso, simultaneamente^{14,48}. A proporção de pacientes identificados com macroprolactinemia concomitante à hiperprolactinemia verdadeira no presente estudo é semelhante à taxa encontrada por Germano *et al*⁴⁴, que avaliaram 172 casos. Já Whitehead *et al*⁴³ encontraram apenas um paciente (0,6%), entre os 175 estudados.

Pela interpretação convencional da pesquisa de macroprolactina, 23 pacientes (21%) tiveram o resultado indeterminado entre 40 e 60% de recuperação. Todos tinham a concentração de prolactina pós-PEG elevada em relação aos limites superiores dos intervalos de referência, com indicação de hiperprolactinemia verdadeira, o que foi confirmado nas amostras disponibilizadas para a GFC. Podemos dizer que neste trabalho a porcentagem de recuperação de 40% foi o valor de corte entre macroprolactinemia e hiperprolactinemia verdadeira. Porém,

pacientes com excesso simultâneo de macroprolactina e prolactina monomérica não foram identificados com esta interpretação

De um total de 112 pacientes estudados, oito tiveram resultados de concentração de prolactina pós-PEG próximos aos valores de corte dos intervalos de referência. Destes oito, três pacientes tiveram suas amostras encaminhadas para GFC e dois tiveram os resultados encontrados no presente estudo confirmados pela GFC. O resultado de hiperprolactinemia verdadeira de um paciente foi confirmado pela GFC. Um resultado *borderline* de difícil interpretação encontrado neste estudo e também na GFC pode ser melhor compreendido com os dados do paciente: pseudo-hermafroditismo, hiperplasia congênita de supra-renal, resultado indeterminado de pesquisa de macroprolactina anterior, RMN de sela túrcica normal e hiperprolactinemia leve persistente. Um resultado de macroprolactinemia isolada, encontrado neste estudo foi diferente do resultado da GFC, de macroprolactinemia associada ao excesso de prolactina monomérica.

Whitehead *et al*⁴³ utilizaram o fator 1,2 para multiplicar os resultados de prolactina pós-PEG, para compensar a fração de prolactina monomérica precipitada (20%). No presente trabalho, caso fosse utilizado este fator, o número de resultados indeterminados seria menor. Porém, em outros trabalhos semelhantes na literatura^{14,44,48,78,79}, o único fator utilizado foi para corrigir a diluição feita no tratamento da amostra com o PEG.

Dos 21 pacientes deste estudo com resultado positivo para a pesquisa de macroprolactina, dez pacientes se encontravam em investigação para infertilidade, três pacientes apresentavam distúrbios menstruais, uma paciente apresentava galactorreia e um paciente apresentava disfunção erétil. As características clínicas da hiperprolactinemia foram encontradas na maioria dos pacientes com teste positivo na pesquisa de macroprolactina. No entanto nenhum paciente apresentou uma clínica clássica de hiperprolactinemia com amenorreia e galactorreia ou disfunção sexual revertida com tratamento medicamentoso. A alta taxa de infertilidade encontrada neste estudo pode ser explicada pelo grande número de pacientes encaminhados ao serviço de referência em reprodução humana assistida do HC/UFMG.

Dos 21 pacientes deste estudo com resultado positivo para a pesquisa de macroprolactina, dez tiveram o resultado de prolactina total aumentada como um achado recente e não foram encontradas mais informações relacionadas a este dado em seus prontuários. Dos outros 11

pacientes, sete (64%) tiveram a dosagem sérica de prolactina repetida muitas vezes e foram submetidos a testes de imagem (tomografia computadorizada e/ou ressonância nuclear magnética para sela túrcica), sendo que dois apresentaram microadenoma selar. Estes dois resultados de microadenoma podem não ter significado clínico e um destes pacientes (65F) tem resultado de macroprolactinemia isolada confirmado pela GFC. Quatro pacientes (36%) fizeram uso de agonistas dopaminérgicos. Apesar do número reduzido de pacientes com macroprolactinemia no presente estudo, estes dados foram corroborados pelo estudo de 106 pacientes com macroprolactinemia de Vallette-Kasik *et al*⁴⁰, onde 76% dos pacientes foram submetidos a testes de imagem e 42% fizeram uso de terapêutica dopaminérgica. Alterações menstruais e galactorreia são comuns em pacientes com hiperprolactinemia verdadeira, mas são encontrados, com frequência, em pacientes com macroprolactinemia^{7,40,73}. Há vários relatos de investigações desnecessárias e tratamentos inadequados em pacientes com concentração sérica elevada de prolactina, depois explicada pela macroprolactinemia^{14,37,39}. Nos pacientes com macroprolactinemia, a frequência de imagens anormais da hipófise, até 20%, é semelhante à encontrada na população em geral^{14,40,79,80}. As pacientes com macroprolactinemia e prolactina monomérica normal devem ser avaliadas corretamente quanto a irregularidades menstruais e infertilidade pois outras causas destes sintomas podem coexistir com a macroprolactinemia⁸¹.

A pesquisa de macroprolactina deve ser incluída no diagnóstico diferencial de hiperprolactinemia^{17,82}. A suspeita de macroprolactinemia deve ser considerada sempre que a história clínica e/ou exames de imagem forem incompatíveis com resultados elevados de concentrações séricas de prolactina¹¹. Por outro lado, a macroprolactinemia não exclui a possibilidade da presença de um adenoma de hipófise^{73,80}. Hauache *et al*⁸⁰ encontraram testes de imagem normais em pacientes assintomáticos com macroprolactinemia e sugeriram que testes de imagem fossem realizados em pacientes com macroprolactinemia e características clínicas relevantes.

Recentemente a *American Association of Clinical Endocrinologists* e o *American College of Endocrinology Disease* reconheceram a relevância clínica da macroprolactina como interferente nos imunoensaios para a dosagem de prolactina. Foi recomendado que, na presença de hiperprolactinemia, a macroprolactina seja levada em consideração sempre que houver inconsistência no quadro clínico, achados de imagem e/ou resposta ao tratamento⁸³.

Portanto, é importante que os laboratórios clínicos tomem conhecimento sobre a interferência da macroprolactina no imunoensaio em uso e disponibilizem, na rotina laboratorial, a pesquisa de macroprolactina.

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, apresentamos a proposta da dosagem de prolactina sérica passar a ser realizada no sistema analítico *Architect*[®](Abbott) e que seja implantado o teste da pesquisa de macroprolactina pela precipitação com polietileno glicol no SML do HC/UFMG. Assim, será possível a identificação de macroprolactinemia nas amostras hipeprolactinêmicas e a quantificação da concentração de prolactina monomérica pós PEG a ser comparada aos intervalos de referência adequados.

O presente trabalho apresentou algumas limitações: todas as 112 amostras estudadas na pesquisa da macroprolactina deveriam ter seu resultado confirmado pela GFC; nem todas as amostras tiveram volume de soro suficiente para serem armazenadas em duplicata; os procedimentos de seleção e acondicionamento das amostras poderiam ser aprimorados visando maior casuística.

Como perspectivas futuras, propõe-se a realização de um estudo de viabilidade do estabelecimento de intervalos de referência de prolactina monomérica pós-PEG no SML do HC, UFMG e a elaboração de um projeto de análise clínica retrospectiva de todos os pacientes que participaram deste trabalho.

7- CONCLUSÕES

- O SML do HC/UFMG realiza, em média, 1070 dosagens de prolactina por ano e 35% dos resultados são elevados em relação aos valores de referência adotados;
- O reagente comercial para dosagem de prolactina no equipamento *Architect*[®] (*Abbott*), um imunoenensaio imunométrico por quimioluminescência, pode ser utilizado na rotina do SML. A validação deste reagente forneceu resultados dentro das especificações de desempenho analítico previamente estabelecidas, o que assegura a geração de resultados clinicamente válidos;
- A verificação dos intervalos de referência selecionados para o estudo foi adequada.
- A interpretação do resultado da pesquisa de macroprolactina pela comparação da concentração de prolactina monomérica pós-PEG com um intervalo de referência de amostras de indivíduos saudáveis tratadas com PEG apresentou maior especificidade no diagnóstico de hiperprolactinemia verdadeira do que a abordagem convencional de porcentagem de recuperação de prolactina pós-PEG e identificou casos de excesso simultâneo de macroprolactina e de prolactina monomérica bioativa.;
- A prevalência de macroprolactinemia nas amostras hiperprolactinêmicas do presente estudo foi de 19%, o que está de acordo com a literatura;
- Os resultados da pesquisa de macroprolactina pela comparação da concentração de prolactina monomérica pós-PEG com um intervalo de referência adequado são confiáveis, dado o alto grau de concordância com os resultados obtidos com a GFC;

Concluindo, a abordagem de interpretação do teste pela comparação da concentração de prolactina monomérica pós-PEG com um intervalo de referência de amostras de indivíduos saudáveis tratadas com o PEG deve ser adotada, pois apresentou melhor desempenho do que o critério convencional. Recomenda-se a implantação do teste pesquisa de macroprolactina pela precipitação com o PEG como triagem para todas as amostras hiperprolactinêmicas do SML do HC, UFMG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Freeman ME, Kanyieska S, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 2000; 80(4): 1523-631.
2. Bolyakov A, Paduch DA. Prolactin in men's health and disease. *Curr Opin Urol.* 2011; 21(6): 527-34.
3. Gibney J, Smith TP, McKenna TJ. Clinical relevance of macroprolactin. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005; 62(6): 633-43.
4. 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(10): 1673-81.
5. Fahie-Wilson M, Smith TP. Determination of prolactin: The macroprolactin problem. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013; 27(5): 725-42.
6. Shimatsu A, Hattori N. Macroprolactinemia: Diagnostic, Clinical, and Pathogenic Significance. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 167132. doi: 10.1155/2012/167132
7. Gibney J, Smith TP, McKenna TJ. The impact on clinical practice of routine screening for macroprolactin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(7): 3927-32.
8. Smith TP, Suliman AM, Fahie-Wilson MN, McKenna TJ, Fahie-Wilson MN. Gross variability in the detection of prolactin in sera containing big big prolactin (macroprolactin) by commercial immunoassays. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(12): 5410-15.
9. Kavanagh L, McKenna TJ, Fahie-Wilson MN, Gibney J, Smith TP. Specificity and clinical utility of methods for the detection of macroprolactin. *Clin Chem.* 2006; 52(7): 1366-72.
10. Kasum M, Oreskovic S, Zec I, Jezek D, Tomic V, Gall V, Adzic G. Macroprolactinemia: new insights in hyperprolactinemia. *Biochem Med.* 2012; 22(2): 171-9.
11. Vaishya R, Gupta R, Arora S. Macroprolactin; A Frequent Cause of Misdiagnosed Hyperprolactinemia in Clinical Practice. *J Reprod Infertil.* 2010; 11(3): 161-7.
12. Lippi G, Plebani M. Macroprolactin: searching for a needle in a haystack? *Clin Chem Lab Med.* 2016; 54(4): 519-22.
13. McCudden CR, Sharpless JL, Grenache DG. Comparison of multiple methods for identification of hyperprolactinemia in the presence of macroprolactin. *Clin Chim Acta.* 2010; 411(3): 155-60.
14. 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(9): 1504-9.
15. Henry RK, Bowden SA. A Macroprolactin Level Today May Keep Health Care Cost and the Surgical Knife at Bay. *Clin Pediatr.* 2014; 54(3): 283-5.
16. 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.* 1998; 19(3): 225-68.
17. Sadideen H, Swaminathan R. Macroprolactin: what is it and what is its importance? *Int J Clin Pract.* 2006; 60(4): 457-61.
18. Mancini T, Casanueva FF, Giustina A. Hyperprolactinemia and Prolactinomas. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 2008; 37(1): 67-99.
19. Chahal J, Schlechte J. Hyperprolactinemia. *Pituitary.* 2008; 11(2): 141-6.

20. Vilar L, Flaseriu M, Bronstein MD. Challenges and pitfalls in the diagnosis of hyperprolactinemia. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 2014 ;58: 9-22.
21. Vilar L, Naves LA. Avaliação Diagnóstica da Hiperprolactinemia. In: Vilar L. *Endocrinologia Clínica*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p.39-49.
22. Healy M-L. Diagnosis, misdiagnosis and management of hyperprolactinemia. *Expert Rev Endocrin Metab.* 2006; 1(1): 123-32.
23. Fahie-Wilson M. In hyperprolactinemia, testing for macroprolactin is essential. *Clin Chem.* 2003; 49: 1434-6.
24. Fahie-Wilson MN, John R, Ellis AR. Macroprolactin; high molecular mass forms of circulating prolactin. *Ann Clin Biochem.* 2005; 42: 175-92.
25. Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2012; 11(6-7): A465-70.
26. Iwama S, Welt CK, Romero CJ, Radovick S, Caturegli P. Isolated prolactin deficiency associated with serum autoantibodies against prolactin-secreting cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98(10): 3920-5.
27. Whittaker Pg Fau - Wilcox T, Wilcox T Fau - Lind T, Lind T. Maintained fertility in a patient with hyperprolactinemia due to big, big prolactin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981; 53(4): 863-6.
28. Hattori N, Nakaya Y, Kitagawa K, Inagaki C, Ikekubo K. Immunoglobulin G subclasses and prolactin (PRL) isoforms in macroprolactinemia due to anti- PRL autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(5): 3036-44.
29. 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(4): 599-605.
30. Hattori N, Nakayama Y, Kitagawa K, Li T, Inagaki C. Development of anti- PRL (prolactin) autoantibodies by homologous PRL in rats: A model for macroprolactinemia. *Endocrinol.* 2007; 148(5): 2465-70.
31. Hattori N, Aisaka K, Shimatsu A. A possible cause of the variable detectability of macroprolactin by different immunoassay systems. 2016; 54(4): 603-8.
32. Vieira JG, Tachibana TT, Ferrer CM, Sá J, Biscolla RP, Hoff AO, Kanashiro I. Hyperprolactinemia: new assay more specific for the monomeric form does not eliminate screening for macroprolactin with polyethylene glycol precipitation. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010; 54(9): 856-7.
33. Wallace IR, Satti N, Courtney CH, 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.* 2010; 95(7): 3268-71.
34. Smith TP, Kavanagh L Fau - Healy M-L, Healy MI Fau - McKenna TJ. Technology insight: measuring prolactin in clinical samples. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007; 3: 279-89.
35. Gilson G, Schmit P, Thix J, Hoffman JP, Humbel RL. Prolactin results for samples containing macroprolactin are method and sample dependent. *Clin Chem.* 2001; 47(2): 331-33.
36. Hattori N, Ishihara T, Saiki Y. Macroprolactinaemia: prevalence and aetiologies in a large group of hospital workers. *Clin Endocrinol.* 2009; 71(5): 702-8.
37. Cattaneo F, Kappeler D, Müller B. Macroprolactinaemia, the major unknown in the differential diagnosis of hyperprolactinaemia: 10 cases and discussion of diagnostic clues. *Swiss Med Wkly.* 2001; 131(9-10): 122-6.
38. Hattori N, Adachi T, Fau - Ishihara T, Shimatsu A. The natural history of macroprolactinaemia. *Eur J Endocrinol.* 2012; 166: 625-9.

39. Cattaneo FA, Fahie-Wilson MN. Concomitant occurrence of macroprolactin, exercise-induced amenorrhea, and a pituitary lesion: A diagnostic pitfall. Case report. *J Neurosurg.* 2001; 95(2): 334-7.
40. 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(2): 581-8.
41. Olukoga AO, Brue T. Macroprolactinemia is clinically important. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(10): 4833-4.
42. McKenna TJ. Should macroprolactin be measured in all hyperprolactinaemic sera? *Clin Endocrinol.* 2009; 71(4): 466-9.
43. Whitehead S, Cornes M, Ford C, Gama R. Reference ranges for serum total and monomeric prolactin for the current generation Abbott Architect assay. *Ann Clin Biochem.* 2015; 52: 61-6.
44. Germano L, Mormile A, Filtri L, Cocciardi E, Di Grazia M, Marranca D, Limone P, Migliardi M. Evaluation of polyethylene glycol precipitation as screening test for macroprolactinemia using Architect immunoanalyser. *Biol Spec.* 2005; 20(6): 402-7.
45. 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.* 2008; (45): 256-9.
46. Fahie-Wilson M, Halsall D. Polyethylene glycol precipitation: proceed with care. *Ann Clin Biochem.* 2008; (45): 233-5.
47. Casanueva FF, Molitch ME, Schlechte JA, ABS R, Bonert V, Bronstein MD *et al.* Guidelines of the Pituitary Society for the diagnosis and management of prolactinomas. *Clin Endocrinol.* 2006; 65(2): 265-73.
48. Jamaluddin FA, Sthaneshwar P, Hussein Z, Othman N, Chan SP. Importance of screening for macroprolactin in all hyperprolactinaemic sera. *Malays J Pathol.* 2013; 35(1): 59-63.
49. Vilar L, Moura E, Canadas V, Gusmão A, Campos R, Leal E *et al.* Prevalence of macroprolactinemia among 115 patients with hyperprolactinemia. *Arq Bras de Endocrinol Metab.* 2007; 51(1): 86-91.
50. Cortet-Rudelli C, Sapin R, Bonneville JF, Brue T. Etiological diagnosis of hyperprolactinemia. *Ann Endocrinol.* 2007; 68(2): 98-105.
51. de Soárez PC, de Arêa Leão Souza SC, Vieira JGH, Ferraz MB. The Effect of Identifying Macroprolactinemia on Health- Care Utilization and Costs in Patients with Elevated Serum Prolactin Levels. *Value Health.* 2009; 12(6): 930-4.
52. Whitley RJ, Meikle W, Watts NB. Pituitary Glycoprotein Hormones. In: Burtis CA, R AE, Tietz Textbook Of Clinical Chemistry. 2nd ed. Philadelphia: W.S.Saunders Company; 1994.p.1672-5.
53. Hwang P, Guyda H, Friesen H. A radioimmunoassay for human prolactin. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1971; 68(8): 1902-6.
54. Klee GG. Interferences in hormone immunoassays. *Clin Lab Med.* 2004;24(1):1-18.
55. Lab Tests Online-BR Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). [atualizado em 13 de dezembro de 2011; acesso em 07 de outubro de 2015]. Disponível em: <<https://www.labtestsonline.org.br/understanding/analytes/prolactin/tab/test>>.
56. David SR, Taylor CC, Kinon BJ, Breier A. The effects of olanzapine, risperidone, and haloperidol on plasma prolactin levels in patients with schizophrenia. *Clin Ther.* 2000; 22(9): 1085-96.
57. Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev.* 2004; 25(2): 105-120.

58. Hoofnagle AN, Wener MH. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. *J Immunol Methods*. 2009; 347(1-2): 3-11.
59. do Carmo Dias Gontijo M, de Souza Vasconcellos L, Ribeiro-Oliveira A Jr. Hook effect and linear range in prolactin assays: distinct confounding entities. *Pituitary*. 2016; 19(4): 458-9.
60. Stenman U-H. Pitfalls in hormone determinations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013; 27(5): 629-30.
61. Oliveira CA, Mendes ME (Org.). *Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática*. 1. ed. Rio de Janeiro: ControlLab, 2010. p.15-93.
62. Basques JC. *Especificações da qualidade analítica*. Belo Horizonte: Labtest; 2009 [acesso em 21 de setembro de 2016]. Disponível em: <<http://labtest.com.br/publicacoes/publicacoeslabtest>>.
63. Westgard JO. *Basic Method Validation*. 2nd ed. Madison: Westgard QC; 2003.
64. Prolactina [Instruções de uso]. Architect system Abbott. North Chicago: Abbott Laboratories; 2012. Ref.7K76.
65. Prolactina [Instruções de uso]. Produtos de Imunodiagnóstico Vitros Rochester: Ortho-Clinical Diagnostics; 2016. Ref.184 9793.
66. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M. Home-Westgard QC. Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from intra-and inter-individual biologic variation. [atualizado em 2014; acesso em 19 de fevereiro de 2014]. Disponível em: <<https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>>.
67. NCCLS/CLSI. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods. Approved guideline. Document EP05-A2. 2004.
68. NCCLS/CLSI. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach. Approved guideline. Document EP6-A. 2004.
69. Bland J, Altman G. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat. Methods Med. Res*. 1999; 8(2): 135-160.
70. NCCLS/CLSI. Method comparison and bias estimation using patient samples. Approved guideline. Document EP9-A2. 2002.
71. NCCLS/CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory. Approved guideline. Document C28-A3. 2008.
72. Schlechte JA. The macroprolactin problem. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(12): 5408-9.
73. Isik S, Berker D, Tutuncu YA, Ozuguz U, Gokay F, Erden G *et al*. Clinical and radiological findings in macroprolactinemia. *Endocrine*. 2012; 41(2): 327-33.
74. 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(6): 884-885.
75. 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(8): 1758-9.
76. Sánchez-Eixerés MR, Mauri M, Alfayate R, Graells ML, Miralles C, López A, Picó A. Prevalence of Macroprolactin Detected by Elecsys 2010. *Horm Res*. 2001; 56(3-4): 87-92.
77. Vieira JG. Macroprolactinemia. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol*. 2002; 46(1): 45-50.
78. Beda-Maluga K, Pisarek H, Komorowski J, Swietoslawski J, Fuss-Chmielewska J, Winczyk K. Evaluation of hyperprolactinaemia with the use of the intervals for prolactin after macroforms separation. *J Physiol Pharmacol*. 2014; 65(3): 359-64.

79. Leslie H, Courtney CH, Bell PM, et al. Laboratory and clinical experience in 55 patients with macroprolactinemia identified by a simple polyethylene glycol precipitation method. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(4): 1909-10.
80. Hauache OM, Rocha AJ, Maia ACJr, Maciel RM, Vieira JG. Screening for macroprolactinaemia and pituitary imaging studies. *Clin Endocrinol.* 2002; 57(3): 327-31.
81. Glezer A, Bronstein MD. Approach to the Patient with Persistent Hyperprolactinemia and Negative Sellar Imaging. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97(7): 2211–6.
82. Sapin R, Gasser F, Fischbach E, Grucker D. Macroprolactin detection: a new approach. *Ann Biol Clin.* 2000; 58(6): 729-34.
83. Samson SL, Hamrahian AH, Ezzat S. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology Disease State Clinical Review: Clinical relevance of macroprolactin in the absence or presence of true hyperprolactinemia. *Endocr Pract.* 2015; 21(12): 1427-35.

ANEXOS

ANEXO 1- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP


Projeto: CAAE – 40340514.3.0000.5149

Interessado(a): Prof. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 25 de fevereiro de 2015, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo da implantação da pesquisa de macroprolactina pela avaliação de prolactina monomérica pós-polietileno glicol em amostras hiperprolactinêmicas numa plataforma hospitalar de nível terciário**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.


Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO 2 – APROVAÇÃO DA DIRETORIA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DO HC, UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais

Hospital das Clínicas

Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão.

Belo Horizonte, 05 de Novembro de 2014.

PROCESSO: Nº 144/2014 "Estudo da implantação da pesquisa de macroprolactina pela avaliação de prolactina monomérica pós-poliétileno glicol em amostras hiperprolactilênicas numa plataforma hospitalar de nível terciário"

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG em 20/09/2014, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE **relatório** parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,

Profº Alexandre Rodrigues Ferreira
Diretor da DEPE/HC-UFMG

Sr.
Profº Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

ANEXO 3 -- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Título da pesquisa: Estudo da implantação da pesquisa de macroprolactina pela avaliação de prolactina monomérica pós-polietileno glicol em amostras hiperprolactinêmicas numa plataforma hospitalar de nível terciário

Pesquisadores:

Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior (telefone de contato: 3409-9552)

Leonardo de Souza Vasconcellos (telefone de contato: 3409-9774)

Maria do Carmo Dias Gontijo (telefones de contato: 3409-9011 e 8725-5898)

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG:

Telefone: (31) 3409-4592 Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II, Sala 2005 – 2º andar – Pampulha, Belo Horizonte/MG - CEP: 31270-901

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo que tem por objetivo implantar a pesquisa de macroprolactina pela avaliação da prolactina monomérica após o tratamento da amostra com polietileno glicol. Este trabalho é importante, pois a macroprolactina é um interferente comum nas dosagens do hormônio prolactina, não tem significado patológico e não requer tratamento. Os benefícios deste estudo estão relacionados à correta diferenciação entre a hiperprolactinemia verdadeira e a concentração elevada de macroprolactina. Isto pode evitar um diagnóstico errado, a realização de testes de imagem sem necessidade, tratamentos inadequados e preocupação desnecessária para os pacientes e seus médicos.

Os formulários serão identificados por números e os dados coletados serão utilizados apenas para fins dos objetivos da pesquisa em foco. Fica garantido o sigilo das informações, assim como o direito de você retirar o seu consentimento a qualquer tempo. O seu nome não será divulgado em nenhum momento. Após o término da pesquisa, os dados coletados serão armazenados e ficarão sob a responsabilidade dos pesquisadores que assumem o compromisso de preservar seu anonimato e utilizá-los apenas para fins científicos. Caso você queira ter acesso aos resultados dos seus exames, eles ficarão disponíveis na Secretaria de Resultados do Serviço de Medicina Laboratorial do HC, UFMG. Se o resultado de algum dos seus exames estiver alterado, você será contatado e encaminhado ao Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

Você não terá nenhum gasto e também nenhum ganho financeiro para participar. Em caso de recusa, você não será penalizado (a) de forma alguma.

Os riscos e desconforto envolvidos nesta pesquisa são os inerentes à disponibilidade de tempo para a aplicação do questionário e à realização da coleta de sangue periférico. Nesse caso, eventualmente, poderão ocorrer hematoma e dor localizados, que serão minimizados pela realização da coleta de sangue por profissionais capacitados. Caso queira, você poderá solicitar quaisquer informações adicionais e a qualquer tempo aos pesquisadores responsáveis.

Após ser esclarecido (a) sobre as informações anteriores, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Eu, _____, declaro que li as informações do TCLE acima, esclareci minhas dúvidas, aceitei participar do “Estudo da implantação da pesquisa de macroprolactina pela avaliação de prolactina monomérica pós-polietileno glicol em amostras hiperprolactinêmicas numa plataforma hospitalar de nível terciário” e o assino livremente. Fui devidamente informado e esclarecido sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Autorizo a utilização dos dados coletados e de minhas amostras séricas para os fins científicos relatados. Foi-me garantido o sigilo das informações e sei que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____, ____/____/____/

Assinatura do participante: _____

Assinaturas dos pesquisadores:

Maria do Carmo Dias Gontijo: _____

Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior: _____

Leonardo de Souza Vasconcellos: _____

ANEXO 4 – FORMULÁRIO DE PESQUISA

Telefone _____ Profissão: _____

Data de nascimento: _____ Sexo: () F () M

Peso: _____ Kg Altura: _____ cm

- 1) Você tem ou teve algum problema de saúde nos últimos seis meses?
() Sim. Qual? _____
() Não
- 2) Você tem alguma doença crônica?
() Sim. Qual? _____
() Não
- 3) Você toma algum tipo de medicamento?
() Sim. Qual e com que frequência? _____
() Não
- 4) Possui diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica, doença hepática, insuficiência renal, insuficiência adrenal, SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), síndrome nefrótica, doença tireoidiana ou outras autoimunidades?
() Sim. Qual? _____
() Não
- 5) Se mulher: Há possibilidade de você estar grávida? () Sim. () Não
- 6) Se mulher: Está amamentando? () Sim. () Não
- 7) Se mulher: Você faz uso de anticoncepcional? () Sim. () Não
- 8) Se mulher: Você faz terapia de reposição hormonal? () Sim. () Não

Elegível? () SIM () NÃO

Médico: _____ Data: _____

ANEXO 5 – HOOK EFFECT AND LINEAR RANGE IN PROLACTIN ASSAYS: DISTINCT CONFOUNDING ENTITIES

Pituitary
DOI 10.1007/s11102-014-0632-3

Hook effect and linear range in prolactin assays: distinct confounding entities

Maria do Carmo Dias Gontijo · Leonardo de Souza Vasconcellos · Antonio Ribeiro-Oliveira Jr.

© Springer Science+Business Media New York 2015

Dear Editor,

Ever since the description of the first immunoassay by Yalow and Berson [1], the use of antibodies to measure hormones has assisted in the establishment of disease diagnosis and prognosis. In the first competitive assays, endogenous antigens and radioisotope-labeled antigens competed for limited quantities of antibody binding sites. With the advancement of technology came the immunometric assays, in which capture antibodies are immobilized in a solid phase and second antibodies are labeled with a signal generator. Those antibodies bind to different epitopes of the antigen to be quantified, thus forming a “sandwich”. The development of monoclonal antibodies and sandwich tests using fluorescent or chemiluminescent markers immensely improved assay sensitivity compared to the classic radioimmunoassays [2].

Among the potential flaws involving immunoassays are the hook effect, also known as prozone phenomenon, and the reporting of concentrations outside the dynamic (linear) range of the assay. Importantly, these two distinct issues have often been confused, especially in prolactin (PRL) immunoassays, where inappropriately low levels of prolactin are sometimes reported in macroprolactinomas.

The antigen–antibody interaction in a given immunoassay depends primarily on the relative antigen-to-antibody proportion (Fig. 1). Excess amounts of either could compromise the appropriate formation of the immunocomplexes. Extremely high concentrations of any analyte/

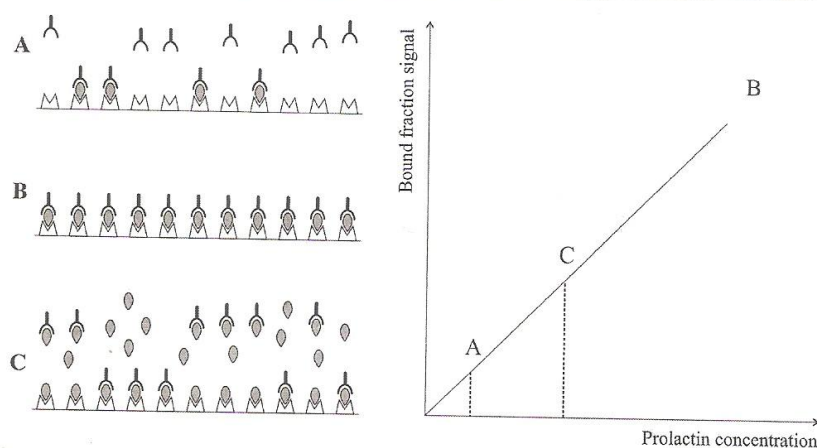
antigen such as prolactin can saturate simultaneously both the capture and the labeled antibody. In this situation, only a few prolactin molecules actually are bound in a sandwich complex and quantified by the test (Fig. 1c), while most prolactin molecules are only bound to one antibody and, therefore, washed away. As a consequence, falsely low results are being reported, and the correct result for the PRL concentration is much higher than that reported by the laboratory measuring the hormone in a non-diluted sample. This is known as high-dose hook effect and was described in approximately 5 % of the patients with macroprolactinomas [3]. Reported results in these cases may be within or, more frequently, slightly above the manufacturer’s reference range. Therefore, when PRL-secreting macroadenomas are suspected, the clinician should request a PRL determination in a diluted sample in order to overcome this artifact.

Generally, the serum PRL values above which the hook effect may be induced are given in the instruction sheets of the immunoassay kits. Ideally, clinicians should be aware of those values for the assays they use, as the hook effect has been described in current prolactin immunoassays. For instance, considering two different platforms for the PRL test, the hook effect is not supposed to be induced up to PRL value of 20,680 ng/mL with the Vitros[®] platform (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc, Buckinghamshire, UK), while with the Access Immunoassay Systems[®] (Beckman Coulter, Inc, CA, USA) this value is 30,000 ng/mL.

It should be kept in mind that the reportable PRL reference ranges for the kits mentioned earlier are 1.4–329 ng/mL for the Vitros[®] kit and 0.25–200 ng/mL for the Access[®] kit. Prolactin levels greater than 329 ng/mL on the Vitros[®] system are automatically diluted to 1:10, with readings of up to 3,290 ng/mL. However, those values could, in some situations, still be insufficient to obtain

M. do Carmo Dias Gontijo · L. de Souza Vasconcellos · A. Ribeiro-Oliveira Jr. (✉)
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
e-mail: antonioojr@gmail.com

Fig. 1 Immunometric assay of prolactin, before wash step, in a situation of normal prolactin concentration (a), elevated, but out of assay linearity, prolactin concentration (b), and extremely high prolactin concentrations with hook effect (c). \circ Prolactin, ∇ solid phase antibody (capture), \wedge signal generator antibody



correct PRL values in the presence of a PRL-secreting macroadenoma (Fig. 1b). Some laboratories go so far as to report the result as “>3,290 ng/mL” with the justification that the equipment does not perform automatic dilutions above 1:10 and/or that there is a potential loss of accuracy at subsequent dilutions. With the Access[®] system, values reported as “>2,000 ng/mL” could be even further from the real PRL levels for a given sample in which the hormone concentration is very high. It seems that, in many instances, the laboratory is not aware of the importance of exact quantification for the result. Therefore, it is the clinician’s responsibility to refrain from deciding on a therapeutic approach until the laboratory re-assays the sample at further dilutions, even if it has to be done manually, and until the result is within the linear range of the assay. It should be noted that this situation, in theory, occurs with values between 3,290 and 20,680 ng/mL on the Vitros[®] and between 2,000 and 30,000 ng/mL on the Access[®]. Furthermore, it is worthwhile to mention that clinicians should be able to extrapolate this information and adapt it to other prolactin immunoassays whenever necessary.

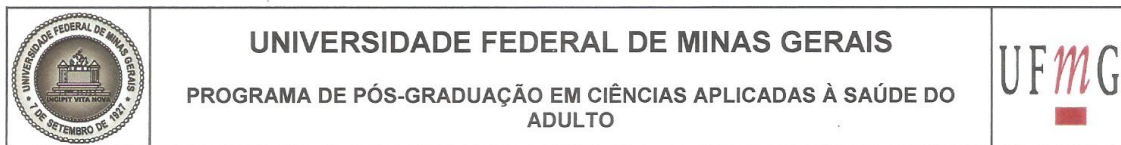
Thus, there are two quite distinct interfering factors in PRL immunometric results that should be recognized. The first is the hook effect, when sample dilutions have to be indicated on the basis of clinical suspicion, since it is

impossible for laboratories to dilute all samples. An appropriate procedure in these cases enables the distinction between macroadenomas secreting extremely high levels of PRL and clinically nonfunctioning macroadenomas, as the treatment approaches to those two conditions follow different protocols. Regarding the second problematic issue, the limited linear range of the assays, it is paramount that the laboratory ensures that only those results derived from measurement within the linear range of the assay are reported, so that the clinician can evaluate the outcomes of the prescribed treatment (e.g., dopaminergic agonists) based on pre- and post-treatment exact PRL determinations.

Acknowledgments We wish to thank Dr Martin Bidlingmaier for kindly reading this letter.

References

1. Yalow RS, Berson SA (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 39:1157–1175
2. Stenman UH (2013) Pitfalls in hormone determinations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27:743–744
3. St-Jean E, Blain F, Comtois R (1996) High prolactin levels may be missed by immunoradiometric assay in patients with macroprolactinomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 44:305–309

ANEXO 6 – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO**FOLHA DE APROVAÇÃO**

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MACROPROLACTINEMIA EM AMOSTRAS HIPERPROLACTINÊMICAS, ATRAVÉS DA CONCENTRAÇÃO DE PROLACTINA MONOMÉRICA DOSADA APÓS PRECIPITAÇÃO COM POLIETILENO GLICOL


MARIA DO CARMO DIAS GONTIJO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO.

Aprovada em 16 de novembro de 2016, pela banca constituída pelos membros:



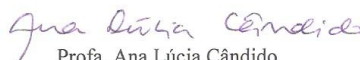
Prof. Antonio Ribeiro de Oliveira Junior - Orientador
UFMG



Prof. Leonardo de Souza Vasconcellos - Coorientador
UFMG



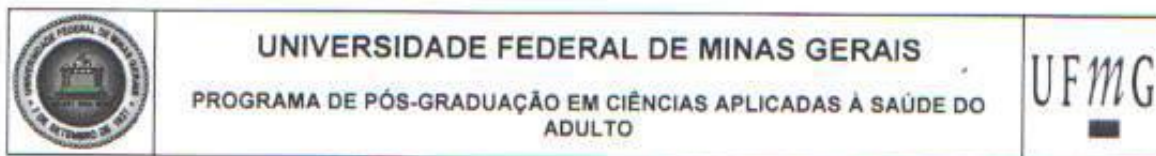
Prof. Silvana Maria Elói Santos
UFMG



Prof. Ana Lúcia Cândido
UFMG

Belo Horizonte, 16 de novembro de 2016.

ANEXO 7 – ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA MARIA DO CARMO DIAS GONTIJO

Realizou-se, no dia 16 de novembro de 2016, às 08:00 horas, Sala 029, andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MACROPROLACTINEMIA EM AMOSTRAS HIPERPROLACTINÊMICAS, ATRAVÉS DA CONCENTRAÇÃO DE PROLACTINA MONOMÉRICA DOSADA APÓS PRECIPITAÇÃO COM POLIETILENO GLICOL**, apresentada por **MARIA DO CARMO DIAS GONTIJO**, número de registro 2015656949, graduada no curso de FARMACIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Antonio Ribeiro de Oliveira Junior - Orientador (UFMG), Prof. Leonardo de Souza Vasconcellos – Coorientador (UFMG), Prof. Silvana Maria Elói Santos (UFMG), Profa. Ana Lúcia Cândido (UFMG).


A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada


Finalizados os trabalhos, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 16 de novembro de 2016.


 Prof. Antonio Ribeiro de Oliveira Junior (Doutor)


 Prof. Leonardo de Souza Vasconcellos (Doutor)


 Profa. Silvana Maria Elói Santos (Doutor)


 Profa. Ana Lúcia Cândido (Doutor)

MARIA DO CARMO DIAS GONTIJO
 Centro de Pós-Graduação
 Faculdade de Medicina-UFMG
 Av. Prof. Alfredo Balena, 190-5º Andar
 CEP 30130-100-Fundamentos-BH/MG

CONFERE COM ORIGINAL
 Centro de Pós-Graduação
 Faculdade de Medicina - UFMG

APÊNDICE A

Resultados da pesquisa de macroprolactina em 96 mulheres, realizada no sistema Architect® (Abbott), no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

| AMOSTRA | IDADE | PRL TOTAL | PRL pós- PEG | % RECUPERAÇÃO | INTERPRETAÇÃO |
|---------|-------|--------------|--------------------|------------------|-------------------------------|
| 1 | 18 | 34,2 | 13,1 | 38 | Macroprolactinemia |
| 2 | 19 | 38,0 | 20,9 | 55 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 3 | 19 | 195,7 | 93,5 | 48 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 4 | 20 | 40,7 | 25,5 | 63 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 5 | 21 | 40,9 | 29,0 | 71 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 6 | 22 | 83,0 | 52,7 | 63 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 7 | 23 | 77,7 | 53,5 | 69 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 8 | 23 | 95,5 | 55,2 | 58 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 9 | 24 | 40,3 | 22,8 | 57 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 10 | 24 | 45,1 | 29,2 | 65 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 11 | 24 | 153,2 | 7,6 | 5 | Macroprolactinemia |
| 12 | 25 | 38,5 | 20,3 | 53 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 13 | 25 | 29,9 | 9,0 | 30 | Macroprolactinemia |
| 14 | 26 | 80,8 | 8,3 | 10 | Macroprolactinemia |
| 15 | 26 | 45,4 | 25,4 | 56 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 16 | 26 | 39,3 | 25,1 | 64 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 17 | 27 | 31,7 | 21,1 | 67 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 18 | 28 | 66,5 | 30,5 | 46 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 19 | 28 | 57,2 | 39,4 | 69 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 20 | 28 | 38,2 | 25,7 | 67 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 21 | 28 | 125,6 | 74,9 | 60 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 22 | 29 | 39,3 | 23,5 | 60 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 23 | 29 | 36,7 | 24,3 | 66 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 24 | 29 | 113,0 | 70,1 | 62 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 25 | 30 | 84,3 | 53,4 | 63 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 26 | 30 | 36,1 | 26,0 | 72 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 27 | 31 | 68,9 | 45,0 | 65 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 28 | 31 | 38,3 | 25,2 | 66 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 29 | 32 | 38,8 | 25,2 | 65 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 30 | 32 | 34,6 | 22,5 | 65 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 31 | 32 | 46,0 | 6,4 | 14 | Macroprolactinemia |
| 32 | 32 | 46,5 | 28,2 | 61 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 33 | 32 | 32,3 | 17,0 | 53 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 34 | 33 | 84,9 | 54,2 | 64 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 35 | 33 | 234,3 | 111,6 | 48 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 36 | 33 | 199,7 | 110,3 | 55 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 37 | 34 | 29,9 | 21,2 | 71 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 38 | 34 | 36,1 | 21,0 | 58 | Hiperprolactinemia verdadeira |

| (...Continuação) AMOSTRA | IDADE | PRL TOTAL | PRL pós- PEG | % RECUPERAÇÃO | INTERPRETAÇÃO |
|-----------------------------|-------|--------------|--------------------|------------------|-------------------------------|
| 39 | 34 | 41,1 | 24,2 | 59 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 40 | 35 | 138,1 | 85,0 | 62 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 41 | 35 | 49,2 | 17,6 | 36 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 42 | 35 | 31,7 | 23,5 | 74 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 43 | 35 | 49,0 | 15,7 | 32 | Macroprolactinemia |
| 44 | 36 | 61,5 | 45,7 | 74 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 45 | 36 | 198,6 | 15,0 | 8 | Macroprolactinemia |
| 46 | 36 | 46,5 | 7,1 | 15 | Macroprolactinemia |
| 47 | 37 | 182,3 | 101,3 | 56 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 48 | 38 | 58,9 | 42,8 | 73 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 49 | 38 | 72,2 | 41,8 | 58 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 50 | 38 | 56,8 | 40,2 | 71 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 51 | 38 | 109,0 | 11,5 | 11 | Macroprolactinemia |
| 52 | 38 | 33,9 | 20,9 | 62 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 53 | 39 | 106,3 | 62,7 | 59 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 54 | 39 | 30,3 | 21,7 | 72 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 55 | 39 | 310,2 | 14,5 | 5 | Macroprolactinemia |
| 56 | 39 | 72,6 | 14,2 | 20 | Macroprolactinemia |
| 57 | 39 | 76,8 | 2,9 | 4 | Macroprolactinemia |
| 58 | 39 | 140,4 | 100,0 | 71 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 59 | 39 | 36,2 | 25,1 | 70 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 60 | 40 | 47,5 | 3,9 | 8 | Macroprolactinemia |
| 61 | 40 | 184,4 | 140,3 | 76 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 62 | 41 | 43,3 | 8,9 | 21 | Macroprolactinemia |
| 63 | 41 | 50,4 | 33,8 | 67 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 64 | 42 | 71,5 | 51,0 | 71 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 65 | 42 | 191,4 | 7,0 | 4 | Macroprolactinemia |
| 66 | 43 | 83,5 | 54,7 | 66 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 67 | 43 | 81,6 | 59,6 | 73 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 68 | 43 | 127,8 | 84,1 | 66 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 69 | 43 | 57,1 | 37,7 | 66 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 70 | 43 | 31,7 | 5,0 | 16 | Macroprolactinemia |
| 71 | 43 | 70,6 | 41,1 | 58 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 72 | 44 | 59,9 | 9,0 | 15 | Macroprolactinemia |
| 73 | 44 | 36,4 | 26,5 | 73 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 74 | 44 | 46,0 | 31,4 | 68 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 75 | 45 | 31,8 | 21,9 | 69 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 76 | 45 | 33,1 | 23,4 | 71 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 77 | 46 | 62,7 | 47,6 | 76 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 78 | 46 | 91,9 | 60,8 | 66 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 79 | 47 | 36,9 | 16,4 | 44 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 80 | 48 | 126,0 | 79,0 | 63 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 81 | 50 | 219,2 | 100,5 | 46 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 82 | 52 | 153,2 | 102,5 | 67 | Hiperprolactinemia verdadeira |

| (...Continuação) AMOSTRA | IDADE | PRL TOTAL | PRL pós- PEG | % RECUPERAÇÃO | INTERPRETAÇÃO |
|-----------------------------|-------|--------------|--------------------|------------------|--|
| 83 | 52 | 38,0 | 26,1 | 69 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 84 | 52 | 40,0 | 3,6 | 9 | Macroprolactinemia |
| 85 | 54 | 85,6 | 64,9 | 76 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 86 | 55 | 39,0 | 27,7 | 71 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 87 | 55 | 35,1 | 23,9 | 68 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 88 | 55 | 103,1 | 64,3 | 62 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 89 | 55 | 84,7 | 64,3 | 76 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 90 | 58 | 32,9 | 19,5 | 59 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 91 | 59 | 51,9 | 35,6 | 69 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 92 | 60 | 48,2 | 34,9 | 72 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 93 | 64 | 80,3 | 52,5 | 65 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 94 | 69 | 90,2 | 54,5 | 60 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 95 | 75 | 30,3 | 6,0 | 20 | Macroprolactinemia |
| 96 | 80 | 138,9 | 43,6 | 31 | Hiperprolactinemia verdadeira+ macroprolactinemia |
| MÉDIA | 38 | 76,4 | 38,2 | 54 | |
| DESVIO PADRÃO | 12 | 55,1 | 28,8 | 21 | |

PRL - prolactina (ng/mL), PEG - polietileno glicol

APÊNDICE B

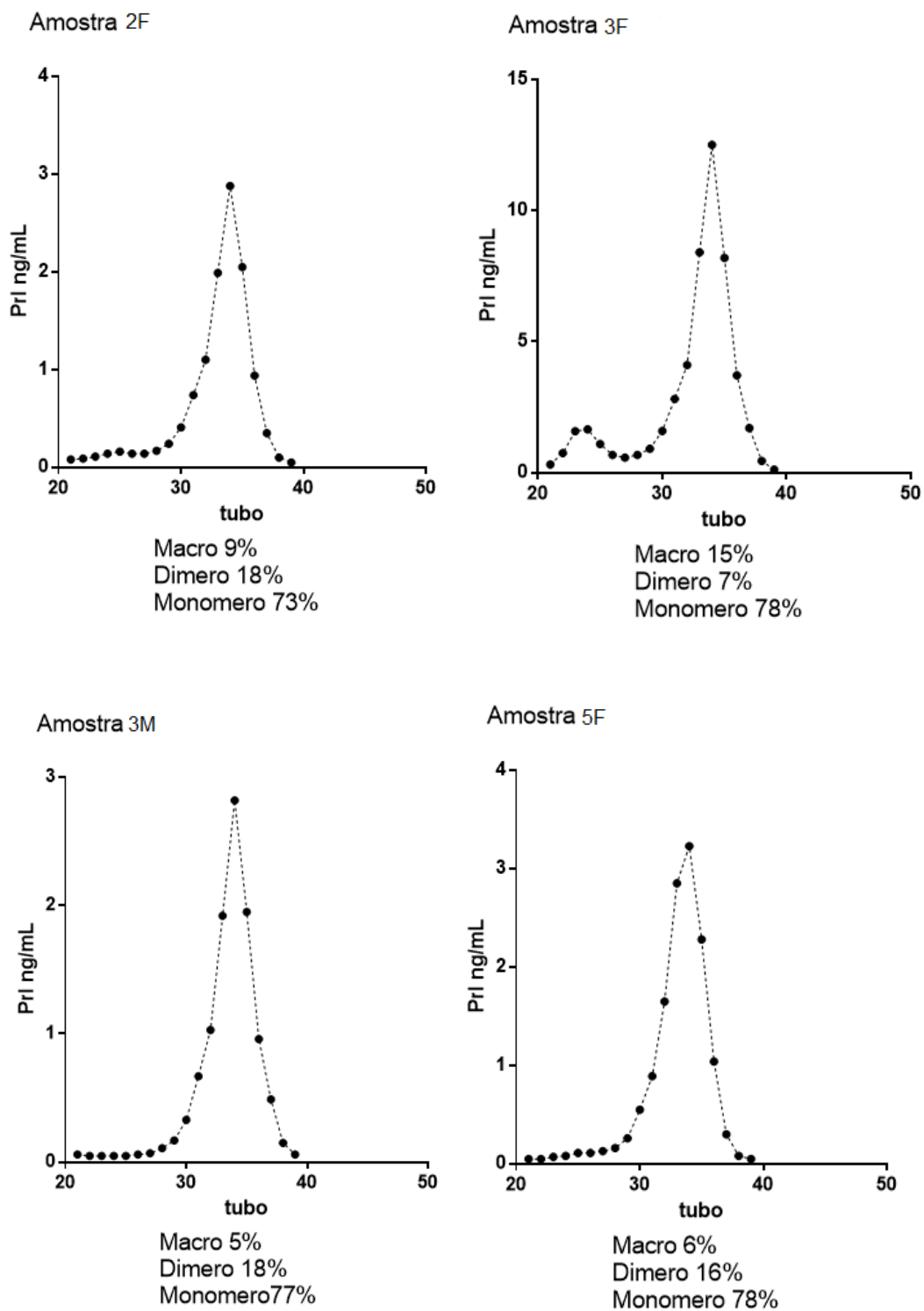
Resultados da pesquisa de macroprolactina em 16 homens, realizada no sistema *Architect*[®] (Abbott), no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

| AMOSTRA | IDADE | PRL TOTAL | PRL pós- PEG | % RECUPERAÇÃO | INTERPRETAÇÃO |
|------------------|-------|--------------|--------------------|------------------|--|
| 1 | 21 | 111,6 | 60,2 | 54 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 2 | 23 | 39,3 | 26,7 | 68 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 3 | 23 | 40,4 | 28,2 | 70 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 4 | 25 | 113,6 | 19,7 | 17 | Hiperprolactinemia verdadeira+ macroprolactinemia |
| 5 | 27 | 101,6 | 59,5 | 59 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 6 | 32 | 105,1 | 66,4 | 63 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 7 | 39 | 35,7 | 15,3 | 43 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 8 | 44 | 32,9 | 6,6 | 20 | Macroprolactina |
| 9 | 46 | 589,2 | 313,0 | 53 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 10 | 50 | 38,5 | 28,4 | 74 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 11 | 52 | 35,2 | 11,5 | 33 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 12 | 56 | 23,1 | 15,0 | 65 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 13 | 60 | 54,3 | 35,5 | 65 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| 14 | 62 | 87,1 | 17,0 | 20 | Hiperprolactinemia verdadeira+ macroprolactinemia |
| 15 | 64 | 55,6 | 4,8 | 9 | Macroprolactina |
| 16 | 65 | 32,3 | 19,9 | 62 | Hiperprolactinemia verdadeira |
| MÉDIA | 43 | 93,5 | 45,5 | 48 | |
| DESVIO PADRÃO | 16 | 136,0 | 73,8 | 22 | |

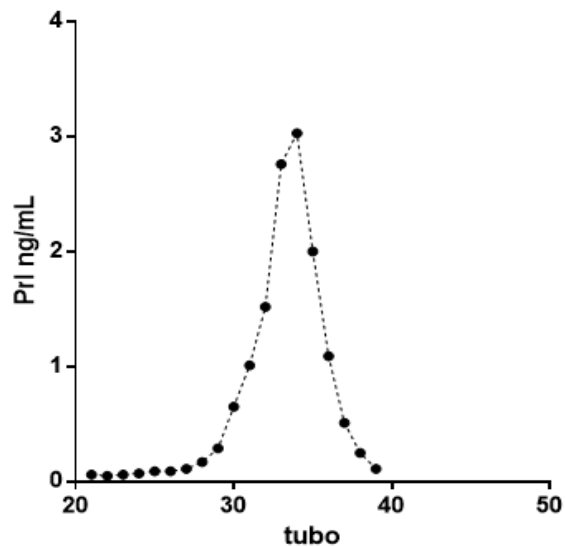
PRL - prolactina (ng/mL), PEG - polietileno glicol

APÊNDICE C

Registros gráficos de 25 cromatografias em coluna de gel filtração, realizadas em laboratório de pesquisa da Escola Paulista de Medicina, pelo Prof. Dr. José Gilberto Vieira.

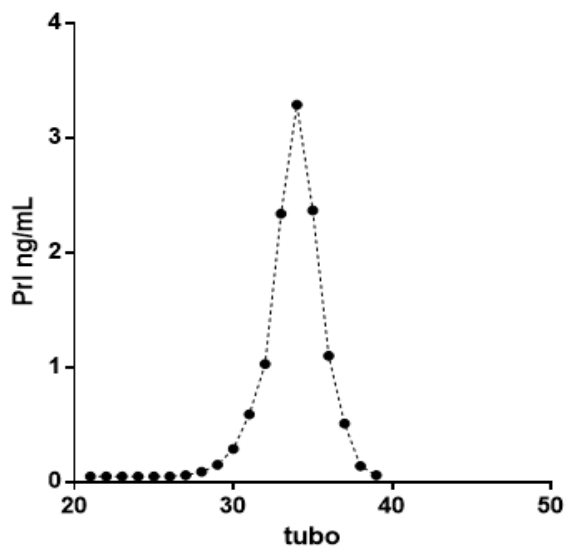


Amostra 7F



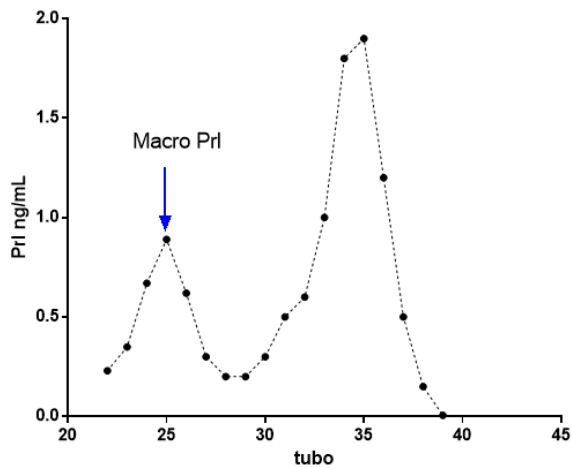
Macro 6%
 Dímero 17%
 Monomero 77%

Amostra 10M



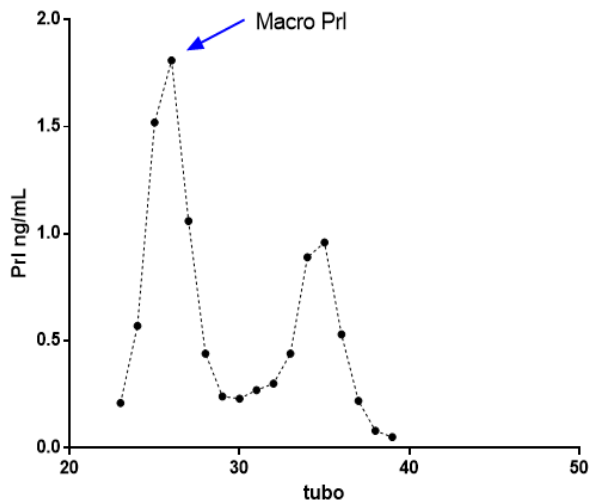
Macro 4%
 Dímero 16%
 Monomero 80%

Amostra 12F

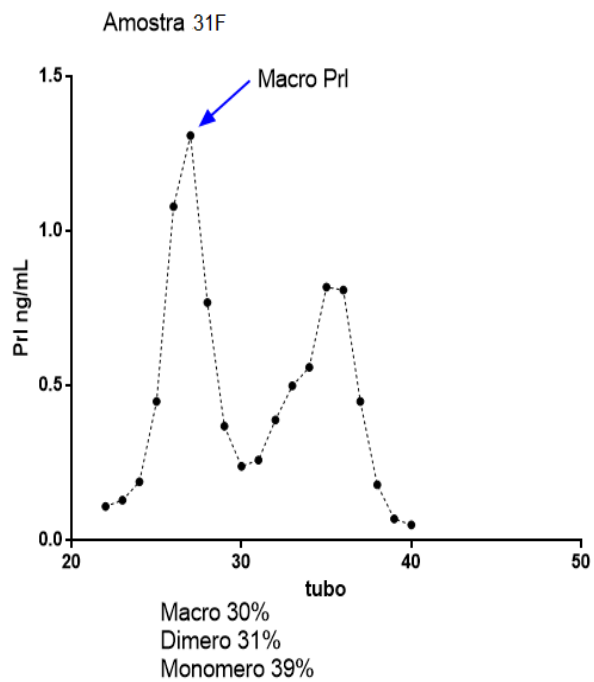
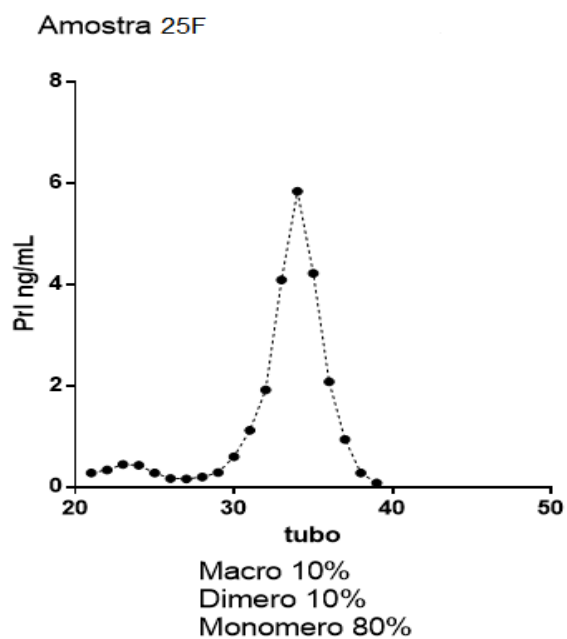
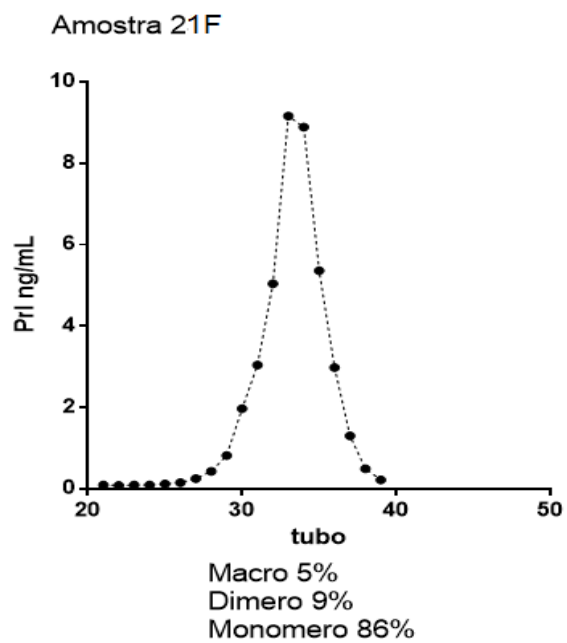
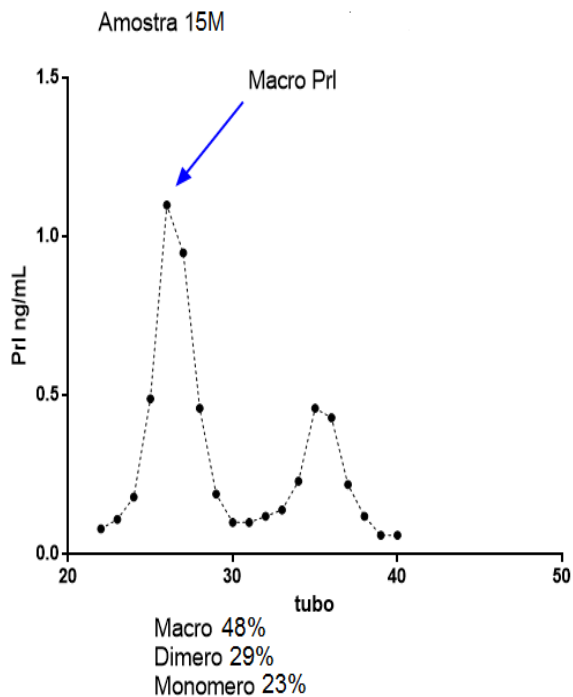


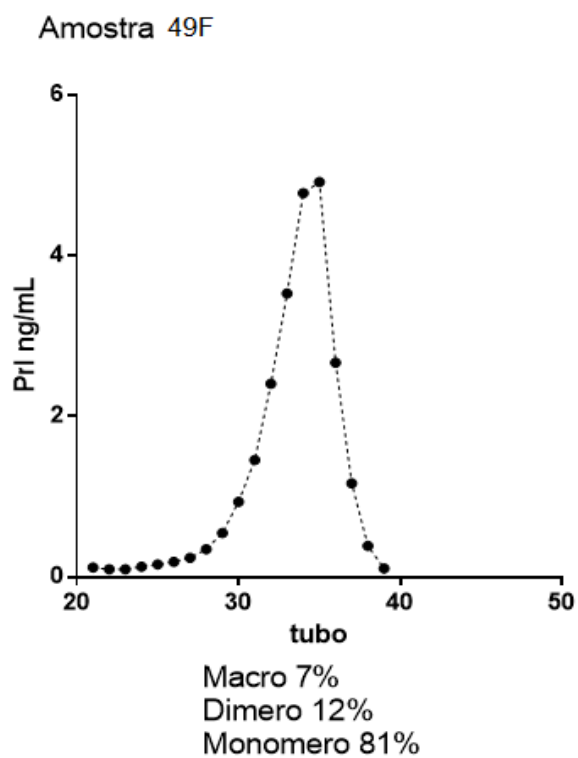
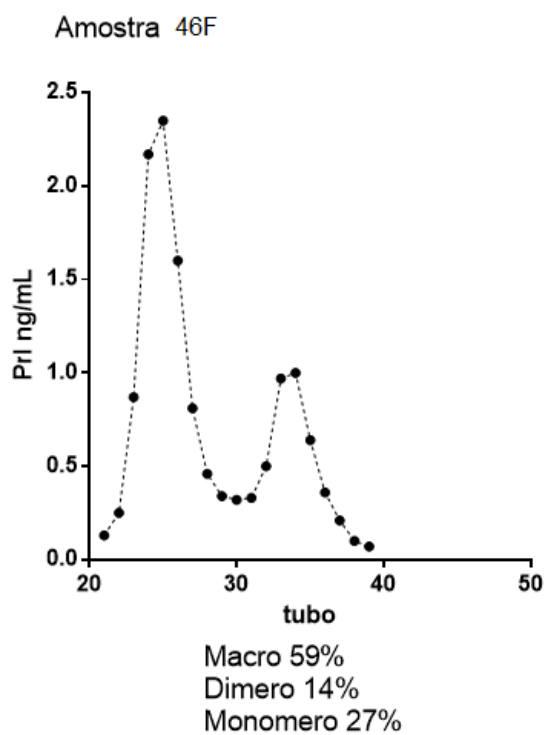
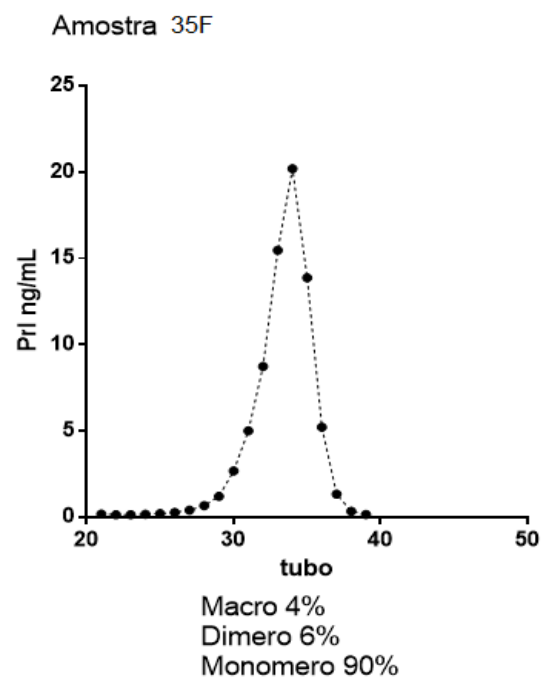
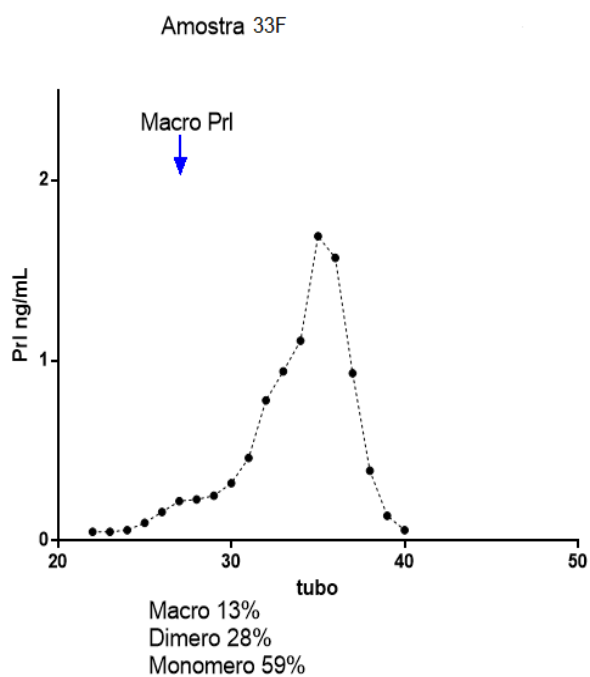
Macro 27%
 Dímero 17%
 monomero 56%

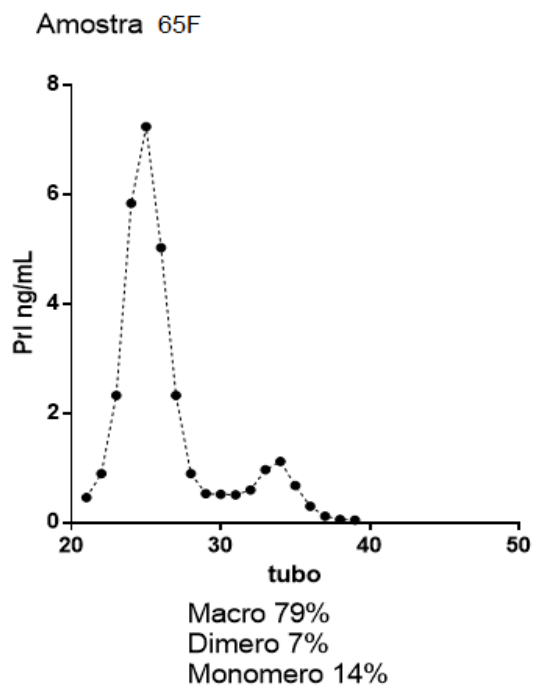
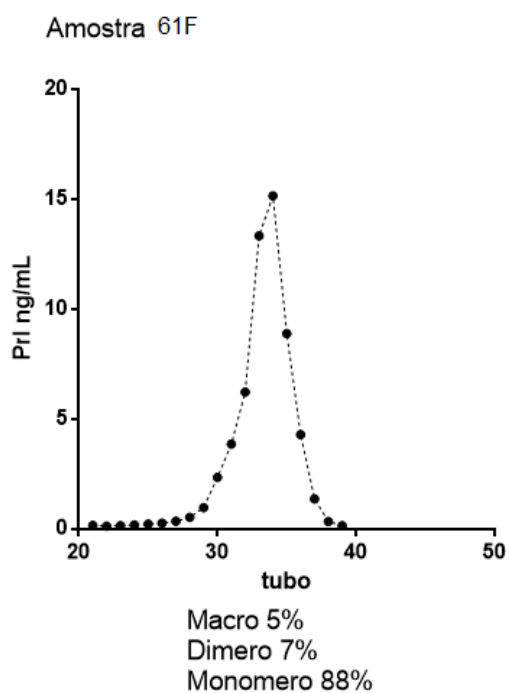
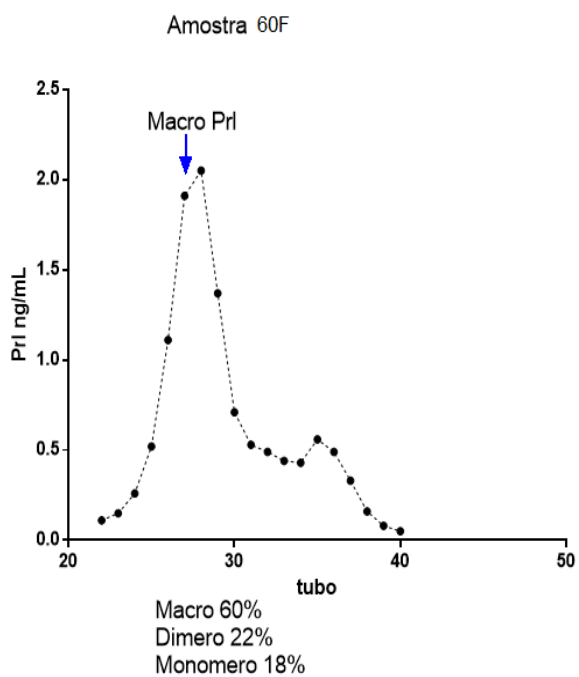
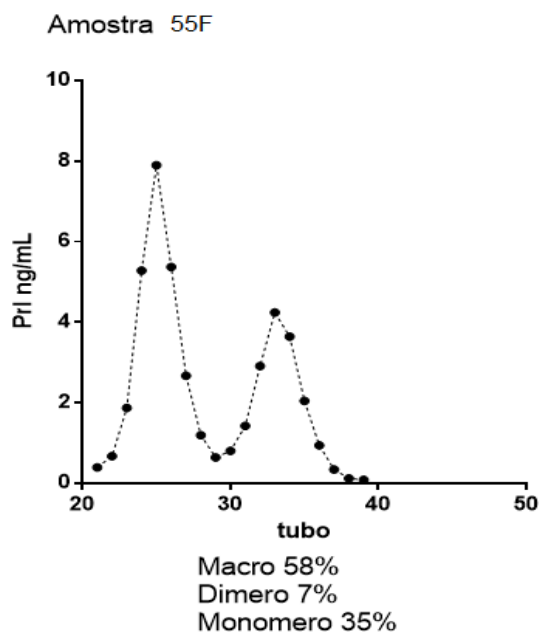
Amostra 14F



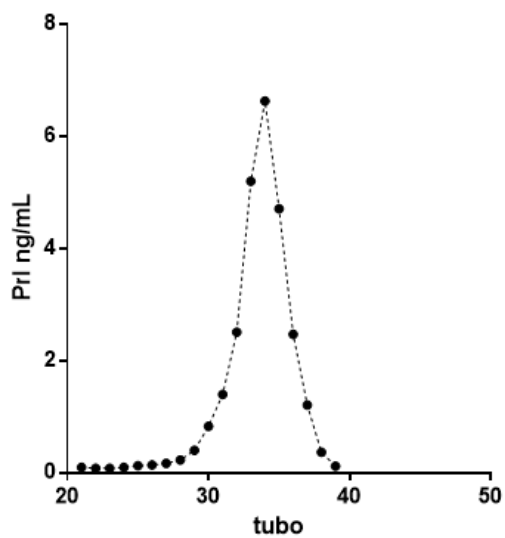
Macro 51%
 Dímero 20%
 Monomero 29%





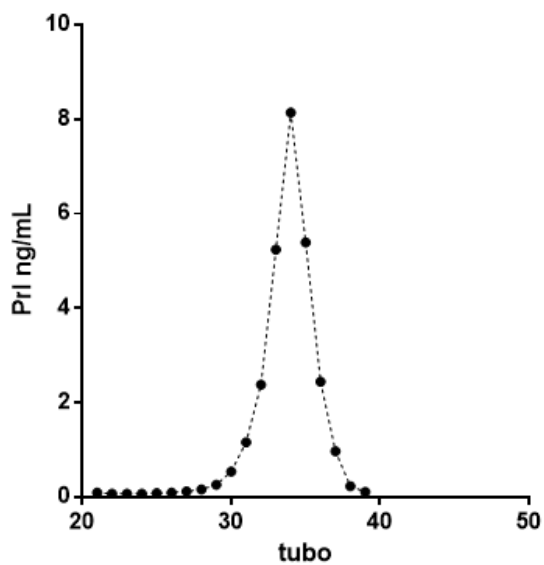


Amostra 66F



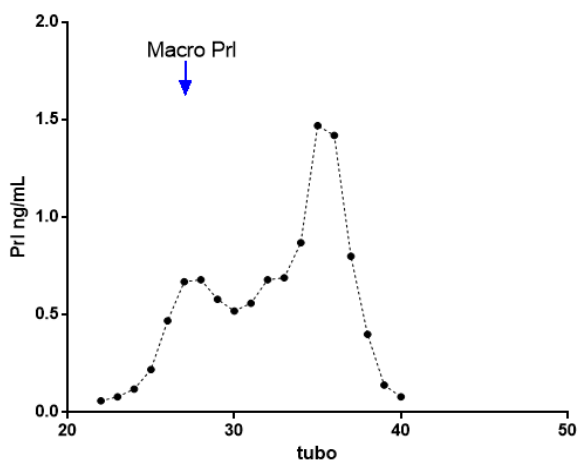
Macro 5%
 Dimero 10%
 Monomero 85%

Amostra 67F



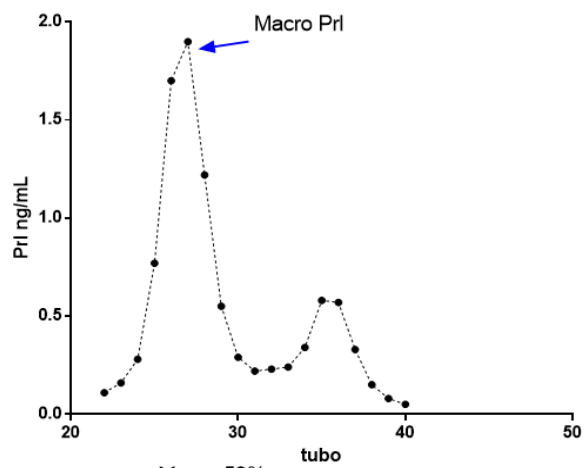
Macro 3%
 Dimero 9%
 Monomero 88%

Amostra 79F



Macro 27%
 Dimero 26%
 Monomero 47%

Amostra 84F



Macro 59%
 Dimero 21%
 Monomero 20%

