



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA HIPERPROLACTINEMIA INDUCIDA POR SULPIRIDA SOBRE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Biól. ELVA HORTENCIA ADÁN CASTRO

TUTORES

**DRA. MA. DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ-L.
DRA. EDITH ARNOLD HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

COMITÉ TUTOR

**DRA. ROCÍO BRENDA ANGUIANO SERRANO
DR. JOSÉ GERARDO ROJAS PILONI
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

CAMPUS JURQUILLA QUERÉTARO, QRO., JULIO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis se realizó en el Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla, Querétaro, bajo la dirección de la **Dra. Ma. del Carmen Clapp Jiménez-L.** y la **Dra. Edith Arnold Hernández** en el laboratorio de Endocrinología Molecular (A-14) del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular. Fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) **247164**, además la alumna fue becaria CONACYT con el número de registro **588869**.

JURADO DE EXÁMEN

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Presidente

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez-L.

Secretario

Dra. Ma. Ludivina Robles Osorio

Vocal

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano

Suplente

Dr. Lenin David Ochoa de la Paz

Suplente

I. RESUMEN

La retinopatía diabética (RD) es una complicación ocular derivada de la diabetes mellitus (DM) que se caracteriza por daños en la microvasculatura de la retina que concurren en una vasopermeabilidad excesiva y proliferación vascular (angiogénesis) que comprometen la visión. Las vasoinhibinas, una familia de péptidos derivados del corte proteolítico de la hormona PRL, inhiben la angiogénesis y disminuyen la vasopermeabilidad causada por la diabetes. En este trabajo investigamos el uso del fármaco sulpirida, un antagonista de los receptores tipo 2 de dopamina que induce hiperprolactinemia, bajo la hipótesis de que el aumento de PRL sistémica es fuente de vasoinhibinas oculares que contrarrestan la progresión de la RD. Encontramos que la sulpirida indujo hiperprolactinemia en forma dosis-dependiente, donde la dosis más alta (20 mg/kg) ocasionó niveles de PRL en suero de 117.7 ± 10.6 ng/mL. Demostramos que las vasoinhibinas oculares aumentan en los vítreos de animales tratados con sulpirida ya que detectamos proteínas de 16 y 14 kDa con inmunorreactividad de PRL que comigran con los estándares de vasoinhibinas. Además, demostramos que el tratamiento con sulpirida por 2 semanas a la segunda o a la cuarta semana de diabetes con estreptozotocina (STZ; 60 mg/kg i.p.), se reduce el incremento de la vasopermeabilidad ocular debida a la diabetes. La sulpirida no mostró efectos colaterales sobre el peso corporal y ni la glucosa sanguínea de los animales tratados. Nuestros resultados indican que la sulpirida, posee efectos terapéuticos potenciales contra la RD a través de aumentar los niveles de PRL y su conversión intraocular hacia vasoinhibinas.

II. SUMMARY

Diabetic retinopathy (RD), an ocular complication of diabetes mellitus (DM), is characterized by damage to the retinal microvasculature that results in excessive vasopermeability and vascular proliferation (angiogenesis) that compromise vision. Vasoinhibins, a family of peptides derived from proteolytic cleavage of the hormone prolactin (PRL), inhibit angiogenesis and decrease vasodilation and vasopermeability in experimental diabetes. Here, we used the drug sulpiride, an antagonist of dopamine type 2 receptors that induces hyperprolactinemia, with the hypothesis that those higher levels of systemic prolactin result in the increase of ocular able to counteract the progression of RD. Daily intraperitoneal (i.p.) injections of sulpiride induced hyperprolactinemia in a dose-dependent manner, with the highest dose (20 mg/Kg) leading to maximal serum PRL levels (117.7 ± 10.6 ng/mL). We also demonstrated that ocular vasoinhibins increased in sulpiride-treated animals, as indicated by the presence of 16 and 14 kDa PRL-immunoreactive that co-migrate with vasoinhibin standards in the vitreous of sulpiride-treated animals not found in the absence of the drug. Sulpiride administered for 2 weeks at 2 or 4 weeks after inducing diabetes with streptozotocin (STZ; i.p. 60 mg/kg) reduced the diabetes-induced increase in retinal vasopermeability. Sulpiride had no adverse side effects on retinal vasopermeability in non-diabetic controls and in the body weight and glucose circulating levels of all animals. Sulpiride is a prokinetic drug used in diabetic patients that may be desirable to target DR due to its hyperprolactinemic effect that results in elevated levels of intraocular vasoinhibins.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente el apoyo y la dirección académica de la Dra. Ma. del Carmen Clapp Jiménez-L. y la Dra. Edith Arnold Hernández, así como el espíritu crítico pero siempre constructivo y humano de mi comité tutorial, la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano y al Dr. José Gerardo Rojas Piloni.

Son muchas las personas que de manera directa o indirecta contribuyeron a hacer posible esta tesis, ya sea con su amistad, múltiples enseñanzas o apoyo moral, en especial los integrantes del laboratorio A-14; a Nundehui Díaz Lezama que ha sido mi compañera y maestra en este proyecto, así como a Lupita Ledesma y Xarubet Ruiz quienes me han brindado su valiosa amistad y apoyo incondicional y Gabriela Ramírez con quien compartí todas las vivencias de los dos años de la maestría.

La ayuda y asesoría invaluable del Nut. Fernando López Barrera y el apoyo técnico del M en C. Gabriel Nava Pinto.

La asistencia de los laboratoristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán.

El apoyo a los responsables del bioterio del Instituto de Neurobiología el MVZ. Martín García Servín y la Dra. Alejandra Castilla.

El apoyo técnico de la Lic. Ma. Lourdes Lara Ayala, responsable de la Unidad de Videoconferencia. Al Dr. Francisco Valles Valenzuela coordinador de la Biblioteca de la UNAM, Campus Juriquilla, y al Ing. Ramón Martínez Olvera responsable de la Unidad de Cómputo.

El apoyo y asistencia del jefe de la unidad de enseñanza y estudios de posgrado la M. en C. Leonor Casanova Rico.

DEDICATORIAS

A mis padres: Eligio y Luisa

A mis hermanos: Norma, Mariana, Angéles, Ramón y Luis

...quienes han sido mi motivación más grande en este camino, por todo el amor y apoyo que me han dado.

A Carlos Fernando,

...por haberme encontrado y darme tu mano todos los días.

A mí me basta con el misterio de la eternidad de la vida, con el presentimiento y la conciencia de la construcción prodigiosa de lo existente, con la honesta aspiración de comprender hasta la mínima parte de razón que podamos discernir en la obra de la Naturaleza.

Albert Einstein

ÍNDICE

	<i>Página</i>
I. RESUMEN	i
II. SUMMARY	li
III. AGRADECIMIENTOS	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. <i>Diabetes Mellitus</i>	2
2.2. <i>La retina</i>	4
2.3. <i>Sistema vascular de la retina</i>	6
2.4. <i>Retinopatía diabética (RD)</i>	7
2.5. <i>Prevención y tratamientos para la RD</i>	10
2.6. <i>Prolactina (PRL)</i>	12
2.7. <i>Las vasoinhibinas</i>	14
2.8. <i>Relación entre la PRL circulante y las vasoinhibinas oculares en la RD</i>	16
2.9. <i>Sulpirida</i>	17
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. <i>Evaluación del efecto de la sulpirida sobre los niveles circulantes de PRL en ratas no diabéticas</i>	21
6.2. <i>Detección de las vasoinhibinas en el vítreo de ratas no diabéticas tratadas con sulpirida</i>	23
6.3. <i>Evaluación del efecto de la sulpirida sobre la vasopermeabilidad de la retina de ratas diabéticas</i>	25
6.4. <i>Análisis estadístico</i>	27
7. RESULTADOS	28
7.1. <i>La sulpirida aumenta los niveles de PRL sistémica de manera dosis-dependiente</i>	28

7.2.	<i>Las vasoinhibinas aumentan en el vítreo de ratas no diabéticas tratadas con sulpirida</i>	29
7.3.	<i>La PRL sistémica disminuye en ratas diabéticas y se eleva con el tratamiento con sulpirida</i>	30
7.4.	<i>La sulpirida inhibe el aumento de la permeabilidad vascular de la retina, causada por la diabetes</i>	31
8.	DISCUSIÓN	35
9.	CONCLUSION	40
10.	REFERENCIAS	41-49

INDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1	Esquema que muestra la estructura ocular y conformación de la retina.	6
Figura 2	Representación de la estructura de la hormona PRL.	14
Figura 3	Esquema que ilustra los sitios de corte de la PRL y la generación de las diferentes vasoinhibinas.	15
Figura 4	Esquema propuesto del uso de la sulpirida para elevar los niveles de PRL circulante	19
Figura 5	Cuantificación de la PRL en suero de ratas no diabéticas tratadas por 5 días con dosis crecientes de sulpirida.	28
Figura 6	Inmunoprecipitación (IP)-Western blot de vítreos de animales tratados y no tratados con sulpirida.	29
Figura 7	Niveles de PRL en suero de ratas controles (C) y diabéticas (DB) tratadas o no con sulpirida (Sulp).	30
Figura 8	La sulpirida disminuye el aumento en la vasopermeabilidad retiniana debida a la diabetes.	32
Figura 9	La sulpirida inhibe el aumento de la vasopermeabilidad retiniana debida a la diabetes.	34

ÍNDICE DE TABLAS	<i>Página</i>
Tabla I. Valores de peso corporal y niveles de glucosa en sangre de los grupos experimentales 4 semanas posteriores a la inducción de diabetes.	32
Tabla II. Valores de peso corporal y niveles de glucosa en sangre de los grupos experimentales a las 6 semanas posteriores a la inducción de diabetes.	34

1. INTRODUCCIÓN

La retinopatía diabética (RD) es la complicación ocular más severa derivada de la diabetes mellitus (DM) y es la segunda causa de ceguera irreversible y discapacidad visual en la población mundial en edad laboral (20 a 64 años) (Fong *et al.*, 2004; IDF, 2015). En México se estima que 2 de cada 5 personas que padecen DM cursan con RD (Gutiérrez *et al.*, 2012) y que luego de 10 años con la enfermedad, el 90% de las personas con DM tipo 1 y más del 60% de aquellas con DM tipo 2 presentarán algún grado de retinopatía (Mohamed, Gillies, & Wong, 2007).

Los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la RD son complejos, pero hasta ahora la hiperglucemia ha sido el principal factor de riesgo asociado al inicio y progresión de la RD. La hiperglucemia produce especies reactivas de oxígeno que al activar múltiples vías bioquímicas conducen al daño microvascular de la retina (Brownlee, 2005; Xu, He, & King, 2005). Las principales alteraciones morfológicas observadas en la vasculatura de la retina incluyen la pérdida de pericitos, de células endoteliales y el aumento en la vasopermeabilidad que conlleva al engrosamiento de la membrana basal de los capilares sanguíneos (Simo, Carrasco, García-Ramírez, & Hernández, 2006). En estadíos avanzados de la RD, estas alteraciones conducen a la oclusión de la luz capilar y a la subsecuente isquemia e hipoxia, que a su vez desencadenan la producción de factores proangiogénicos, entre los que destaca el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Simo *et al.*, 2006; Simo & Hernández, 2008).

El tratamiento convencional para la RD es la fotocoagulación con láser que básicamente actúa a través de generar pequeñas quemaduras en zonas discretas de la retina con el propósito de eliminar el tejido isquémico productor de factores proangiogénicos (Margolis, Singh, Bhatnagar, & Kaiser, 2008). Sin embargo, este procedimiento solamente es eficaz en el 50% de los pacientes con RD y, al ser destructivo en sí mismo, conlleva efectos colaterales no deseados que incluyen la presencia de glaucoma y el desarrollo de lesiones neurales que conducen a la disminución irreversible de la visión (Williams *et al.*, 2004). La vitrectomía es otro tratamiento por el cual se sustituye una porción o la totalidad del vítreo. Se lleva a cabo en cuadros avanzados de RD donde ocurren hemorragias vítreas o el desprendimiento de la retina. La vitrectomía

aumenta el riesgo de la formación de cataratas en un 44% (Tezel *et al.*, 1996) y es un factor de riesgo para neovascularización del iris (Stefansson, 2009). Además, tanto la terapia láser como la vitrectomía sólo son aplicables en los estadios avanzados de la RD y tienen baja eficiencia para revertir las lesiones.

En las últimas décadas se ha buscado desarrollar terapias más efectivas y menos invasivas para curar y/o prevenir la progresión de la RD. Tal es el caso del uso de agentes antiangiogénicos e inhibidores de la vasopermeabilidad capaces de bloquear los efectos vasculares del VEGF y que incluyen el secuestro del VEGF mediante anticuerpos y su receptor soluble así como la inhibición de la producción del VEGF con RNAs de interferencia (Bainbridge, Mistry, Thrasher, & Ali, 2003). Es claro que la identificación de sustancias endógenas inhibitorias de la angiogénesis y de la vasopermeabilidad tiene valor potencial para el control de la RD. En este sentido, estudios recientes muestran que hormona prolactina (PRL) y los metabolitos derivados de su proteólisis (vasoinhibinas) son parte de estas sustancias. A continuación se revisan aspectos generales de la fisiopatología de la diabetes y de la RD, del eje PRL/vasoinhibinas y de la droga (Reich *et al.*, 2003) utilizados en el presente estudio.

2. ANTECEDENTES

2.1. Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) es la enfermedad crónico degenerativa más común y se considera uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Hay 320,5 millones de personas con diabetes en edad laboral (20-64 años) y 94,2 millones de personas diabéticas entre 65-79 años. Se había estimado que para el año 2025 habría 300 millones de pacientes con DM, sin embargo, la prevalencia de esta enfermedad para finales del 2015 sobrepasó estas estimaciones encontrándose más de 415 millones de personas con el padecimiento; lo que implica que para el año 2040 habrá entre 521-829 millones de personas enfermas con diabetes en el mundo (IDF, 2015). México ocupa el sexto lugar a nivel mundial con 11.5 millones de diabéticos y en nuestro país la diabetes es una de las primeras causas de mortalidad (Gutiérrez *et al.*, 2012).

La DM es probablemente una de las enfermedades más viejas conocidas por el hombre, pues existen registros de manuscritos egipcios que hablan de ella desde hace 3,000 años (Ahmed, 2002). La DM se describe como un conjunto de desórdenes metabólicos caracterizados por altos niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), que aparece ante una deficiencia de la hormona insulina o por la resistencia a sus efectos hormonales. La insulina se sintetiza y secreta por las células β presentes en el páncreas y es responsable de la internalización celular de la glucosa como fuente de energía (Edwards, 2004).

En 1936 se identificaron los dos tipos principales de diabetes y se les denominó como diabetes “dependiente de insulina” (tipo 1) y “no dependiente de insulina” (tipo 2) (Patlak, 2002). La DM tipo 1 es el tipo de diabetes menos común, es causada por una destrucción selectiva de las células β pancreáticas debido a un proceso autoinmune que conduce a una absoluta deficiencia de insulina (Daneman, 2006), por lo que los pacientes requieren de una terapia con insulina para mantener su normoglicemia. La DM tipo 2 fue la primera enfermedad descrita como síndrome metabólico en 1988 y es el tipo de diabetes más común. Resulta de la interacción de factores genéticos, medioambientales y factores de riesgo conductuales como la obesidad, la mala alimentación, la inactividad física, entre otros (Stumvoll, Goldstein, & van Haeften, 2005). Con el tiempo todos estos factores conducen a una resistencia a la acción de la insulina y la consecuente hiperglucemia (Deshpande, Harris-Hayes, & Schootman, 2008; Holt, 2004).

Otro tipo de diabetes de DM es la gestacional, que se presenta a consecuencia de una resistencia a la insulina desarrollada alrededor de la semana 24 del embarazo y parece deberse a la acción de hormonas producidas por la placenta (Persson & Hanson, 1998). Además, existe un estado denominado “prediabetes” que describe una condición en la cual las personas presentan niveles altos de glucosa en sangre, pero no tan altos como para considerarse DM, que se definen como “tolerancia alterada a la glucosa” y estos pacientes poseen un alto riesgo de progresar a la DM tipo 2 (Deshpande *et al.*, 2008).

En cualquier tipo de diabetes, la falta de incorporación de glucosa a las células resulta en hiperglucemia que a través de diversas alteraciones bioquímicas causa severas complicaciones en tejidos y órganos del cuerpo que comprometen la vida. Estas

complicaciones se pueden agrupar en macrovasculares como daños cardiovasculares, ataques cerebrovasculares y enfermedades vasculares periféricas; y complicaciones microvasculares que producen daños al sistema nervioso (Holt, 2004), daños renales (nefropatías) y daños oculares (edema macular diabético y retinopatía diabética) (Antonetti, Klein, & Gardner, 2012; Cai & Boulton, 2002).

En cuanto a los daños oculares, la RD, es una complicación del sistema microvascular de la retina que conduce a la pérdida de la visión causada por lesiones, oclusión y proliferación de los vasos sanguíneos (Cheung, Mitchell, & Wong, 2010). Para poder entender cómo es que la visión se ve seriamente afectada por la DM, a continuación se explicará la anatomía ocular y la estructura de la retina para posteriormente comentar aspectos de la fisiopatología de la RD.

2.2. La retina

La retina es un tejido que forma parte del sistema nervioso central (SNC), se encuentra dentro del ojo en la región más interna y es el tejido encargado de capturar las señales luminosas para transformarlas en impulsos nerviosos que viajarán a través del nervio óptico hacia el cerebro para dar lugar a la percepción visual. Para que la retina pueda llevar a cabo la fototransducción, el ojo presenta una anatomía y fisiología muy particulares, donde las señales de luz deben atravesar de forma sucesiva la córnea, el humor acuoso, el cristalino y el cuerpo vítreo hasta llegar a la retina (**Fig.1A**). Estas estructuras deben mantenerse transparentes para maximizar la transmisión de la luz y la refracción hacia la retina (Hassell & Birk, 2010; Jester, 2008).

La córnea es el lente más externo del ojo cuya función es transmitir la luz y tiene el mayor poder refractivo del ojo; su composición es 78% agua y al menos 15% colágeno, posee abundantes enzimas y proteínas solubles en agua. El cristalino, otro lente de forma biconvexa que debe mantenerse transparente, está compuesto en un 90% por proteínas solubles en agua llamadas “cristalinas”. Estas proteínas forman agregados solubles de alto peso molecular que incrementan el índice de refracción de la luz (Bloemendal *et al.*, 2004; Hoehenwarter, Klose, & Jungblut, 2006). El cuerpo vítreo es un gel que ocupa la cámara posterior del ojo que también debe su transparencia a que está compuesto por agua, colágeno y ácido hialurónico. El vítreo contribuye a mantener la presión ocular,

evita que el globo ocular se colapse, absorbe impactos y mantiene a la retina en su posición.

La retina por su parte, está formada por diez capas de células neuronales (**Fig. 1B**) y está aislada del resto de las estructuras oculares por la membrana limitante interna (MLI) que forma el límite con el vítreo. La MLI está formada por uniones no especializadas entre los pies vítreos de las células de Müller seguido de la capa de fibras del nervio óptico (CFNO) formada por prolongaciones de axones de las células ganglionares. La capa siguiente es la de las células ganglionares (CCG) formada por los somas de las células ganglionares, de algunas células amácrinas y de las células gliales (astrocitos). Siguen la capa plexiforme interna (CPI) donde se establecen contactos sinápticos entre las células bipolares y las amacrinas; la capa nuclear interna (CNI) constituida por los núcleos de las células bipolares, amacrinas y horizontales y células de Müller; la capa plexiforme externa (CPE) formada por fibras nerviosas que provienen de los fotorreceptores (conos y bastones que son células altamente especializadas en transformar la luz en energía química); la capa nuclear externa (Mcmurdo et al., 1987) donde se agrupan los somas de los fotorreceptores; la membrana limitante externa (MLE) formada por uniones especializadas entre los segmentos internos de los fotorreceptores y las prolongaciones externas de las células de Müller. En penúltimo lugar está la capa de los segmentos externos de los fotorreceptores (CF) y finalmente, el epitelio pigmentario retiniano (EPR). Las células del EPR contienen gran cantidad de melanina, que absorbe el exceso de luz e impide su reflejo sobre otras partes de la retina (Archer, Gardiner, & Stitt, 2007).

Tanto la córnea, el cristalino y el vítreo se caracterizan por su transparencia debida en gran medida a la ausencia de vasos sanguíneos lo que permite que la luz pase directo a la retina sin sufrir alguna desviación. El aporte de nutrientes y oxígeno lo obtienen por difusión. De la misma manera, las capas celulares de la retina a partir de la CNE hasta la MLE están desprovistas de vasos sanguíneos con la finalidad de captar la mayor cantidad de luz. Por lo cual, el sistema microvascular de la retina debe estar finamente regulado.

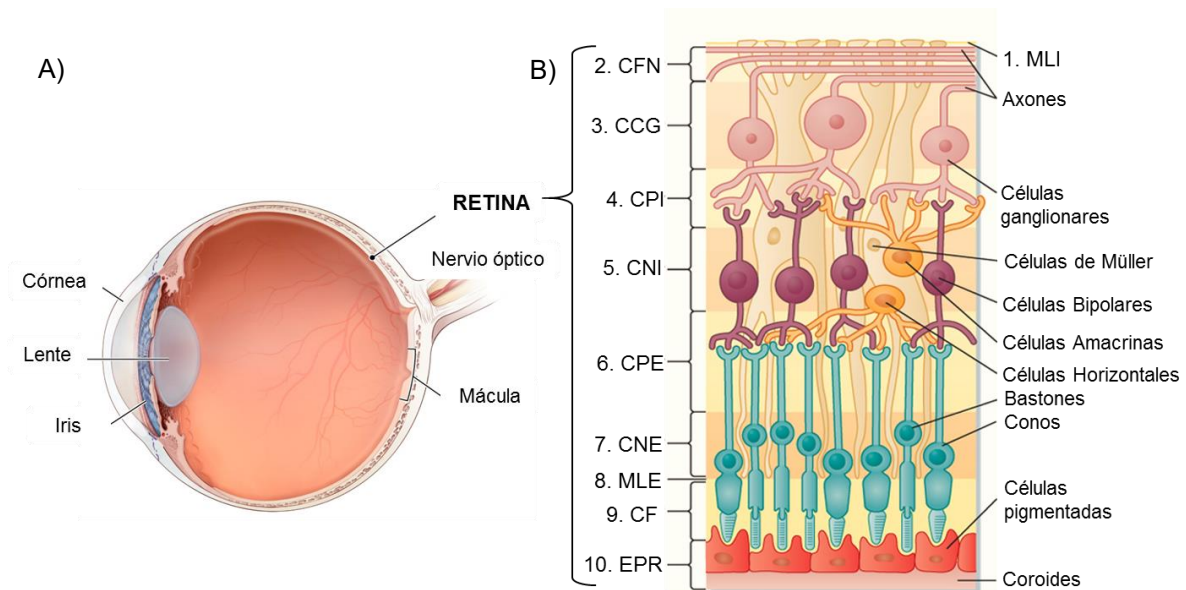


Figura 1. Esquema que muestra la estructura ocular y conformación de la retina. A) partes que conforman el ojo. B) Capas de la retina. (Esquema modificado de Koeppen y Stanton, 2008).

2.3. Sistema vascular de la retina

La retina está vascularizada por dos sistemas separados, uno que deriva de la arteria central y el otro que está formado por las arterias ciliares posteriores cortas (Kiel, 2010).

El sistema microvascular de la arteria central de la retina, tiene su origen en la arteria oftálmica que deriva de la arteria carótida interna. La arteria central viaja dentro del nervio óptico para entrar al ojo, luego se ramifica para suministrar las capas interiores de la retina. Es decir, las capas más cercanas al compartimento vítreo (MLI, CFNO, CCG, CPI y CNI). Mientras que las capas más externas de la retina (CPE, CNE, MLE, CF y EPR) reciben riego sanguíneo por difusión a través de los vasos de la coroides que derivan de las arterias ciliares posteriores cortas (Archer *et al.*, 2007; Kiel, 2010).

Ambos sistemas microvasculares están formados por células endoteliales, membrana basal y pericitos que confluyen para formar a las arterias y arteriolas que dirigen el flujo ocular en general y de la retina en particular. Sin embargo, la entrada de los componentes de la circulación a la retina está regulada por la barrera hematorretiniana, constituida por las uniones estrechas del endotelio vascular no fenestrado y las uniones estrechas entre las células del EPR y del epitelio de los cuerpos

ciliares (estructuras localizadas entre el iris y la porción más anterior y periférica de la retina) (Kaur, Foulds, & Ling, 2008). Por lo tanto, la incorporación a la retina de la mayoría de moléculas sistémicas requiere de un transporte activo a través de las células endoteliales, el EPR y el epitelio de los cuerpos ciliares. Anomalías de la circulación retiniana son indicadores de disfunción. Entre dichas anomalías destaca la vasopermeabilidad excesiva y la sobreproducción de los vasos sanguíneos que ocurren en las retinopatías vasoproliferativas como la RD.

2.4. Retinopatía diabética (RD)

La RD es un trastorno específico de la vasculatura de la retina derivada de la DM (Lieth, Gardner, Barber, & Antonetti, 2000; Tzekov & Arden, 1999), que con el tiempo, resulta en una neurodegeneración retiniana que compromete la visión (Antonetti *et al.*, 2012). Es la primera causa de ceguera irreversible y discapacidad visual en la población mundial en edad laboral (20 a 64 años) (Moss, Klein, & Klein, 1998; Fong *et al.*, 2004; Antonetti *et al.*, 2012;). Estudios epidemiológicos en el campo oftalmológico, han reportado que 90 millones de personas con DM presentan RD y de éstos, 17 millones de pacientes desarrollarán RD proliferativa. La RD ocurre en pacientes con DM tipo 1 así como tipo 2. Se sabe que del 50 al 60% de las personas con DM tipo 2 desarrollarán RD luego de 10 a 15 años con la enfermedad; mientras que ésto sucede en el 90% de los enfermos con DM tipo 1 (Klein, Klein, Moss, Davis, & DeMets, 1984; Mohamed *et al.*, 2007). En México, la prevalencia informada de RD en pacientes con DM tipo 2 es del 42 al 50% (Gonzalez Villalpando, Gonzalez Villalpando, Arredondo Perez, & Stern, 1994; Rodriguez-Villalobos, Ramirez-Barba, & Cervantes-Aguayo, 1994) y la incidencia de RD es de 23%, 48% y 71% a los 3, 6 y 12 años con DM, respectivamente (Rodriguez-Villalobos *et al.*, 2005).

Los factores de riesgo que conducen al desarrollo de la RD incluyen el tiempo con diabetes, la intensidad de la hiperglucemia y la hipertensión arterial (Ding & Wong, 2012; Lamoureux, Hassell, & Keeffe, 2004). Sin embargo, el desarrollo y evolución de la RD no puede explicarse completamente por la hiperglucemia e hipertensión, ya que hay estudios que han demostrado que una proporción de diabéticos con buen control

glucémico y/o de presión arterial no desarrollan DR (Keenan *et al.*, 2007), mientras que otros con el mismo control desarrollan estadios graves de DR (Zhang, Krzentowski, Albert, & Lefebvre, 2001), lo que sugiere que la RD está determinada por múltiples factores asociados con la DM. Por ejemplo, se ha sugerido que factores genéticos, la dislipidemia, la nefropatía diabética, la obesidad y marcadores de inflamación y disfunción endotelial sistémica pueden ser factores de riesgo para el desarrollo de RD (Nguyen *et al.*, 2009; Sasongko *et al.*, 2012).

En cuanto a los factores genéticos, se ha reportado que del 20 al 50% de los pacientes con DM tipo 1, presentan marcadores genéticos para el desarrollo de RD proliferativa, pero no así para las personas con DM tipo 2 donde la mayoría de marcadores son epigenéticos (Huang *et al.*, 2011).

En términos generales, en la RD se presentan alteraciones a nivel estructural y funcional en los vasos de la retina, que incluyen lesiones, oclusión y proliferación (Cheung *et al.*, 2010). De acuerdo a las alteraciones vasculares, se ha clasificado la RD en dos estadios: no proliferativo (RDNP) y proliferativo (RDP). La RDNP es la fase inicial de la RD y se caracteriza por el engrosamiento de la membrana basal de los capilares, muerte y desprendimiento de pericitos y del endotelio vascular, que a su vez conlleva al aumento de la permeabilidad vascular y a la oclusión vascular de la retina. En la RDP tiene lugar la proliferación de vasos sanguíneos anómalos que en sus etapas avanzadas invaden y sangran hacia el vítreo y llegan a ocasionar el desprendimiento de la retina (Frank, 2004).

Sin embargo, debido a los múltiples factores de riesgo ya mencionados ha sido difícil explicar su etiología. Actualmente hay hipótesis sustentadas en estudios clínicos y preclínicos que tratan de explicar los mecanismos fisiopatológicos de la RD. Una de las hipótesis es la fuerte asociación entre la hiperglicemia crónica y el inicio y la progresión de la RD, aunque el mecanismo que subyace al daño microvascular como resultado de la hiperglicemia, sigue siendo poco claro (Matthews *et al.*, 2004). Se han propuesto algunas vías bioquímicas que actúan como posibles vínculos entre la hiperglicemia y la RD. Estos incluyen el incremento en la producción de polioles, la síntesis de diacilglicerol por la vía de la proteína cinasa C (PKC), la producción de radicales libres, la glicosilación de productos finales (AGEs) y la leucostasis (Brownlee, 2005). Además, hay evidencia de que la inflamación vascular y del tejido neuronal de la retina, la activación del sistema

renina-angiotensina (RAS), la vía de la hexosamina, la deficiencia de la acción de la insulina en la vasculatura y el estrés oxidativo tienen un importante papel en el desarrollo de la RD a través de alterar la expresión y acción de proteínas, hormonas, factores de crecimiento y citocinas (Simo & Hernandez, 2014).

Entre las vías bioquímicas que resultan en daño vascular de la retina debido a la hiperglucemia crónica se encuentra la vía del poliol o sorbitol. Esta vía consiste en una cascada de reacciones químicas catalizadas por la enzima aldosa reductasa donde se obtiene fructuosa a partir de glucosa, pasando por el sorbitol. El incremento de esta vía disminuye los niveles de NADPH que se requieren para la generación de glutatión reducido que es un antioxidante intracelular muy importante. Al tener bajas concentraciones de glutatión reducido, las células se vuelven susceptibles al estrés oxidativo que, en etapas tempranas de la diabetes, produce la disfunción de las células endoteliales (Engerman & Kern, 1995). Además, el NADP⁺ procedente de la vía del poliol desvía el metabolismo de la glucosa hacia la síntesis *de novo* de diacilglicerol (DAG) el cual activa a la proteína cinasa C (PKC). La PKC estimula la expresión de endotelina-1 que disminuye el flujo capilar causando isquemia en la retina. A su vez, la isquemia retiniana estimula la síntesis del VEGF, que es un potente factor angiogénico (Das-Evcimen & King, 2007). Mientras que los pericitos mueren por efectos combinados del estrés oxidativo, a consecuencia de la vía del sorbitol y la glicosilación no enzimática (Hammes *et al.*, 2011).

Por otra parte, la hiperglucemia puede inducir de manera irreversible la glicosilación tanto de proteínas intracelulares como extracelulares en un proceso conocido como la reacción de Maillard, donde se adiciona la molécula de glucosa al grupo amino de la lisina de las proteínas. Esto trae como consecuencia que las proteínas modifiquen su estructura, sus propiedades fisicoquímicas y sus funciones biológicas. El grado de glicosilación dependerá de la concentración de glucosa en el medio, así que cuando las concentraciones de glucosa se mantienen altas constantemente, los productos de las reacciones de glicosilación se estabilizan y se transforman en los llamados productos finales de glicosilación conocidos como AGE (Advanced Glycosylation End Products) (Singh, Bali, Singh, & Jaggi, 2014). Los AGEs alteran las propiedades de la membrana plasmática del endotelio favoreciendo la leucostasis

(Gabbay, 1982). Además, se conoce que los AGEs también inducen la expresión de factores como el VEGF (Cai & Boulton, 2002). De hecho, hay experimentos que han demostrado que la administración de AGEs a ratas no diabéticas conduce a alteraciones similares a las causadas por la hiperglucemia, incluyendo el aumento de la permeabilidad vascular y la vasodilatación mediada por óxido nítrico (NO) (Brownlee, 2001).

El estrés oxidativo que se define como un desequilibrio entre las moléculas oxidantes y las antioxidantes, desempeña un papel crítico en la patogénesis de las complicaciones vasculares derivadas de la DM. Se sabe que el aumento del estrés oxidativo puede ser causado por hiperglucemia, hiperlipidemia y ácidos grasos libres elevados, que se observan comúnmente en pacientes con diabetes y con resistencia a la insulina (Kuroki, Isshiki, & King, 2003). El estrés oxidativo induce la proliferación de las células endoteliales, la adhesión de los macrófagos al endotelio vascular, la activación de las plaquetas y la peroxidación de los lípidos, que contribuyen al desarrollo y progresión de las complicaciones vasculares.

En conjunto, todas estas alteraciones bioquímicas conllevan a una disminución en la perfusión sanguínea y consecuentemente a una hipoxia local en la retina. La hipoxia, por si misma, promueve la angiogénesis a través de la producción de factores angiogénicos e inhibiendo la de los factores antiangiogénicos (Carmeliet, 2005). En la retina de pacientes diabéticos, los nuevos vasos sanguíneos son anómalos pues crecen en dirección al cuerpo vítreo, son frágiles y tienden sangrar produciendo hemorragias dentro del vítreo que interfieren con la visión, pero que además, favorecen la producción de un tejido fibroso que ejerce tracción sobre la retina que la desprende y llega a ocasionar una ceguera irreversible (Frank, 2004; Yam & Kwok, 2007).

2.5. Prevención y tratamientos para la RD

Hasta hoy en día, la principal estrategia para prevenir el desarrollo de la RD en personas con DM, es el control de los niveles de glucosa en sangre y el control de la presión sanguínea (Frank, 2004). Existe evidencia de que el control temprano de la glicemia reduce el riesgo de desarrollo y progresión de la RD en un 21% (UK Prospective Diabetes Study, 1998). El control de la presión sanguínea como método preventivo de la RD no es muy claro aún, pero se ha reportado que los pacientes diabéticos que presentan

una presión sanguínea menor 180/85 mmHg, con respecto a los pacientes que presentan de 180/105 mmHg, presentan un menor riesgo para la progresión de la RD y que sólo un tercio de los pacientes con buen control de la presión sanguínea requieren una intervención láser para contrarrestar la RD (UK Prospective Diabetes Study, 1998). Sin embargo, el porcentaje de pacientes diabéticos que logran mantener una normoglicemia y controlar su presión sanguínea es muy bajo, debido a que la mayoría tarda meses o años en acudir a un diagnóstico clínico para el control de la glucemia. Esto aumenta el riesgo del desarrollo y la progresión de la RD hacia la etapa proliferativa que requiere terapias como la fotocoagulación láser (Bhavsar, 2006).

La fotocoagulación láser ha sido el tratamiento ocular estándar en pacientes con RD proliferativa por más de tres décadas (Frank, 2004). Se usó por primera vez en la década de los 70's por el oftalmólogo Duke-Elder quien consiguió la regresión de los exudados duros vasculares producidos en una etapa avanzada de la RD (Neubauer & Ulbig, 2007). La fotocoagulación láser tiene su efecto sobre la retina cuando la radiación luminosa se convierte en energía térmica generando pequeñas quemaduras en zonas discretas de la retina con el propósito de eliminar el tejido isquémico productor de factores proangiogénicos (Singh, Ramasamy, Abraham, Gupta, & Gupta, 2008; Suomalainen, 1993). Sin embargo, este procedimiento es eficaz en el 50% de los casos y reduce el riesgo de pérdida de la visión del 14 al 33% de los casos pero no elimina el riesgo de progresión de la RD proliferativa. Además la fotocoagulación láser tiene efectos colaterales no deseados que incluyen la inducción de una vascularización secundaria, la presencia de glaucoma, la interferencia con la visión nocturna y el desarrollo de lesiones neurales que disminuyen la calidad visual.

La vitrectomía es otro tratamiento de la RD que consiste en sustituir una porción o la totalidad del vítreo. Se lleva a cabo cuando tienen lugar cuadros avanzados de hemorragias vítreas o de desprendimiento de retina. El inconveniente que presenta este procedimiento quirúrgico es el hecho de que aumenta el riesgo de la formación de cataratas en un 44% (Tezel *et al.*, 1996) y es un factor de riesgo para neovascularización del iris (Stefansson, 2009).

Aunque la fotocoagulación con láser y la vitrectomía presentan una tasa de éxito elevada, no previenen el desarrollo de la RD ni son propiamente curativas, aunado al

hecho de que después de intervenciones sucesivas, los efectos adversos de ambos procedimientos aumentan la probabilidad de ceguera.

En el año 2000, se introdujo como nueva modalidad de tratamiento la administración intraocular de esteroides y moléculas anti-angiogénicas (Bainbridge *et al.*, 2003). El uso de agentes anti-angiogénicos se basa en la premisa de que la angiogénesis es el común denominador de la RD proliferativa. Agentes capaces de bloquear el efecto del VEGF como anticuerpos anti-VEGF, RNA de interferencia contra el VEGF (Reich *et al.*, 2003) o receptores solubles a VEGF (Bainbridge *et al.*, 2003) reportaron ser favorables y presentar pocos efectos adversos, como endoftalmitis o inducción de cataratas. Sin embargo, a largo plazo las inyecciones de agentes anti-VEGF, conducen a la neurodegeneración de la retina y aumentan el riesgo de alteraciones vasculares coroideas. Además, existe la preocupación de que el fármaco inyectado a nivel intravítreo, pase hacia la circulación sistémica y aumente el riesgo cardiovascular (Cheung & Wong, 2008). Por lo cual, la vigilancia oftalmológica de estas terapias oculares sigue en pie y es necesario aclarar los posibles riesgos causados a la vasculatura a nivel sistémico.

Por lo tanto, el objetivo primordial de la investigación en este campo es la búsqueda de terapias más efectivas y menos invasivas capaces no sólo de prevenir sino de curar la RD a través de contrarrestar las alteraciones vasculares retinianas determinantes del padecimiento. Entre estos factores se encuentran las vasoinhibinas, una familia de fragmentos péptidicos derivados de la PRL que inhiben la vasopermeabilidad, la vasodilatación y la angiogénesis ocular (Clapp *et al.*, 2008). De hecho, estos péptidos bloquean el efecto del VEGF y de otros factores angiogénicos (Garcia *et al.*, 2008; Gonzalez *et al.*, 2004).

2.6. Prolactina (PRL)

La PRL es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada mayormente por células especializadas llamadas lactótrofos, que ocupan del 20 al 50% del lóbulo anterior de la glándula hipófisis (Ben-Jonathan, Mershon, Allen, & Steinmetz, 1996; Freeman, Kanyicska, Lerant, & Nagy, 2000). Esta hormona fue descubierta en 1928 y su nombre está basado en sus efectos estimuladores de la producción de leche y del crecimiento de

la glándula mamaria en mamíferos. No obstante, actualmente se sabe que la PRL está involucrada en más de 300 funciones biológicas ya que, además de sus múltiples acciones en la reproducción y la lactancia, participa en el crecimiento y el desarrollo, el metabolismo, la función cerebral, la regulación del sistema inmunológico, la osmoregulación y la angiogénesis (Ben-Jonathan, Hugo, Brandebourg, & LaPensee, 2006; Clapp, Thebault, Jeziorski, & Martinez De La Escalera, 2009). La síntesis y secreción de PRL no está restringida a la hipófisis, también ocurre en órganos y tejidos como la placenta, el epitelio mamario, las células del sistema inmunológico (leucocitos), el útero, el endometrio, el cerebro, la próstata, el tejido adiposo, el endotelio vascular y el cartílago articular, entre otros (Ben-Jonathan *et al.*, 1996; Clapp *et al.*, 2008; Corbacho, Martinez de la Escalera, & Clapp, 2002; Macotela *et al.*, 2006). Consistente con la multiplicidad de sus efectos, el receptor de la PRL se expresa en prácticamente todos los tejidos (Bole-Feysot, Goffin, Edery, Binart, & Kelly, 1998) y es estructuralmente heterogéneo. Se han identificado al menos tres isoformas moleculares que resultan del procesamiento alternativo del ARN mensajero. En estos receptores se definen tres dominios estructurales, el extracitoplasmático, el intramembranal y el intracitoplasmático. El dominio extracelular o dominio de unión a ligando es idéntico en las tres isoformas y la diferencia entre los receptores reside en la extensión del dominio intracitoplasmático que se definen como corto (42 kDa), intermedio (65 kDa) y largo (80 kDa). La PRL ejerce la mayoría de sus efectos a través de la isoforma larga (Goffin, Bernichtein, Touraine, & Kelly, 2005).

La PRL está codificada por un sólo gen, localizado en el cromosoma 6 en el humano (Truong *et al.*, 1984) y en el cromosoma 17 en la rata (Cooke, Szpirer, & Levan, 1986). La principal isoforma de la PRL es una proteína monomérica constituida por 199 aminoácidos ligados por tres puentes disulfuro, una estructura terciaria conformada de cuatro α -hélices anti-paralelas y una masa molecular de 23kDa (Freeman *et al.*, 2000) **(Fig.2)**. No obstante, han sido identificadas otras isoformas de PRL resultado de modificaciones postraduccionales como la agregación, la fosforilación, la glicosilación, la sulfatación, la deamidación y la proteólisis (Larrea, Villanueva, Cravioto, Escorza, & Delreal, 1985; Sinha, 1995). El significado funcional de estas modificaciones se apoya principalmente en hallazgos asociados con la proteólisis enzimática de la hormona.

Diferentes proteasas cortan a la PRL en fragmentos de diferentes tamaños que van de 11 a 18 kDa, los cuales se ha demostrado que poseen efectos vasculares no presentes en la molécula completa de PRL y que son denominados como ‘vasoinhibinas’ ya que inhiben la angiogénesis, la vasopermeabilidad y la vasodilatación (Clapp *et al.*, 2006).

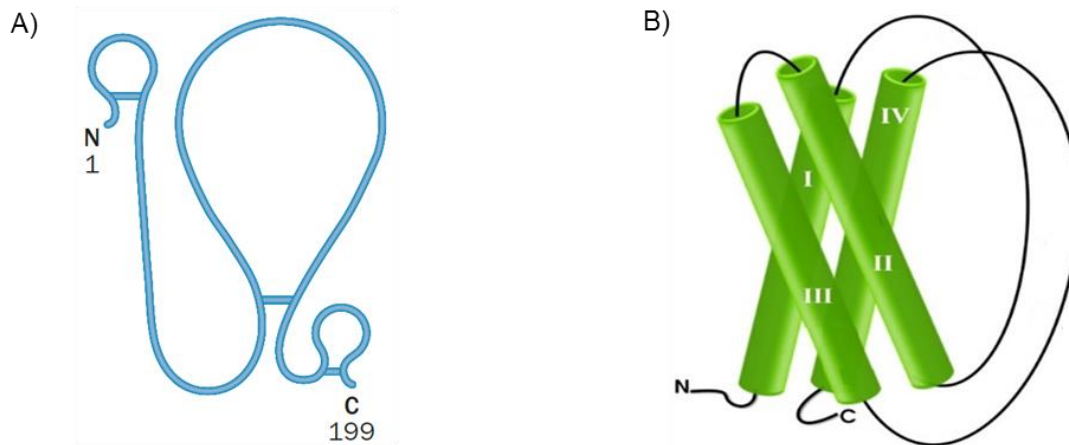


Figura 2. Representación de la estructura de la hormona PRL. A) Esquema de la estructura primaria de la PRL, compuesta por 199 aminoácidos ligados por tres puentes disulfuros. B) Estructura terciaria de la PRL conformada por cuatro α -hélices anti-paralelas unidas por tres asas flexibles. (Esquemas tomados y modificados de Bernard *et al.*, 2015 y Clapp *et al.*, 2008).

2.7. Las vasoinhibinas

Se llamó ‘vasoinhibinas’ de manera colectiva a la familia de fragmentos peptídicos derivados del corte proteolítico de la PRL por diferentes enzimas, y cuyos efectos biológicos recaen principalmente sobre el endotelio vascular donde actúan como inhibidores naturales del proceso angiogénico (Clapp *et al.*, 2006; Clapp *et al.*, 2008).

El corte de PRL se lleva a cabo por las proteasas que generan dos fragmentos peptídicos: un fragmento que contiene la región amino-terminal de la proteína y otro fragmento que corresponde a la región carboxilo-terminal de la misma. A pesar de que ambos fragmentos se generan concomitantemente, sólo los fragmentos que contienen la región amino-terminal poseen propiedades inhibitorias de la función vascular (Clapp *et al.*, 2006). Las enzimas responsables de cortar a la PRL incluyen a la catepsina D (Baldocchi, Tan, King, & Nicoll, 1993; Piwnica *et al.*, 2004), las metaloproteasas de matriz (MMP) de los tipos 1, 2, 3, 8, 9 y 13 (Macotella *et al.*, 2006) y la proteína morfogénica de

hueso-1 (BMP-1) (Ge, Fernandez, Moses, & Greenspan, 2007). Estas proteasas cortan a la PRL en diferentes regiones de la molécula, cerca y dentro del asa que conecta las α -hélices 3 y 4, por ende, la masa molecular de las vasoinhibinas resultantes depende de qué enzima realice el corte y en qué sitio. Por ejemplo, la catepsina D corta a la PRL humana entre los aminoácidos 132-133, 147-148 y 150-151, lo que genera vasoinhibinas de 15, 16.8 y 17.2 kDa respectivamente; sin embargo, la misma enzima (catepsina D) corta a la PRL de la rata entre los aminoácidos 145-146 lo que resulta en una vasoinhibina de aproximadamente 16.3 kDa (Baldocchi *et al.*, 1993). Las vasoinhibinas derivadas de la acción de las metaloproteasas de matriz, tienen una masa molecular entre los 17 y 14 kDa y la BMP-1 corta a la PRL entre los aminoácidos 159-160 resultando en un péptido de aproximadamente de 18 kDa (**Fig. 3**).

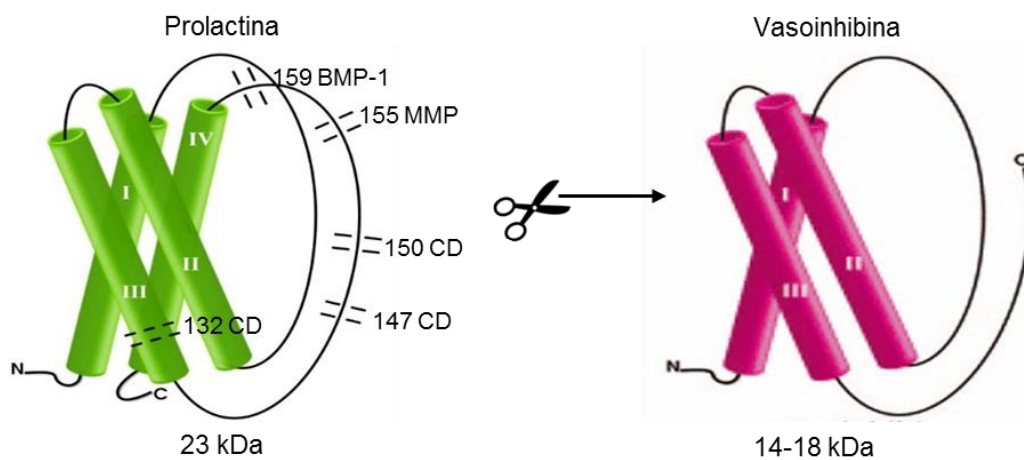


Figura 3. Esquema que ilustra los sitios de corte de la PRL y la generación de las diferentes vasoinhibinas. La PRL es cortada por catepsina D (CD) metaloproteasas de matriz (MMP) y la proteína morfógena de hueso tipo 1 (BMP-1) que resulta en vasoinhibinas que van de 14-18kDa de masa molecular, todas ellas correspondientes a la región amino-terminal de la molécula (Esquema tomado y modificado de Clapp *et al.*, 2008).

Consistentemente con la naturaleza ubicua de la PRL y la presencia de las proteasas capaces de convertir la PRL hacia vasoinhibinas en diferentes tejidos y fluidos, se han detectado vasoinhibinas en la hipófisis anterior y posterior, el endotelio vascular, el hipotálamo, el cartílago, la glándula mamaria, los cardiomiocitos, y la retina (Aranda *et al.*, 2005; Clapp *et al.*, 1994; Corbacho *et al.*, 2000; Macotella *et al.*, 2006); y en fluidos

biológicos como el suero, el fluido subretiniano, y la orina (Dueñas *et al.*, 2004; Fukuoka, Hamamoto, & Higurashi, 1991; González *et al.*, 2007).

Ahora bien, con respecto a la actividad biológica de las vasoinhibinas, se ha demostrado que mientras la PRL estimula la proliferación vascular; las vasoinhibinas, ejercen el efecto opuesto, *v.gr.* son antiangiogénicas pero también vasoconstrictoras e inhibidoras de la permeabilidad vascular (Clapp, Aranda, González, Jeziorski, & Martínez de la Escalera, 2006). Por esto, las vasoinhibinas figuran como potentes inhibidores naturales de vasopermeabilidad y angiogénesis que caracteriza a la retinopatía diabética.

2.8. Relación entre la PRL circulante y las vasoinhibinas oculares en la RD

Estudios clínicos han mostrado una asociación controversial entre la RD y los niveles circulantes de PRL. Así, se han reportado niveles elevados (Harter *et al.*, 1976; Hunter *et al.*, 1974), similares (Mooradian *et al.*, 1985) y bajos (Arnold *et al.*, 2010) en pacientes diabéticos con RD proliferativa con respecto a pacientes con RD no proliferativa o sin RD. También se reportaron menores niveles circulantes de vasoinhibinas en pacientes con RD en comparación con pacientes sin RD (Triebel, Huefner, & Ramadori, 2009). Mas recientemente, en un estudio con 2,377 pacientes (1,034 hombres y 1,343 mujeres postmenopausicas) se encontró que altos niveles de PRL circulante se asociaban con un menor riesgo de presentar intolerancia a la glucosa y padecer diabetes (Wang *et al.*, 2013), lo que pudiera también implicar un efecto protector de la PRL contra las complicaciones vasculares de la diabetes.

La PRL podría proteger contra la RD en virtud de ser precursora de las vasoinhibinas. Estudios preclínicos han mostrado que la presencia de vasoinhibinas en la retina de la rata contribuyen a mantener su control vascular. Extractos de retina contienen proteínas de 16 kDa con inmunorreactividad de PRL que corresponden al extremo N-terminal de la hormona y su inactivación mediante la inyección intravítrea de anticuerpos que las secuestran estimula la angiogénesis en la retina (Aranda *et al.*, 2005). También se ha demostrado que la inyección intravítrea de vasoinhibinas inhibe la vasopermeabilidad en respuesta al VEGF o a otras sustancias vasoactivas (Arredondo Zamarripa *et al.*, 2014; García *et al.*, 2008); y que la inyección intravítrea de virus adenoasociados que transducen a las vasoinhibinas previene el desarrollo de la

retinopatía diabética experimental (Ramírez *et al.*, 2011). Más directamente, la posibilidad de que la PRL circulante se incorpore al ojo y sea procesada hacia vasoinhibinas con efectos vasculares se sustentó en el trabajo de Arnold y colaboradores (Arnold *et al.*, 2010). En este estudio se encontró que la elevación crónica de los niveles circulantes de PRL mediante la colocación de implantes de glándulas hipofisarias de ratas donadoras bajo la cápsula renal de ratas receptoras, se asoció con un aumento en las vasoinhibinas retinianas y una disminución de la vasopermeabilidad de la retina debida a la diabetes o a la inyección intravítrea de VEGF (Arnold *et al.*, 2010). Además, se conoce que la PRL puede atravesar la barrera hematorretiniana, ya que la PRL radioactiva inyectada en el corazón se localiza en la coroides, la retina y los cuerpos ciliares (O'Steen & Sundberg, 1982). Además, los cuerpos ciliares (Arnold *et al.*, 2010) y el EPR (Melendez García *et al.*, 2016) expresan el receptor de la PRL y, por ende, un mecanismo para el transporte activo de la hormona al interior del ojo.

En su conjunto estos hallazgos sustentan la premisa de que los pacientes con altos niveles de PRL sistémica pueden presentar un menor riesgo de desarrollo y progresión de la RD a través de que se favorece la incorporación intraocular de la hormona y su procesamiento a vasoinhibinas con efectos protectores contra las alteraciones vasculares retinianas. Por lo cual, en este proyecto se investigó el posible valor protector contra la RD experimental de un fármaco llamado sulpirida el cual, es recomendado en la clínica a pacientes diabéticos por sus efectos procinéticos y que tiene como efecto secundario elevar los niveles de PRL circulante.

2.9. Sulpirida

Existen fármacos de uso clínico que son recomendados a pacientes diabéticos por sus propiedades procinéticas y que tienen como efecto secundario inducir hiperprolactinemia. Entre estos fármacos se encuentra la sulpirida, que fue desarrollada en Francia desde 1967 como una benzamida que bloquea selectivamente a los receptores tipo D2 de dopamina en el sistema nervioso central (SNC) y en el tracto gastrointestinal (Rossi & Forgione, 1995). Debido a estas acciones fue indicado inicialmente para tratar trastornos psiquiátricos como un antipsicótico y antidepresivo a altas concentraciones (200-3,200 mg/día) (Caley & Weber, 1995) y a bajas

concentraciones (50-75 mg/día) por sus efectos procinéticos, antieméticos y antidisépticos (Mansi *et al.*, 1995).

La sulpirida ejerce su acción procinética a través de un mecanismo dual: antagonizando los receptores tipo 2 de dopamina y activando a los receptores serotoninérgicos (5HT₄). Ambos efectos favorecen la acción colinérgica sobre la musculatura lisa del tracto digestivo reduciendo trastornos como la gastroparesis (retardo en la evacuación gástrica) y la dispepsia que se sabe afectan a los pacientes con diabetes (Mansi *et al.*, 1995; Mearin *et al.*, 2004). Sin embargo, está bien documentado que los fármacos antidopaminérgicos tienen como efecto secundario elevar los niveles circulantes de la hormona PRL (Haddad, Hellewell, & Wieck, 2001). La dopamina es el principal inhibidor de la síntesis y liberación de PRL vía su acción sobre los receptores tipo 2 presentes en los lactotrofos hipofisarios (Freeman *et al.*, 2000). A nivel experimental, se ha reportado que la sulpirida en ratas (20mg/kg de peso corporal inyectada i.p. una vez al día durante 21 días) eleva a la PRL sistémica por sobre el valor basal (46.2 ± 10.5 ng/mL vs. 11.2 ± 5.5 ng/mL, respectivamente) (Baptista, Lacruz, Páez, Hernández, & Beaulieu, 2002).

Los efectos negativos de la hiperprolactinemia son la turgencia y crecimiento mamario (ginecomastia), la galactorrea, la anovulación y la disminución de la libido. Sin embargo, Lozano y colaboradores en un estudio sobre la eficacia contra la dispepsia y la bioseguridad de la levosulpirida (forma levórgica de la sulpirida) administraron la droga a 342 pacientes (151 hombres y 191 mujeres con edad promedio de 38 años) en una dosis de 75 mg de levosulpirida por día durante 4 semanas y reportaron que sólo 11 de ellos presentaron galactorrea leve como efecto adverso, pero que ninguno de estos 11 pacientes tuvieron que abandonar el estudio (Lozano *et al.*, 2007). Estos resultados muestran que los efectos adversos derivados del estado hiperprolactinéxico parecen no ser relevantes.

Con estos antecedentes y considerando que los actuales tratamientos contra la RD no son del todo eficaces y presentan riesgos importantes, en este proyecto se propuso investigar el posible uso terapéutico de la sulpirida contra la RD experimental. Esto en virtud de que la inducción de hiperprolactinemia mediante la administración de sulpirida eleva a la PRL sistémica lo que favorece su incorporación y conversión

intraocular a vasoinhibinas capaces de contrarrestar el aumento de permeabilidad vascular que se observa en la retina en el modelo de diabetes experimental inducido por estreptozotocina en la rata (**Fig.4**).

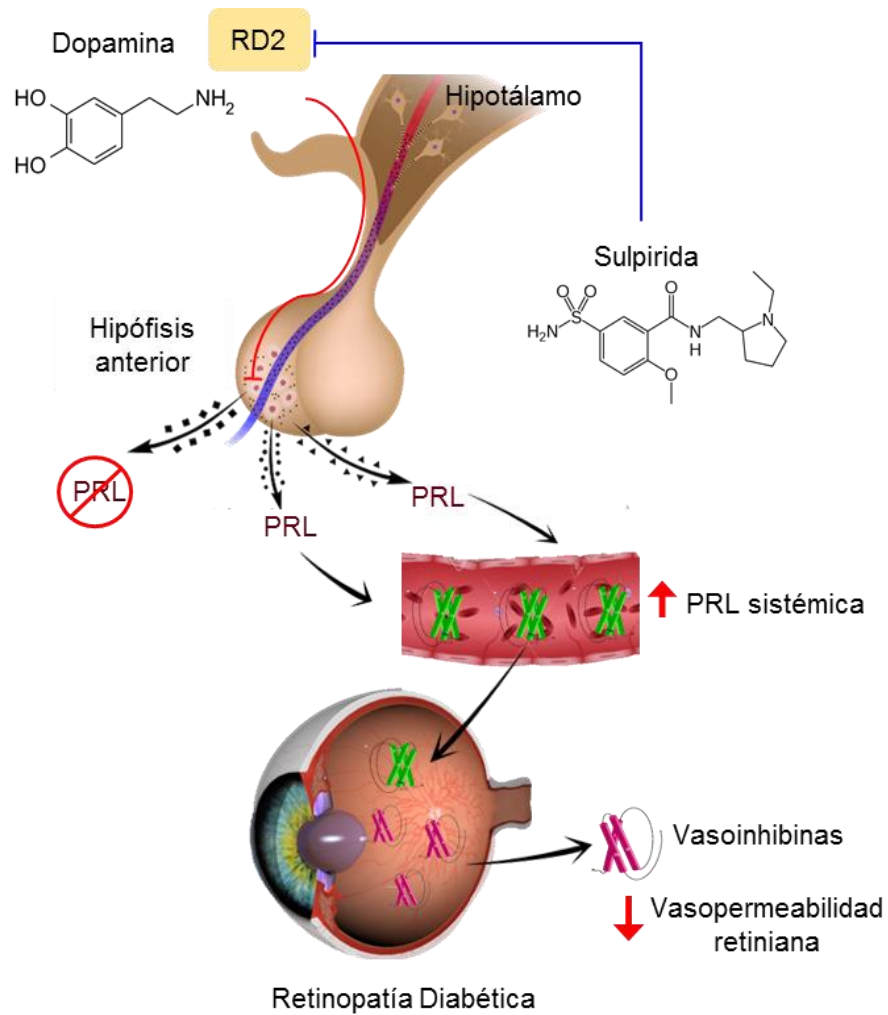


Figura 4. Esquema propuesto del uso de la sulpirida para elevar los niveles de PRL circulante, con el objetivo de aumentar las vasoinhibinas intraoculares y contrarrestar la vasopermeabilidad retiniana causada por la diabetes experimental.

3. JUSTIFICACIÓN

La DM es un problema de salud pública a nivel mundial que tiene como complicación importante la RD. Los tratamientos actuales contra la RD no son del todo satisfactorios y es menester identificar nuevos blancos terapéuticos para controlar este padecimiento. Este proyecto propone evaluar el uso de un fármaco (sulpirida) para elevar los niveles sistémicos de PRL y que ya es indicado para tratar trastornos gastrointestinales en pacientes diabéticos, esperando que la hiperprolactinemia se traduzca en un aumento de vasoinhibinas oculares capaces de contrarrestar alteraciones vasculares retinianas características de la RD experimental.

4. HIPÓTESIS

La administración de sulpirida elevará los niveles sistémicos de PRL (hiperprolactinemia) lo que se traducirá en un aumento de las vasoinhibinas oculares que contrarrestarán la excesiva permeabilidad vascular en la retina de ratas diabéticas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la sulpirida sobre los niveles sistémicos de PRL (hiperprolactinemia) e intraoculares de vasoinhibinas y sobre la vasopermeabilidad de la retina en un modelo de diabetes experimental inducido por estreptozotocina en ratas.

5.2. Objetivos particulares

1. Evaluar el aumento de PRL sistémica inducido por sulpirida en ratas no diabéticas.
2. Comprobar la presencia y aumento de las vasoinhibinas endógenas en el vítreo de animales no diabéticos tratados con sulpirida.
3. Cuantificar a la PRL circulante en ratas no diabéticas y diabéticas tratadas o no con sulpirida.
4. Evaluar la vasopermeabilidad de la retina en ratas no diabéticas y diabéticas tratadas o no con sulpirida.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar de entre 250-300 g de peso corporal, las cuales fueron puestas con un ciclo de luz/oscuridad 12/12h con comida y agua *ad libitum*. Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM y todos los experimentos fueron autorizados por el Comité de Ética de dicho instituto. Antes de cada experimento los animales fueron manipulados mimetizando las condiciones del sacrificio durante 5 días, para reducir los efectos del estrés asociados con el mismo, ya que se conoce que el estrés estimula la secreción hipofisiaria de PRL (Seggie & Brown, 1975).

6.1. Evaluación del efecto de la sulpirida sobre los niveles circulantes de PRL en ratas no diabéticas

Administración del fármaco sulpirida

La sulpirida que se utilizó corresponde a una formulación farmacéutica de uso humano, llamada comercialmente como Dogmatil que es una solución inyectable con una concentración de 50 mg/mL producida por los laboratorios SANOFI®.

Diseño experimental

Se usó un total de 20 ratas macho Wistar a las cuales se les administraron diferentes dosis de sulpirida mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) diaria durante 5 días. Las dosis diarias fueron 5, 10 y 20 mg/kg de peso corporal. El grupo de ratas control recibió solución salina i.p. Los animales fueron anestesiados bajo una atmósfera saturada de CO₂ y sacrificados por decapitación para colectar la sangre y realizar la enucleación y la extracción de las retinas y los vítreos.

El suero se obtuvo mediante centrifugación de la sangre a 3,000 rpm durante 15 min a 4°C. Los sueros fueron guardados en alícuotas y congelados a -80°C hasta la cuantificación de PRL mediante ELISA.

Inmediatamente después de la enucleación, los ojos fueron puestos en un buffer de fosfatos (PBS) Ph 7.5 (Sigma # SLBN2927V) e inmediatamente se obtuvieron el vítreo y la retina bajo el estereoscopio y se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80° C.

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Es un inmunoensayo para medir a la PRL en suero que utiliza volúmenes pequeños (2-6 µl) y una combinación de anticuerpos contra la PRL capaces de identificarla de entre toda una mezcla de proteínas totales del plasma. Esta técnica fue descrita por Guillou y colaboradores en 2015, para cuantificar a la PRL sérica de ratón con una sensibilidad de 0.2 ng/mL. Los inmunoensayos previos para medir PRL requieren más de 100 µl de suero y detectan a la PRL dentro de un rango de 7 a 370 ng/mL (Guillou *et al.*, 2015). Esta técnica recientemente fue implementada en el laboratorio para medir PRL de ratón y rata en suero utilizando una curva que va de 0.03125 ng/mL a 2 ng/mL.

Se utilizó una placa de 96 pozos (Sigma-Aldrich cis 9018-100EA) a la que se adicionaron 50 µl de anticuerpo policlonal de captura anti-PRL de rata (AFP65191/Guinea Pig, Instituto Nacional de Salud, EUA) a una dilución 1:1000 en cada pozo que se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó el anticuerpo y se realizó un bloqueo con buffer de fosfatos a pH 7.4 con leche al 5% durante 2 h a T/A. Posteriormente se realizaron lavados de la placa y se preparó una curva estándar que va a de 0-2ng/mL de PRL de rata, diluida en PBS+Tween20 al 0.05% + BSA (albúmina sérica bovina). Se realizaron diluciones de las muestras: 1:25 para el suero control y 1:50 para los sueros de las ratas tratadas con sulpirida. Después del bloqueo se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20, luego se adicionaron a los pozos las diferentes concentraciones de PRL estándar y las muestras (50 µl) por duplicado y se les incubó durante 2 h T/A. Después de este tiempo, se retiraron las muestras, se hicieron 3 lavados y se agregó inmediatamente el anticuerpo de detección (anti-PRL de ratón suministrado por el Dr. Frank Talamantes, Universidad de California, Santa Cruz, CA). La reacción se incubó

durante 2 h a T/A, se lavó el exceso del anticuerpo y se agregó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (anti rabbit, IgG, Fisher Scientific; NA934). La placa se incubó por 1.5 h a T/A. Finalmente, se eliminó el anticuerpo secundario, se realizaron lavados y se agregó la solución de revelado con o-fenilenediamina que actúa como sustrato de la peroxidasa y permite detectar la presencia del anticuerpo adherido mediante una reacción colorimétrica. El nivel de reacción (cantidad de sustrato) se determinó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm y 650 nm. La concentración de la PRL en los sueros se determinó extrapolando los valores de densidad óptica con respecto a la curva estándar.

6.2. Detección de las vasoinhibinas en el vítreo de ratas no diabéticas tratadas con sulpirida

Inmunoprecipitación del vítreo

La inmunoprecipitación (IP) es un método que se basa en la especificidad de anticuerpos para detectar o aislar una proteína de interés (antígeno) de una mezcla compleja de proteínas (Kaboord & Perr, 2008). La IP ha sido utilizada para evaluar tanto la expresión diferencial de una proteína, caracterizar su peso molecular, identificar modificaciones postraduccionales así como los ligandos que interactúan. Los anticuerpos utilizados pueden ser policlonales o monoclonales para reconocer la proteína de interés (Kaboord & Perr, 2008).

Para fines de este proyecto, se utilizó la IP para detectar PRL y/o vasoinhibinas presentes en el vítreo de ratas controles tratadas o no con sulpirida. Se utilizó el método clásico de IP que consistió en los siguientes pasos: (1) la mezcla de 5 vítreos (volumen total de 50 μ l) de ratas controles no tratadas con sulpirida y por otro lado la mezcla de 7 vítreos (50 μ l) de ratas controles tratadas con sulpirida (20 mg/kg). Los vítreos fueron incubados en buffer Net-Gel (Tris 50mM, NaCl 150mM, Nonidet P-40 0.1%, EDTA 1mM pH 8.0, Gelatina 0.25%, Azida de sodio 0.02%) en combinación con 2 μ l de antisero anti-PRL de rata (C-1) en agitación a 4°C durante toda la noche (O/N). Al día siguiente, se agregaron 35 μ l de la proteína A la cual fue preparada en fresco (100 mg de proteína A en 1ml de buffer de fosfato de sodio 0.1M pH 8.0; agitación (vortex) y centrifugación a

13,000 rpm/1min. Se eliminó el sobrenadante y se agregó un volumen de buffer igual a lo desechado) para formar agregados moleculares que faciliten la recuperación del antígeno; la mezcla se incubó durante 2 h en agitación a 4°C. Después de la incubación se realizaron 3 lavados que consistieron: en la centrifugación de las muestras incubadas a 10,000 rpm/5min a 4°C, la eliminación del sobrenadante y la adición de 800µl de Net-gel para el segundo lavado, la adición de (Net-gel/SDS10%) para el segundo lavado y de Tris-NP40 para el tercer lavado. Las muestras se incubaron por 10 min en agitación hasta el lavado subsecuente. Después del tercer lavado, las muestras se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante dejando 30 µl del precipitado de la muestra total, a los cuales se les agregó 15 µl de Laemmli 2x y se calentaron a 95°C por 10 min. Las muestras se volvieron a centrifugar brevemente y se procesaron por SDS-PAGE y Western-blot. Para lo cual, las muestras inmunoprecipitadas de vítreo se cargaron en un gel de poliacrilamida con glicerol al 15%, 1.5mm de espesor con 10 pozos y se migraron bajo una intensidad de 90 V durante 5 h. Como estándares se utilizaron una preparación de PRL recombinante de rata (100 ng) y una preparación de vasoinhibinas (3 µl) generadas mediante proteólisis enzimática de la PRL recombinante de rata, generada de acuerdo al método previamente descrito (Clapp, 1987). Como control negativo se utilizó un 'blanco' que es el buffer Net-gel agregando 2 µl del anticuerpo anti-PRL rata C1 fueron inmunoprecipitados de la misma forma que las muestras experimentales.

Posteriormente las muestras fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm (BIO-RAD#9004-70-0). La membrana se incubó con un anticuerpo primario (antisuero anti-PRL rata C4) a una dilución 1:500 a 4°C con agitación O/N. La membrana se lavó para quitar el exceso del anticuerpo primario y se incubó en anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (1:5000) durante 2 h a T/A. Finalmente el blot se reveló usando un kit comercial para fosfatasa alcalina (BIO-RAD AP Conjugate substrate kit #170-6432) y se observó la reacción colorimétrica.

6.3. Evaluación del efecto de la sulpirida sobre la vasopermeabilidad de la retina de ratas diabéticas

Diabetes experimental

Se indujo diabetes mediante la administración de una única dosis de estreptozotocina (STZ) de 60 mg/kg de peso corporal vía intraperitoneal. La STZ es un fármaco que desencadena procesos autoinmunes que resultan en la destrucción de los islotes de Langerhans del páncreas, constituidos principalmente de células β las encargadas de producir insulina, por lo cual se considera un modelo de diabetes tipo 1 (Wei *et al.*, 2003). Una sola inyección de STZ es capaz de inducir diabetes 2 a 4 días después de su administración y genera una condición de hiperglucemia permanente (Akbarzadeh *et al.*, 2007). A los grupos controles se les administró el vehículo donde se diluye la STZ (buffer de citratos, pH 4.5). La diabetes se confirmó midiendo niveles de glucosa en sangre > 250 mg/dL mediante un glucómetro convencional.

Diseño experimental

Para evaluar el efecto de la sulpirida sobre la permeabilidad vascular retiniana en la diabetes, se llevaron a cabo dos protocolos: (1) animales a los cuales a las 2 semanas post-STZ o -vehículo se les administró o no la sulpirida (i.p. 20 mg/kg) diariamente durante 2 semanas hasta alcanzar un tiempo total de diabetes de 4 semanas. (2) animales a los cuales a las 4 semanas post-STZ o -vehículo se les administró o no la sulpirida (i.p. 20 mg/kg) diariamente durante 2 semanas hasta alcanzar un tiempo total de diabetes de 6 semanas.

En ambos esquemas experimentales se tuvieron los siguientes grupos animales:

- » Grupo de ratas controles (C)
- » Grupo de ratas controles tratadas con sulpirida (C+Sulp)
- » Grupo de ratas diabéticas (DB)
- » Grupo de ratas diabéticas tratadas con sulpirida (DB+Sulp)

Durante la administración de sulpirida, la dosis se ajustó cada 2 días de acuerdo al peso de los animales, además se registraron semanalmente el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre como parámetros del estado de salud. Finalmente, se evaluó la vasopermeabilidad retiniana mediante el ensayo de azul de Evans.

Ensayo de Azul de Evans

Es un ensayo *in vivo* que permite medir el aumento en la permeabilidad vascular (Nagaraja, Keenan, Fenstermacher, & Knight, 2008; Wolman *et al.*, 1981). Este ensayo fue desarrollado por Evans y colaboradores en 1920 con el objetivo de poder medir el volumen de plasma sanguíneo y la integridad de la barrera hematoencefálica (Saunders, Dziegielewska, Mollgard, & Habgood, 2015). Observaron que el colorante T-1824 blue azo se distribuía en todo el animal, era estable en circulación y que no se perdía fácilmente en la orina. La estabilidad de este colorante depende de su capacidad para unirse a la proteína albúmina y a globulinas presentes en la sangre (Allen & Orahovats, 1950; Saunders *et al.*, 2015). El fundamento de estas observaciones es que bajo condiciones fisiológicas el endotelio vascular constituye una barrera selectiva de transporte entre la sangre y el espacio intersticial en los tejidos, lo cual es esencial para la homeostasis de los fluidos (Beck *et al.*, 1999). Es decir, en condiciones normales los vasos sanguíneos impiden la extravasación de la albúmina, de manera que al inyectar el colorante azul de Evans éste permanece unido a ella y por tanto contenido dentro de los vasos sanguíneos. Por el contrario, en condiciones patológicas como en la RD, se produce un incremento en la permeabilidad vascular y ocurre una extravasación de la albúmina unida al colorante hacia el espacio intersticial, permitiendo cuantificar la vasopermeabilidad.

Los animales recibieron una inyección intravenosa (vena yugular) del colorante azul de Evans (45 mg/kg) previamente sometidos a anestesia general con ketamina (70%) y xilacina (30%) i.p. (1 µl/g de peso corporal). Dos horas después los animales fueron asfixiados en un ambiente de CO₂ e inmediatamente perfundidos, con un buffer de fosfatos (PBS) con pH de 3.5 inyectado en la aorta ascendente del corazón. Luego se enuclearon ambos ojos para extraer la retina. Posteriormente las retinas fueron puestas en el disolvente formamida (Sigma-Aldrich #SHBG9108V) durante 18 h a 72°C para

extraer el colorante extravasado. Luego se realizó una curva estándar del colorante que se cargó por duplicado en una placa de 96 pozos y se cargó 50 µl del colorante extraído de cada retina y se leyó mediante espectrofotometría a 396 nm de longitud. Al final se calculó la cantidad de colorante en la retina con respecto a la curva (Brown, Mitar, & Whitworth, 1992; Matsuda, Nishikawa, & Tanaka, 1995).

6.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los grupos experimentales se usó la prueba paramétrica ANOVA (*Analysis of variance*) de una vía, con múltiples comparaciones. Seguida de una prueba post-hoc Tukey. Se consideró diferencia estadística para valores de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. La sulpirida aumenta los niveles de PRL sistémica de manera dosis-dependiente

Para corroborar la hiperprolactinemia inducida por sulpirida, se administraron dosis crecientes de la droga por 5 días consecutivos en ratas no diabéticas y se cuantificó la PRL en suero. Se encontró que la sulpirida indujo un aumento en los niveles de PRL sistémica de manera dosis-dependiente. La dosis más alta de sulpirida (20 mg/kg), indujo una hiperprolactinemia de hasta 117.7 ± 10.6 ng/mL comparable a la observada en cuadros de hiperprolactinemia fisiológica, v. gr, embarazo y lactancia (Ben-Jonathan *et al.*, 2006) (Fig. 5).

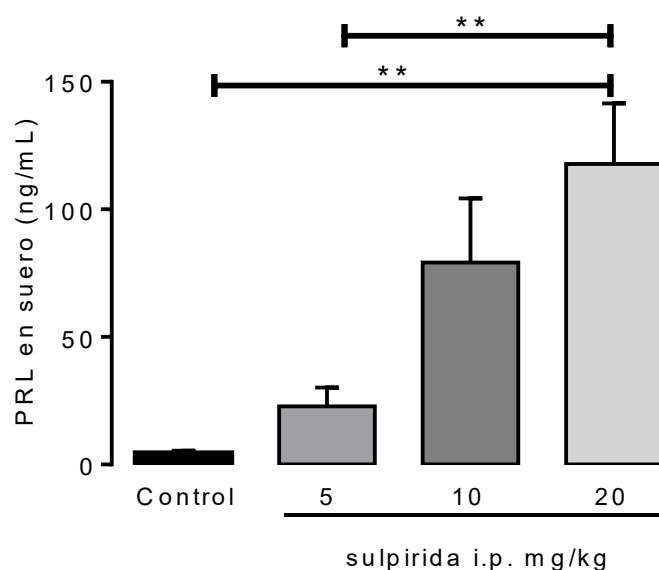


Figura 5. Cuantificación de la PRL en suero de ratas no diabéticas tratadas por 5 días con dosis crecientes de sulpirida. La cuantificación de PRL se realizó mediante ELISA. Los valores son promedios $\pm$ SEM de 5 ratas por grupo. ** $p < 0.01$ vs el grupo Control.

Este resultado indica que la dosis más alta de sulpirida permitirá evaluar la influencia de la hiperprolactinemia sobre los niveles intraoculares de vasoinhibinas y, consecuentemente, sobre la progresión de la RD experimental.

7.2. Las vasoinhibinas aumentan en el vítreo de ratas no diabéticas tratadas con sulpirida

Para investigar si la hiperprolactinemia inducida por sulpirida se traduce en un aumento en las vasoinhibinas oculares, se realizó la inmunoprecipitación (IP) y análisis por Western blot de vítreos (50 μ l) de ratas no diabéticas tratadas o no con sulpirida durante 5 días. Se encontró que los vítreos de las ratas tratadas con sulpirida contienen dos bandas con inmunoreactividad de PRL con pesos moleculares que corresponden a las vasoinhibinas de 16 y 14 kDa (**Fig. 6**). Estas bandas no se observaron en los vítreos de las ratas que no recibieron sulpirida.

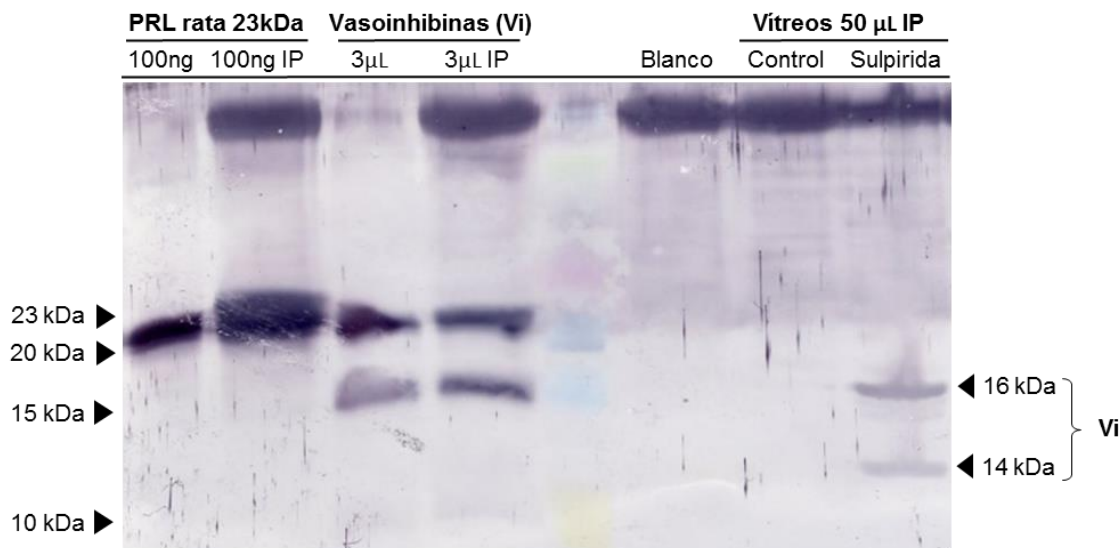


Figura 6. Inmunoprecipitación (IP)-Western blot de vítreos de animales tratados y no tratados con sulpirida. Estándares de PRL recombinante de rata 23 kDa (100 ng) sin IP (carril 1) e IP (carril 2); estándares de vasoinhibinas de rata sin IP (carril 3) e IP (carril 4); marcadores de peso molecular (carril 5); mezcla de IP sin vítreo (blanco, carril 6); pool de cinco vítreos IP de animales no tratados con sulpirida (carril 7) y pool de siete vítreos de animales con sulpirida (carril 8). Los números a la izquierda indican los pesos moleculares de marcadores y a la derecha se indican las proteínas con inmunorreactividad de PRL que probablemente corresponden a vasoinhibinas de 14 y 16 kDa. Para la IP se usó el anticuerpo anti-PRL de rata C1 y el revelado del blot con el anti-PRL rata C4.

Este resultado apoya la hipótesis de que el aumento de la PRL sistémica por acción de la sulpirida se traduce en un aumento de vasoinhibinas intraoculares y, por

ende, que la sulpirida es un buen método para elevar los niveles intraoculares de estos péptidos.

7.3. La PRL sistémica disminuye en ratas diabéticas y se eleva con el tratamiento con sulpirida

Para evaluar el efecto de sulpirida sobre los niveles de PRL circulante en la condición diabética, se indujo diabetes con STZ y a las dos semanas post-STZ o vehículo se administró la sulpirida (i.p., 20 mg/kg) diariamente durante 2 semanas. La PRL circulante disminuyó por efecto de la diabetes como ya se había reportado previamente (Lemini *et al.*, 2015). Las ratas diabéticas sin el tratamiento con sulpirida presentan niveles de PRL circulante por debajo de las concentraciones de PRL de animales controles no tratados con sulpirida (3.74 ± 1.1 ng/mL vs 10.2 ± 2.2 ng/mL, respectivamente); mientras que en animales diabéticos tratados con sulpirida se observaron mayores niveles de PRL (22.9 ± 13.9 ng/mL) (**Fig. 7**).

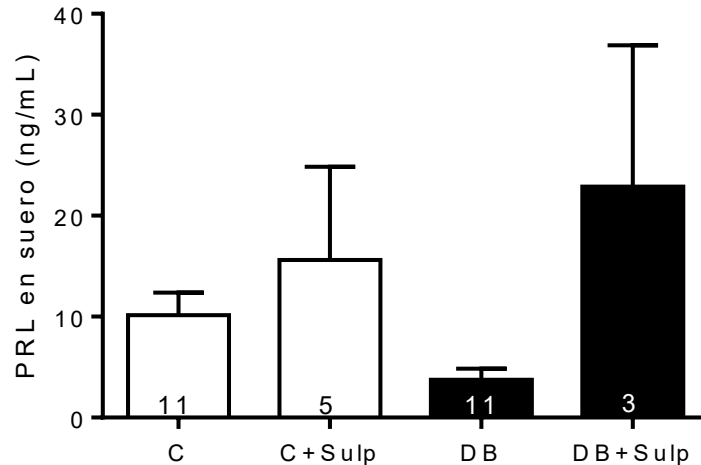


Figura 7. Niveles de PRL en suero de ratas controles (C) y diabéticas (DB) tratadas o no con sulpirida (Sulp). La cuantificación se realizó mediante ELISA. Los valores son promedios $\pm$ SEM. El número de animales se indica dentro de las barras.

Cabe mencionar que no se pudo realizar un análisis estadístico debido al número reducido de animales diabéticos tratados con sulpirida.

7.4. La sulpirida inhibe el aumento de la permeabilidad vascular de la retina, causada por la diabetes

Con el objetivo de evaluar el efecto de la sulpirida sobre la vasopermeabilidad retiniana en la diabetes, se llevó a cabo dos esquemas experimentales: (1) animales a los cuales a las 2 semanas post-STZ se les administró la sulpirida (i.p. 20 mg/kg) diariamente durante 2 semanas hasta alcanzar un tiempo total de diabetes de 4 semanas. (2) animales a los cuales a la 4 semana post-STZ o -vehículo se les administró la sulpirida (i.p. 20 mg/kg) diariamente durante 2 semanas hasta alcanzar un tiempo total de diabetes de 6 semanas. Esto con el propósito de determinar la acción terapéutica de la sulpirida en la diabetes más temprana y menos severa vs una diabetes de más tiempo y mejor instalada.

Bajo el primer protocolo (inicio de la administración de sulpirida a las dos semanas de diabetes) se corroboró el aumento significativo ($p= 0.0314$) en la vasopermeabilidad de la retina debido a la diabetes. Sin embargo, este aumento no fue significativo en las ratas tratadas con sulpirida, lo que sugiere que dicho tratamiento reduce la vasopermeabilidad debida a la diabetes (**Fig. 8**). La sulpirida no modificó la vasopermeabilidad retiniana en animales no diabéticos.

En estos animales, también se evaluó semanalmente el peso corporal y la glucosa sanguínea y, como se esperaba, se encontró que los animales diabéticos presentaron menor peso corporal y un estado de hiperglucemia permanente, en relación a los no diabéticos (**Tabla I**). Estos cambios también se observaron, aunque menos asentados, bajo el tratamiento con sulpirida sugiriendo la ausencia de efectos adversos a consecuencia de la administración del fármaco.

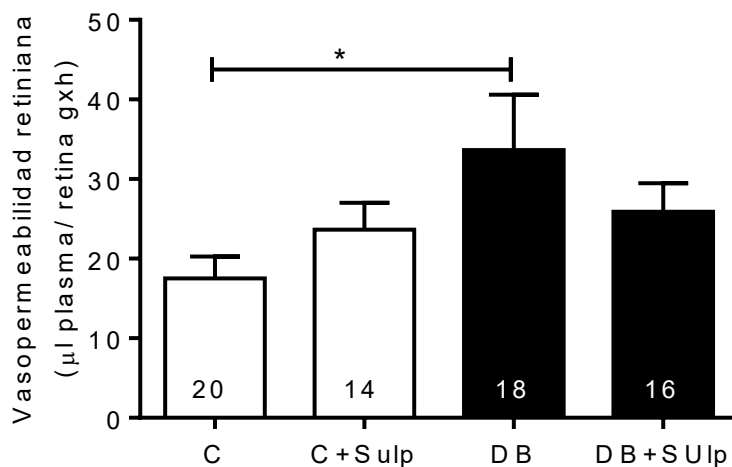


Figura 8. La sulpirida disminuye el aumento en la vasopermeabilidad retiniana debida a la diabetes. La vasopermeabilidad de la retina se evaluó mediante el método de azul de Evans en ratas no diabéticas tratadas (C+Sulp) o no (C) con sulpirida (Sulp) y ratas diabéticas (DB) no tratadas y tratadas con sulpirida (DB+Sulp). El tratamiento con sulpirida fue por dos semanas y se inició a las dos semanas post-STZ (4 semanas de tiempo total de diabetes). Los valores representan los promedios $\pm$ SEM. Los números dentro de las barras indican el número de retinas analizadas. * $p < 0.05$. Se realizó ANOVA de una vía, múltiples comparaciones.

Tabla I. Valores de peso corporal y niveles de glucosa en sangre de los grupos experimentales a las 4 semanas posteriores a la inducción de diabetes.

Semanas post-STZ	Tratamiento	N	Peso (g)	Glucosa (mg/dL)
4	C	12	398.2 $\pm$ 2.0	140.8 $\pm$ 2.5
4	C+Sulp	8	389.3 $\pm$ 3.7	135.9 $\pm$ 3.5
4	DB	10	303.0 $\pm$ 3.7**** vs C	498.3 $\pm$ 7**** vs C
4	DB+Sulp	8	327.6 $\pm$ 2.8**** vs C	455.1 $\pm$ 6.5**** vs C

Ratas no diabéticas tratadas (C+Sulp) o no (C) con sulpirida (Sulp) y ratas diabéticas tratadas (DB+Sulp) o no con sulpirida. Los valores corresponden a los promedios $\pm$ SEM donde **** $p < 0.0001$ vs Control. Se realizó ANOVA de una vía, múltiples comparaciones, tanto para peso como niveles de glucosa.

Con el objeto de corroborar el efecto protector de la sulpirida que no fue muy claro en el experimento inmediato anterior y evaluar su eficacia en un estado más avanzado

de la diabetes se propuso el segundo tiempo de diabetes experimental, i.e., animales a los cuales se les administró la sulpirida a las 4 semanas post-STZ y, por ende, que fueron diabéticos por un total de 6 semanas. Sorprendentemente, en este grupo se observó que el tratamiento con sulpirida disminuyó significativamente el aumento en la vasopermeabilidad de la retina observado en las ratas diabéticas (**Fig. 9**). En los grupos controles, el tratamiento con sulpirida no modificó en forma significativa la vasopermeabilidad de la retina.

También se encontró de nuevo que en estos grupos los animales diabéticos presentaron menor peso corporal y un estado de hiperglucemia permanente, en relación a los no diabéticos y que estos cambios también se observaron, aunque menos asentados, bajo el tratamiento con sulpirida (**Tabla II**), apoyando la ausencia de efectos adversos a consecuencia de la administración del fármaco.

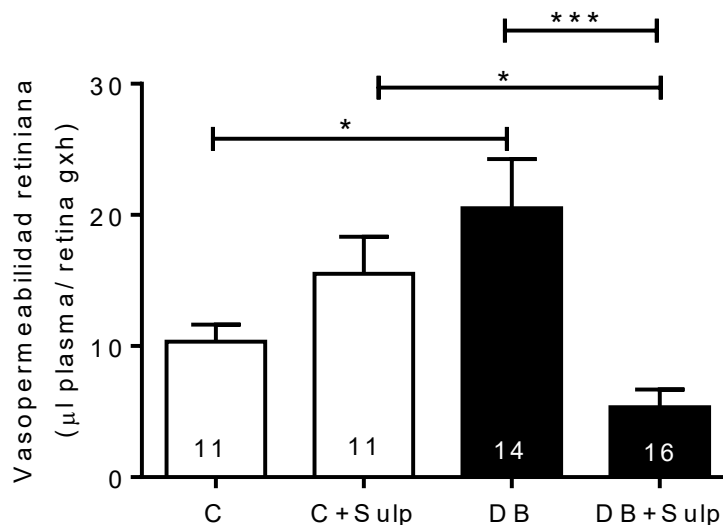


Figura 9. La sulpirida inhibe el aumento de la vasopermeabilidad retiniana debida a la diabetes. La vasopermeabilidad de la retina se evaluó mediante el ensayo de azul de Evans en ratas no diabéticas tratadas (C+Sulp) o no (C) con sulpirida (Sulp) y ratas diabéticas tratadas (DB+Sulp) o no con sulpirida (Sulp) por 4 semanas. Los valores representan los promedios $\pm$ SEM. Los números dentro de las barras indican el número de retinas analizadas. * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$. Se realizó ANOVA de una vía, múltiples comparaciones.

Tabla II. Valores de peso corporal y niveles de glucosa en sangre de los grupos experimentales a las 6 semanas posteriores a la inducción de diabetes.

Semanas post-STZ	Tratamiento	N	Peso (g)	Glucosa (mg/dL)
6	C	5	485 ± 8.1	127 ± 3.9
6	C+Sulp	6	418.5 ± 6.3* vs C	132.1 ± 1.6
6	DB	9	348.6 ± 3.5**** vs C	536.8 ± 4.8**** vs C
6	DB+Sulp	10	384.5 ± 1.9**** vs C	506.4 ± 4.5**** vs C

En ratas no diabéticas (controles) tratadas (C+Sulp) o no (C) con sulpirida (Sulp) y ratas diabéticas tratadas (DB+Sulp) o no con Sulp. Los valores corresponden a los promedios ± SEM.

*** p<0.005 vs Control. Se realizó ANOVA de una vía, múltiples comparaciones, tanto para peso como niveles de glucosa.

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de esta tesis de que la hiperprolactinemia inducida por la sulpirida, contrarresta efectos tempranos de la diabetes (excesiva vasopermeabilidad retiniana) que conducen hacia el desarrollo de la RD y que esta acción probablemente involucra la mayor generación de vasoinhibinas oculares.

La RD es un trastorno ocular derivado de la DM, que se considera la principal causa de ceguera irreversible y discapacidad visual en la población mundial en edad laboral (Antonetti *et al.*, 2012; Fong *et al.*, 2004; Moss *et al.*, 1998). Sin embargo, actualmente no existe una terapia totalmente eficaz para controlar el desarrollo de la RD (Frank, 2004; UK Prospective Diabetes Study, 1998) ya que los tratamientos convencionales para contrarrestar la progresión de la RD (fotocoagulación con láser, vitrectomía y administración intraocular de antiangiogénicos) presentan efectos adversos y requieren intervenciones sucesivas que comprometen la visión (Frank, 2004). Por lo cual, es imperante la investigación acerca de posibles mediadores químicos capaces de contrarrestar las alteraciones vasculares de la retina determinantes de la RD bajo esquemas de tratamientos menos invasivos y más eficaces contra el padecimiento. Al respecto, estudios preclínicos indican que las vasoinhibinas pudieran ser parte de estos mediadores químicos.

Las vasoinhibinas son fragmentos moleculares de la hormona PRL con acciones antiangiogénicas, vasoconstrictoras e inhibidoras de la permeabilidad vascular (Clapp *et al.*, 2006). Se ha demostrado que las vasoinhibinas se pueden generar en la retina a partir de PRL producida localmente. Estudios de hibridización *in situ* mostraron la presencia del RNA mensajero de la PRL en la capa nuclear externa, en la capa nuclear interna y en la capa de células ganglionares de la retina (Aranda *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2008). También se demostró que la PRL del plasma puede incorporarse al ojo y ser convertida a vasoinhibinas por tejidos oculares (Arnold *et al.*, 2010). Notablemente, las vasoinhibinas inhiben la angiogénesis y la vasopermeabilidad ocular. Los efectos de las vasoinhibinas se han reproducido mediante la administración intravítrea de los péptidos puros (García *et al.*, 2008; Arredondo Zamarripa *et al.*, 2014) y de virus adeno-asociados recombinantes que los codifican (Ramírez *et al.*, 2011). Ambos tratamientos bloquean el aumento en la

vasopermeabilidad retiniana que ocurre en respuesta a la administración intravítrea de VEGF o bradicinina y por efecto de la diabetes experimental. Además, se ha demostrado que las vasoinhibinas reducen la angiogénesis retiniana en un modelo de retinopatía inducido por isquemia en el ratón recién nacido (Pan *et al.*, 2004). También se sabe que vasoinhibinas reducen en un 50% la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento de fibroblastos en la córnea (Duenas *et al.*, 1999) y que pueden inducir la apoptosis de las células endoteliales y promover la regresión vascular intraocular (Martini *et al.*, 2000; Duenas *et al.*, 2004).

La idea de que las vasoinhibinas pudieran ejercer efectos protectores contra la RD se sustenta en gran medida en sus efectos inhibidores de la acción del VEGF, el principal mediador de las alteraciones vasculares retinianas que conducen a la RD. Los niveles de VEGF se incrementan en el vítreo de pacientes con RD y edema macular diabético (Aiello *et al.*, 1994; Funatsu *et al.*, 2006) y, como se mencionó anteriormente, el uso de moléculas anti-VEGF mejora ambos padecimientos (Stefanini *et al.*, 2014; Stewart, 2014). El VEGF promueve el incremento de la permeabilidad y proliferación de células endoteliales de aorta bovina y de capilares retinianos en cultivo y éste incremento se reduce cuando el VEGF se administra conjuntamente con vasoinhibinas (Frelin, Ladoux, & D'Angelo, 2000; García *et al.*, 2008). Se conoce que las vasoinhibinas actúan a través de inhibir la fosforilación de eNOS y por tanto la producción del óxido nítrico (NO) así como la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) sobre las células endoteliales en respuesta al VEGF (García *et al.*, 2008).

Otro antecedente fundamental de nuestro proyecto es el hecho de que los niveles de PRL y de vasoinhibinas disminuyen en pacientes con RD (Triebel *et al.*, 2009) y que la PRL circulante se incorpora al ojo donde es procesada a vasoinhibinas (Arnold *et al.*, 2010). Notablemente, el estado de hiperprolactinemia mitiga la permeabilidad excesiva causada tanto por la inyección intravítrea de VEGF como por la diabetes, en ratas (Arnold *et al.*, 2010). Sin embargo, en el estudio de Arnold y colaboradores la hiperprolactinemia fue inducida mediante la colocación de dos glándulas hipófisis, bajo la cápsula renal de una rata receptora. Este es un procedimiento experimental bien aceptado para inducir hiperprolactinemia, que se basa en que el trasplante de las hipófisis que las separa del control inhibitorio hipotalámico esencialmente mediado por la dopamina. La dopamina

producida por núcleos en la base del hipotálamo es transferida a la hipófisis vía el sistema porta hipotálamo-hipofisiario y, a través de activar receptores de tipo 2, inhibe la síntesis y secreción de la PRL por los lactótrofos (Mansi *et al.*, 1995). El efecto del trasplante es selectivo sobre PRL ya que ésta es la única hormona hipofisiaria predominantemente sujeta a un control inhibitorio por parte del hipotálamo, sin embargo, en este modelo también se han reportado niveles incrementados de glucocorticoides séricos (Adler, 1986).

Una alternativa para inducir hiperprolactinemia es el uso de antagonistas de los receptores tipo 2 de la dopamina (D2), estrategia empleada en múltiples abordajes experimentales (Baptista *et al.*, 2002). Una gran variedad de estos antagonistas son autorizados en la clínica para tratar diversos padecimientos por lo que su uso tendría el propósito doble, por una parte verificar el papel de la hiperprolactinemia como fuente de vasoinhibinas oculares capaces de inhibir alteraciones vasculares retinianas debidas a la diabetes (hipótesis del estudio) y, por otra, desarrollar un nuevo tratamiento con un fármaco ya disponible en la clínica

En este proyecto se utilizó a la sulpirida, un antagonista de los receptores D2 de la dopamina empleado en la clínica por sus propiedades procinéticas. La sulpirida tiene una afinidad baja (>10 nM) por los receptores D2 de dopamina lo que permite que a dosis bajas (75 mg diarios) tenga efecto gastrointestinal pero no efectos centrales anti-psicóticos, neurolépticos y extrapiramidales que pudieran ser adversos que se sabe, requieren de dosis diarias mayores (200-300 mg) (Tonini *et al.*, 2004).

Encontramos que la sulpirida induce hiperprolactinemia en forma similar a la reportada previamente en la rata (Baptista *et al.*, 2002). La elevación de PRL sistémica se asoció con la presencia de vasoinhibinas de 14 y 16 kDa en los vítreos, que sólo fueron detectadas en los animales tratados con sulpirida pero no en los no tratados con dicho fármaco. Ésta es la primera vez que se detecta a las vasoinhibinas en el vítreo, donde su presencia podría implicar la participación de estos péptidos en el mantenimiento de las propiedades avasculares de esta estructura. Estos hallazgos son consistentes con lo reportado por Arnold y colaboradores en 2010, donde la hiperprolactinemia en respuesta a los implantes hipofisiarios bajo la cápsula renal, se asoció con una mayor concentración de vasoinhibinas en la retina. Queda por determinar si el tratamiento con sulpirida bajo

nuestras condiciones experimentales también eleva a las vasoinhibinas de la retina, las cuales probablemente serían la fuente de las vasoinhibinas vítreas.

Posteriormente evaluamos el efecto de la sulpirida sobre los niveles de PRL sistémica en la condición diabética. Confirmamos que la PRL sérica disminuye por efecto de la diabetes inducida por STZ en la rata (Lemini *et al.*, 2015). Esta disminución se ha asociado funcionalmente con el predominio de las acciones del factor de crecimiento transformante β por sobre las del factor de necrosis tumoral α sobre la PRL hipofisiaria. El primer factor inhibe y el segundo estimula la síntesis y secreción hipofisiaria de la PRL, y los niveles de ambos, se alteran consecuentemente tanto en la hipófisis como en la circulación de los animales diabéticos (Lemini *et al.*, 2015). Además, la disminución de la PRL sérica se ha asociado con la resistencia a la insulina y se considera un factor de riesgo para la DM tipo 2 y otras enfermedades metabólicas (Balbach *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

El tratamiento con sulpirida elevó los niveles circulantes de la PRL en los animales diabéticos. Desafortunadamente, no pudimos demostrar diferencias significativas en estas determinaciones probablemente debido a dos razones: (1) el bajo número de animales tratados con sulpirida que se tuvo en este ensayo y (2), que el sacrificio de los animales se realizó cerca del tiempo de menor efecto del fármaco. Se conoce que en el humano la sulpirida administrada oralmente tiene una latencia de 1-2 h para elevar los niveles de PRL y que la PRL se mantiene elevada por 4-6 h (Mcmurdo *et al.*, 1987). A diferencia del experimento en ratas no diabéticas (**Fig. 5**) donde los animales fueron sacrificados 3 h después de la administración de la sulpirida, en este último experimento (**Fig. 7**) se sacrificó a los animales a las 5 horas posteriores a la administración de sulpirida. De manera que los niveles circulantes de la PRL estarían más cercanos a declinar y, por ende, serían menores. Sin embargo, muy probablemente la farmacodinámica de la sulpirida difiere entre la rata y el humano y, por supuesto, de acuerdo a la vía de administración oral vs. la intraperitoneal empleada en nuestro estudio. Este análisis debe ser ampliado con nuevos experimentos.

Nuestro trabajo muestra por primera vez el valor terapéutico potencial de la sulpirida contra la vasopermeabilidad excesiva debida a la diabetes. El tratamiento con sulpirida de 2 semanas iniciado en ratas con 2 y con 4 semanas post-STZ redujo y

bloqueó, respectivamente, el aumento en la extravasación de proteínas plasmáticas en la retina evaluada por el método de Azul de Evans. Este método es el convencional para evaluar la interrupción de la barrera hematorretiniana que puede ocurrir tanto a nivel del endotelio vascular como del EPR. Interesantemente, las vasoinhibinas reducen la permeabilidad de la barrera a ambos niveles. Como ya mencionamos, las vasoinhibinas inhiben la permeabilidad de células endoteliales (García *et al.*, 2008), pero también se sabe que interfieren con la del EPR. Un estudio reciente mostró que la bradicinina, un factor vasoactivo que contribuye a la RD (Arredondo Zamarripa *et al.*, 2014), reduce la resistencia transepitelial de células del EPR en cultivo (que indica un aumento en su permeabilidad). Las vasoinhibinas bloquean la menor resistencia transepitelial del EPR inducida por bradicinina mediante acciones inhibitorias de mecanismos dependientes de óxido nítrico y estrés oxidativo (Arredondo Zamarripa *et al.*, 2014).

Los hallazgos del presente estudio son consistentes con nuestra hipótesis que propone de que la hiperprolactinemia inducida mediante sulpirida se traduce en mayores niveles intraoculares de vasoinhibinas capaces de contrarrestar alteraciones en la barrera hematorretiniana determinantes de la RD. Sin embargo, también es posible que la sulpirida proteja contra la RD a través de mecanismos independientes de la PRL. A este respecto, se sabe que la dopamina puede actuar sobre receptores D2 presentes en el endotelio vascular (Bhattacharya *et al.*, 2008) inhibiendo su proliferación (Basu *et al.*, 2001). Sin embargo, la acción benéfica de la sulpirida implica una inhibición y no una promoción de acciones de dopamina. Estudios en proceso están comparando el efecto de la sulpirida con la administración crónica de la PRL pura (mediante bombas implantadas de infusión crónica). Estos estudios permitirán reforzar a la PRL y su conversión intraocular a vasoinhibinas como mecanismo del efecto protector de la sulpirida.

9. CONCLUSION

Los resultados del presente estudio nos permiten concluir que la sulpirida posee potencial terapéutico contra la RD en virtud de elevar los niveles sistémicos de PRL y, por ende, la concentración intraocular de vasoinhibinas con acciones inhibitorias de la vasopermeabilidad y angiogénesis retinianas determinantes del padecimiento.

10.REFERENCIAS

- Adler, R. A. (1986). The Anterior Pituitary-Grafted Rat - a Valid Model of Chronic Hyperprolactinemia. *Endocrine Reviews*, 7(3), 302-313.
- Ahmed, A. M. (2002). History of diabetes mellitus. *Saudi Med J*, 23(4), 373-378.
- Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., . . . et al. (1994). Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*, 331(22), 1480-1487. doi: 10.1056/NEJM199412013312203
- Akbarzadeh, A., Norouzzian, D., Mehrabi, M. R., Jamshidi, Sh, Farhangi, A., Verdi, A. A., . . . Rad, B. L. (2007). Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem*, 22(2), 60-64. doi: 10.1007/BF02913315
- Allen, T. H., & Orahovats, P. D. (1950). Combination of toluidine dye isomers with plasma albumin. *Am J Physiol*, 161(3), 473-482.
- Antonetti, D. A., Klein, R., & Gardner, T. W. (2012). Diabetic retinopathy. *N Engl J Med*, 366(13), 1227-1239. doi: 10.1056/NEJMra1005073
- Aranda, J., Rivera, J. C., Jeziorski, M. C., Riesgo-Escovar, J., Nava, G., Lopez-Barrera, F., . . . Clapp, C. (2005). Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(8), 2947-2953. doi: 10.1167/iovs.05-0173
- Archer, D.B., Gardiner, T. A. , & Stitt, A. W. . (2007). Functional Anatomy, Fine Structure and Basic Pathology of the Retinal Vasculature. In A. M. Joussen, T. W. Gardner, B. Kirchhof & S. J. Ryan (Eds.), *Retinal Vascular Disease*. Germany.
- Arnold, E., Rivera, J. C., Thebault, S., Moreno-Paramo, D., Quiroz-Mercado, H., Quintanar-Stephano, A., . . . Clapp, C. (2010). High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vaso-inhibins. *Diabetes*, 59(12), 3192-3197. doi: 10.2337/db10-0873
- Arredondo Zamarripa, D., Diaz-Lezama, N., Melendez Garcia, R., Chavez Balderas, J., Adan, N., Ledesma-Colunga, M. G., . . . Thebault, S. (2014). Vaso-inhibins regulate the inner and outer blood-retinal barrier and limit retinal oxidative stress. *Front Cell Neurosci*, 8, 333. doi: 10.3389/fncel.2014.00333
- Bainbridge, J. W., Mistry, A. R., Thrasher, A. J., & Ali, R. R. (2003). Gene therapy for ocular angiogenesis. *Clin Sci (Lond)*, 104(6), 561-575. doi: 10.1042/CS20020314
- Balbach, L., Wallaschofski, H., Volzke, H., Nauck, M., Dorr, M., & Haring, R. (2013). Serum prolactin concentrations as risk factor of metabolic syndrome or type 2 diabetes? *Bmc Endocrine Disorders*, 13. doi: Artn 12
10.1186/1472-6823-13-12
- Baldocchi, R. A., Tan, L., King, D. S., & Nicoll, C. S. (1993). Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology*, 133(2), 935-938. doi: 10.1210/endo.133.2.8344226
- Baptista, T., Lacruz, A., Paez, X., Hernandez, L., & Beaulieu, S. (2002). The antipsychotic drug sulpiride does not affect bodyweight in male rats. Is insulin resistance involved? *European Journal of Pharmacology*, 447(1), 91-98. doi: Pii S0014-2999(02)01816-2
Doi 10.1016/S0014-2999(02)01816-2
- Basu, S., Nagy, J. A., Pal, S., Vasile, E., Eckelhoefer, I. A., Bliss, V. S., . . . Mukhopadhyay, D. (2001). The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med*, 7(5), 569-574. doi: 10.1038/87895

- Beck, K. F., Eberhardt, W., Frank, S., Huwiler, A., Messmer, U. K., Muhl, H., & Pfeilschifter, J. (1999). Inducible NO synthase: Role in cellular signalling. *Journal of Experimental Biology*, 202(6), 645-653.
- Ben-Jonathan, N., Hugo, E. R., Brandebourg, T. D., & LaPensee, C. R. (2006). Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab*, 17(3), 110-116. doi: 10.1016/j.tem.2006.02.005
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J. L., Allen, D. L., & Steinmetz, R. W. (1996). Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev*, 17(6), 639-669. doi: 10.1210/edrv-17-6-639
- Bhattacharya, R., Sinha, S., Yang, S.P., Patra, C., Dutta, S., Wang, E., & Mukhopadhyay, D. (2008). The neurotransmitter dopamine modulates vascular permeability in the endothelium. *Journal of Molecular Signaling*, 3(14).
- Bhavsar, A. R. (2006). Diabetic retinopathy: the latest in current management. *Retina*, 26(6 Suppl), S71-79. doi: 10.1097/01.iae.0000236466.23640.c9
- Bloemendal, H., de Jong, W., Jaenicke, R., Lubsen, N. H., Slingsby, C., & Tardieu, A. (2004). Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol*, 86(3), 407-485. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2003.11.012
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 19(3), 225-268. doi: 10.1210/Er.19.3.225
- Brown, M. A., Mitar, D. A., & Whitworth, J. A. (1992). Measurement of Plasma-Volume in Pregnancy. *Clinical Science*, 83(1), 29-34.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813-820. doi: 10.1038/414813a
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 54(6), 1615-1625.
- Cai, J., & Boulton, M. (2002). The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye (Lond)*, 16(3), 242-260. doi: 10.1038/sj/eye/6700133
- Caley, C. F., & Weber, S. S. (1995). Sulpiride: an antipsychotic with selective dopaminergic antagonist properties. *Ann Pharmacother*, 29(2), 152-160. doi: 10.1177/106002809502900210
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3, 4-10. doi: 10.1159/000088478
- Clapp, C. (1987). Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology*, 121(6), 2055-2064. doi: 10.1210/endo-121-6-2055
- Clapp, C., Aranda, J., Gonzalez, C., Jeziorski, M. C., & Martinez de la Escalera, G. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab*, 17(8), 301-307. doi: 10.1016/j.tem.2006.08.002
- Clapp, C., Gonzalez, C., Macotela, Y., Aranda, J., Rivera, J. C., Garcia, C., . . . Martinez de la Escalera, G. (2006). Vasoinhibins: a family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function. *Front Horm Res*, 35, 64-73. doi: 10.1159/000094309
- Clapp, C., Thebault, S., Arnold, E., Garcia, C., Rivera, J. C., & de la Escalera, G. M. (2008). Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(4), E772-778. doi: 10.1152/ajpendo.90358.2008
- Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M. C., & Martinez De La Escalera, G. (2009). Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev*, 89(4), 1177-1215. doi: 10.1152/physrev.00024.2009

- Clapp, C., Torner, L., Gutierrez-Ospina, G., Alcantara, E., Lopez-Gomez, F. J., Nagano, M., . . . Martinez de la Escalera, G. (1994). The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(22), 10384-10388.
- Cooke, N. E., Szpirer, C., & Levan, G. (1986). The related genes encoding growth hormone and prolactin have been dispersed to chromosomes 10 and 17 in the rat. *Endocrinology*, 119(6), 2451-2454. doi: 10.1210/endo-119-6-2451
- Corbacho, A. M., Martinez De La Escalera, G., & Clapp, C. (2002). Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol*, 173(2), 219-238.
- Corbacho, A. M., Nava, G., Eiserich, J. P., Noris, G., Macotela, Y., Struman, I., . . . Clapp, C. (2000). Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *J Biol Chem*, 275(18), 13183-13186.
- Cheung, N., Mitchell, P., & Wong, T. Y. (2010). Diabetic retinopathy. *Lancet*, 376(9735), 124-136. doi: 10.1016/S0140-6736(09)62124-3
- Cheung, N., & Wong, T. Y. (2008). Diabetic retinopathy and systemic vascular complications. *Prog Retin Eye Res*, 27(2), 161-176. doi: 10.1016/j.preteyeres.2007.12.001
- Daneman, D. (2006). Type 1 diabetes. *Lancet*, 367(9513), 847-858. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68341-4
- Das Evcimen, N., & King, G. L. (2007). The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res*, 55(6), 498-510. doi: 10.1016/j.phrs.2007.04.016
- Deshpande, A. D., Harris-Hayes, M., & Schootman, M. (2008). Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther*, 88(11), 1254-1264. doi: 10.2522/ptj.20080020
- Ding, J., & Wong, T. Y. (2012). Current epidemiology of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Curr Diab Rep*, 12(4), 346-354. doi: 10.1007/s11892-012-0283-6
- Duenas, Z., Rivera, J. C., Quiroz-Mercado, H., Aranda, J., Macotela, Y., Montes de Oca, P., . . . Clapp, C. (2004). Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(7), 2049-2055.
- Duenas, Z., Torner, L., Corbacho, A. M., Ochoa, A., Gutierrez-Ospina, G., Lopez-Barrera, F., . . . Clapp, C. (1999). Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(11), 2498-2505.
- Edwards, C. M. B. . (2004). International Textbook of Diabetes Mellitus. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 97(11), 554.
- Engerman, R. L., & Kern, T. S. (1995). Retinopathy in Animal-Models of Diabetes. *Diabetes-Metabolism Reviews*, 11(2), 109-120.
- Fong, D. S., Aiello, L., Gardner, T. W., King, G. L., Blankenship, G., Cavallerano, J. D., . . . American Diabetes, Association. (2004). Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care*, 27 Suppl 1, S84-87.
- Frank, R. N. (2004). Diabetic retinopathy. *N Engl J Med*, 350(1), 48-58. doi: 10.1056/NEJMra021678
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*, 80(4), 1523-1631.
- Frelin, C., Ladoux, A., & D'Angelo, G. (2000). Vascular endothelial growth factors and angiogenesis. *Annales D Endocrinologie*, 61(1), 70-74.
- Fukuoka, H., Hamamoto, R., & Higurashi, M. (1991). Heterogeneity of serum and amniotic fluid prolactin in humans. *Horm Res*, 35 Suppl 1, 58-63.

- Funatsu, H., Yamashita, H., Nakamura, S., Mimura, T., Eguchi, S., Noma, H., & Hori, S. (2006). Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 113(2), 294-301. doi: 10.1016/j.ophtha.2005.10.030
- Gabbay, K. H. (1982). Glycosylated hemoglobin and diabetes mellitus. *Med Clin North Am*, 66(6), 1309-1315.
- Garcia, C., Aranda, J., Arnold, E., Thebault, S., Macotela, Y., Lopez-Casillas, F., . . . Clapp, C. (2008). Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest*, 118(6), 2291-2300. doi: 10.1172/JCI34508
- Ge, G., Fernandez, C. A., Moses, M. A., & Greenspan, D. S. (2007). Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(24), 10010-10015. doi: 10.1073/pnas.0704179104
- Goffin, V., Bernichtein, S., Touraine, P., & Kelly, P. A. (2005). Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocr Rev*, 26(3), 400-422. doi: 10.1210/er.2004-0016
- Gonzalez, C., Corbacho, A. M., Eiserich, J. P., Garcia, C., Lopez-Barrera, F., Morales-Tlalpan, V., . . . Clapp, C. (2004). 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology*, 145(12), 5714-5722. doi: 10.1210/en.2004-0647
- Gonzalez, C., Parra, A., Ramirez-Peredo, J., Garcia, C., Rivera, J. C., Macotela, Y., . . . Clapp, C. (2007). Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Laboratory Investigation*, 87(10), 1009-1017. doi: 10.1038/labinvest.3700662
- Gonzalez Villalpando, M. E., Gonzalez Villalpando, C., Arredondo Perez, B., & Stern, M. P. (1994). Diabetic retinopathy in Mexico. Prevalence and clinical characteristics. *Arch Med Res*, 25(3), 355-360.
- Guillou, A., Romano, N., Steyn, F., Abitbol, K., Le Tissier, P., Bonnefont, X., . . . Martin, A. O. (2015). Assessment of lactotroph axis functionality in mice: longitudinal monitoring of PRL secretion by ultrasensitive-ELISA. *Endocrinology*, 156(5), 1924-1930. doi: 10.1210/en.2014-1571
- Gutierrez, J. P., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco A, Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M., & Hernández-Ávila, M. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 *Resultados Nacionales*. (pp. 14-192). Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX).
- Haddad, P. M., Hellewell, J. S., & Wieck, A. (2001). Antipsychotic induced hyperprolactinaemia: a series of illustrative case reports. *J Psychopharmacol*, 15(4), 293-295. doi: 10.1177/026988110101500408
- Hammes, H. P., Kerner, W., Hofer, S., Kordonouri, O., Raile, K., Holl, R. W., & Group, D. PV-Wiss Study. (2011). Diabetic retinopathy in type 1 diabetes-a contemporary analysis of 8,784 patients. *Diabetologia*, 54(8), 1977-1984. doi: 10.1007/s00125-011-2198-1
- Harter, M., Balarac, N., Pourcher, P., Koslowski, J. M., Krebs, B., & Ramaioli, A. (1976). Diabetic-Retinopathy and Prolactin. *Lancet*, 2(7992), 961-962.
- Hassell, J. R., & Birk, D. E. (2010). The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res*, 91(3), 326-335. doi: 10.1016/j.exer.2010.06.021
- Hoehenwarter, W., Klose, J., & Jungblut, P. R. (2006). Eye lens proteomics. *Amino Acids*, 30(4), 369-389. doi: 10.1007/s00726-005-0283-9
- Holt, R. I. (2004). Diagnosis, epidemiology and pathogenesis of diabetes mellitus: an update for psychiatrists. *Br J Psychiatry Suppl*, 47, S55-63.

- Huang, Y. C., Lin, J. M., Lin, H. J., Chen, C. C., Chen, S. Y., Tsai, C. H., & Tsai, F. J. (2011). Genome-wide association study of diabetic retinopathy in a Taiwanese population. *Ophthalmology*, 118(4), 642-648. doi: 10.1016/j.opht.2010.07.020
- Hunter, P. R., Anderson, J., Lunn, T. A., Horrobin, D. F., Boyns, A. R., & Cole, E. N. (1974). Letter: Diabetic retinopathy and prolactin. *Lancet*, 1(7868), 1237.
- IDF, International Diabetes Federation. (2015). Diabetes atlas (7th ed.). Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.
- Jester, J. V. (2008). Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Semin Cell Dev Biol*, 19(2), 82-93. doi: 10.1016/j.semcdb.2007.09.015
- Kaboord, B., & Perr, M. (2008). Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol*, 424, 349-364. doi: 10.1007/978-1-60327-064-9_27
- Kaur, C., Foulds, W. S., & Ling, E. A. (2008). Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clin Ophthalmol*, 2(4), 879-889.
- Keenan, H. A., Costacou, T., Sun, J. K., Doria, A., Cavallerano, J., Coney, J., . . . King, G. L. (2007). Clinical factors associated with resistance to microvascular complications in diabetic patients of extreme disease duration: the 50-year medalist study. *Diabetes Care*, 30(8), 1995-1997. doi: 10.2337/dc06-2222
- Kiel, J.W. (2010). *The Ocular Circulation*. San Rafael, Calif.: Morgan & Claypool Life Sciences.
- Klein, R., Klein, B. E., Moss, S. E., Davis, M. D., & DeMets, D. L. (1984). The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol*, 102(4), 520-526.
- Kuroki, T., Isshiki, K., & King, G. L. (2003). Oxidative stress: the lead or supporting actor in the pathogenesis of diabetic complications. *J Am Soc Nephrol*, 14(8 Suppl 3), S216-220.
- Lamoureux, E. L., Hassell, J. B., & Keeffe, J. E. (2004). The impact of diabetic retinopathy on participation in daily living. *Arch Ophthalmol*, 122(1), 84-88. doi: 10.1001/archoph.122.1.84
- Larrea, F., Villanueva, C., Cravioto, M. C., Escorza, A., & Delreal, O. (1985). Further Evidence That Big, Big Prolactin Is Preferentially Secreted in Women with Hyperprolactinemia and Normal Ovarian-Function. *Fertility and Sterility*, 44(1), 25-30.
- Lemini, M., Ruiz-Herrera, X., Ledesma-Colunga, M. G., Diaz-Lezama, N., De los Rios, E. A., Lopez-Barrera, F., . . . Clapp, C. (2015). Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels are reduced in obese and diabetic rats: role of TGF-beta and TNF-alpha. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 308(9), R792-R799. doi: 10.1152/ajpregu.00327.2014
- Lieth, E., Gardner, T. W., Barber, A. J., & Antonetti, D. A. (2000). Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes. *Clin Exp Ophthalmol*, 28(1), 3-8.
- Lozano, R., Concha, M. P., Montealegre, A., de Leon, L., Villalba, J. O., Esteban, H. L., . . . Quiros, H. B. (2007). Effectiveness and safety of levosulpiride in the treatment of dysmotility-like functional dyspepsia. *Ther Clin Risk Manag*, 3(1), 149-155.
- Macotella, Y., Aguilar, M. B., Guzman-Morales, J., Rivera, J. C., Zermeno, C., Lopez-Barrera, F., . . . Clapp, C. (2006). Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci*, 119(Pt 9), 1790-1800. doi: 10.1242/jcs.02887
- Mansi, C., Savarino, V., Vigneri, S., Perilli, D., Melga, P., Sciaba, L., . . . Mela, G. S. (1995). Gastrokinetic effects of levosulpiride in dyspeptic patients with diabetic gastroparesis. *Am J Gastroenterol*, 90(11), 1989-1993.

- Margolis, R., Singh, R. P., Bhatnagar, P., & Kaiser, P. K. (2008). Intravitreal triamcinolone as adjunctive treatment to laser panretinal photocoagulation for concomitant proliferative diabetic retinopathy and clinically significant macular oedema. *Acta Ophthalmol*, 86(1), 105-110. doi: 10.1111/j.1600-0420.2007.00940.x
- Martini, J. F., Piot, C., Humeau, L. M., Struman, I., Martial, J. A., & Weiner, R. I. (2000). The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol*, 14(10), 1536-1549. doi: 10.1210/mend.14.10.0543
- Matsuda, R., Nishikawa, A., & Tanaka, H. (1995). Visualization of Dystrophic Muscle-Fibers in Mdx Mouse by Vital Staining with Evans Blue - Evidence of Apoptosis in Dystrophin-Deficient Muscle. *Journal of Biochemistry*, 118(5), 959-964.
- Matthews, D. R., Stratton, I. M., Aldington, S. J., Holman, R. R., Kohnner, E. M., & Group, U. K. Prospective Diabetes Study. (2004). Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Arch Ophthalmol*, 122(11), 1631-1640. doi: 10.1001/archophth.122.11.1631
- Mcmurdo, M. E. T., Howie, P. W., Lewis, M., Marnie, M., Mcewen, J., & Mcneilly, A. S. (1987). Prolactin Response to Low-Dose Sulpiride. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 24(2), 133-137.
- Mearin, F., Rodrigo, L., Perez-Mota, A., Balboa, A., Jimenez, I., Sebastian, J. J., & Paton, C. (2004). Levosulpiride and cisapride in the treatment of dysmotility-like functional dyspepsia: a randomized, double-masked trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2(4), 301-308.
- Melendez Garcia, R., Arredondo Zamarripa, D., Arnold, E., Ruiz-Herrera, X., Noguez Imm, R., Baeza Cruz, G., . . . Thebault, S. (2016). Prolactin protects retinal pigment epithelium by inhibiting sirtuin 2-dependent cell death. *EBioMedicine*, 7, 35-49. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.03.048
- Mohamed, Q., Gillies, M. C., & Wong, T. Y. (2007). Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA*, 298(8), 902-916. doi: 10.1001/jama.298.8.902
- Mooradian, A. D., Morley, J. E., Billington, C. J., Slag, M. F., Elson, M. K., & Shafer, R. B. (1985). Hyperprolactinemia in Male Diabetics. *Postgraduate Medical Journal*, 61(711), 11-14.
- Moss, S. E., Klein, R., & Klein, B. E. (1998). The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology*, 105(6), 998-1003. doi: 10.1016/S0161-6420(98)96025-0
- Nagaraja, T. N., Keenan, K. A., Fenstermacher, J. D., & Knight, R. A. (2008). Acute leakage patterns of fluorescent plasma flow markers after transient focal cerebral ischemia suggest large openings in blood-brain barrier. *Microcirculation*, 15(1), 1-14. doi: 10.1080/10739680701409811
- Neubauer, A. S., & Ulbig, M. W. (2007). Laser treatment in diabetic retinopathy. *Ophthalmologica*, 221(2), 95-102. doi: 10.1159/000098254
- Nguyen, T. T., Alibrahim, E., Islam, F. M., Klein, R., Klein, B. E., Cotch, M. F., . . . Wong, T. Y. (2009). Inflammatory, hemostatic, and other novel biomarkers for diabetic retinopathy: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Diabetes Care*, 32(9), 1704-1709. doi: 10.2337/dc09-0102
- O'Steen, W. K., & Sundberg, D. K. (1982). Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injection of iodinated prolactin. *Ophthalmic Res*, 14(1), 54-62.
- Pan, H., Nguyen, N. Q., Yoshida, H., Bentzien, F., Shaw, L. C., Rentier-Delrue, F., . . . Grant, M. B. (2004). Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(7), 2413-2419.
- Patlak, M. (2002). New weapons to combat an ancient disease: treating diabetes. *FASEB J*, 16(14), 1853.

- Persson, B., & Hanson, U. (1998). Neonatal morbidities in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 21 Suppl 2, B79-84.
- Piwnica, D., Touraine, P., Struman, I., Tabruyn, S., Bolbach, G., Clapp, C., . . . Goffin, V. (2004). Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol Endocrinol*, 18(10), 2522-2542. doi: 10.1210/me.2004-0200
- Ramirez, M., Wu, Z., Moreno-Carranza, B., Jeziorski, M. C., Arnold, E., Diaz-Lezama, N., . . . Clapp, C. (2011). Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(12), 8944-8950. doi: 10.1167/iovs.11-8190
- Reich, S. J., Fosnot, J., Kuroki, A., Tang, W., Yang, X., Maguire, A. M., . . . Tolentino, M. J. (2003). Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis*, 9, 210-216.
- Rivera, J. C., Aranda, J., Riesgo, J., Nava, G., Thebault, S., Lopez-Barrera, F., . . . Clapp, C. (2008). Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina. *Exp Eye Res*, 86(2), 314-321. doi: 10.1016/j.exer.2007.11.003
- Rodriguez-Villalobos, E., Cervantes-Aguayo, F., Vargas-Salado, E., Ávalos-Muñoz, M. E., Juárez-Becerril, D. M., & Ramírez-Barba, E. J. (2005). Retinopatía diabética. Incidencia y progresión a 12 años. *Cir. Ciruj.*, 73, 97-84.
- Rodriguez-Villalobos, E., Ramirez-Barba, E. J., & Cervantes-Aguayo, F. (1994). [The incidence and opportunity for the diagnosis of diabetic retinopathy]. *Salud Publica Mex*, 36(3), 275-280.
- Rossi, F., & Forgione, A. (1995). Pharmacotoxicological aspects of levosulpiride. *Pharmacol Res*, 31(2), 81-94.
- Sasongko, M. B., Wong, T. Y., Nguyen, T. T., Shaw, J. E., Jenkins, A. J., & Wang, J. J. (2012). Novel versus traditional risk markers for diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 55(3), 666-670. doi: 10.1007/s00125-011-2424-x
- Saunders, N. R., Dziegielewska, K. M., Mollgard, K., & Habgood, M. D. (2015). Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Frontiers in Neuroscience*, 9. doi: Artn 385 10.3339/Fnins.2015.00385
- Seggie, J. A., & Brown, G. M. (1975). Stress Response Patterns of Plasma Corticosterone, Prolactin, and Growth-Hormone in Rat, Following Handling or Exposure to Novel Environment. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 53(4), 629-637.
- Simo, R., Carrasco, E., Garcia-Ramirez, M., & Hernandez, C. (2006). Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev*, 2(1), 71-98.
- Simo, R., & Hernandez, C. (2008). Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia*, 51(9), 1574-1580. doi: 10.1007/s00125-008-0989-9
- Simo, R., & Hernandez, C. (2014). Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol Metab*, 25(1), 23-33. doi: 10.1016/j.tem.2013.09.005
- Singh, Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A. S. . (2014). Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol*, 18(1), 1-14. doi: 10.4196/kjpp.2014.18.1.1
- Singh, R., Ramasamy, K., Abraham, C., Gupta, V., & Gupta, A. (2008). Diabetic retinopathy: an update. *Indian J Ophthalmol*, 56(3), 178-188.
- Sinha, Y. N. (1995). Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev*, 16(3), 354-369. doi: 10.1210/edrv-16-3-354

- Stefanini, F. R., Badaro, E., Falabella, P., Koss, M., Farah, M. E., & Maia, M. (2014). Anti-VEGF for the management of diabetic macular edema. *J Immunol Res*, 2014, 632307. doi: 10.1155/2014/632307
- Stefansson, E. (2009). Physiology of vitreous surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 247(2), 147-163. doi: 10.1007/s00417-008-0980-7
- Stewart, M. W. (2014). Anti-VEGF therapy for diabetic macular edema. *Curr Diab Rep*, 14(8), 510. doi: 10.1007/s11892-014-0510-4
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, 365(9467), 1333-1346. doi: 10.1016/S0140-6736(05)61032-X
- Suomalainen, V. P. (1993). Comparison of retinal lesions produced by transscleral krypton laser photocoagulation, transpupillar krypton laser photocoagulation and cryocoagulation. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 71(2), 224-229.
- Tezel, T. H., Del Priore, L. V., Flowers, B. E., Groszof, D. H., Benenson, I. L., Zamora, R. L., & Kaplan, H. J. (1996). Correlation between scanning laser ophthalmoscope microperimetry and anatomic abnormalities in patients with subfoveal neovascularization. *Ophthalmology*, 103(11), 1829-1836.
- Tonini, M., Cipollina, L., Poluzzi, E., Crema, F., Corazza, G. R., & De Ponti, F. (2004). Review article: clinical implications of enteric and central D2 receptor blockade by antidopaminergic gastrointestinal prokinetics. *Aliment Pharmacol Ther*, 19(4), 379-390.
- Triebel, J., Huefner, M., & Ramadori, G. (2009). Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol*, 161(2), 345-353. doi: 10.1530/EJE-09-0130
- Truong, A. T., Duez, C., Belayew, A., Renard, A., Pictet, R., Bell, G. I., & Martial, J. A. (1984). Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J*, 3(2), 429-437.
- Tzekov, R., & Arden, G. B. (1999). The electroretinogram in diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol*, 44(1), 53-60.
- UK Prospective Diabetes Study. (1998). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). (UKPDS) Group. *Lancet*, 352(9131), 837-853.
- Wang, T., Lu, J., Xu, Y., Li, M., Sun, J., Zhang, J., . . . Ning, G. (2013). Circulating prolactin associates with diabetes and impaired glucose regulation: a population-based study. *Diabetes Care*, 36(7), 1974-1980. doi: 10.2337/dc12-1893
- Wei, M., Ong, L., Smith, M. T., Ross, F. B., Schmid, K., Hoey, A. J., . . . Brown, L. (2003). The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart Lung Circ*, 12(1), 44-50. doi: 10.1046/j.1444-2892.2003.00160.x
- Williams, G. A., Scott, I. U., Haller, J. A., Maguire, A. M., Marcus, D., & McDonald, H. R. (2004). Single-field fundus photography for diabetic retinopathy screening: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*, 111(5), 1055-1062. doi: 10.1016/j.ophtha.2004.02.004
- Wolman, M., Klatzo, I., Chui, E., Wilmes, F., Nishimoto, K., Fujiwara, K., & Spatz, M. (1981). Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol*, 54(1), 55-61.
- Xu, Y., He, Z., & King, G. L. (2005). Introduction of hyperglycemia and dyslipidemia in the pathogenesis of diabetic vascular complications. *Curr Diab Rep*, 5(2), 91-97.
- Yam, J. C., & Kwok, A. K. (2007). Update on the treatment of diabetic retinopathy. *Hong Kong Med J*, 13(1), 46-60.

Zhang, L., Krzentowski, G., Albert, A., & Lefebvre, P. J. (2001). Risk of developing retinopathy in Diabetes Control and Complications Trial type 1 diabetic patients with good or poor metabolic control. *Diabetes Care*, 24(7), 1275-1279.