



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**“ANÁLISIS DEL EJE PROLACTINA-VASOINHIBINAS COMO BLANCO
TERAPÉUTICO DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA
M. en C. ELVA HORTENCIA ADÁN CASTRO

TUTOR
DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR
DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DR. YONATHAN OMAR GARFIAS BECERRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

JURIQUILLA QUERÉTARO, QRO., ENERO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Esta tesis se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Campus Juriquilla-Querétaro, bajo la tutela de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L. El trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (proyecto 289568) y la UNAM (proyecto 405PC). La alumna recibió la beca CONACYT con número de registro **588869**.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí para el desarrollo de este proyecto, por sus conocimientos brindados, su paciencia, enseñanza y tiempo.

A mi Comité Tutor formado por el Dr. Mauricio Díaz Muñoz y por el Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra por su dirección y apoyo académico.

Al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera por sus consejos académicos durante estos años.

A la Dra. Xarubet Ruiz Herrera y al Nutr. Fernando López Barrera por su invaluable apoyo y asistencia técnica.

A la labor asistencial de los laboratoristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán.

A la Dra. Alejandra Castilla León, a la Dra. María A. Carbajo Mata y el MVZ. José Martín García Servín por el apoyo y asistencia técnica en la obtención y manejo de los animales del bioterio.

El asesoramiento de la Dra. Nuri Aranda López, responsable de la Unidad de Enseñanza del Instituto de Neurobiología.

El apoyo técnico del Dr. Fco. Javier Valles Valenzuela coordinador de la Biblioteca UNAM Campus Juriquilla, del Ing. Ramón Martínez Olvera responsable de la Unidad de Cómputo, así como la asistencia y apoyo de la Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala (E.P.D.) quien fue responsable de la Unidad de Videoconferencia durante mis años de doctorado.

Mi infinito agradecimiento a:

Dra. Lourdes Montserrat Siqueiros Márquez, Dra. Gabriela Ramírez Hernández, Dra. Xarubet Ruiz Herrera, Dra. Nundehui Díaz Lezama y M. en C. Francisco Freinet Núñez, por su amistad, su gran compañerismo, por sus enseñanzas y todo su apoyo en los experimentos de estos años.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>i</i>
RESUMEN	<i>ii</i>
ABSTRACT	<i>iii</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Diabetes mellitus	4
2.2. Prevalencia e incidencia de la RD	5
2.3. Características de la retina	6
2.4. Clasificación y etiología de la RD	8
2.5. Terapias de la RD	11
2.6. Eje PRL-vasoconstrictora	12
2.7. Efectos de la vasoconstrictora	14
2.8. Sulpirida	15
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1. PRL y vasoconstrictora	20
6.2. Animales	20
6.2.1. Sulpirida	20
6.2.2. Modelo de diabetes inducido por estreptozotocina (STZ)	21
6.2.3. Tratamiento con sulpirida	21
6.2.4. Tratamiento con PRL	21
6.3. Cuantificación de PRL en suero	22
6.3.1. ELISA	22
6.3.2. Bioensayo de Nb2	22
6.4. Inmunoprecipitación (IP)-Western blot	23
6.5. Western blot de extractos de retina	23
6.5.1. Evaluación de la vasoconstrictora retiniana	23
6.5.2. Evaluación de albúmina en la retina	24
6.6. Ensayo de azul de Evans	24
6.7. Administración intravítrea de VEGF	25
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
8.1. La sulpirida induce hiperprolactinemia de manera dosis-dependiente en ratas no diabéticas.	27
8.2. La PRL sistémica disminuye en la condición diabética.	28
8.3. La sulpirida aumenta los niveles circulantes de PRL en ratas diabéticas y no diabéticas.	29

8.4.	<i>La sulpirida aumenta los niveles de vasoinhibina en la retina de ratas diabéticas.</i>	31
8.5.	<i>La sulpirida inhibe el aumento de la vasopermeabilidad retiniana inducida por la diabetes.</i>	32
8.6.	<i>La sulpirida reduce las hemorragias retinianas inducidas por VEGF.</i>	34
8.7.	<i>El tratamiento con PRL incrementa a la vasoinhibina retiniana e inhibe el aumento de la vasopermeabilidad retiniana causada por la diabetes.</i>	35
8.8.	<i>El tratamiento con sulpirida o con PRL no modifica los niveles de glucosa sanguínea y el peso corporal.</i>	38
9.	<i>DISCUSIÓN GENERAL</i>	40
10.	<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	45
11.	<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	57
12.	<i>ANEXOS</i>	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs	Productos finales de glicación avanzada
BMP-1	Proteína morfogénica de hueso tipo 1
DM	Diabetes mellitus
DB	Diabético
EDM	Edema macular diabético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
eNOS	Oxido nítrico sintetasa endotelial
EPR	Epitelio pigmentado retiniano
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
HIF-1α	Factor inducible por hypoxia-1 α
HUVEC	Células endoteliales de la vena umbilical humana
MMPs	Metaloproteasas de matriz
NO	Óxido nítrico
NDB	No diabético
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PRL	Prolactina
RD	Retinopatía diabética
RDNP	Retinopatía diabética no proliferativa
RDP	Retinopatía diabética proliferativa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	Sulpirida
SNC	Sistema Nervioso Central
STZ	Estreptozotocina
TIDA	Neuronas dopaminérgicas túbero-infundibulares
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR-2	Receptor tipo 2 del Factor de crecimiento endotelial vascular
Vi	Vasoinhibina
V	Vehículo

RESUMEN

La retinopatía diabética (RD) se caracteriza por un aumento exacerbado en la permeabilidad y en la proliferación (angiogénesis) de los vasos sanguíneos de la retina. La vaso inhibina es un fragmento molecular de la hormona prolactina que inhibe la hipervasopermeabilidad y la angiogénesis retiniana en modelos experimentales de RD. La inducción de hiperprolactinemia por levosulpirida, un antagonista de los receptores tipo D2 de la dopamina, eleva los niveles de vaso inhibina en el vítreo de pacientes con RD y sugiere el beneficio terapéutico de este medicamento vía la inhibición de las alteraciones vasculares retinianas por vaso inhibina. En esta tesis se investigó si la hiperprolactinemia inducida por la forma racémica de la levosulpirida (sulpirida), eleva los niveles intraoculares de vaso inhibina e inhibe la hipervasopermeabilidad retiniana en ratas diabéticas. Cuatro semanas después de inducir la diabetes con estreptozotocina, se trató a las ratas por dos semanas con sulpirida o con bombas osmóticas subcutáneas que liberan PRL. La PRL sérica y la vaso inhibina retiniana se evaluaron mediante ELISA y Western blot, respectivamente; y el ensayo azul de Evans determinó la vasopermeabilidad de la retina. La hiperprolactinemia generada por el tratamiento con sulpirida, o con PRL exógena, aumentó el nivel de vaso inhibina en la retina y redujo significativamente la vasopermeabilidad retiniana debida a la diabetes. La sulpirida también disminuyó la producción de hemorragias retinianas inducidas por la administración intravítrea del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Ni la sulpirida ni la PRL exógena modificaron los niveles de glucosa sanguínea y el peso corporal de los animales. Concluimos que la hiperprolactinemia inducida por sulpirida inhibe la excesiva vasopermeabilidad inducida por la diabetes o por el VEGF a través de favorecer la conversión intraocular de la PRL endógena a vaso inhibina. Estos hallazgos apoyan el potencial terapéutico de la sulpirida y su forma levógira (levosulpirida) en la RD.

ABSTRACT

Increased retinal vasopermeability and angiogenesis are hallmarks of diabetic retinopathy (DR). Vasoinhibin is a fragment of the hormone prolactin (PRL) that inhibits diabetes-induced retinal vasopermeability and ischemia-induced retinal angiogenesis in rodents. Hyperprolactinemia induced by levosulpiride, a dopamine D2-type receptor antagonist, is associated with an increase in the levels of vasoinhibin in the vitreous of patients with DR, implying a beneficial outcome due to vasoinhibin-mediated inhibition of retinal vascular alterations. Here, we evaluated whether hyperprolactinemia induced by the racemic form of levosulpiride (sulpiride), increases the intraocular levels of vasoinhibin and inhibits excessive retinal vasopermeability in diabetic rats. Diabetes was generated with streptozotocin and, four weeks later, rats were treated for two weeks with sulpiride or with osmotic pumps delivering PRL. Serum PRL and retinal vasoinhibin were evaluated by ELISA and Western blot, respectively, and the Evans blue assay assessed retinal vasopermeability. Hyperprolactinemia induced by sulpiride or exogenous PRL was associated with increased levels of vasoinhibin in the retina and reduced retinal vasopermeability. Sulpiride also decreased retinal hemorrhages in response to the intravitreal administration of vascular endothelial growth factor (VEGF). Neither sulpiride nor exogenous PRL modified the blood glucose levels or body weight. We conclude that sulpiride-induced hyperprolactinemia inhibits the diabetes- and VEGF-mediated increase in retinal vasopermeability by promoting the intraocular conversion of endogenous PRL to vasoinhibin. These findings support the therapeutic potential of sulpiride and its levorotatory enantiomer, levosulpiride, against DR.

1. INTRODUCCIÓN

La retinopatía diabética (RD), una complicación microvascular de la retina derivada de la diabetes mellitus (DM), constituye la principal causa de ceguera irreversible y discapacidad visual en la población mundial en edad laboral (20 a 74 años) (Lee et al., 2015). Quinientos treinta y siete millones de personas padecen diabetes en el mundo (IDF Diabetes Atlas, 2021) y se conoce que después de 5 a 15 años con la enfermedad el 75 al 97% de esta población presentará algún grado de retinopatía (Klein et al., 1984, 2008; Lee et al., 2015).

La RD progresa al producirse un aumento en la vasopermeabilidad de la retina que conduce a edema, hemorragias, e isquemia (Simó & Hernández, 2008). La isquemia deriva en una hipoxia local que induce la expresión de factores pro-angiogénicos (entre los que sobresale el factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF) que conlleva a la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). Los neovasos invaden y sangran en el vítreo y, en estados avanzados de la enfermedad, llegan a desprender la retina ocasionando ceguera irreversible (Antonetti et al., 2021; Wong et al., 2016).

El cuidado de parámetros metabólicos característicos de la diabetes (glucosa y lípidos en la sangre) y el control de la presión arterial reducen el riesgo de desarrollar RD solamente en el 11% de los casos (Hirsch & Brownlee, 2010). Los abordajes terapéuticos actuales (fotocoagulación con láser, vitrectomía y terapia anti-angiogénica intravítrea) son efectivos en el 50-80% de los casos, sólo son aplicables en los estados avanzados de la RD y pueden dañar la capacidad visual (Kollias & Ulbig, 2010). Por estas razones, es clara la necesidad de identificar nuevos blancos terapéuticos que permitan desarrollar tratamientos más eficaces y menos invasivos.

La vasoinhibina es una proteína endógena con potencialidad terapéutica. Actúa directamente sobre el endotelio vascular inhibiendo la vasopermeabilidad y la angiogénesis en respuesta al VEGF (Clapp et al., 2008; García et al., 2008) y a otros

factores vasoactivos (Clapp et al., 2015). La vasoinhibina deriva de la proteólisis de la hormona prolactina (PRL), que por sí misma no posee efectos inhibitorios sobre la función vascular. La generación de la vasoinhibina define al eje prolactina-vasoinhibina como un eje endócrino donde la PRL se convierte en una nueva hormona (la vasoinhibina) con acciones diferentes y donde la conversión de PRL a vasoinhibina se regula a nivel del hipotálamo, la glándula pituitaria y los órganos blanco (Triebel, Bertsch, et al., 2015).

La vasoinhibina regula la angiogénesis y la vasopermeabilidad ocular (Clapp et al., 2008). Se ha detectado en la retina de la rata (Aranda et al., 2005) y en el líquido sub-retiniano de pacientes con retinopatía del prematuro (Dueñas et al., 2004). Su participación fisiológica se apoya en experimentos donde la inmuno-neutralización de la vasoinhibina estimula la angiogénesis en la retina (Aranda et al., 2005). Además, la administración intravítrea de vectores recombinantes que transducen a la vasoinhibina, inhibe la angiogénesis inducida por isquemia en la retina del ratón (Pan et al., 2004) así como la vasopermeabilidad inducida por diabetes experimental en la rata o la administración intravítrea de VEGF (Arredondo Zamarripa et al., 2014; Díaz-Lezama et al., 2016; García et al., 2008; Ramírez et al., 2011).

La PRL circulante puede ser fuente de la vasoinhibina ocular (Arnold et al., 2010). Se conoce que PRL radioactiva inyectada sistémicamente se incorpora a tejidos oculares como la coroides, la retina y los cuerpos ciliares (O'Steen & Sundberg, 1982) y que los cuerpos ciliares y el epitelio pigmentado retiniano expresan al receptor de la PRL (Arnold et al., 2010; Meléndez García et al., 2016). De manera que, en condiciones fisiológicas la PRL puede atravesar la barrera hemato-ocular a través de su unión al receptor y dentro de los compartimentos oculares convertirse a vasoinhibina. Consistentemente con esta propuesta, estudios de nuestro laboratorio mostraron que la elevación crónica de los niveles circulantes de PRL, mediante implantes de glándulas hipofisarias bajo la cápsula renal, se asocia con un aumento de la vasoinhibina en la retina y con una disminución en la

vasopermeabilidad que tiene lugar en la retina de ratas diabéticas (Arnold et al., 2010).

Estas observaciones sugieren que la hiperprolactinemia tiene valor terapéutico en la RD a través de favorecer el aumento intraocular de vaso inhibina; y, por lo tanto, que fármacos capaces de elevar los niveles circulantes de la PRL podrían tener también dicho potencial. En este proyecto investigamos uno de estos fármacos, la sulpirida, como un tratamiento potencial contra la RD. La sulpirida es un antagonista de los receptores D2 de la dopamina, que al bloquear el efecto inhibitorio de la dopamina hipotalámica resulta en la estimulación de la secreción hipofisiaria de la PRL (Rossi & Forgione, 1995). Evaluamos el efecto de la sulpirida sobre los niveles circulantes y retinianos de la PRL y la vaso inhibina respectivamente, así como el efecto sobre la vasopermeabilidad de la retina diabética en el modelo de diabetes inducido por estreptozotocina (STZ) y sobre la administración intravítrea del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Analizamos la especificidad del efecto de dicho fármaco a través de compararlo con el obtenido mediante la administración de PRL exógena en ratas diabéticas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es la enfermedad crónico-degenerativa más común considerada uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Actualmente hay 536.6 millones de personas con diabetes entre 20 a 79 años. Esto representa el 9.8 % de la población mundial. Se prevé que para el 2045 el número de personas con dicho padecimiento aumentará a 783.2 millones. México ocupa el séptimo lugar a nivel mundial de mayor incidencia de diabetes, que se estima en 14.1 millones de pacientes (IDF Diabetes Atlas, 2021)

La DM describe a un grupo de desórdenes metabólicos caracterizados por altos niveles de glucosa en plasma (hiperglucemia), resultado de una deficiencia en la síntesis de insulina (DM tipo 1) o bien, por una respuesta disminuida de los tejidos blanco a la señalización de esta hormona ó resistencia a la insulina (DM tipo 2) (Ozougwu et al., 2013). La insulina es sintetizada y secretada por las células β del páncreas y es responsable de la homeostasis de la glucosa a través estimular su internalización hacia el interior celular, para ser metabolizada como fuente de energía (Alberti, 2010).

La DM tipo 1 es causada por la destrucción selectiva de las células β pancreáticas debido a un proceso autoinmune que puede conducir a una absoluta deficiencia de insulina, por lo que los pacientes requieren de una terapia con insulina para mantener su normoglicemia (Shulman & Daneman, 2010). La DM tipo 2 es el tipo más común de diabetes ya que representa el 90% de los casos de DM en el mundo (IDF Diabetes Atlas, 2021). La DM tipo 2 tiene una etiología múltiple que resulta de la interacción de factores genéticos, medioambientales y conductuales asociados a la obesidad, la mala alimentación y la inactividad física, entre otros (Stumvoll et al., 2005). Con el tiempo, estos factores conducen a la resistencia a la acción de la insulina y la consecuente hiperglucemia (Deshpande et al., 2008). Además, existe

un estado denominado 'prediabetes' que describe una condición en la cual las personas presentan niveles altos de glucosa en sangre y mayor riesgo de progresar a la DM tipo 2 (IDF Diabetes Atlas, 2021).

Existe también la DM gestacional, que se presenta a consecuencia de la resistencia a la insulina desarrollada por el sobrepeso y obesidad durante la gestación, aunque también influyen las hormonas producidas por la placenta (McIntyre et al., 2019). Recientemente se han descrito y clasificado otros tipos de diabetes englobados como 'diabetes monogénica', es decir, que se originan a consecuencia de la alteración en un solo gen y se pueden diferenciar en dos grandes grupos, las diabetes neonatales y las diabetes tipo MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) la cuales son detectadas en la infancia o adolescencia (Steck & Winter, 2011).

En cualquier tipo de diabetes, la hiperglucemia junto con otros factores de riesgo como la hipertensión y la hiperlipidemia, inician una cascada de cambios fisiológicos y bioquímicos a nivel sistémico. Entre estos cambios destaca la disfunción del sistema endotelial a nivel macro y micro-vascular (Cheung et al., 2010). Dentro de las complicaciones micro-vasculares más severas de la diabetes están la nefropatía y patologías oculares como el edema macular diabético (EMD) y la retinopatía diabética (RD) (Antonetti et al., 2012; Cai & Boulton, 2002).

2.2. Prevalencia e incidencia de la RD

La RD es una de las principales causas de ceguera irreversible o disminución de la capacidad visual en la población mundial en edad laboral (20 a 79 años) (Antonetti et al., 2012; Cheung et al., 2010; Stewart, 2017b). La prevalencia mundial de cualquier grado de RD es del 35%; en el 2010 el número mundial de personas con RD fue 126.6 millones y se estima que para el 2030 aumentarán a 191 millones de los cuales 56.3 millones tendrán comprometida seriamente la visión (Stewart, 2017a). La incidencia de RD en la DM tipo 1 es del 50%, 74% y 97% después de 5

a 7, 10 y 25 años con el padecimiento, respectivamente. La incidencia de RD en pacientes con DM tipo 2 es del 60% después de 10 a 15 años con la enfermedad (Fong et al., 2004; Ting et al., 2016).

En México, existen pocos estudios sobre la incidencia de RD y los datos reportados son principalmente para DM tipo 2. La incidencia de RD es del 23% después de 3-4 años con diabetes y del 47.6% a los 6 años con la enfermedad (Rodríguez-Villalobos et al., 2004). En un estudio donde se analizó la incidencia y progresión de la RD en pacientes con DM tipo 2 a lo largo de 12 años, se reportó que la RD de cualquier grado se presentó en 30 de 42 pacientes que no tenían la patología al inicio del estudio, estableciéndose una incidencia de 71.4 % y progresión de 74 % (Rodríguez-Villalobos et al., 2005). Estos datos son importantes pues sugieren que la incidencia de la RD en México es más alta y se desarrolla en menos tiempo que a nivel mundial.

2.3. Características de la retina

La retina se encuentra en la región más interna del ojo y forma parte del sistema nervioso central (SNC). Es el tejido neural encargado de captar las señales luminosas y transformarlas en impulsos nerviosos (fototransducción) que viajarán a través del nervio óptico hacia el cerebro para dar lugar a la percepción visual (Purves et al., 2001). Para que la fototransducción sea posible, la luz debe atravesar de forma sucesiva todas las estructuras oculares: la córnea, el humor acuoso, el lente y el cuerpo vítreo hasta llegar a la retina (**Fig.1**). Por lo que estas estructuras deben mantenerse transparentes para maximizar la transmisión y la refracción de la luz hacia la retina (Bassnett et al., 2011). La transparencia de dichas estructuras se debe a la ausencia de vasos sanguíneos, por lo que el aporte de nutrientes y oxígeno lo obtienen por difusión.

La retina por su parte está formada por cinco tipos de células organizadas en diez capas: **neuronas** (fotorreceptores, células bipolares, células horizontales, células amácrinas y células ganglionares), **células gliales** (células de Müller y astrocitos),

células de la microglía, células endoteliales y pericitos (Antonetti et al., 2006). La retina también tiene la exigencia de mantener algunas capas desprovistas de vasos sanguíneos en su totalidad para captar la mayor cantidad de luz, por lo que la densidad de vasos sanguíneos en la retina es baja a pesar de una demanda metabólica muy alta, lo que indica que la microvasculatura debe estar finamente regulada (Antonetti et al., 2006).

La retina está vascularizada por dos sistemas, uno que deriva de la arteria central (barrera hematorretiniana interna) y el otro formado por las arterias ciliares posteriores cortas (barrera hematorretiniana externa) (Das & Byrd, 2014). 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 entra al ojo por el nervio óptico donde se ramifica para irrigar las capas internas de la retina (cercanas al cuerpo vítreo); mientras que las capas más externas de la retina reciben oxígeno y nutrientes por difusión de la coroides; vía el epitelio pigmentado retiniano (Das & Byrd, 2014). Los vasos sanguíneos están formados por células endoteliales, membrana basal y pericitos, pero a diferencia de otros lechos vasculares, el endotelio de los vasos de la retina no es fenestrado, presenta uniones estrechas y baja permeabilidad (Xia & Rizzolo, 2017). La baja permeabilidad del endotelio vascular retiniano se altera en la condición diabética que ocasiona daños en su estructura y fisiología que desencadena la progresión hacia la RD y el EMD.

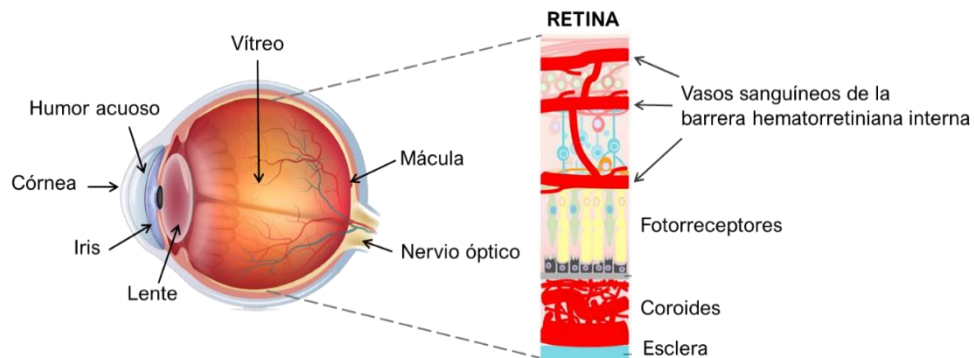


Figura 1. Anatomía del ojo y estructura de la retina. (Esquema modificado de Xia & Rizzolo, 2017).

2.4. Clasificación y etiología de la RD

La diabetes afecta a todo el ojo, los anexos oculares, la vía neurosensorial y el sistema de motilidad ocular, sin embargo, la afección más severa que conlleva a la pérdida de visión se debe a complicaciones microvasculares de la retina (Stewart, 2017c). La RD es una patología de la microvasculatura de la retina derivada de alteraciones a nivel estructural y funcional de los vasos sanguíneos que genera disminución de la capacidad visual y, eventualmente ceguera (Cheung et al., 2010).

La RD se clasifica en no proliferativa (RDNP) y proliferativa (RDP). La RDNP se caracteriza por flujo sanguíneo alterado e incremento de la permeabilidad vascular que conduce a la formación hemorragias y edema, el engrosamiento de la lámina basal de los capilares, así como la muerte y desprendimiento de pericitos y de células endoteliales que genera capilares acelulares, oclusión capilar y por ende a la formación de zonas de isquemia e hipoxia (Durham & Herman, 2011). La hipoxia estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes (angiogénesis), característica de la RDP (**Fig. 2**) (Frank, 2009).

Clínicamente, las manifestaciones de la RD incluyen la formación de microaneurismas, exudados duros (depósitos lipídicos) y algodinosos y, en estados avanzados, la proliferación de los vasos sanguíneos los cuales son frágiles y frecuentemente se rompen produciendo hemorragias vítreas que interfieren con la visión y conducen a la generación de tejido fibroso que al ejercer tracción sobre la retina la desprende y ocasiona ceguera irreversible (Antonetti et al., 2021). Además, se ha descrito que conforme incrementa la severidad de la RD, aumenta el riesgo de desarrollar EMD; pues existe correlación con la localización de la permeabilidad vascular, el grado del engrosamiento de la retina y el desarrollo del EMD (Gardner et al., 2009).

La etiología de la RD es compleja, pues están involucrados múltiples factores como la hiperglucemia, la duración de la DM, la hiperlipidemia y la hipertensión arterial

(Nguyen et al., 2009; Sasongko et al., 2012). Estudios epidemiológicos muestran que un buen control de la glucosa sanguínea y la hipertensión arterial previenen el desarrollo y progresión de complicaciones vasculares asociadas a la diabetes, pero no eliminan del todo el riesgo de padecer RD (King et al., 1999; Stewart, 2017c). Se sabe que una proporción de diabéticos con buen control glucémico y/o de presión arterial, no desarrollan RD (Keenan et al., 2007) mientras que otros pacientes con el mismo buen control desarrollan estados graves del padecimiento (Zhang et al., 2001). Esto podría indicar la participación de otros factores como la obesidad, la resistencia a la insulina y la inflamación que han sido asociados a la disfunción del endotelio vascular en complicaciones como la nefropatía diabética (Sasongko et al., 2012).

El entendimiento de los mecanismos patofisiológicos que subyacen a la RD está en constante avance, pero se acepta que la hiperglicemia crónica es fundamental para iniciar alteraciones bioquímicas en la microvasculatura de la retina que conllevan al desarrollo del padecimiento (Matthews et al., 2004). Se ha propuesto que la alteración en las rutas bioquímicas del metabolismo de la glucosa por efecto de la hiperglicemia, desencadena alteraciones vasculares en la retina (Cohen & Gardner, 2016). Estas rutas incluyen la vía de la aldosa reductasa (vía de los polioles), la activación de la vía de la proteína quinasa C (PKC), la glicación no enzimática y la generación de productos finales de glicación avanzada o AGEs (Advanced Glycation End products) (Brownlee, 2005; Cohen & Gardner, 2016), así como el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS; Reactive Oxygen Species) y estrés oxidativo (Cheung et al., 2010).

En conjunto la hiperglucemia, los AGEs, ROS y el estrés oxidativo, así como la generación de citocinas proinflamatorias, estimulan en la retina diabética la sobreproducción de moléculas pro-angiogénicas como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el VEGF (Antonetti et al., 2021).

El VEGF es el factor más relevante asociado al incremento de la vasopermeabilidad retiniana, la disrupción de la barrera hematorretiniana y la neovascularización (Antonetti et al., 2021; Simó et al., 2014). De hecho, en la retina diabética, la alteración del flujo sanguíneo genera zonas de isquemia e hipoxia que activan al factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α) responsable de incrementar la transcripción y expresión del VEGF (Simó et al., 2014).

El VEGF actúa a través de su receptor tipo 2 (VEGFR-2) que está presente en el endotelio vascular retiniano (Gupta et al., 2013), activando a la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS). La eNOS es una enzima dependiente de Ca²⁺/Calmodulina activada por la liberación de calcio intracelular, tras la activación de la fosfolipasa C (PLC) (Gélinas et al., 2002), una vez activada produce óxido nítrico (NO). El NO promueve la vasodilatación, la vasopermeabilidad y la angiogénesis. Ratones nulos para el gene de la eNOS, mostraron una extravasación significativamente reducida de albúmina sérica bovina en la piel, así como angiogénesis reducida en respuesta a la administración de VEGF (Fukumura et al., 2001). Pacientes con RD y modelos de diabetes en ratas (Gong et al., 2013) presentan niveles intraoculares elevados de VEGF (Adamis et al., 1994; Funatsu et al., 2002), lo que ha motivado la búsqueda de moléculas dirigidas a contrarrestar el efecto del VEGF.

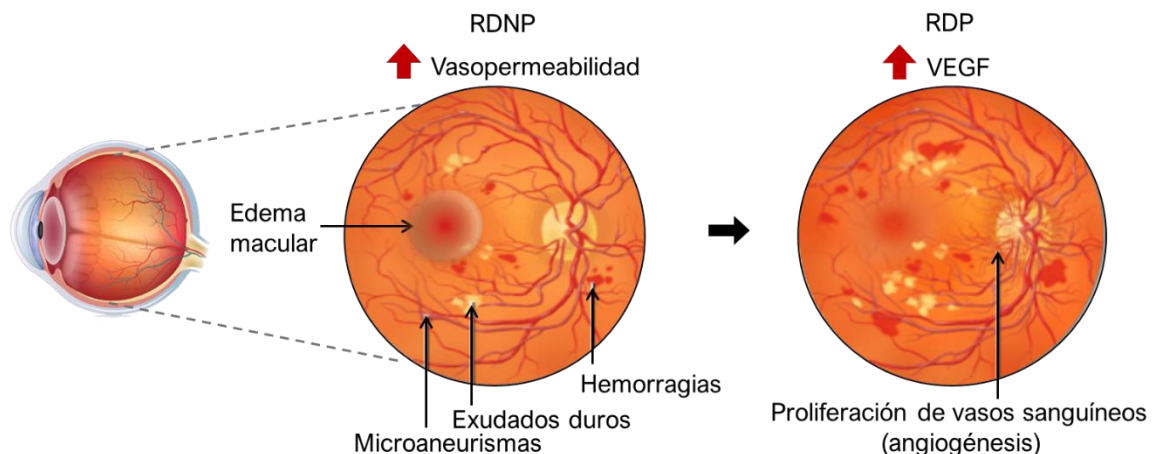


Figura 2. Principales alteraciones de la microvasculatura de la retina derivadas de la diabetes asociados al desarrollo de la RD no proliferativa (RDNP) y su progresión hacia RD proliferativa (RDP).

2.5. Terapias de la RD

Los tratamientos convencionales de la RD incluyen a la fotocoagulación láser, la vitrectomía y las terapias intraoculares anti-angiogénicas y anti-inflamatorias (Tomita et al., 2021). La fotocoagulación láser ha sido el tratamiento ocular estándar en pacientes con RDP por más de tres décadas (Frank, 2009). Este tratamiento consiste en la aplicación de láser para generar pequeñas quemaduras en zonas discretas de la retina con el propósito, entre otros, de eliminar el tejido isquémico productor de factores pro-angiogénicos. Si bien este procedimiento reduce el avance de la enfermedad en el 50% de los casos, no revierte las lesiones y es por sí mismo destructivo (Gupta & Gupta, 2015).

La vitrectomía consiste en sustituir quirúrgicamente una porción o la totalidad del vítreo. Se lleva a cabo en estados avanzados de las hemorragias vítreas o del desprendimiento de la retina. El inconveniente de este tratamiento es que aumenta el riesgo de formación de cataratas en un 44% y de la neovascularización del iris (Stefánsson, 2009). Aunque la fotocoagulación con láser y la vitrectomía presentan una tasa de éxito elevada es decir, por arriba del 50 % (Evans et al., 2014; Sharma et al., 2016), pueden requerir intervenciones sucesivas (en el caso del láser) y son procedimientos altamente invasivos (Fong et al., 2007).

Dado que la RDP está determinada por la angiogénesis, un tratamiento efectivo es la terapia anti-angiogénica intravítrea. Generalmente se administran de manera intraocular moléculas dirigidas a bloquear el efecto del VEGF, como anticuerpos anti-VEGF, RNA de interferencia contra el VEGF (Reich et al., 2003) o receptores solubles de VEGF (Bainbridge et al., 2003). Este tratamiento es efectivo en el 70-80% de los casos, sin embargo, su eficacia suele ser temporal y su uso a largo plazo puede conducir a la neurodegeneración de la retina y aumentar el riesgo de alteraciones vasculares coroideas. Además, existe la preocupación de que el fármaco inyectado a nivel intraocular ingrese hacia la circulación sistémica causando

algún efecto colateral sistémico, por lo que es indispensable la vigilancia clínica de estas terapias oculares (Cheung et al., 2014).

Por lo tanto, uno de los objetivos de la investigación en este campo, es la búsqueda de nuevas moléculas o tratamientos que no sólo contrarresten los estados de la RD sino que prevengan el inicio de las alteraciones vasculares retinianas determinantes del padecimiento. Al respecto, la vasoinhibina posee efectos inhibitorios sobre la vasopermeabilidad, la vasodilatación y la angiogénesis ocular (Clapp et al., 2008) y puede contrarrestar la acción no solamente del VEGF si no de otros factores angiogénicos (Arredondo Zamarripa et al., 2014; García et al., 2008).

2.6. Eje PRL-vasoinhibina

La PRL es una hormona proteica, sintetizada y secretada mayoritariamente por células especializadas de la glándula pituitaria anterior, los lactótrofos (Ben-Jonathan et al., 1996). Esta hormona se identificó por sus efectos estimuladores de la producción de leche en los mamíferos (Freeman et al., 2000), no obstante, hasta ahora se le han encontrado más de 300 acciones biológicas que involucran efectos en la reproducción, el desarrollo, el crecimiento, el metabolismo, la función cerebral, la respuesta inmune, la osmorregulación y la angiogénesis (Ben-Jonathan et al., 2006; Clapp et al., 2009; Freeman et al., 2000). Esta diversidad funcional se debe, en parte, a que la síntesis y secreción de PRL no es exclusiva de la hipófisis, también ocurre en órganos y tejidos extra-hipofisarios como la placenta, el epitelio mamario, las células del sistema inmunológico (leucocitos), el útero, el endometrio, el cerebro, la próstata, el tejido adiposo, el cartílago articular y el propio endotelio vascular (Ben-Jonathan et al., 1996; Clapp et al., 2008; Corbacho et al., 2002; Y Macotela et al., 2006). Además, la diversidad funcional de la PRL se apoya en la distribución ubicua de su receptor (Bole-Feysot et al., 1998) y en la heterogeneidad estructural de la proteína que resulta de modificaciones postraduccionales como la derivada de la proteólisis enzimática.

Proteasas como la catepsina D (Piwnica et al., 2006), diferentes tipos de metaloproteasas de matriz (MMPs) (Y Macotella et al., 2006), la proteína morfogénica de hueso tipo-1 (BMP-1) (Ge et al., 2007) y la trombina (Zamora et al., 2021) cortan a la PRL en fragmentos de tamaños variables (5.7-18 kDa) los cuales contienen a la región amino-terminal (N-terminal) de la hormona. Estos fragmentos, poseen efectos inhibitorios sobre la función vascular que no están presentes en la molécula completa de PRL y que permitieron su denominación como 'vasoinhibina' (Clapp et al., 2006).

La conversión de PRL a vasoinhibina depende del nivel de la producción de la PRL hipofisaria, así como de la actividad de las proteasas convertidoras presentes tanto en los tejidos productores, como en los tejidos blanco. Estas observaciones condujeron al planteamiento de un nuevo eje endócrino, **el eje PRL-vasoinhibina** a través del cual, la PRL se convierte a una nueva hormona 'la vasoinhibina' por mecanismos que tienen lugar en el hipotálamo, la hipófisis y los órganos blanco (**Fig. 3**) (Triebel, Bertsch, et al., 2015).

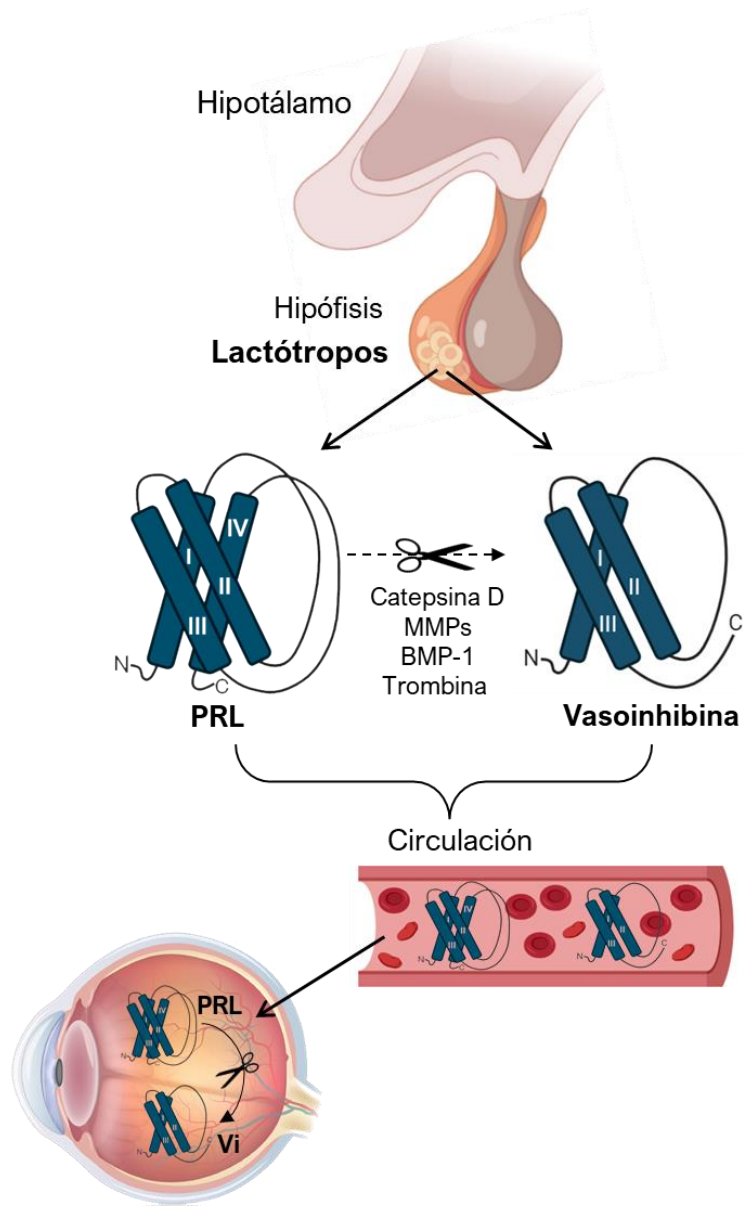


Figura 3. Eje PRL-vasoinhibina. Esquema modificado de Triebel et al., 2015.

2.7. Efectos de la vasoinhibina

La vasoinhibina representa un potente regulador natural de la vasopermeabilidad y la angiogénesis. En el ojo sano, la angiogénesis está altamente restringida, pues estructuras como la córnea, el cristalino, el vítreo y la región externa de la retina son avasculares, esto les confiere la transparencia necesaria para la visión (Beebe, 2008). La vasoinhibina participa en la restricción fisiológica de la angiogénesis ocular, pues está presente en la retina en condiciones fisiológicas y su inactivación

mediante la inyección intravítrea de anticuerpos que la inmuno-neutralizan, estimula la angiogénesis local (Aranda et al., 2005). También se ha demostrado que la administración intravítrea de vasoinhibina inhibe la vasopermeabilidad retiniana inducida por VEGF (García et al., 2008) y bradicinina (Arredondo Zamarripa et al., 2014); y que la inyección intravítrea de virus adenoasociados que transducen a la vasoinhibina previene (Ramírez et al., 2011) y revierte (Díaz-Lezama et al., 2016) el desarrollo de la retinopatía diabética experimental.

La posibilidad de que la PRL circulante sea fuente de la vasoinhibina ocular, se sustenta en que la PRL radioactiva inyectada de manera intracardiaca se localiza en la coroides, la retina y los cuerpos ciliares de la rata (O'Steen & Sundberg, 1982) indicando que esta hormona puede atravesar la barrera hemato-ocular. Además, los cuerpos ciliares y el epitelio pigmentado retiniano (EPR) expresan al receptor de la PRL (Arnold et al., 2010; Meléndez García et al., 2016) y pueden representar un mecanismo para el transporte activo de la hormona al interior del ojo. El trabajo de Arnold y colaboradores, mostró que la elevación crónica de los niveles circulantes de PRL mediante la colocación de implantes de glándulas hipofisarias en la cápsula renal de ratas receptoras, se asocia con un aumento en la vasoinhibina retiniana y con una disminución en la vasopermeabilidad que tiene lugar en la retina de ratas diabéticas (Arnold et al., 2010). Estos hallazgos sugieren que la hiperprolactinemia puede tener valor terapéutico en la RD a través de favorecer el incremento intraocular de la vasoinhibina. En apoyo a esto, estudios clínicos han mostrado que los niveles de PRL y los de la vasoinhibina están disminuidos en pacientes con RD (Arnold et al., 2010; Triebel et al., 2009) y que altos niveles de PRL circulante se asocian con un menor riesgo de padecer diabetes y sus complicaciones (Wang et al., 2013, 2016).

2.8. Sulpirida

La sulpirida es una benzamida que bloquea selectivamente a los receptores tipo D2 de la dopamina en el sistema nervioso central y en el tracto gastrointestinal (Rossi &

Forgione, 1995). Inicialmente fue medicada como un antipsicótico y antidepresivo a dosis elevadas (200-3,200 mg/día) (Caley & Weber, 1995) pero a dosis menores (50-75 mg/día) la sulpirida tiene efectos antieméticos, anti-dispépticos y procinéticos (Mansi et al., 1995) y es recomendada a pacientes diabéticos que frecuentemente presentan estos problemas digestivos (Kashyap & Farrugia, 2010). El bloqueo de los receptores D2 de la dopamina favorece la acción colinérgica sobre la musculatura lisa del tracto digestivo y con ello la motilidad gastrointestinal (Mansi et al., 1995).

Está bien documentado que los fármacos anti-dopaminérgicos tienen como efecto secundario elevar los niveles circulantes de la hormona PRL (Haddad et al., 2001). La dopamina es el principal inhibidor hipotalámico de la síntesis y secreción de PRL vía su acción sobre receptores tipo D2 presentes en los lactótrofos hipofisarios (Freeman et al., 2000). Por lo que, al antagonizar el efecto inhibitorio de la dopamina, se tiene como resultado un incremento en la secreción de la PRL a la circulación (hiperprolactinemia). Estudios en animales han mostrado el efecto hiperprolactinérmico del tratamiento crónico con sulpirida (Baptista et al., 2002; Debeljuk et al., 1975).

Los efectos negativos de la hiperprolactinemia incluyen turgencia y crecimiento mamario (ginecomastia), galactorrea, anovulación y disminución de la libido (Majumdar & Mangal, 2013). Sin embargo, Lozano y colaboradores reportaron que de 342 pacientes que recibieron levosulpirida (forma levógira de la sulpirida) 75 mg/día de manera oral durante 4 semanas, sólo 11 pacientes presentaron galactorrea leve y ningún paciente tuvo que dejar el estudio por esta causa (Lozano et al., 2007). Esto sugiere que los efectos adversos derivados de la hiperprolactinemia por el tratamiento de la levosulpirida son menores.

Actualmente está en curso un ensayo clínico que investiga el efecto benéfico de elevar los niveles circulantes de PRL mediante el tratamiento oral de la forma levógira de la sulpirida (levosulpirida), en pacientes con RDP (ClinicalTrials.gov. ID NCT0361652) del cual ya se han publicado resultados (Robles-Osorio et al., 2018).

Al respecto, el tratamiento con levosulpirida por dos semanas (75 mg/día) elevó a la PRL sistémica y a la PRL en el vítreo de pacientes con RDP comparado con las muestras de pacientes que recibieron el placebo (101 ± 13 vs. 9.2 ± 1.3 ng/ml PRL en suero y 3.2 ± 0.4 vs. 1.5 ± 0.2 ng/mL de PRL en vitreo). Se encontró que el vítreo de pacientes con levosulpirida tuvo un efecto inhibitorio sobre la proliferación de células HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) en cultivo inducido por FGF y VEGF y dicho efecto anti-angiogénico se redujo cuando se administraron anticuerpos para inmuno-neutralizar a la vasoinhibina lo que demuestra la presencia de una vasoinhibina bioactiva presente en el vítreo. Además se reportó que el vítreo de pacientes con RDP tiene actividad proteolítica capaz de convertir la PRL hacia vasoinhibina (Nuñez-Amaro et al., 2020). Estos hallazgos muestran que la levosulpirida incrementa los niveles intraoculares de vasoinhibina en pacientes con RD y, por ende, sugieren el posible valor benéfico de este medicamento. Sin embargo, aún no concluye el estudio clínico y se desconoce si la levosulpirida protege o no contra la progresión de la RD y el EMD.

En este sentido y de acuerdo con todos los antecedentes, en este proyecto investigamos en animales de experimentación el efecto de la sulpirida (la forma racémica de la levosulpirida) sobre la vasopermeabilidad de la retina inducida por diabetes o por la administración intravítrea de VEGF y si este efecto depende de la generación de vasoinhibina intraocular motivada por la hiperprolactinemia farmacológica. La valoración del efecto de este fármaco sobre la RD experimental complementará lo obtenido en el ensayo clínico, y nos acercará a la obtención de un nuevo tratamiento vía el eje PRL-vasoinhibina.

3. JUSTIFICACIÓN

La retinopatía diabética representa una de las principales causas de ceguera irreversible a nivel mundial. México ocupa el séptimo lugar en el mundo con más de 14 millones de personas con diabetes y con un porcentaje de incidencia de RD mayor a los datos globales (71.4 %). Los tratamientos actuales para la RD son invasivos, de administración periódica, no siempre eficaces y pueden presentar efectos secundarios, por lo que es necesario identificar nuevos blancos terapéuticos. La manipulación del eje PRL-vasoinhibina posee potencial terapéutico en la RD. Esta tesis evaluó el efecto de la hiperprolactinemia inducida por el medicamento sulpirida (un antagonista dopaminérgico de uso clínico para tratar trastornos gastrointestinales, como la gastroparesis que frecuentemente ocurre en la diabetes), con el propósito de que el incremento en la PRL sistémica se traduzca en la acumulación de vasoinhibina en la retina, capaz de inhibir las alteraciones vasculares causadas por la condición diabética o por el VEGF.

4. HIPÓTESIS

La hiperprolactinemia inducida por la sulpirida eleva los niveles intraoculares de la vasoinhibina y, por ende, reduce el aumento de la vasopermeabilidad en la retina de ratas diabéticas.

5. OBJETIVOS

5.1. Determinar si la hiperprolactinemia inducida por sulpirida eleva los niveles de la vasoinhibina en la retina y reduce el aumento de la vasopermeabilidad retiniana en ratas diabéticas.

5.2. Evaluar el efecto de la sulpirida sobre la administración intravítrea de VEGF en ratas no diabéticas.

5.3. Analizar si el efecto de la sulpirida sobre la vasopermeabilidad retiniana en ratas diabéticas, es mediado por la hiperprolactinemia y su conversión de vasoinhibina en la retina, a través de compararlo con el tratamiento de PRL exógena.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. PRL y vasoinhibina

Se utilizó PRL recombinante de rata (AFP878) y PRL ovina (10692C) que fueron obtenidas del National Hormone and Pituitary Program (NHPP) y el Dr. A.F. Parlow (Harbor-University of California, Los Angeles, CA). El estándar de vasoinhibina de 16 kDa fue generado mediante el corte proteolítico de la PRL recombinante de rata incubada con extracto de glándula mamaria, como se ha reportado previamente (Clapp, 1987).

6.2. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar entre 7 a 8 semanas de edad (250-300 g de peso). Todos los animales se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM Campus-Juriquilla bajo condiciones estándares (24 °C, ciclo 12 h luz/12 h oscuridad y comida y agua *ad libitum*). Todos los experimentos fueron autorizados por el Comité de Ética del Instituto de Neurobiología. Al final de cada experimento, los animales se manipularon mimetizando las condiciones a emplear durante el sacrificio para evitar el incremento en los niveles de PRL debido a estrés (Seggie & Brown, 1975).

6.2.1. Sulpirida

Se usó sulpirida inyectable (50 mg/ml, Dogmatil, SANOFI®) y solución salina (0.9% NaCl) como control. Para conocer la dosis adecuada de sulpirida para inducir hiperprolactinemia, se evaluó el efecto en ratas sanas de la inyección intraperitoneal (i.p.) de 3 diferentes dosis (5, 10 y 20 mg/kg) de sulpirida administradas diariamente por 5 días. Las ratas fueron sacrificadas bajo exposición a una atmósfera de CO₂ y decapitación y los sueros se almacenaron a -70 °C para la posterior determinación de PRL.

6.2.2. Modelo de diabetes inducido por estreptozotocina (STZ)

La STZ es un fármaco con propiedades antibióticas y antineoplásicas por su actividad citotóxica que resulta en la destrucción selectiva de las células β del páncreas productoras de la hormona insulina, por lo que se utiliza para generar DM experimental tipo 1 (Abdollahi & Hosseini, 2014). La inyección i.p. de una sola dosis de STZ en la rata, induce diabetes a los 2 a 4 días posteriores a su administración, que se manifiesta por niveles permanentemente altos de glucosa en sangre (≥ 250 mg/dL) y la disminución de insulina circulante (Akbarzadeh et al., 2007; Furman, 2015). Para este proyecto, las ratas fueron sometidas a ayuno por la noche e inyectadas al día siguiente con una única dosis i.p. de STZ (60 mg/kg, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) o de vehículo (buffer de citratos 10 mM, pH 4.5). Los animales con niveles de glucosa en sangre ≥ 250 mg/dL se consideraron diabéticos.

6.2.3. Tratamiento con sulpirida

A las 4 semanas posteriores a la inducción de diabetes (post-STZ), las ratas diabéticas y no diabéticas recibieron una inyección i.p. diaria de sulpirida (20 mg/kg) o vehículo (0.9% NaCl) por dos semanas.

6.2.4. Tratamiento con PRL

A las 4 semanas post-STZ, las ratas diabéticas y no diabéticas fueron o no implantadas subcutáneamente con una bomba osmótica (Alzet, modelo 2002; CURECT Corp., Cupertino, CA) que liberó continuamente PRL ovina a razón de 0.16 mg/kg/día por dos semanas. Los controles fueron sometidos al estímulo de la cirugía (grupo "Sham").

Los animales se distribuyeron en forma aleatorizada antes de recibir los tratamientos y el peso corporal y la glucosa sanguínea (obtenida de la vena de la cola) se evaluó una vez a la semana para determinar posibles diferencias en su estado de salud. Al final de cada experimento (6 semanas post-STZ), los animales se sacrificaron bajo exposición a una atmósfera de CO₂ y decapitación, se colectaron los sueros y las

retinas. Otros animales fueron sometidos al ensayo *in vivo* de azul de Evans para evaluar la vasopermeabilidad de la retina.

6.3. Cuantificación de PRL en suero

6.3.1. ELISA

La PRL endógena se cuantificó en el suero mediante el método de ELISA previamente publicado (Guillou et al., 2015). Brevemente, placas de 96 pozos se adicionaron con 50 μ l de anticuerpo de captura anti-PRL de rata (AFP65191/Guinea Pig) a una dilución 1:1000 y se incubaron toda la noche a 4°C sin agitación. Al día siguiente, se lavó el exceso de anticuerpo, se adicionó leche al 5% en buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.4 y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Se agregaron concentraciones crecientes (0-2ng/mL) de PRL recombinante de rata (curva estándar); y se utilizaron diferentes diluciones de las muestras séricas, a saber: muestras de suero control sin sulpirida (1:10) y con sulpirida (1:200) y sueros de las ratas diabéticas tratadas con sulpirida (1:50). Las placas se incubaron por 2 h a TA. Al cabo de este tiempo, se adicionó el anticuerpo de detección (anti-PRL de ratón; Dr. Frank Talamantes, Universidad de California, Santa Cruz, CA) por 2 h a TA seguido del anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (anti rabbit, IgG, Fisher Scientific; NA934) por 1 h a TA. La detección de la reacción empleó el sustrato de la peroxidasa, o-fenilenediamina, que en presencia del anticuerpo secundario adherido produce una reacción colorimétrica. El nivel de reacción se determinó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 490 nm y 650 nm. La concentración de la PRL en los sueros se determinó interpolando los valores de densidad óptica con respecto a la curva estándar. El ELISA mostró la sensibilidad reportada de 0.2 ng/mL (Guillou et al., 2015).

6.3.2. Bioensayo de Nb2

La PRL ovina presente en el suero de los animales implantados con las bombas osmóticas, se cuantificó mediante el bioensayo de la línea celular Nb2 proveniente de un linfoma de rata Nb2, cuya proliferación es estimulada en forma específica por

la PRL, de acuerdo con el método previamente descrito (Tanaka et al., 1980). Para este ensayo se usó un anticuerpo específico para la PRL ovina (C-3581016789, National Hormone and Peptide Program) que no reacciona con la PRL de la rata.

6.4. Inmunoprecipitación (IP)-Western blot

La PRL y la vasoinhibina fueron evaluadas en el suero de los animales tratados con sulpirida mediante IP-Western blot. Brevemente, 400 µl de suero se incubaron con 2 µl de anticuerpo anti-PRL de rata C-1 [obtenido localmente y caracterizado previamente (Dueñas et al., 1999)] a 4°C toda la noche en NETgel buffer (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM a pH 8.0, Igepal CA-630 al 0.1%, gelatina de piel bovina al 0.25% y acida de sodio al 0.02%). Al día siguiente, las muestras se incubaron por 2 horas con 35 µl de proteína A-sefarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); se lavaron tres veces con NETgel-SDS al 10% y centrifugación (10,000 rpm por 5 min). El precipitado final se adicionó con Laemmli 6X bajo condiciones reductoras, se calentó a 97°C por 10 min y se procesó en geles de poliacrilamida al 15% bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que fueron incubadas con el anticuerpo C-1 (1:500) y el anticuerpo secundario anti-conejo (1:5,000) acoplado a fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 111-055-003, RRID:AB_2337947) y se revelaron con un kit para fosfatasa alcalina (Bio-Rad, Hércules, CA, USA).

6.5. Western blot de extractos de retina

6.5.1. Evaluación de la vasoinhibina retiniana

La vasoinhibina se evaluó en extractos de retina de ratas tratadas con sulpirida o implantadas con las bombas osmóticas que liberaron PRL ovina. Cada retina se homogenizó en 120 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 5 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 50 mM, Na₄P₂O₇ 100 mM, sacarosa 250 mM, Igepal CA-630 al 1%, pH 7.5) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (11697498001; Roche, Basel, Switzerland). La proteína total se cuantificó mediante el método de Bradford. La proteína total (50-80 µg) se procesó bajo condiciones reductoras y

desnaturalizantes (15% SDS-PAGE) y se transfirió a membranas de nitrocelulosa que se incubaron con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la región N-terminal de la PRL de rata (INN-1; 1:500) (Aranda et al., 2005) o de la PRL ovina (4C10) (Scammell et al., 1992). La detección de las proteínas se realizó usando anticuerpos secundarios anti-ratón (1: 5,000) acoplados a fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 115-055-003, RRID:AB_2338528) o acoplados a peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 115-035-003, RRID:AB_10015289. Se reveló a la β -tubulina como control de carga (Abcam Cat# ab6046, RRID: AB_2210370). Las membranas fueron digitalizadas y la densitometría de las bandas se analizó mediante el software Quantity One 1-D (Bio-Rad, Hércules, CA, USA).

6.5.2. Evaluación de albúmina en la retina

Se evaluó a la albúmina en la retina de ratas diabéticas tratadas con sulpirida, como índice de vasopermeabilidad. A las 6 semanas post-STZ, las ratas fueron sacrificadas mediante su exposición a una atmósfera saturada de CO₂, perfundidas con PBS pH 7.5 a 37°C por 5 minutos (o hasta que el hígado aclaró su color) y las retinas fueron obtenidas. Quince μ g de proteína total de extractos de retina se procesaron en SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que se incubaron con una dilución 1:1,000 de un anticuerpo anti-albúmina (1:1,000) (Bethyl Cat# A90-134A, RRID:AB_2891982) y de un anticuerpo anti-GAPDH como control de carga (Abcam Cat# ab9485, RRID:AB_307275). La detección de las proteínas se realizó mediante a reacción de fosfatasa alcalina y la densitometría de las bandas se evaluó con el software Quantity One 1-D.

6.6. Ensayo de azul de Evans

Este es un método para cuantificar la vasopermeabilidad retiniana *in vivo*, consiste en la administración sistémica del colorante azul de Evans. Este colorante se une de manera irreversible a las proteínas circulantes (fundamentalmente albúmina) y, por ende, la medición por espectrometría del azul de Evans en extractos tisulares de

animales perfundidos permite cuantificar a la albúmina extravasada como índice de vasopermeabilidad (Xu et al., 2001).

Animales anestesiados con ketamina (70%) y xilacina (30%) i.p. (1 μ l/g de peso corporal) fueron inyectados en la vena yugular con azul de Evans (45 mg/kg; E2129 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), sacrificados dos horas después, y se obtuvo 1 ml de sangre del corazón para estimar la concentración del colorante en el plasma. Inmediatamente después, los animales fueron perfundidos de manera intracardiaca con PBS (pH 3.5 a 37°C) bajo un flujo de 70 ml/minuto. Las retinas se secaron al vacío (SPD 1010 SpeedVac System; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) por 4 h y se pesaron. El colorante azul de Evans extravasado en la retina se extrajo mediante la incubación con 250 μ l de formamida (F7503; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) por 18 horas a 72 °C; la absorbancia del sobrenadante se midió a 620 nm (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). El incremento de la vasopermeabilidad se calculó mediante una curva estándar de azul de Evans en formamida y la concentración del colorante extraído de la retina se normalizó de acuerdo con el valor del colorante en el plasma, el peso de la retina y el peso corporal de la rata.

6.7. Administración intravítrea de VEGF

Ratas no diabéticas fueron tratadas con sulpirida i.p. (20 mg/kg) o vehículo diariamente por 5 días. En el día 4 del tratamiento, se les inyectó de manera intravítrea VEGF (300 ng/ojo) o PBS (estéril, pH 7.5) como vehículo y 24 h después sus retinas se fijaron por 15 min en paraformaldehído al 4%, se lavaron con PBS (pH 7.5) y se montaron sobre portaobjetos con glicerol/PBS al 50%. Las retinas se observaron bajo microscopía de campo claro (4X) y el área de hemorragias se cuantificó mediante el software Image Pro-Plus versión 7.0.0.591 (Media Cybernetics, Inc.).

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism Versión 6.07 (Systat Software, San Jose, CA). La prueba “t” de Student determinó diferencias entre dos grupos. La prueba ANOVA de una vía o dos vías seguida de la prueba post-hoc Tukey evaluó diferencias entre más de dos grupos. Los valores representan el promedio \pm SEM. Se consideraron diferencias significativas para $p < 0.05$.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. La sulpirida induce hiperprolactinemia de manera dosis-dependiente en ratas no diabéticas.

Investigamos la dosis adecuada de sulpirida para inducir hiperprolactinemia en la rata. La inyección diaria i.p. de sulpirida por 5 días indujo una hiperprolactinemia dosis-dependiente (**Fig. 4**). La dosis más alta (20 mg/kg) elevó la PRL sérica (178.1 ± 27.55 ng/ml) a valores similares a los reportados por Debeljuk y colaboradores (186.5 ± 31.5 ng/ml) (Debeljuk et al., 1975) pero superiores a los observados por Baptista et al. (46.2 ± 10.5 ng/ml) (Baptista et al., 2002) en ratas. En humanos, el fármaco tiene su efecto máximo sobre la PRL circulante entre la primera y la tercera h posteriores a su administración y que el efecto desaparece después de 7 a 8 h cuando el medicamento es eliminado por vía renal (McMurdo et al., 1987). Es posible que las diferencias con el grupo de Baptista se deban al tiempo posterior a la última administración del fármaco en que se cuantificó a la PRL sérica. Esta información no se reporta en los estudios citados, pero en este proyecto la evaluación se realizó a las 3 h posteriores a la última inyección. El efecto observado demuestra la consistencia de la hiperprolactinemia inducida por la sulpirida y determinó el uso de la dosis de 20 mg/kg en los experimentos subsecuentes.

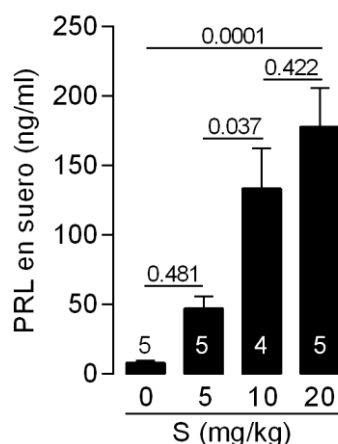


Figura 4. Niveles de PRL en suero en respuesta a diferentes dosis de sulpirida (S) (5, 10, 20 mg/kg) o vehículo (0) inyectadas i.p. una vez al día por 5 días. La PRL fue cuantificada mediante ELISA. Los valores son los promedios \pm SEM. En las barras se indica el número de animales por grupo.

8.2. La PRL sistémica disminuye en la condición diabética.

El valor de la PRL sérica disminuye significativamente a las seis semanas posteriores a la inducción de diabetes con STZ (2.52 ± 0.60 ng/ml vs. 8.13 ± 1.35 ng/ml) (**Fig. 5**). Esta reducción es consistente con reportes previos en la rata (Lemini et al., 2015; Tesone et al., 1985) y en pacientes (Wang et al., 2013). Se ha sugerido que el decremento de los niveles de PRL sistémica, puede deberse a alteraciones debidas a la diabetes como el incremento del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en la glándula pituitaria de ratas diabéticas. Esta citocina no sólo inhibe la liberación de PRL por los lactótrofos (Lemini et al., 2015; Theas et al., 1998) sino que además, promueve la apoptosis de estas células (Candolfi et al., 2002) vía el incremento de proteínas pro-apoptóticas como la Caspasa 8 (Arroba et al., 2005) que resulta en el decremento de la población de lactótrofos a la cuarta semana después de la inducción de diabetes con STZ en la rata (Arroba et al., 2005, 2006). También se ha descrito que las neuronas túbero-infundibulares (TIDA) hipotalámicas aumentan la liberación de dopamina (el principal factor inhibidor de la liberación de PRL a la circulación) hacia la eminencia media de la pituitaria anterior en la rata diabética, y éste incremento en dopamina está relacionado con la disminución en la secreción de PRL por los lactótrofos (Boujon et al., 1995).

La vasoinhibina también disminuye en el suero de pacientes diabéticos (Triebel et al., 2009), posiblemente debido a los bajos niveles de PRL sistémica así como al aumento en la excreción de PRL debido daño renal causado por la condición diabética (Triebel, Moreno-vega, et al., 2015).

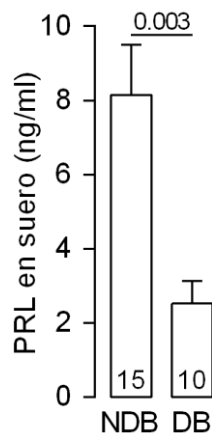


Figura 5. PRL en suero de ratas no diabéticas (NDB) y diabéticas (DB) a la sexta semana post-STZ. La PRL fue cuantificada por ELISA. Los valores son los promedios \pm SEM. En las barras se indica el número de animales por grupo.

8.3. La sulpirida aumenta los niveles circulantes de PRL en ratas diabéticas y no diabéticas

El tratamiento con sulpirida por dos semanas a partir de la cuarta semana post-STZ produjo un mayor aumento ($p = 0.0001$) en la PRL sistémica en los animales no diabéticos que en los animales diabéticos (207.7 ± 9.14 ng/ml vs. $48.09 \pm 5.93.6$) (**Fig. 6A**). La proporción del aumento con respecto al valor basal fue de 21 veces para los animales no diabéticos y de 16 para los diabéticos (**Fig. 6B**). El menor efecto de la sulpirida en la condición diabética, es consistente con la observación de que la STZ promueve la muerte por apoptosis de los lactótopos (Arroba et al., 2006).

Para analizar si la sulpirida también incrementa los niveles de vasoinhbina circulante, investigamos la presencia de vasoinhbina en el suero de las ratas mediante inmunoprecipitación (IP)-Western blot (**Fig. 7**). La IP recuperó la mayor parte de los estándares de PRL y vasoinhbina añadidos al buffer de ensayo, revelados con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la región N-terminal de la PRL, región presente en la vasoinhbina (carriles 1 y 2). Los sueros de las ratas tratadas con sulpirida mostraron el aumento de una proteína inmunorreactiva de 23 kDa (la masa molecular de la PRL) (carriles 6 y 8) comparada con las ratas que recibieron vehículo (carriles 5 y 7) que parece ser mayor en las ratas no diabéticas que en las diabéticas.

Este método confirma el aumento de la PRL sistémica inducido por sulpirida y su mayor magnitud en ausencia de diabetes. No se detectaron proteínas inmunorreactivas más pequeñas, v.g. posible vaso inhibina. La falta de detección de la vaso inhibina podría indicar que su nivel endógeno es menor al límite de sensibilidad de este ensayo (5 ng).

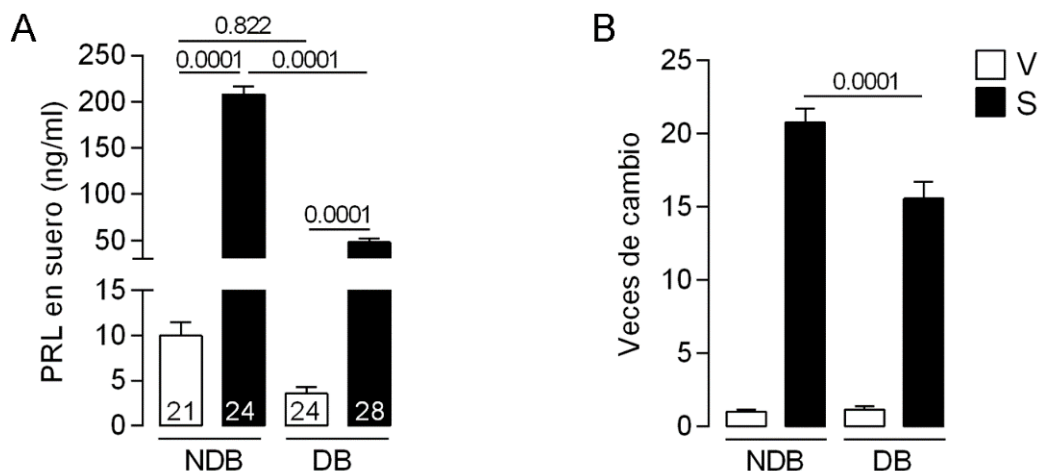


Figura 6. A) Niveles de PRL en suero de ratas no diabéticas (NDB) y diabéticas (DB) tratadas con vehículo (V) o sulpirida (S) diariamente por dos semanas a partir de la cuarta semana post-STZ. La PRL fue cuantificada por ELISA. Los valores son promedios \pm SEM. En las barras se indica el número de animales por grupo. **B)** Las veces de cambio corresponden a la proporción del nivel de PRL sistémica inducido por S sobre el nivel basal de la hormona (V). El número de animales es el indicado en **(A)**.

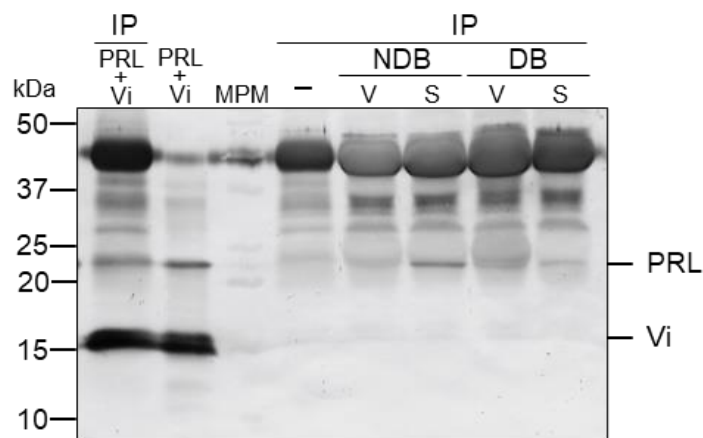


Figura 7. Evaluación de la PRL y vaso inhibina (Vi) por inmunoprecipitación (IP)-Western blot en el suero de ratas no diabéticas (NDB) y diabéticas (DB) tratadas con sulpirida (S) o vehículo (V) diariamente por dos semanas a partir de la cuarta semana post-STZ. De

izquierda a derecha se muestran estándares de PRL y vasoinhibina de rata (PRL+Vi) inmunoprecipitados (IP) o no, marcadores de peso molecular (MPM), y los IP del control negativo sin suero (-), y de los sueros de los grupos experimentales. Los números a la izquierda de la figura indican los pesos moleculares de los MPM en kDa.

8.4. La sulpirida aumenta los niveles de vasoinhibina en la retina de ratas diabéticas.

Para investigar si la hiperprolactinemia inducida por sulpirida resulta en un incremento en la vasoinhibina ocular, evaluamos la presencia de vasoinhibina en extractos de retina provenientes de los grupos experimentales indicados en la Figura 6. El único método disponible para evaluar a la vasoinhibina es el Western-blot y el uso de anticuerpos monoclonales anti-PRL dirigido para reconocer el extremo N-terminal de la molécula presente en la vasoinhibina, ya que no existen anticuerpos que permitan distinguir a la vasoinhibina de la PRL. Encontramos que en las retinas de animales no diabéticos y diabéticos que recibieron sulpirida, aumenta la intensidad de una banda inmunorreactiva de ~16 kDa, comparado con los animales que recibieron vehículo (**Fig. 8A**). Este peso molecular aparente y la reacción con el anticuerpo monoclonal anti-PRL apoya el que dicha proteína corresponde a vasoinhibina. El aumento en la vasoinhibina es consistente con el trabajo de Arnold y colaboradores que mostraron que la hiperprolactinemia inducida por explantes adenohipofisarios se asocia con el incremento de una vasoinhibina de 16kDa en la retina de la rata (Arnold et al., 2010). Es interesante que, a pesar de que la hiperprolactinemia inducida por sulpirida es menor en la diabetes, los niveles de la vasoinhibina en respuesta a la droga son mayores en la diabetes (**Fig. 8B**). Es posible que la alteración de la barrera hemato-ocular que tiene lugar en condición diabética (Antonetti et al., 2012) pueda favorecer una mayor incorporación intraocular de la PRL circulante y, con ello, su conversión a vasoinhibina.

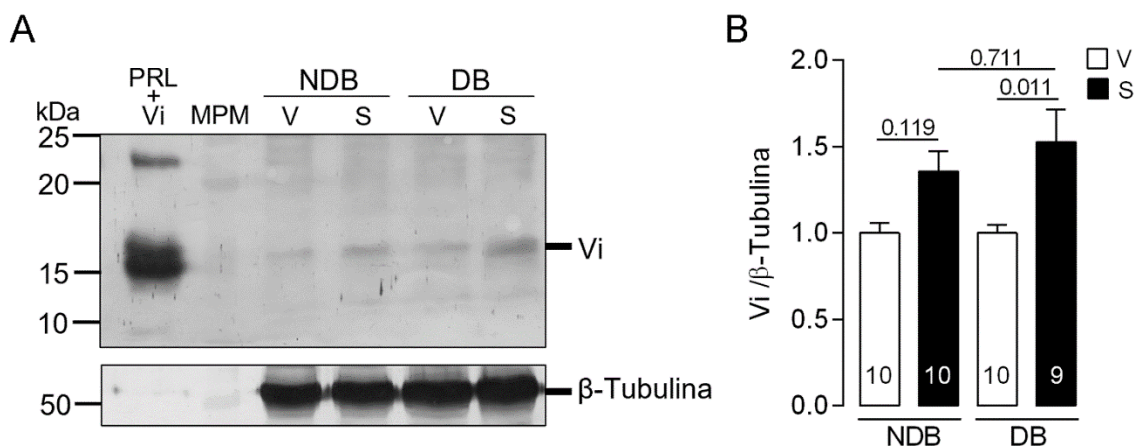


Figura 8. A) Western-blot representativo que muestra proteínas tipo-vasoinhibina (Vi) en lisado de retinas de ratas no diabéticas (NDB) y diabéticas (DB) tratadas con sulpirida (S) o vehículo (V) diariamente por dos semanas a partir de la cuarta semana post-STZ. Se muestra una combinación de estándares de PRL y vasoinhibina de rata (PRL+Vi), marcadores de peso molecular (MPM) seguido de las muestras de retina de los diferentes grupos experimentales. Los números a la izquierda indican los pesos moleculares de los MPM en kDa y a la derecha la Vi y la β -tubulina. **B)** Análisis densitométrico de las bandas de vasoinhibina después de la normalización con respecto a la proteína β -tubulina. Los valores son promedios \pm SEM. Los valores dentro de las barras corresponden al número de retinas evaluadas.

8.5. La sulpirida inhibe el aumento de la vasopermeabilidad retiniana inducida por la diabetes.

Consistentemente con el aumento en la vasoinhibina en la retina, se encontró que la sulpirida inhibe la mayor vasopermeabilidad retiniana causada por la diabetes. La vasopermeabilidad se determinó mediante la cuantificación de la albúmina unida al colorante azul de Evans extravasados en la retina después de una inyección intravenosa del colorante. Como se esperaba la diabetes indujo un incremento significativo de ~ 2 veces en la extravasación de albúmina relativo al grupo no diabético tratado con vehículo, y dicho efecto se inhibió por la sulpirida (**Fig. 9A**). El tratamiento con sulpirida no modificó la vasopermeabilidad basal del grupo control no diabético, lo cual es esperado pues se conoce que la vasoinhibina no modifica la función endotelial basal en ausencia de la acción de sustancias vasoactivas (Clapp et al., 2015). En apoyo a este resultado, evaluamos la albúmina retiniana en extractos de retina mediante Western blot y encontramos que los altos niveles de albúmina

extravasados en las retinas diabéticas fueron también prevenidos por el tratamiento con sulpirida, efecto que también se observó en retinas de ratas no diabéticas (**Fig. 9B**). Las diferencias fueron estadísticamente significativas después de realizar un análisis densitométrico de retinas diferentes (**Fig. 9C**). Estos resultados son novedosos ya que apoyan el potencial terapéutico de la sulpirida en la RD a través de inducir hiperprolactinemia y la consecuente conversión retiniana de PRL a vasoINHIBINA capaz de inhibir el incremento de la vasopermeabilidad debida a la diabetes.

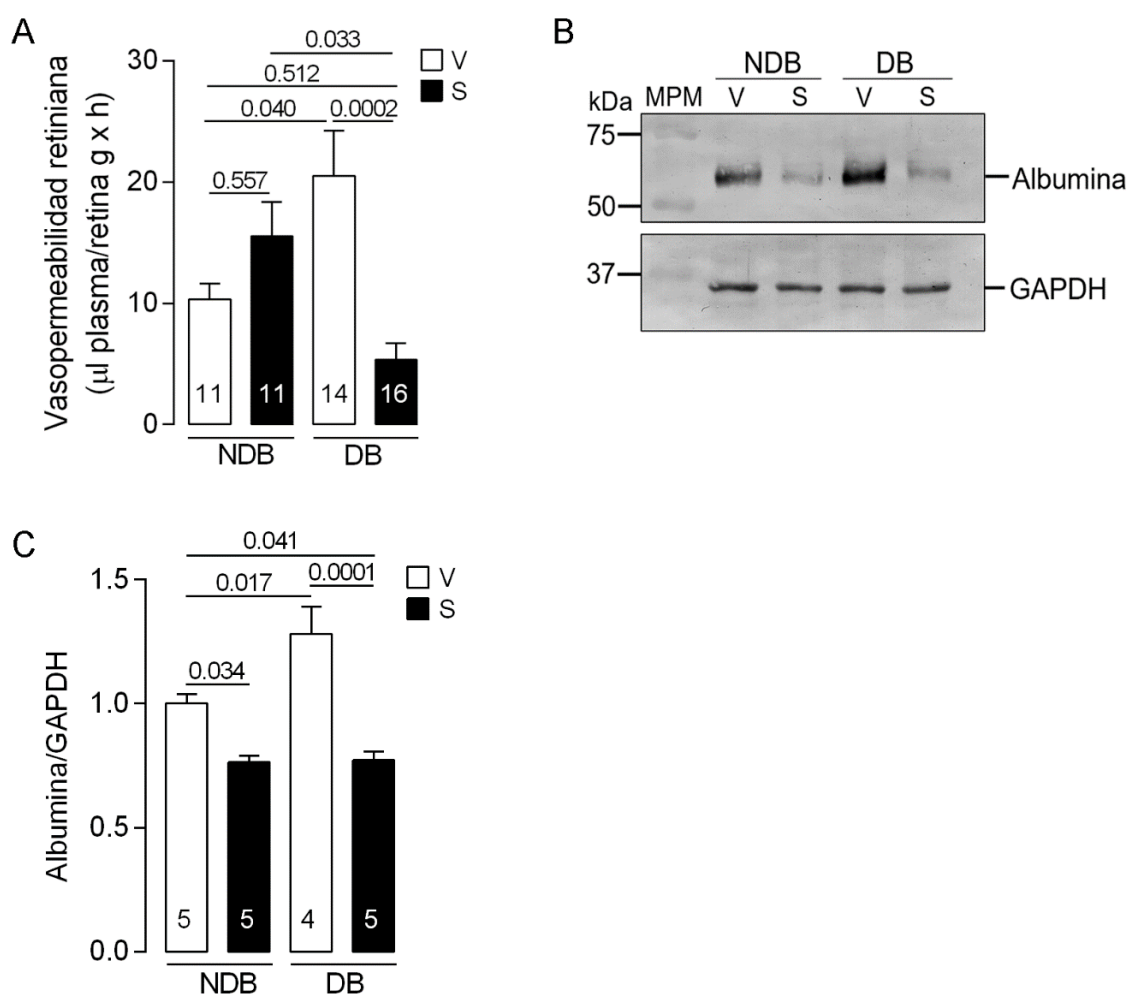


Figura 9. A) Evaluación de la vasopermeabilidad retiniana mediante el ensayo de azul de Evans en ratas no diabéticas (NDB) y diabéticas (DB) tratadas con vehículo (V) o con sulpirida (S) diariamente por dos semanas a partir de la cuarta semana post-STZ. Los valores son promedios ± SEM. En las barras se indica el número de animales por grupo. **B)** Western blot representativo de la albúmina en extractos de retina de ratas NDB y DB

tratadas con V o S. Se muestran los marcadores de peso molecular (MPM) y el peso estimado para la albúmina y la proteína de control de carga GAPDH. **C)** Análisis densitométrico de la albúmina normalizada contra la GAPDH de cada retina. Los valores son promedios \pm SEM. Los números dentro de las barras corresponden al número de retinas evaluadas.

8.6. La sulpirida reduce las hemorragias retinianas inducidas por VEGF.

El VEGF es el principal factor regulador de la permeabilidad vascular en la RD (Simó et al., 2014) y la vasoinhibina inhibe el incremento de la vasopermeabilidad inducido por VEGF (García et al., 2008; Ramírez et al., 2011). Para evaluar si el incremento de vasoinhibina en la retina inducido por sulpirida, inhibe el efecto del VEGF sobre la vasopermeabilidad retiniana, inyectamos VEGF o PBS de manera intravítrea en ratas no diabéticas tratadas con sulpirida o vehículo y, 24 horas después, evaluamos la presencia de hemorragias en montajes planos de retina. Como se esperaba el VEGF generó múltiples hemorragias en la retina (Ramírez et al., 2011), que no se observaron en las retinas inyectadas con PBS, y que prácticamente estuvieron ausentes en los animales tratados con VEGF que recibieron sulpirida (**Fig. 10A**). La sulpirida redujo el área de hemorragias en ~73% (**Fig. 10B**).

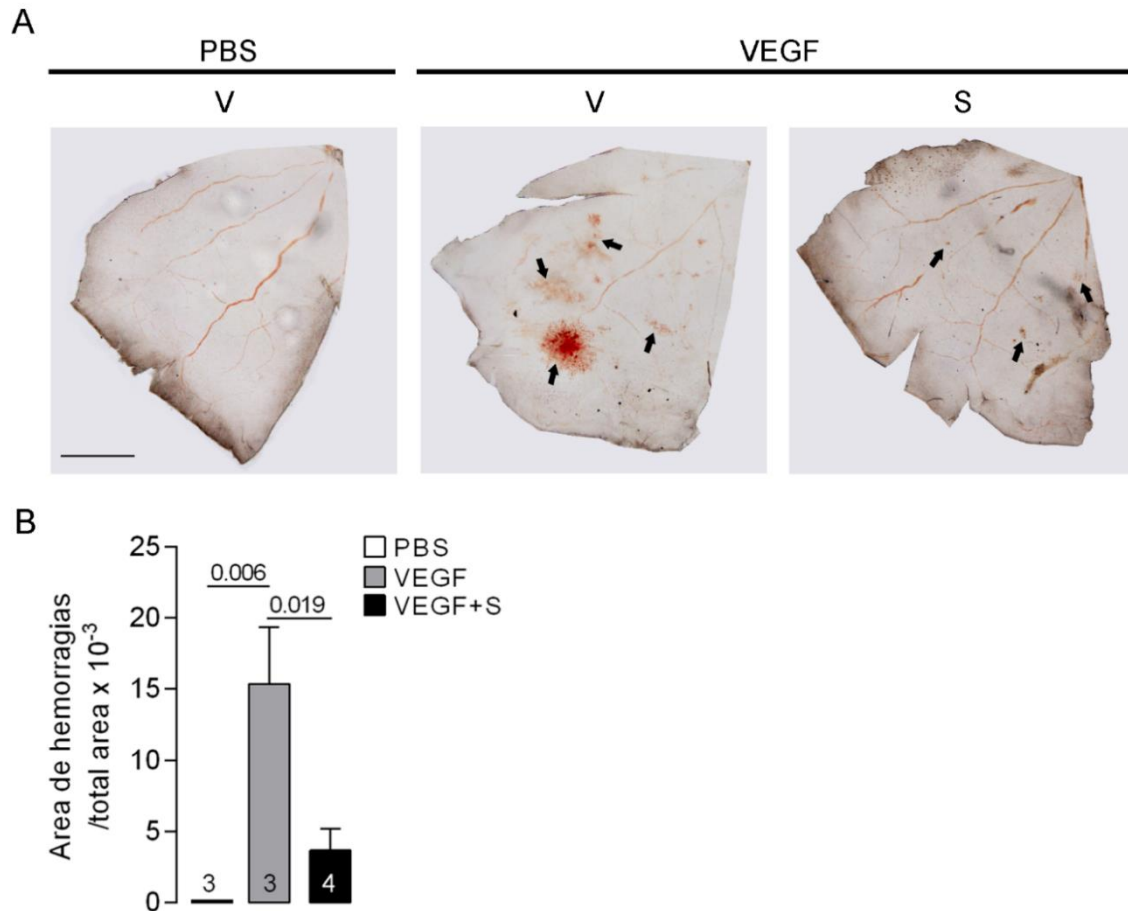


Figura 10. A) Micrografías representativas de una porción del montaje plano de retina 24 h después de la inyección intravítrea de VEGF (300 ng/ojo) o PBS en ratas no diabéticas que fueron pre-tratadas con sulpirida (S) o vehículo por 5 días. Algunas hemorragias están indicadas con las flechas negras. **B)** Cuantificación de las áreas hemorrágicas relativas al área total de la retina. Los valores son los promedios \pm SEM. Los números dentro de las barras corresponden al número de retinas evaluadas.

8.7. El tratamiento con PRL incrementa a la vasoinhibina retiniana e inhibe el aumento de la vasopermeabilidad retiniana causada por la diabetes.

Para analizar si el efecto inhibitorio de la sulpirida es consecuencia de su acción inductora de hiperprolactinemia, el tratamiento con sulpirida fue reemplazado por la administración de PRL exógena. Para lo cual, se implantaron bombas osmóticas subcutáneas que liberan PRL ovina diariamente por dos semanas, a partir de la cuarta semana post-STZ (siguiendo el mismo esquema temporal de tratamiento con sulpirida). La cuantificación de la PRL ovina en el suero mediante el bioensayo de

proliferación celular Nb2 mostró niveles de PRL circulante ~14 veces mayores en las ratas no diabéticas y diabéticas implantadas con las bombas osmóticas (**Fig. 11A**). Los extractos de retinas se analizaron por Western blot y fueron revelados con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la región N-terminal de la PRL ovina que no cruza con la PRL ni la vaso inhibina endógenas de la rata (**Fig. 11B**, carril 3). Asimismo, se comprobó que la PRL y la vaso inhibina de rata, pero no la PRL ovina, reaccionan con el anticuerpo monoclonal contra la región N-terminal de la PRL de rata (carriles 1 y 2). Sólo el extracto de retina de ratas diabéticas con hiperprolactinemia (carril 8) mostró una proteína inmunorreactiva de ~16 kDa que corresponde probablemente a una vaso inhibina derivada del corte de la PRL ovina. Esto tiene sentido ya que las proteasas de rata pueden cortar a la PRL humana, de rata y ovina en vaso inhibina de tamaños similares (Clapp, 1987), además la proteína inmunorreactiva tiene la masa molecular y contiene la región N-terminal de la PRL presente en la vaso inhibina (Zamora et al., 2021).

Consistente con el aumento de vaso inhibina en la retina derivado del tratamiento con PRL exógena, se observó la inhibición de la vasopermeabilidad retiniana en ratas diabéticas con hiperprolactinemia mientras que los animales hiperprolactinémicos no diabéticos no mostraron ningún cambio en la vasopermeabilidad retiniana (**Fig. 11C**). Este hallazgo apoya que el efecto inhibitorio de la sulpirida sobre la vasopermeabilidad retiniana ocurre vía la hiperprolactinemia inducida por el fármaco que favorece la incorporación y procesamiento ocular de la PRL hacia vaso inhibina.

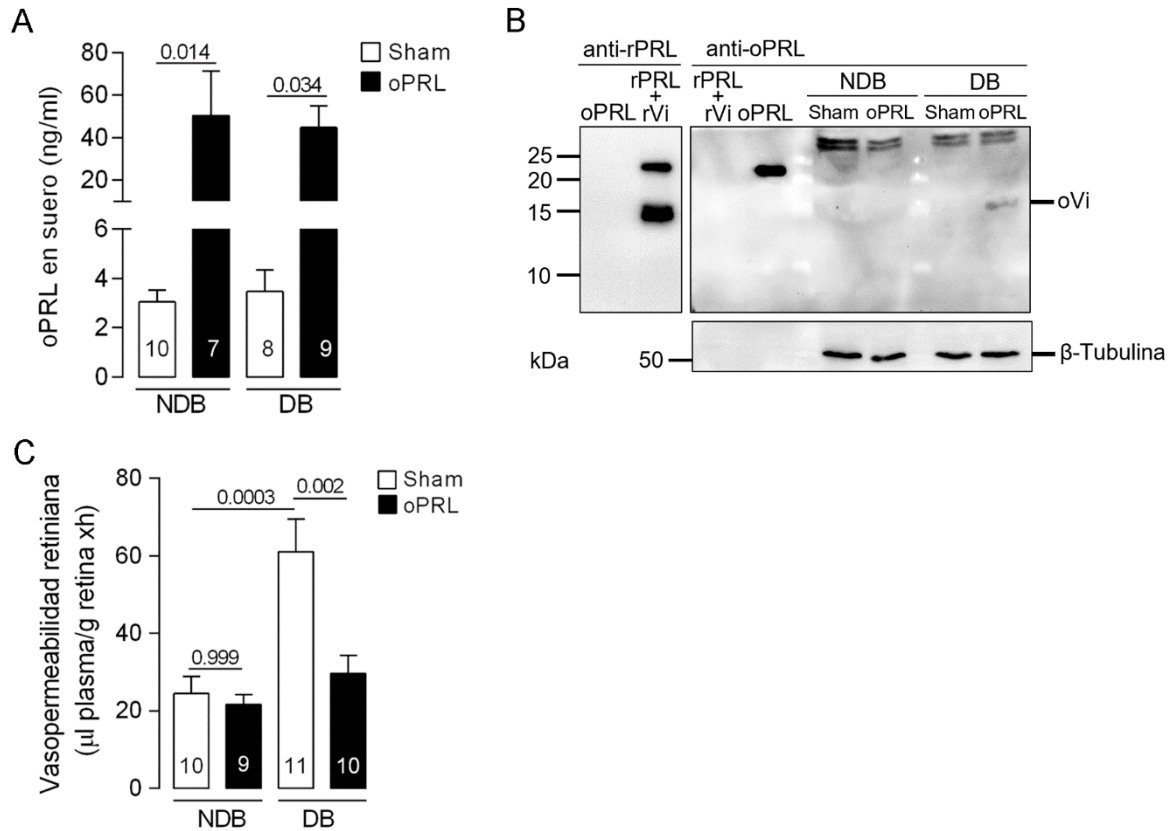


Figura 11. A) Niveles de PRL ovina (oPRL) en suero de ratas no diabéticas (NDB) y diabéticas (DB) implantadas (oPRL) o no (Sham) con bombas osmóticas que liberan oPRL por dos semanas a partir de la cuarta semana post-STZ. La oPRL fue cuantificada mediante el bioensayo Nb2. Los valores son los promedios \pm SEM. Los números dentro de las barras corresponden al número de ratas evaluadas. **B)** Western blot representativo de extractos de retina de ratas NDB y DB implantadas con oPRL o Sham. Los estándares de PRL ovina (oPRL), PRL de rata (rPRL) y vasoinhibina de rata (rVi) fueron revelados con anticuerpos monoclonales anti-PRL de rata o anti-PRL ovina para demostrar que el anticuerpo anti-PRL ovina no reacciona con la PRL y vasoinhibina de rata. Los números a la izquierda indican los pesos moleculares en kDa de marcadores de peso molecular. **C)** Evaluación de la vasopermeabilidad retiniana mediante azul de Evans en ratas NDB y DB implantadas con oPRL o Sham. Los valores son promedios \pm SEM. Los números dentro de las barras corresponden al número de retinas evaluadas.

8.8. El tratamiento con sulpirida o con PRL no modifica los niveles de glucosa sanguínea y el peso corporal.

Para intentar descartar la posible contribución de efectos adversos del fármaco sobre la diabetes y/o la salud de los animales, se evaluaron semanalmente los niveles de glucosa y el peso corporal de los animales en todos los grupos experimentales a lo largo de las 6 semanas de diabetes. Los animales diabéticos mantuvieron niveles de glucosa altos de manera permanente y perdieron peso debido a la diabetes como ha sido reportado en la literatura (Nagarchi et al., 2015). Se encontró que la administración de sulpirida por dos semanas no modificó los niveles de glucosa (**Fig. 12A**) ni el peso corporal (**Fig. 12B**) con respecto a los animales que no recibieron el fármaco. Estos resultados son importantes pues se ha descrito que fármacos antagonistas de los receptores D2 de la dopamina, pueden inducir ganancia de peso en roedores y pacientes, probablemente a través promover hiperfagia (Baptista, 1999; Baptista et al., 1987). No obstante, los resultados aquí obtenidos son consistentes con estudios que reportan la ausencia de efecto crónico de la sulpirida sobre la ganancia de peso en ratas macho (Baptista et al., 2002). Estos datos apoyan que el tratamiento con sulpirida no causa efectos negativos sobre la diabetes y la salud de los animales.

El tratamiento con PRL ovina, mediante el implante de bombas osmóticas por dos semanas tampoco modificó los niveles de glucosa (**Fig. 12C**) ni el peso corporal (**Fig. 12D**) de las ratas, comparado con sus grupos controles respectivos. Esto apoya la ausencia de efectos adversos de la hiperprolactinemia sobre la salud o la condición diabética de los animales.

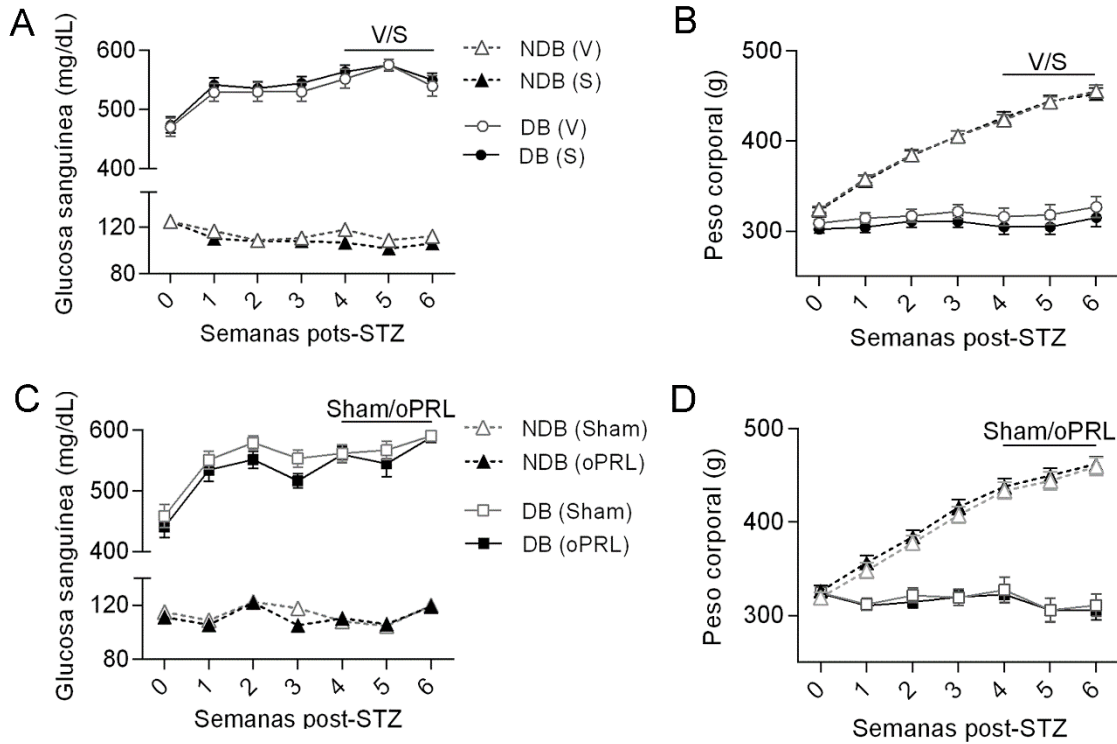


Figura 12. A y C) Valores de glucosa en sangre (mg/dL) a lo largo de las seis semanas post-STZ en ratas no diabéticas (NDB) y diabéticas (DB) tratadas con sulpirida (S) o vehículo (V) o bien, implantadas como bombas osmóticas que liberan PRL ovina (oPRL) o no (Sham). **B y D)** Peso corporal en gramos a lo largo de las seis semanas post-STZ. La línea horizontal por arriba de cada gráfica indica la semana post-STZ en la que se inició la administración de sulpirida o PRL por dos semanas. Los valores son promedios \pm SEM de 21 a 26 ratas por grupo.

9. DISCUSIÓN GENERAL

La hiperglucemia crónica derivada de la DM, causa la pérdida de función y estructura del endotelio vascular de la retina a través de inducir la muerte de células endoteliales y pericitos, lo cual promueve una vasopermeabilidad excesiva de la retina y la acumulación de fluido extracelular generando edema y la formación de exudados duros. Con el tiempo, las hemorragias intra-retinianas, así como la oclusión de los capilares generan áreas de isquemia e hipoxia que conducen a la proliferación de nuevos vasos sanguíneos que invaden y sangran en el vítreo produciendo un tejido fibrovascular que causa el desprendimiento por tracción de la retina y consecuentemente la ceguera (Antonetti et al., 2006, 2021; Durham & Herman, 2011).

Las terapias actuales como la fotocoagulación con láser y la inyección intravítrea de inhibidores de VEGF, son invasivas y parcialmente efectivas, además de que requieren administraciones frecuentes (Boyer et al., 2013), por cual, es importante la búsqueda de nuevas terapias. La vaso inhibina está emergiendo como un factor para la prevención y tratamiento de la RD y el EMD. La vaso inhibina está presente en el ojo sano (Aranda et al., 2005) donde contribuye al estado quiescente de los vasos, ya que la inmuno-neutralización de la vaso inhibina promueve la angiogénesis en la córnea (Dueñas et al., 1999) y la retina (Aranda et al., 2005) y daña la regresión de la vasculatura hialoidea que irriga los tejidos oculares inmaduros (Dueñas et al., 2004). Además, se ha encontrado que los niveles de vaso inhibina circulante están alterados en paciencias con RD (Triebel et al., 2009) y retinopatía del prematuro (Zepeda-Romero et al., 2017). La terapia génica intravítrea para expresar a la vaso inhibina inhibió la angiogénesis inducida por isquemia (Pan et al., 2004) así como el incremento de la vasopermeabilidad inducida por la diabetes o generada por la inyección intravítrea de VEGF (Díaz-Lezama et al., 2016; Ramírez et al., 2011).

La PRL sistémica puede ser fuente de la vaso inhibina ocular ya que la inyección intracardiaca de PRL marcada radioactivamente se incorpora a la retina, la coroides

y los cuerpos ciliares (O'Steen & Sundberg, 1982). Además, fluidos oculares como el líquido subretiniano contienen proteasas que cortan a la PRL a vaso inhibina (Dueñas et al., 2004). La hiperprolactinemia inducida por el implante de dos glándulas pituitarias de ratas donadoras bajo la cápsula renal de ratas receptoras, se asoció con el aumento de vaso inhibina en la retina (Arnold et al., 2010).

En este sentido, la hiperprolactinemia y, por ende, el aumento de vaso inhibina ocular es la base de un ensayo clínico en curso que investiga a la levosulpirida como tratamiento para el EMD y la RD (ClinicalTrials.gov. ID NCT0361652) (Robles-Osorio et al., 2018). Dicho ensayo clínico, ha demostrado que la levosulpirida (forma levógira de la sulpirida) aumenta los niveles de PRL sistémica y la PRL en el vítreo de pacientes con RDP, y que los vítreos de los pacientes que recibieron levosulpirida tienen actividad anti-angiogénica, debida a vaso inhibina, pues inhiben el efecto del FGF y VEGF sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo (Nuñez-Amaro et al., 2020). Sin embargo, la evaluación del efecto de la levosulpirida sobre la progresión del EMD y la RD en la clínica está aún en curso. Este trabajo provee evidencia preclínica que corrobora y sustenta el estudio clínico en proceso a través de mostrar que la hiperprolactinemia inducida por la sulpirida resulta en la acumulación de vaso inhibina en la retina de ratas diabéticas que inhibe las alteraciones vasculares derivadas de este padecimiento.

Como se espera del efecto de un antagonista de los receptores D2 de dopamina, la sulpirida aumentó los niveles de PRL sistémica de manera dosis-dependiente, la dosis más alta de sulpirida elevó a la PRL a valores similares (>100 ng/ml) a los alcanzados con la levosulpirida en el estudio clínico (Nuñez-Amaro et al., 2020). El efecto hiperprolactinémico de la sulpirida fue menor (incremento de 16 vs 21 veces) en la condición diabética comparado con el grupo control de animales no diabéticos. Este resultado no es inesperado ya que se ha reportado que en el modelo de diabetes inducido por STZ tiene lugar la apoptosis de las células productoras de PRL

(lactótrofos) en la glándula pituitaria (Arroba et al., 2003) lo que disminuye los niveles de la PRL circulante (Lemini et al., 2015).

Cuando se evaluó a la PRL por IP-Western blot, encontramos un aumento en la PRL de los sueros de las ratas que recibieron sulpirida, confirmando la hiperprolactinemia observado mediante ELISA; sin embargo, no encontramos un aumento en la vasoinhibina sistémica probablemente debido a que este método no es lo suficientemente sensible para detectar a la vasoinhibina en la circulación (Nuñez-Amaro et al., 2020). En contraste, sí detectamos una proteína tipo-vasoinhibina en lisados de retinas de ratas diabéticas que recibieron sulpirida. La proteína tiene el peso molecular (~16 kDa) y la región N-terminal de la PRL que definen a la vasoinhibina (Zamora et al., 2021). Este resultado es consistente con el ensayo clínico que muestra que la levosulpirida elevó los niveles de una vasoinhibina bioactiva en el vitreo de pacientes con RD (Nuñez-Amaro et al., 2020) y sugiere que la hiperprolactinemia inducida por sulpirida favorece la incorporación de PRL al ojo de animales diabéticos para su procesamiento a vasoinhibina. Consistentemente con el aumento en la vasoinhibina retiniana, la sulpirida inhibió la hipervasopermeabilidad retiniana causada por la diabetes, un efecto conocido de la vasoinhibina (Díaz-Lezama et al., 2016; García et al., 2008; Ramírez et al., 2011). Mas aún, se conoce que la vasoinhibina bloquea el incremento de la vasopermeabilidad retiniana inducida por la inyección intravítrea de VEGF (Díaz-Lezama et al., 2016; García et al., 2008; Ramírez et al., 2011) y en este trabajo reportamos que la sulpirida previno formación de hemorragias retinianas después de la administración intravítrea de VEGF.

El VEGF es el principal factor estimulador de la vasopermeabilidad retiniana que contribuye al desarrollo y progresión del EMD y la RD. Así, se ha mostrado que los niveles de VEGF se incrementan en el ojo pacientes con EMD y RD y que las terapias intravítreas anti-VEGF son efectivas contra estos padecimientos (Adamis et al., 1994; Funatsu et al., 2002). En este sentido, la vasoinhibina inhibe la activación de la eNOS

que promueve la vasopermeabilidad y la vasoproliferación en respuesta al VEGF (García et al., 2008; Gonzalez et al., 2004). El VEGF activa a la eNOS a través de la fosforilación de la vía PI3K/Akt (Six et al., 2002) y de la Ca²⁺-calmodulina (Gélinas et al., 2002); a su vez, la vasoinhibina activa a la proteína fosfatasa 2A que desfosforila a eNOS e inhibe la movilización de Ca²⁺ intracelular, resultado de la producción de inositol 1,4,5-trifosfato inducido por la fosfolipasa C y la expresión de canales iónicos receptores de potencial transitorio (TRPC) (Gonzalez et al., 2004; Thebault et al., 2011).

Los resultados de este trabajo muestran que la sulpirida reduce la excesiva vasopermeabilidad retiniana causada por la diabetes por un mecanismo que probablemente involucra la elevación de la PRL circulante y el subsecuente incremento de la vasoinhibina en la retina capaz de bloquear la acción del VEGF. En apoyo a que la sulpirida actúa a través del efecto hiperprolactinéxico, la administración de la PRL ovina mediante bombas osmóticas de infusión que la liberan por dos semanas, mimetizó la acción de la sulpirida tanto en la acumulación de la vasoinhibina como sobre la inhibición de la vasopermeabilidad retiniana. Sin embargo, dado que los receptores tipo 2 de dopamina se expresan en el endotelio vascular (Zarei et al., 2006) y la activación de estos receptores inhibe la angiogénesis (Basu et al., 2001) y la vasopermeabilidad (Sarkar et al., 2004) mediada por VEGF, es posible que la sulpirida tenga un efecto sobre los vasos sanguíneos por mecanismos independientes del eje PRL-vasoinhibina. No obstante, el hecho de que los receptores D2 inhiben la acción del VEGF en las células endoteliales hace que sea poco probable que la inhibición de la vasopermeabilidad excesiva retiniana en respuesta a la sulpirida sea el resultado de un efecto vascular directo del fármaco.

El tratamiento con sulpirida o con PRL exógena no afectó el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre de los animales sanos y diabéticos. Estos resultados son consistentes con datos previos en ratas sanas (Baptista et al., 2002) y sugiere que la sulpirida no tiene efectos adversos en animales diabéticos. Al respecto, tanto

la sulpirida como la levosulpirida son medicamentos procinético indicados como tratamiento contra la gastroparesis diabética (Mansi et al., 1995). Por su parte, estudios clínicos y preclínicos indican que niveles altos de PRL circulante dentro del rango normal e hiperprolactinémico protegen contra la diabetes y otras enfermedades metabólicas (Yazmín Macotella et al., 2020) y que los niveles de PRL disminuyen tanto en pacientes como en animales diabéticos (Lemini et al., 2015; Triebel, Moreno-vega, et al., 2015). Estas observaciones apoyan la elevación farmacológica de PRL como una terapia benéfica para contrarrestar alteraciones propias de la diabetes y, en particular, de las que causan la ceguera en la diabetes (v.gr. RD y el EMD).

En conclusión, nuestros hallazgos proveen evidencia preclínica del efecto benéfico de la sulpirida como un tratamiento eficaz para contrarrestar la progresión de la RD y el EMD. La demostración final de este potencial está a la espera de la conclusión de estudio clínico en curso.

Finalmente, me permito comentar que el estudio motivo de esta tesis se publicó recientemente (Adán-Castro et al., 2022) y fue apoyado por seis artículos más en donde fui primer autor de dos y coautor de 4 (ver a Anexos).

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi, M., & Hosseini, A. (2014). Streptozotocin. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 402–404. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01170-2>
- Adamis, A. P., Miller, J. W., Bernal, M. T., D'Amico, D. J., Folkman, J., Yeo, T.-K., & Yeo, K.-T. (1994). Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *American Journal of Ophthalmology*, 118(4), 445–450. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)75794-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(14)75794-0)
- Adán-Castro, E., Siqueiros-Márquez, L., Ramírez-Hernández, G., Díaz-Lezama, N., Ruíz-Herrera, X., Núñez, F. F., Núñez-Amaro, C. D., Robles-Osorio, M. L., Bertsch, T., Triebel, J., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2022). Sulpiride-induced hyperprolactinaemia increases retinal vasoinhibin and protects against diabetic retinopathy in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, e13091. <https://doi.org/10.1111/JNE.13091>
- Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Mehrabi, M. R., Jamshidi, S., Farhangi, A., Allah Verdi, A., Mofidian, S. M. A., & Lame Rad, B. (2007). Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22(2), 60–64. <https://doi.org/10.1007/BF02913315>
- Alberti, K. G. M. M. (2010). The Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. In *Textbook of Diabetes: Fourth Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781444324808.ch2>
- Antonetti, D. A., Barber, A. J., Bronson, S. K., Freeman, W. M., Gardner, T. W., Jefferson, L. S., Kester, M., Kimball, S. R., Krady, J. K., Lanoue, K. F., Norbury, C. C., Quinn, P. G., Sandirasegarane, L., & Simpson, I. A. (2006). *Perspectives in Diabetes Diabetic Retinopathy Seeing Beyond Glucose-Induced Microvascular Disease*. <https://doi.org/10.2337/db05-1635>
- Antonetti, D. A., Klein, R., & Gardner, T. W. (2012). Diabetic Retinopathy. *New England Journal of Medicine*, 366(13), 1227–1239. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1005073>
- Antonetti, D. A., Silva, P. S., & Stitt, A. W. (2021). Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy. *Nat Rev Endocrinol*, 17, 195–206. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41574-020-00451-4>
- Aranda, J., Rivera, J. C., Jeziorski, M. C., Riesgo-Escovar, J., Nava, G., López-Barrera, F., Quiróz-Mercado, H., Berger, P., Escalera, G. D. L. M., & Clapp, C. (2005). Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(8), 2947–2953. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0173>
- Arnold, E., Rivera, J. C., Thebault, S., Moreno-Páramo, D., Quiroz-Mercado, H., Quintanar-Stéphano, A., Binart, N., De La Escalera, G. M., & Clapp, C. (2010). High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes*, 59(12), 3192–3197. <https://doi.org/10.2337/db10-0873>
- Arredondo Zamarripa, D., Díaz-Lezama, N., Melendez García, R., Chávez Balderas, J., Adán, N., Ledesma-Colunga, M. G., Arnold, E., Clapp, C., & Thebault, S. (2014). Vasoinhibins regulate the inner and outer blood-retinal barrier and limit retinal oxidative stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(October), 1–15.

<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00333>

- Arroba, A. I., Frago, L. M., Argente, J., & Chowen, J. A. (2005). Activation of Caspase 8 in the Pituitaries of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Implication in Increased Apoptosis of Lactotrophs. *Endocrinology*, *146*(10), 4417–4424. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0517>
- Arroba, A. I., Frago, L. M., Pañeda, C., Argente, J., & Chowen, J. A. (2003). The number of lactotrophs is reduced in the anterior pituitary of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*, *46*(5), 634–638. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1088-6>
- Arroba, A. I., Lechuga-Sancho, A. M., Frago, L. M., Argente, J., & Chowen, J. A. (2006). Increased apoptosis of lactotrophs in streptozotocin-induced diabetic rats is followed by increased proliferation. *Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06908>
- Bainbridge, J. W. B., Mistry, A. R., Thrasher, A. J., & Ali, R. R. (2003). Gene therapy for ocular angiogenesis. *Clinical Science (London, England : 1979)*. <https://doi.org/10.1517/14712598.3.4.599>
- Baptista, T. (1999). Body weight gain induced by antipsychotic drugs: Mechanisms and management. In *Acta Psychiatrica Scandinavica*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1999.tb10908.x>
- Baptista, T., Lacruz, A., Páez, X., Hernández, 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. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01816-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01816-2)
- Baptista, T., Parada, M., & Hernandez, L. (1987). Long term administration of some antipsychotic drugs increases body weight and feeding in rats. Are D2 dopamine receptors involved? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(87\)90340-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(87)90340-6)
- Bassnett, S., Shi, Y., & Vrensen, G. F. J. M. (2011). Biological glass: structural determinants of eye lens transparency. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *366*(1568), 1250. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2010.0302>
- Basu, S., Nagy, J. A., Pal, S., Vasile, E., Eckelhoefer, I. A., Bliss, V. S., Manseau, E. J., Dasgupta, P. S., Dvorak, H. F., & Mukhopadhyay, D. (2001). The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine*, *7*(5), 569–574. <https://doi.org/10.1038/87895>
- Beebe, D. C. (2008). Maintaining transparency: a review of the developmental physiology and pathophysiology of two avascular tissues. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *19*(2), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.08.014>
- Ben-Jonathan, N., Hugo, E. R., Brandebourg, T. D., & LaPensee, C. R. (2006). Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *17*(3), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.02.005>
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J. L., Allen, D. L., Steinmetz, R. W., & Mershon, J. L. (1996).

- Extrapituitary Prolactin : Distribution , Regulation ,. *Endocrine Reviews*, 17(6), 639–669. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-6-639>
- 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. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0334>
- Boujon, C. E., Bestetti, G. E., Abramo, F., Locatelli, V., & Rossi, G. L. (1995). The reduction of circulating growth hormone and prolactin in streptozocin-induced diabetic male rats is possibly caused by hypothalamic rather than pituitary changes. *Journal of Endocrinology*, 145(1), 19–26. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1450019>
- Boyer, D. S., Hopkins, J. J., Sorof, J., & Ehrlich, J. S. (2013). Anti-vascular endothelial growth factor therapy for diabetic macular edema. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 4(6), 151–169. <https://doi.org/10.1177/2042018813512360>
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>
- Cai, J., & Boulton, M. (2002). The pathogenesis of diabetic retinopathy: Old concepts and new questions. In *Eye*. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6700133>
- Caley, C. F., & Weber, S. S. (1995). Sulpiride: An antipsychotic with selective dopaminergic antagonist properties. In *Annals of Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1177/106002809502900210>
- Candolfi, M., Zaldivar, V., De Laurentiis, A., Jaita, G., Pisera, D., & Seilicovich, A. (2002). *TNF-Induces Apoptosis of Lactotropes from Female Rats*. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220377>
- Cheung, N., Mitchell, P., & Wong, T. Y. (2010). Diabetic retinopathy. *The Lancet*, 376(9735), 124–136. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)62124-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)62124-3)
- Cheung, N., Wong, I. Y., & Wong, T. Y. (2014). Ocular anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: Overview of clinical efficacy and evolving applications. *Diabetes Care*, 37(4), 900–905. <https://doi.org/10.2337/dc13-1990>
- 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. <https://doi.org/10.1210/ENDO-121-6-2055>
- Clapp, C., Aranda, J., González, C., Jeziorski, M. C., & de la Escalera, G. M. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 17(8), 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.08.002>
- Clapp, C., Thebault, S., Arnold, E., García, C., Rivera, J. C., & de la Escalera, G. M. (2008). Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 295(4), E772-8. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90358.2008>
- Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M. C., & Martinez De La Escalera, G. (2009). Peptide

- hormone regulation of angiogenesis. *Physiological Reviews*, 89(4), 1177–1215. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2009>
- Clapp, C., Thebault, S., Macotela, Y., Moreno-Carranza, B., Triebel, J., & Martínez de la Escalera, G. (2015). Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 846, 83–95. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12114-7_4
- Cohen, S. R., & Gardner, T. W. (2016). Diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Dev Ophthalmol*, 55(6), 137–146. <https://doi.org/10.1080/17469899.2016.1251312>
- Corbacho, A. M., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2002). Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *Journal of Endocrinology*, 173(2), 219–238. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1730219>
- Das, A., & Byrd, J. (2014). Retinal Vasculature: Structure and Pathologies. *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*, 2137–2161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.04709-2>
- Debeljuk, L., Rozados, R., Daskal, H., Velez, V., & Mancini, A. M. (1975). Acute and chronic effects of sulpride on serum prolactin and gonadotropin levels in castrated male rats (38581). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 148(2), 550–552. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1121507>
- Deshpande, A. D., Harris-Hayes, M., & Schootman, M. (2008). Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications. *Physical Therapy*. <https://doi.org/10.2522/ptj.20080020>
- Díaz-Lezama, N., Wu, Z., Adán-Castro, E., Arnold, E., Vázquez-Membrillo, M., Arredondo-Zamarripa, D., Ledesma-Colunga, M. G., Moreno-Carranza, B., Martínez de la Escalera, G., Colosi, P., & Clapp, C. (2016). Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vectors in the retina: therapeutic effect of AAV2 encoding vasoinhibin and soluble VEGF receptor 1. *Laboratory Investigation*, 96(3), 283–295. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.135>
- Dueñas, Z., Rivera, J. C., Quiróz-Mercado, H., Aranda, J., Macotela, Y., Montes de Oca, P., López-Barrera, F., Nava, G., Guerrero, J. L., Suarez, A., De Regil, M., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2004). Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(7), 2049–2055. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-1346>
- Dueñas, Z., Torner, L., Corbacho, A. M., Ochoa, A., Gutiérrez-Ospina, G., López-Barrera, F., Barrios, F. A., Berger, P., Martínez De La Escalera, G., & Clapp, C. (1999). Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40(11), 2498–2505.
- Durham, J. T., & Herman, I. M. (2011). Microvascular modifications in diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reports*, 11(4), 253–264. <https://doi.org/10.1007/S11892-011-0204-0/TABLES/1>

- Evans, J. R., Michelessi, M., & Virgili, G. (2014). Laser photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2014, Issue 11). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011234.pub2>
- Fong, D. S., Aiello, L., Gardner, T. W., King, G. L., Blankenship, G., Cavallerano, J. D., Ferris, F. L., & Klein, R. (2004). Retinopathy in Diabetes. *Diabetes Care*, 27(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.2337/diacare.27.2007.s84>
- Fong, D. S., Girach, A., & Boney, A. (2007). Visual side effects of successful scatter laser photocoagulation surgery for proliferative diabetic retinopathy: A literature review. *Retina*, 27(7), 816–824. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e318042d32c>
- Frank, R. N. (2009). Treating diabetic retinopathy by inhibiting growth factor pathways. In *Current Opinion in Investigational Drugs*.
- Freeman, M., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin : Structure , Function , and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*, 80(4), 1523–1631.
- Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., Buerk, D. G., Huang, P. L., & Jain, R. K. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2604. <https://doi.org/10.1073/PNAS.041359198>
- Funatsu, H., Yamashita, H., Noma, H., Mimura, T., Yamashita, T., & Hori, S. (2002). Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humor of diabetics with macular edema. *American Journal of Ophthalmology*, 133(1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(01\)01269-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(01)01269-7)
- Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology / Editorial Board, S.J. Enna (Editor-in-Chief) ... [et Al.]*, 70(September 2015), 5.47.1-5.47.20. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70>
- García, C., Aranda, J., Arnold, E., Thébault, S., Macotela, Y., López-Casillas, F., Mendoza, V., Quiroz-Mercado, H., Hernández-Montiel, H. L., Lin, S. H., De La Escalera, G. M., & Clapp, C. (2008). Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *Journal of Clinical Investigation*, 118(6), 2291–2300. <https://doi.org/10.1172/JCI34508>
- Gardner, T. W., Larsen, M., Girach, A., & Zhi, X. (2009). Diabetic macular oedema and visual loss: Relationship to location, severity and duration. *Acta Ophthalmologica*, 87(7), 709–713. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2009.01545.x>
- Ge, G., Fernández, C. A., Moses, M. A., & Greenspan, D. S. (2007). Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10010–10015. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0704179104>
- Gélinas, D. S., Bernatchez, P. N., Rollin, S., Bazan, N. G., & Sirois, M. G. (2002). Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: Role of PI3K, PKC and PLC pathways. *British Journal of Pharmacology*, 137(7), 1021–1030. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0704956>

- Gong, C. Y., Lu, B., Hu, Q. W., & Ji, L. L. (2013). Streptozotocin induced diabetic retinopathy in rat and the expression of vascular endothelial growth factor and its receptor. *International Journal of Ophthalmology*, 6(5), 573. <https://doi.org/10.3980/J.ISSN.2222-3959.2013.05.03>
- Gonzalez, C., Corbacho, A. M., Eiserich, J. P., Garcia, C., Lopez-Barrera, F., Morales-Tlalpan, V., Barajas-Espinosa, A., Diaz-Muñoz, M., Rubio, R., Lin, S. H., Martinez De La Escalera, G., & Clapp, C. (2004). 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology*, 145(12), 5714–5722. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0647>
- Guillou, A., Romanò, N., Steyn, F., Abitbol, K., Le Tissier, P., Bonnefont, X., Chen, C., Mollard, P., & Martin, A. O. (2015). Assessment of lactotroph axis functionality in mice: Longitudinal monitoring of PRL secretion by ultrasensitive-ELISA. *Endocrinology*, 156(5), 1924–1930. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1571>
- Gupta, N., & Gupta, R. (2015). Diabetic Retinopathy - An Update. *Journal International Medical Sciences Academy*, 28(1). <https://doi.org/10.1016/j.sjopt.2011.01.009>
- Gupta, N., Mansoor, S., Sharma, A., Sapkal, A., Sheth, J., Falatoonzadeh, P., Kuppermann, B., & Kenney, M. (2013). Diabetic Retinopathy and VEGF. *The Open Ophthalmology Journal*, 7(1), 4–10. <https://doi.org/10.2174/1874364101307010004>
- Haddad, P., Hellewell, J. S. E., & Wieck, A. (2001). Antipsychotic induced hyperprolactinaemia: A series of illustrative case reports. *Journal of Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1177/026988110101500408>
- Hirsch, I. B., & Brownlee, M. (2010). Beyond Hemoglobin A1c—Need for Additional Markers of Risk for Diabetic Microvascular Complications. *Jama*, 303(22), 2291. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.785>
- IDF Diabetes Atlas. (2021). *International Diabetes Federation*. (10th edn. Brussels). https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF_Atlas_10th_Edition_2021.pdf
- Kashyap, P., & Farrugia, G. (2010). Diabetic gastroparesis: What we have learned and had to unlearn in the past 5 years. In *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.199703>
- Keenan, H. A., Costacou, T., Sun, J. K., Doria, A., Cavellarano, J., Coney, J., Orchard, T. J., Aiello, L. P., & King, G. L. (2007). Clinical factors associated with resistance to microvascular complications in diabetic patients of extreme disease duration. *Diabetes Care*, 30(8), 1995–1997. <https://doi.org/10.2337/dc06-2222>.Additional
- King, P., Peacock, I., & Donnelly, R. (1999). The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 48(5), 643–648. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2125.1999.00092.X>
- Klein, R., Klein, B. E. K., Moss, S. E., Davis, M. D., & DeMets, D. L. (1984). The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Archives of Ophthalmology*, 102(4), 527. <https://doi.org/10.1001/archophth.1984.01040030405011>
- Klein, R., Knudtson, M. D., Lee, K. E., Gangnon, R., & Klein, B. E. K. (2008). The Wisconsin

- Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XXII. The Twenty-Five-Year Progression of Retinopathy in Persons with Type 1 Diabetes. *Ophthalmology*, 115(11), 1859. <https://doi.org/10.1016/J.OPHTHA.2008.08.023>
- Kollias, A. N., & Ulbig, M. W. (2010). Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*, 107(5), 75–83; quiz 84. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0075>
- Lee, R., Wong, T. Y., & Sabanayagam, C. (2015). Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. *Eye and Vision*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/S40662-015-0026-2>
- Lemini, M., Ruiz-Herrera, X., Ledesma-Colunga, M. G., Díaz-Lezama, N., De los Ríos, E. A., López-Barrera, F., Méndez, I., de la Escalera, G. M., Macotela, Y., & Clapp, C. (2015). Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels are reduced in obese and diabetic rats: Role of TGF- β and TNF- α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 308(9), R792–R799. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00327.2014>
- Lozano, R., Peralta Concha, M. G., Montealegre, A., de Leon, L., Ortiz Villalba, J., Lee Esteban, H. O., Cromeyer, M., Rivas García, J. A., Brossa, A., Lluberés, G., Izquierdo Sandí, E., & Burgos Quirós, H. (2007). Effectiveness and safety of levosulpiride in the treatment of dysmotility-like functional dyspepsia. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3(1), 149–155. <https://doi.org/10.2147/tcrm.2007.3.1.149>
- Macotela, Y., Aguilar, M. B., Guzmán-Morales, J., Rivera, J. C., Zermeño, C., López-Barrera, F., Nava, G., Lavalle, C., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2006). Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *Journal of Cell Science*, 119(9), 1790–1800. <https://doi.org/10.1242/jcs.02887>
- Macotela, Yazmín, Triebel, J., & Clapp, C. (2020). Time for a new perspective on prolactin in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 31(4), 276–286. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.01.004>
- Majumdar, A., & Mangal, N. S. (2013). Hyperprolactinemia. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 6(3), 168–175. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.121400>
- Mansi, C., Savarino, V., Vigneri, S., Perilli, D., Melga, P., Sciabà, L., De Martini, D., & Mela, G. S. (1995). Gastrokinetic Effects of Levosulpiride in Dyspeptic Patients with Diabetic Gastroparesis. *The American Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1995.tb10178.x>
- Matthews, D. R., Stratton, I. M., Aldington, S. J., Holman, R. R., & Kohner, E. M. (2004). Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Archives of Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1001/archophth.122.11.1631>
- McIntyre, H. D., Catalano, P., Zhang, C., Desoye, G., Mathiesen, E. R., & Damm, P. (2019). Gestational diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0098-8>
- McMurdo, M., Howie, P., Lewis, M., Marnie, M., McEwen, J., & McNeilly, A. (1987). Prolactin response to low dose sulpiride. *British Journal of Clinical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1987.tb03153.x>

- Meléndez García, R., Arredondo Zamarripa, D., Arnold, E., Ruiz-Herrera, X., Noguez Imm, R., Baeza Cruz, G., Adán, N., Binart, N., Riesgo-Escovar, J., Goffin, V., Ordaz, B., Peña-Ortega, F., Martínez-Torres, A., Clapp, C., & Thebault, S. (2016). Prolactin protects retinal pigment epithelium by inhibiting sirtuin 2-dependent cell death. *EBioMedicine*, 7, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.048>
- Nagarchi, K., Ahmed, S., Sabus, A., & Hussain Saheb, S. (2015). Effect of streptozotocin on glucose levels in albino Wistar Rats. *J. Pharm. Sci. & Res*, 7(2), 67–69. <https://www.jpsr.pharmainfo.in/Documents/Volumes/vol7issue02/jpsr07021505.pdf>
- Nguyen, T. T., Alibrahim, E., Islam, F. M. A., Klein, R., Klein, B. E. K., Cotch, M. F., Shea, S., & Wong, T. Y. (2009). Inflammatory, hemostatic, and other novel biomarkers for diabetic retinopathy: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *Diabetes Care*. <https://doi.org/10.2337/dc09-0102>
- Nuñez-Amaro, C. D., Moreno-Vega, A. I., Adan-Castro, E., Zamora, M., Garcia-Franco, R., Ramirez-Neria, P., Garcia-Roa, M., Villalpando, Y., Robles, J. P., Ramirez-Hernandez, G., Lopez, M., Sanchez, J., Lopez-Star, E., Bertsch, T., de la Escalera, G. M., Robles-Osorio, M. L., Triebel, J., & Clapp, C. (2020). Levosulpiride increases the levels of prolactin and antiangiogenic vasoinhibin in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Translational Vision Science and Technology*, 9(9), 27. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.9.27>
- O'Steen, W. K., & Sundberg, D. K. (1982). Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injection of iodinated prolactin. *Ophthalmic Research*, 14(1), 54–62. <https://doi.org/10.1159/000265174>
- Ozougwu, O., C., J., Obimba, C., K., Belonwu, D., C., Unakalamba, & B., C. (2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 4(4), 46–57. <https://doi.org/10.5897/JPAP2013.0001>
- Pan, H., Nguyen, N. Q., Yoshida, H., Bentzien, F., Shaw, L. C., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Weiner, R., Struman, I., & Grant, M. B. (2004). Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(7), 2413–2419. <https://doi.org/10.1167/IOVS.03-1001>
- Piwnica, D., Fernandez, I., Binart, N., Touraine, P., Kelly, P. A., & Goffin, V. (2006). A New Mechanism for Prolactin Processing into 16K PRL by Secreted Cathepsin D. *Molecular Endocrinology*, 20(12), 3263–3278. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0044>
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2001). The Retina. In *Neuroscience* (2nd editio).
- Ramírez, M., Wu, Z., Moreno-Carranza, B., Jeziorski, M. C., Arnold, E., Díaz-Lezama, N., de la Escalera, G. M., Colosi, P., & Clapp, C. (2011). Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(12), 8944–8950. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8190>
- Reich, S. J., Fosnot, J., Kuroki, A., Tang, W., Yang, X., Maguire, A. M., Bennett, J., & Tolentino, M. J. (2003). Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively

inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis*. <https://doi.org/v9/a31> [pii]

- Robles-Osorio, M. L., García-Franco, R., Núñez-Amaro, C. D., Mira-Lorenzo, X., Ramírez-Neria, P., Hernández, W., López-Star, E., Bertsch, T., Martínez de la Escalera, G., Triebel, J., & Clapp, C. (2018). Basis and design of a randomized clinical trial to evaluate the effect of levosulpiride on retinal alterations in patients with diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 242. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00242>
- Rodríguez-Villalobos, E., Cervantes-Aguayo, F., Vargas-Salado, E., Ávalos-Muñoz, M. E., Juárez-Becerril, D. M., & Ramírez-Barba, É. J. (2005). Retinopatía diabética. Incidencia y progresión a 12 años. *Cir Ciruj*, *73*(2), 79–84. <http://www.medigraphic.com/pdfs/circir/cc-2005/cc052b.pdf>
- Rodríguez-Villalobos, E., Ramírez-Barba, É. J., Carvantes-Aguayo, F., Vargas-Salado, E., & Ávalos-Muñoz, M. E. (2004). Incidencia y Progresión de la Retinopatía Diabética en Diabetes Mellitus 2 a 6 años. *Diabetes Hoy*, *4*(Julio-Agosto), 1262–1271.
- Rossi, F., & Forgione, A. (1995). Pharmacotoxicological aspects of levosulpiride. *Pharmacological Research*, *31*(2), 81–94. [https://doi.org/10.1016/1043-6618\(95\)80052-2](https://doi.org/10.1016/1043-6618(95)80052-2)
- Sarkar, C., Chakroborty, D., Mitra, R. B., Banerjee, S., Dasgupta, P. S., & Basu, S. (2004). Dopamine in vivo inhibits VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2, MAPK, and focal adhesion kinase in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *287*(4), H1554–H1560. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00272.2004>
- 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*. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2424-x>
- Scammell, J. G., Luck, D. N., Valentine, D. L., & Smith, M. (1992). Epitope mapping of monoclonal antibodies to bovine prolactin. *American Journal of Physiology*, *263*(3), E520–E525. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1992.263.3.e520>
- Seggie, J. A., & Brown, G. M. (1975). Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin, and growth hormone in the rat, following handling or exposure to novel environment. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *53*(4), 629–637. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1175088>
- Sharma, T., Fong, A., Lai, T. Y., Lee, V., Das, S., & Lam, D. (2016). Surgical treatment for diabetic vitreoretinal diseases: a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, *44*(4), 340–354. <https://doi.org/10.1111/ceo.12752>
- Shulman, R. M., & Daneman, D. (2010). Type 1 diabetes mellitus in childhood. In *Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2010.09.001>
- Simó, R., & Hernández, C. (2008). Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: Hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia*, *51*(9), 1574–1580. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-0989-9>
- Simó, R., Sundstrom, J. M., & Antonetti, D. A. (2014). Ocular anti-VEGF therapy for diabetic

- retinopathy: The role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy. In *Diabetes Care* (Vol. 37, Issue 4, pp. 893–899). American Diabetes Association Inc. <https://doi.org/10.2337/dc13-2002>
- Six, I., Kureishi, Y., Luo, Z., & Walsh, K. (2002). Akt signaling mediates VEGF/VPF vascular permeability in vivo. *FEBS Letters*, 532(1–2), 67–69. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03630-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03630-X)
- Steck, A. K., & Winter, W. E. (2011). Review on monogenic diabetes. In *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* (Vol. 18, Issue 4, pp. 252–258). Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3283488275>
- Stefánsson, E. (2009). Physiology of vitreous surgery. In *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1007/s00417-008-0980-7>
- Stewart, M. W. (2017a). Diabetes and Diabetic Retinopathy: Overview of a Worldwide Epidemic. In *Diabetic Retinopathy* (pp. 1–27). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3509-8_1
- Stewart, M. W. (2017b). *Diabetic Retinopathy*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-3509-8>
- Stewart, M. W. (2017c). The Diabetic Retina: Anatomy and Pathophysiology. In *Diabetic Retinopathy* (pp. 29–72). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3509-8_2
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & Van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: Principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61032-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61032-X)
- Tanaka, T., Shiu, R. P., Gout, P. W., Beer, C. T., Noble, R. L., & Friesen, H. G. (1980). A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: Measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 51(5), 1058–1063. <https://doi.org/10.1210/jcem-51-5-1058>
- Tesone, M., Ladenheim, R. G., & Charreau, E. H. (1985). Alterations in the prolactin secretion in streptozotocin-induced diabetic rats. Correlation with pituitary and hypothalamus estradiol receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 43(2–3), 135–140. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3935499>
- Theas, M. S., De Laurentiis, A., Lasaga, M., Pisera, D., Duvilanski, B. H., & Seilicovich, A. (1998). Effect of Lipopolysaccharide on Tumor Necrosis Factor and Prolactin Release from Rat Anterior Pituitary Cells. *Endocrine*, 8(3), 241–246. <https://doi.org/10.1385/ENDO:8:3:241>
- Thebault, S., González, C., García, C., Arredondo-Zamarripa, D., Nava, G., Vaca, L., López-Casillas, F., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2011). Vaso-inhibins prevent bradykinin-stimulated endothelial cell proliferation by inactivating eNOS via reduction of both intracellular Ca²⁺ levels and eNOS phosphorylation at ser1179. *Pharmaceuticals*, 4(7), 1052–1069. <https://doi.org/10.3390/PH4071052>
- Ting, D. S. W., Cheung, G. C. M., & Wong, T. Y. (2016). Diabetic retinopathy: global prevalence, major risk factors, screening practices and public health challenges: a review. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 44(4), 260–277.

<https://doi.org/10.1111/ceo.12696>

- Tomita, Y., Lee, D., Tsubota, K., Negishi, K., & Kurihara, T. (2021). Updates on the current treatments for diabetic retinopathy and possibility of future oral therapy. *Journal of Clinical Medicine*, 10(20). <https://doi.org/10.3390/jcm10204666>
- Triebel, J., Bertsch, T., Bollheimer, C., Rios-Barrera, D., Pearce, C. F., Hübner, M., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2015). Principles of the prolactin/vasoinhibin axis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 309, R1193–R1203. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00256.2015>
- Triebel, J., Huefner, M., & Ramadori, G. (2009). Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *European Journal of Endocrinology*, 161(2), 345–353. <https://doi.org/10.1530/EJE-09-0130>
- Triebel, J., Moreno-vega, A. I., Vázquez-membrillo, M., Nava, G., García-franco, R., López-star, E., Baldivieso-hurtado, O., Ochoa, D., Macotela, Y., Bertsch, T., Martínez, G., Escalera, D., & Clapp, C. (2015). *High Prolactin Excretion in Patients with Diabetes Mellitus and Impaired Renal Function*. 1–8. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2014.141237>
- Wang, T., Lu, J., Xu, Y., Li, M., Sun, J., Zhang, J., Xu, B., Xu, M., Chen, Y., Bi, Y., Wang, W., & Ning, G. (2013). Circulating prolactin associates with diabetes and impaired glucose regulation: A population-based study. *Diabetes Care*, 36(7), 1974–1980. <https://doi.org/10.2337/dc12-1893>
- Wang, T., Xu, Y., Xu, M., Ning, G., Lu, J., Dai, M., Xu, B., Sun, J., Sun, W., Lai, S., Bi, Y., & Wang, W. (2016). Circulating Prolactin and Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Study. *American Journal of Epidemiology*. <https://doi.org/10.1093/aje/kwv326>
- Wong, T. Y., Cheung, C. M. G., Larsen, M., Sharma, S., & Simó, R. (2016). Diabetic retinopathy. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(March). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.12>
- Xia, T., & Rizzolo, L. J. (2017). Effects of diabetic retinopathy on the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Vision Research*. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2017.02.006>
- Xu, Q., Qaum, T., & Adamis, A. P. (2001). Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42(3), 789–794.
- Zamora, M., Robles, J. P., Aguilar, M. B., Romero-Gómez, S. de J., Bertsch, T., Martínez de la Escalera, G., Triebel, J., & Clapp, C. (2021). Thrombin cleaves prolactin into a potent 5.6 kDa vasoinhibin: Implication for tissue repair. *Endocrinology*, 162(12), bqab177. <https://doi.org/10.1210/ENDOCR/BQAB177>
- Zarei, S., Frieden, M., Rubi, B., Villemin, P., Gauthier, B. R., Maechler, P., & Vischer, U. M. (2006). Dopamine modulates von Willebrand factor secretion in endothelial cells via D2–D4 receptors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(7), 1588–1595. <https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2006.01998.X>
- Zepeda-Romero, L. C., Vazquez-Membrillo, M., Adan-Castro, E., Gomez-Aguayo, F.,

Gutierrez-Padilla, J. A., Angulo-Castellanos, E., De Leon, J. C. B., Gonzalez-Bernal, C., Quezada-Chalita, M. A., Meza-Anguiano, A., Diaz-Lezama, N., De La Escalera, G. M., Triebel, J., & Clapp, C. (2017). Higher prolactin and vasoinhibin serum levels associated with incidence and progression of retinopathy of prematurity. *Pediatric Research*, 81(3), 473–479. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.241>

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*. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.7.1275>

11. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Anatomía del ojo y estructura de la retina.	7
Figura 2. Principales alteraciones de la microvasculatura de la retina derivadas de la diabetes.	10
Figura 3. Eje PRL-vaso inhibina.	14
Figura 4. Niveles de PRL en suero en respuesta a diferentes dosis de sulpirida.	27
Figura 5. PRL en suero de ratas no diabéticas y diabéticas a la sexta semana post-STZ.	29
Figura 6. Niveles de PRL en suero de ratas no diabéticas y diabéticas tratadas con vehículo o sulpirida diariamente por dos semanas a partir de la cuarta semana post-STZ.	30
Figura 7. Evaluación de la PRL y vaso inhibina por inmunoprecipitación (IP)-Western blot.	30
Figura 8. Western blot de la vaso inhibina en lisado de retina de ratas no diabéticas y diabéticas tratadas con vehículo o sulpirida a partir de la cuarta semana post-STZ.	32
Figura 9. Evaluación de la vasopermeabilidad retiniana mediante el ensayo de azul de Evans.	33
Figura 10. Micrografías representativas de una porción de montaje plano de retina 24 h después de la inyección intravítrea de VEGF.	35
Figura 11. Niveles de PRL ovina en suero de ratas no diabéticas y diabéticas implantadas o no con bombas que liberaron oPRL.	37
Figura 12. Valores de glucosa sanguínea y peso corporal a lo largo de las seis semanas post-STZ.	39

12. ANEXOS

Publicaciones de primer autor


1. **Adán-Castro, E.**, Siqueiros-Márquez, L., Ramírez-Hernández, G., Díaz-Lezama, N., Ruíz-Herrera, X., Núñez, F. F., Núñez-Amaro, C. D., Robles-Osorio, M. L., Bertsch, T., Triebel, J., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2022). **Sulpiride-induced hyperprolactinaemia increases retinal vasoinhibin and protects against diabetic retinopathy in rats.** *Journal of neuroendocrinology*, 34(4), e13091. <https://doi.org/10.1111/jne.13091>
2. Nuñez-Amaro, C. D., Moreno-Vega, A. I., **Adan-Castro, E.**, Zamora, M., Garcia-Franco, R., Ramirez-Neria, P., Garcia-Roa, M., Villalpando, Y., Robles, J. P., Ramirez-Hernandez, G., Lopez, M., Sanchez, J., Lopez-Star, E., Bertsch, T., Martinez de la Escalera, G., Robles-Osorio, M. L., Triebel, J., & Clapp, C. (2020). **Levosulpiride Increases the Levels of Prolactin and Antiangiogenic Vasoinhibin in the Vitreous of Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy.** *Translational vision science & technology*, 9(9), 27. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.9.27>

Publicaciones de co-autor

3. Robles, J. P., Zamora, M., **Adán-Castro, E.**, Siqueiros-Marquez, L., Martinez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2022). The spike protein of SARS-CoV-2 induces endothelial inflammation through integrin $\alpha 5\beta 1$ and NF- κ B signaling. *The Journal of biological chemistry*, 298(3), 101695. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101695>
4. Robles, J. P., Zamora, M., Siqueiros-Marquez, L., **Adán-Castro, E.**, Ramirez-Hernandez, G., Nuñez, F. F., Lopez-Casillas, F., Millar, R. P., Bertsch, T., Martínez de la Escalera, G., Triebel, J., & Clapp, C. (2022). **The HGR motif is the antiangiogenic determinant of vasoinhibin: implications for a therapeutic orally active oligopeptide.** *Angiogenesis*, 25(1), 57–70. <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09800-x>
5. Hernández-Soto, R., Pimentel-Farfan, A. K., **Adan-Castro, E.**, Clapp, C., & Peña-Ortega, F. (2022). **Main olfactory bulb reconfiguration by prolonged passive olfactory experience correlates with increased brain-derived neurotrophic factor and improved innate olfaction.** *The European journal of neuroscience*, 55(5), 1141–1161. <https://doi.org/10.1111/ejn.15610>

6. Ramirez-Hernandez, G., **Adan-Castro, E.**, Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Martinez de la Escalera, G., Macotela, Y., & Clapp, C. (2021). **Global Deletion of the Prolactin Receptor Aggravates Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice.** *Frontiers in endocrinology*, 12, 619696. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.619696>
7. Vázquez-Membrillo, M., Siqueiros-Márquez, L., Núñez, F. F., Díaz-Lezama, N., **Adán-Castro, E.**, Ramírez-Hernández, G., Adán, N., Macotela, Y., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2020). **Prolactin stimulates the vascularisation of the retina in newborn mice under hyperoxia conditions.** *Journal of neuroendocrinology*, 32(11), e12858. <https://doi.org/10.1111/jne.12858>
8. Clapp, C., Diaz-Lezama, N., **Adan-Castro, E.**, Ramirez-Hernandez, G., Moreno-Carranza, B., Sarti, A. C., Falzoni, S., Solini, A., & Di Virgilio, F. (2019). **Pharmacological blockade of the P2X7 receptor reverses retinal damage in a rat model of type 1 diabetes.** *Acta diabetologica*, 56(9), 1031–1036. <https://doi.org/10.1007/s00592-019-01343-4>
9. Perez-Ortiz, A. C., Peralta-Ildefonso, M. J., Lira-Romero, E., Moya-Albor, E., Brieva, J., Ramirez-Sanchez, I., Clapp, C., Luna-Angulo, A., Rendon, A., **Adán-Castro, E.**, Ramírez-Hernández, G., Díaz-Lezama, N., Coral-Vázquez, R. M., & Estrada-Mena, F. J. (2019). **Lack of Delta-Sarcoglycan (Sgcd) Results in Retinal Degeneration.** *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5480. <https://doi.org/10.3390/ijms20215480>
10. Zepeda-Romero, L. C., Vazquez-Membrillo, M., **Adán-Castro, E.**, Gomez-Aguayo, F., Gutierrez-Padilla, J. A., Angulo-Castellanos, E., Barrera de Leon, J. C., Gonzalez-Bernal, C., Quezada-Chalita, M. A., Meza-Anguiano, A., Diaz-Lezama, N., Martinez de la Escalera, G., Triebel, J., & Clapp, C. (2017). **Higher prolactin and vasoinhibin serum levels associated with incidence and progression of retinopathy of prematurity.** *Pediatric research*, 81(3), 473–479. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.241>
11. Díaz-Lezama, N., Wu, Z., **Adán-Castro, E.**, Arnold, E., Vázquez-Membrillo, M., Arredondo-Zamarripa, D., Ledesma-Colunga, M. G., Moreno-Carranza, B., Martinez de la Escalera, G., Colosi, P., & Clapp, C. (2016). **Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vectors in the retina: therapeutic effect of AAV2 encoding vasoinhibin and soluble VEGF receptor 1.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 96(3), 283–295. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.135>

Sulpiride-induced hyperprolactinaemia increases retinal vasoinhibin and protects against diabetic retinopathy in rats

Elva Adán-Castro¹ | Lourdes Siqueiros-Márquez¹ | Gabriela Ramírez-Hernández¹ |
 Nundehui Díaz-Lezama¹ | Xarubet Ruíz-Herrera¹ | Francisco Freinet Núñez¹ |
 Carlos D. Núñez-Amaro² | Ma. Ludivina Robles-Osorio² | Thomas Bertsch³ |
 Jakob Triebel³ | Gonzalo Martínez de la Escalera¹ | Carmen Clapp¹ 

¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Querétaro, México

²Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México

³Institute for Clinical Chemistry, Laboratory Medicine and Transfusion Medicine, Nuremberg General Hospital & Paracelsus Medical University, Nuremberg, Germany

Correspondence

Carmen Clapp, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Querétaro, Qro., 876230 México.

Email: clapp@unam.mx

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Number: 289568 and 588869; Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Grant/Award Number: 405PC

Abstract

Excessive vasopermeability and angiogenesis compromise vision in diabetic macular oedema (DME) and diabetic retinopathy (DR). Vasoinhibin is a fragment of the hormone prolactin (PRL) that inhibits diabetes-induced retinal hypervasopermeability and ischaemia-induced retinal angiogenesis in rodents. Hyperprolactinaemia generated by the dopamine D2 receptor antagonist, levosulpiride, is associated with higher levels of vasoinhibin in the vitreous of patients with DR, implying a beneficial outcome due to vasoinhibin-mediated inhibition of retinal vascular alterations. Here, we tested whether hyperprolactinaemia induced by racemic sulpiride increases intraocular vasoinhibin levels and inhibits retinal hypervasopermeability in diabetic rats. Diabetes was generated with streptozotocin and, 4 weeks later, rats were treated for 2 weeks with sulpiride or osmotic minipumps delivering PRL. ELISA, Western blot, and Evans blue assay were used to evaluate serum PRL, retinal vasoinhibin, and retinal vasopermeability, respectively. Hyperprolactinaemia in response to sulpiride or exogenous PRL was associated with increased levels of vasoinhibin in the retina and reduced retinal hypervasopermeability. Furthermore, sulpiride decreased retinal haemorrhages in response to the intravitreal administration of vascular endothelial growth factor (VEGF). Neither sulpiride nor exogenous PRL modified blood glucose levels or bodyweight. We conclude that sulpiride-induced hyperprolactinaemia inhibits the diabetes- and VEGF-mediated increase in retinal vasopermeability by promoting the intraocular conversion of endogenous PRL to vasoinhibin. These findings support the therapeutic potential of sulpiride and its levorotatory enantiomer, levosulpiride, against DME and DR.

KEYWORDS

diabetic macular oedema, diabetic retinopathy, dopamine D2 receptor antagonists, hypervasopermeability, levosulpiride, prolactin, VEGF

1 | INTRODUCTION

Diabetic macular oedema (DME) and diabetic retinopathy (DR) are the leading causes of vision loss in working-age individuals worldwide. Nearly 10% of the world population is diabetic,¹ and it is estimated that 35% of people with diabetes have sight-threatening stages of DME and DR.² Current treatments, laser photocoagulation, intravitreal injections, and vitrectomy are invasive, not always effective, and temporary underscoring the need for better therapeutic approaches.^{3,4} An ongoing clinical trial is investigating a new treatment for DME and DR centred on elevating the circulating levels of the pituitary hormone prolactin (PRL) with the oral administration of the prokinetic dopamine type D2 receptor antagonist, levosulpiride (ClinicalTrials.gov. ID NCT03161652).

Prolactin acquires antivasopermeability and antiangiogenic properties after undergoing proteolytic cleavage to vasoinhibin, a PRL fragment that acts directly on endothelial cells to inhibit vasopermeability and angiogenesis.⁵⁻⁷ The generation of vasoinhibin depends on PRL levels and the activity of PRL-cleaving proteases regulated at the hypothalamus, the pituitary, and the target tissue levels defining the PRL/vasoinhibin axis.⁸ This axis helps maintain corneal avascularity,⁹ restricts retinal vasculature,¹⁰ and is disrupted in retinopathy of prematurity^{11,12} and DR.¹³ Furthermore, the overexpression of ocular vasoinhibin inhibits ischaemia-induced retinal angiogenesis¹⁴ and prevents and reverses diabetes-induced retinal hypervasopermeability in rodents.¹⁵⁻¹⁷ These observations have led to the hypothesis that medications causing hyperprolactinaemia, resulting in higher levels of vasoinhibin, could be beneficial in DME and DR.¹⁸ One such medication is levosulpiride, a prokinetic frequently used to treat diabetic gastroparesis,¹⁹ that is highly effective for inducing hyperprolactinaemia as it blocks dopamine D2 receptors in the anterior pituitary gland.²⁰ The ongoing clinical trial supported the potential beneficial outcome of levosulpiride by showing that this compound elevates PRL and vasoinhibin levels in the vitreous of patients with proliferative DR undergoing elective pars plana vitrectomy.²¹ Here, we report that rats treated with either racemic sulpiride or exogenous PRL have increased levels of vasoinhibin in the retina and display reduced retinal hypervasopermeability in response to diabetes or vascular endothelial growth factor (VEGF) intravitreal administration.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Materials

Recombinant rat PRL (AFP878) and ovine PRL (10692C) were purchased from the National Hormone and Pituitary Program (NHPP) and Dr A.F. Parlow (Harbor-University of California, Los Angeles Medical Center, Los Angeles, CA). A 16 kDa vasoinhibin containing the first 145 amino acids of PRL was generated by the enzymatic proteolysis of rat PRL with a mammary gland extract, as previously reported.²²

2.2 | Animals

Male Wistar rats aged 7–8 weeks (250–300 g) were maintained under standard laboratory conditions (24°C, 12 h/12 h light/dark cycle, with free access to food and water) and cared for in accordance with regulations of the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research (ARVO). The Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology of the National University of Mexico (UNAM) approved all animal experiments.

2.3 | Sulpiride dose

Healthy rats were intraperitoneally (i.p.) injected every day for 5 days with different doses of sulpiride (Dogmatil, Sanofi) or vehicle (0.9% NaCl) and euthanized by CO₂ inhalation and decapitation, and their serum was collected for PRL determination by ELISA.

2.4 | Intravitreal administration of VEGF

Nondiabetic rats were injected i.p. with vehicle or sulpiride (20 mg/kg) daily for 5 days. At the fourth day of treatment, rats were injected intravitreally with 3 µl vehicle (PBS) or VEGF (300 ng) and, 24 h after injection, the retinas were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, washed with PBS, flat-mounted with glycerol/50% PBS on glass slides, and observed under light-field microscopy. Haemorrhagic areas were quantified using Image Pro-Plus software version 7.0.0.591 (Media Cybernetics, Inc.).

2.5 | Streptozotocin-induced diabetes

Rats were injected i.p. with vehicle or a single dose of streptozotocin (STZ) (60 mg/kg in 10 mM citrate buffer, pH 4.5) (Sigma-Aldrich) after overnight fasting. Animals with blood glucose higher than 250 mg/dl at three days post-STZ were considered diabetic.²³ Four weeks after STZ, diabetic and nondiabetic rats were daily injected i.p. with sulpiride (20 mg/kg) or vehicle for two weeks. In other experiments, diabetic and nondiabetic rats were or were not (sham surgery) implanted subcutaneously with osmotic minipumps (Alzet Model 2002; DURECT Corp.) releasing 0.16 mg/kg per day of ovine PRL for 2 weeks. All animals were randomized before receiving treatments, and their bodyweight and blood glucose levels (tail vein samples) determined once each week. Animals were euthanized by CO₂ inhalation and decapitation and their serum and retinas collected.

2.6 | Serum PRL

Rat PRL was measured in serum by ELISA as previously described.²⁴

Ovine PRL released by osmotic minipumps was measured in serum using the Nb2 cell assay, a standard procedure based on the

proliferative response of the Nb2 lymphoma cell line to PRL, carried out as previously described.²⁵ The Nb2 assay detects rat and ovine PRLs, therefore, we made this assay specific to ovine PRL by using a 1:500 dilution of an anti-ovine PRL antiserum (National Hormone & Peptide Program, Torrance, Cat no. C-3581016789, RRID:AB-2629483) that does not cross-react with rat PRL. Accordingly, the difference in Nb2-bioactivity between the absence and presence of anti-ovine PRL antibodies quantified the levels of ovine PRL in rat serum.

2.7 | Immunoprecipitation – Western blot

Prolactin and vasoinhibin were evaluated in serum by immunoprecipitation (IP) – Western blot. Briefly, serum samples (400 μ l) were incubated overnight at 4°C with 2 μ l of anti-rat PRL antiserum (C-1, obtained locally and characterized as reported⁹) in NETgel buffer (50 mM Tris base, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH8.0), 0.1% Igepal CA-630, 0.25% Gelatin from bovine skin, 0.02% Sodium Azide), followed by a 2 h incubation with protein-A Sepharose beads (35 μ l; Sigma-Aldrich). The samples were washed three times with NETgel containing 10% SDS and centrifugation (9,000 *g* for 5 min). The final pellet was subjected to SDS/PAGE on a 15% gel under reducing conditions, transferred to nitrocellulose membranes, and blots were incubated overnight with a 1:500 dilution of the C-1 anti-rat PRL antiserum.⁹ Detection used alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Labs Cat no. 111-055-003, RRID:AB_2337947) and the alkaline phosphatase conjugate substrate kit (Bio-Rad).

2.8 | Retinal vasoinhibin

Vasoinhibin was evaluated in the retina by Western blot. Briefly, each retina was homogenized in 120 μ l lysis buffer (5 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 100 mM sodium acid pyrophosphate, 250 mM sucrose, 1% Igepal CA-630, pH 7.5) supplemented with the protease inhibitor cocktail (11697498001; Roche). Retinal lysates (50–80 μ g total protein) were resolved in reducing SDS/PAGE 15% gels, blotted, and probed overnight with a 1:500 dilution of monoclonal antibodies directed against the N-terminus of rat PRL (INN-1)¹⁰ or ovine PRL (4C10).²⁶ Detection used alkaline phosphatase-coupled and horseradish peroxidase conjugate antibodies (Jackson ImmunoResearch Labs Cat no. 115-055-003, RRID:AB_2338528; Cat no. 115-035-003, RRID:AB_10015289), respectively. β -tubulin was evaluated as loading control using anti-rat β -tubulin antibody (Abcam Cat no. ab6046, RRID:AB_2210370). Quantity One 1-D analysis software (Bio-Rad) evaluated optical density values.

2.9 | Evans blue assay

Retinal vasopermeability was determined by the Evans blue method, as previously reported.²⁷ Briefly, rats were anaesthetized (1 μ l/g

bodyweight, 70% ketamine and 30% xylazine i.p.) and injected (intrajugularly) with Evans blue (45 mg/kg; E2129 Sigma-Aldrich). Two hours later, 1 ml of blood was drawn from the heart to measure Evans blue concentration in plasma, and the rats were perfused for 2 min via the left ventricle with PBS (pH 3.5 at 37°C) at a pressure that allowed a flow rate of 70 ml/min before insertion of catheter and start of perfusion. The retina was dissected and vacuum-dried (SPD 1010 SpeedVac System; Thermo Fisher Scientific) for 4 h. The Evans blue dye was extracted by incubating each retina in 250 μ l formamide (F7503; Sigma-Aldrich) for 18 h at 72°C. Absorbance was measured in the supernatant at 620 nm using the Varioskan Flash spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). The tracer concentration in the extracts was calculated using a standard curve of Evans blue in formamide and normalized to the retina and bodyweight and to the Evans blue concentration in plasma.

2.10 | Albumin in retina

Albumin was evaluated in the retina by Western blot as an index of vasopermeability. Rats were euthanized by CO₂ inhalation and transcardially perfused with PBS (pH 7.4 at 37°C) for 5 min or until liver was cleared of blood, and the retinas were obtained. Retinal lysates (15 μ g total protein) were subjected to reducing SDS/PAGE (10% gel) and blotted overnight at 4°C with a 1:1000 dilution of goat anti-mouse albumin (Bethyl Cat no. A90-134A, RRID:AB_2891982) and anti-mouse GAPDH (Abcam Cat no. ab9485, RRID:AB_307275) as loading control. Detection used alkaline phosphatase-coupled secondary antibodies and the alkaline phosphatase conjugate substrate kit. The Quantity One 1-D analysis software evaluated optical density values.

2.11 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.07 software (Systat Software). The values are expressed as mean \pm SEM. The unpaired two-tailed Student's *t*-test evaluated differences between two groups, whereas one-way ANOVA or two-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test compared means of multiple groups. The threshold for significance was set at $p \leq .05$.

3 | RESULTS

3.1 | Sulpiride induces hyperprolactinaemia in nondiabetic and diabetic rats

Sulpiride induced a dose-dependent increase in serum PRL in nondiabetic rats (Figure 1A), in which serum PRL levels were higher than in the rat STZ-induced diabetes model (Figure 1B) as previously reported.²⁸ The highest dose of sulpiride (20 mg/kg/day) increased circulating PRL to a greater magnitude in nondiabetic

than in diabetic animals (Figure 1C). Serum PRL was elevated by 21- and 16-fold over basal values in nondiabetic and diabetic rats, respectively (Figure 1D). To analyse whether sulpiride also increased circulating vasoinhibin levels, we investigated the presence of vasoinhibin in serum by IP-Western blot (Figure 1E). IP recovered nearly all the PRL and vasoinhibin standards added to the assay buffer as revealed by a monoclonal antibody directed against the N-terminal region of PRL, the region of the PRL molecule present in vasoinhibin (lanes 1 and 2). The serum from sulpiride-treated rats contained higher levels of a 23-kDa immunoreactive protein (the molecular mass of full-length PRL) (lanes 6 and 8) compared to vehicle-treated rats (lanes 5 and 7); and such increment appeared higher in the nondiabetic than in the diabetic animals, thereby confirming the sulpiride-induced elevation of serum PRL. Smaller immunoreactive proteins, presumed vasoinhibin, were not found. Lack of vasoinhibin detection may indicate that serum vasoinhibin is below the detection limit of the assay (5 ng).

3.2 | Sulpiride increases vasoinhibin in the retina of diabetic rats

Vasoinhibin is present in the retina¹⁰ and because levosulpiride-induced hyperprolactinaemia associated with an increase in the levels of vasoinhibin in the vitreous of patients with DR,²¹ we reasoned that an increment in ocular vasoinhibin could originate from the intraocular cleavage of PRL coming from the circulation. Accordingly, we explored whether the hyperprolactinaemia induced by sulpiride increased the levels of vasoinhibin in the retina of diabetic rats. Western blot analysis of retinal lysates using the N-terminal anti-PRL monoclonal antibody showed an immunoreactive ~16 kDa band that may correspond to vasoinhibin, which ranges in size from 14 to 18 kDa and contains the N-terminal end of PRL⁸ (Figure 2A). The densitometric values of the vasoinhibin-like protein were significantly higher after sulpiride treatment in the diabetic condition but not in the nondiabetic one (Figure 2B). These findings suggest that sulpiride elevates vasoinhibin levels in the retina of diabetic rats.

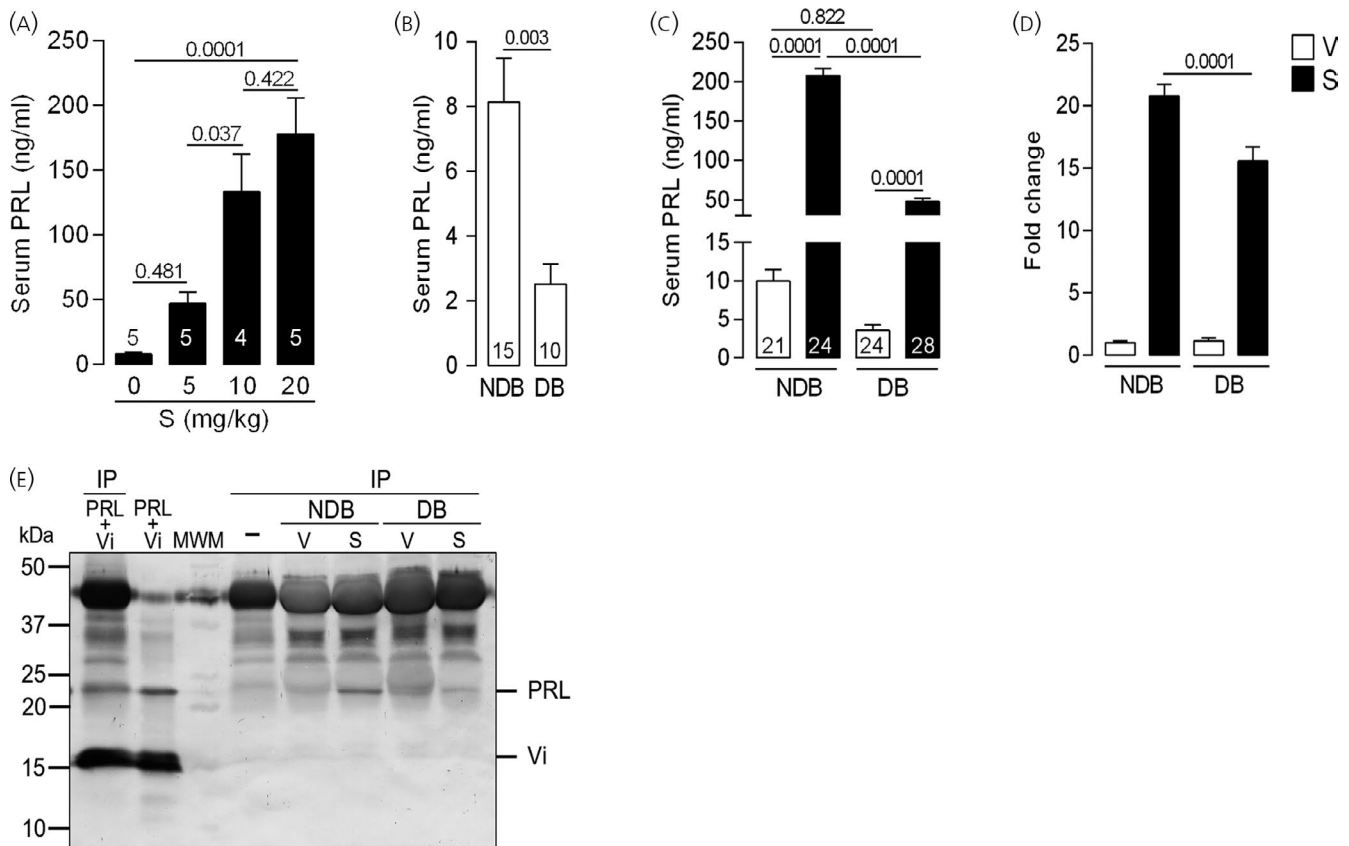


FIGURE 1 Sulpiride induces hyperprolactinaemia in nondiabetic and diabetic rats. (A) Dose-response stimulation of serum prolactin (PRL) levels by different doses of sulpiride (S) administered daily to healthy rats for 5 days. (B) Serum PRL levels in nondiabetic (NDB) and diabetic (DB) rats 6 weeks after inducing or not diabetes with streptozotocin (STZ). (C) Serum PRL levels in NDB and DB rats treated with vehicle (V) or 20 mg/kg sulpiride (S) for 2 weeks, starting 4 weeks after inducing or not diabetes with STZ. (D) PRL serum levels expressed relative to V-treated groups. Values are means \pm SEM; numbers within the bars indicate the number of rats per group. (E) Representative immunoprecipitation (IP)-Western blot evaluation of PRL and vasoinhibin (Vi) in the serum of NDB and DB rats treated with V or S (20 mg/kg) for 2 weeks, starting 4 weeks after inducing or not diabetes with STZ. Rat PRL and vasoinhibin standards (PRL + Vi) were evaluated after and before IP. The IP control without serum (-) and the molecular weight markers (MWM) are shown. Numbers on the left indicate the molecular weights of marker proteins

3.3 | Sulpiride inhibits the diabetes-induced increase in retinal hypervasopermeability

Consistent with the increase in retinal vasoinhibin, treatment with sulpiride lowered diabetes-induced retinal hypervasopermeability as determined by the extravasation of albumin stained by the intravenous injection of the Evans blue dye (Figure 3A). As expected,¹⁶ diabetes induced a significant ~2-fold increase in the retinal accumulation of Evans blue-stained albumin relative to vehicle-treated nondiabetic rats, and this effect was prevented by sulpiride (Figure 3A). Sulpiride did not significantly modify the retinal levels of the tracer in the nondiabetic rats. Consistent with these findings, the direct measurement of albumin in retinal extracts by Western blot showed that the higher values of albumin in diabetic rats were also prevented by sulpiride, although sulpiride also reduced extravasated albumin in the retinas from nondiabetic animals (Figure 3B). These differences were statistically significant after quantifying the densitometric values of albumin from different retinas (Figure 3C). The reason for the discrepancies in nondiabetic rats between both methods is unclear but may relate to an incomplete retinal blood perfusion when using Western blot detection.

3.4 | Sulpiride reduces the VEGF-induced increase in retinal haemorrhages

VEGF is a major vascular permeability factor in DR^{4,29} and vasoinhibin inhibits the VEGF-induced increase in retinal vasopermeability.^{15,16} To assess whether the sulpiride-mediated increase in retinal vasoinhibin inhibits VEGF-induced retinal hypervasopermeability, VEGF or PBS were injected into the vitreous of healthy rats treated with sulpiride or vehicle and their flat-mounted retinas were evaluated 24 h after intravitreal injection. VEGF caused multiple haemorrhagic areas in the retina that were absent in control eyes injected with PBS and nearly absent in VEGF-injected eyes from rats treated with sulpiride (Figure 4A). Image analysis showed that sulpiride reduced VEGF-induced haemorrhagic areas by 73% (Figure 4B).

3.5 | Osmotic minipumps delivering PRL elevate retinal vasoinhibin and inhibit the diabetes-induced increase in retinal vasopermeability

To examine whether the action of sulpiride was due to the hyperprolactinaemic effect of the drug, sulpiride treatment was replaced by osmotic minipumps releasing ovine PRL for 2 weeks starting at four weeks post-STZ injection (the same timeframe of sulpiride treatment). As demonstrated by the Nb2 cell bioassay, serum levels of exogenous ovine PRL (oPRL) increased by ~14-fold in nondiabetic and diabetic rats carrying the osmotic minipumps (Figure 5A). Rat proteases cleave rat, human, and ovine PRL into similar size vasoinhibin.²² The cleavage sites in PRL are conserved throughout evolution for main PRL cleaving enzymes, such as matrix metalloproteases,³⁰

substantiating the ubiquity of vasoinhibin generation and action among vertebrates. To evaluate whether the high levels of circulating ovine PRL favored its intraocular cleavage to vasoinhibin, retinal lysates were analyzed by Western blots probed with an N-terminal anti-ovine PRL monoclonal antibody that does not react with rat PRL and rat vasoinhibin (Figure 5B, lane 3). Rat PRL and vasoinhibin, but not ovine PRL reacted with the N-terminal anti-rat PRL antibody (lanes 1 and 2). Only the retina from diabetic rats made hyperprolactinaemic by the delivery of ovine PRL (lane 8) contained an immunoreactive 16 kDa band that may, thereby, correspond to ovine vasoinhibin (oVi). This vasoinhibin-like protein has the molecular mass of a vasoinhibin and contains the N-terminal region of PRL that defines vasoinhibin.³¹ Consistent with the increase in vasoinhibin, hypervasopermeability was prevented in the retina of hyperprolactinaemic diabetic rats, whereas hyperprolactinaemic nondiabetic animals showed no change in retinal vasopermeability (Figure 5C).

Neither sulpiride nor exogenous PRL altered the blood glucose levels and bodyweight of diabetic and nondiabetic rats (Figure 6).

4 | DISCUSSION

Central to the pathogenesis of DME and DR is chronic hyperglycaemia causing the loss of vascular cells (pericytes and endothelial cells) that result in enhanced retinal vasopermeability and accumulation of extracellular fluid and hard exudates that impair vision when the macula is affected. Over time, intraretinal haemorrhages and capillary occlusion create areas of ischaemia that lead to the proliferation of new blood vessels that invade and bleed into the vitreous producing a fibrovascular tissue that can cause retinal detachment and blindness. The established therapies, laser photocoagulation and intravitreal anti-VEGF inhibitors, are invasive, only partially effective, and require frequent deliveries,³² making the search for new therapeutics essential.⁴

Vasoinhibin is emerging as a modifiable factor for the prevention and treatment of DME and DR. Vasoinhibin is present in the healthy eye¹⁰ where it contributes to the quiescent state of blood vessels. Immunoneutralization of vasoinhibin promotes angiogenesis in the cornea⁹ and retina¹⁰ and impairs the regression of the transient hyaloid vasculature that irrigates immature ocular tissues.³³ Furthermore, the circulating levels of vasoinhibin are altered in patients with DR¹³ and retinopathy of prematurity,¹¹ and in rodents the transfer of the vasoinhibin gene inhibits ischaemia-induced angiogenesis¹⁴ and retinal hypervasopermeability due to diabetes or intravitreal VEGF administration.^{16,17}

Ocular vasoinhibin can originate from systemic PRL entering the eye. Iodinated PRL injected intracardially is incorporated into the retina, choroid, and ciliary body³⁴; ocular fluids contain proteases that convert PRL to vasoinhibin,³³ and rats rendered hyperprolactinaemic, by placing two anterior pituitary grafts under the kidney capsule, have increased levels of vasoinhibin in the retina.³⁵ Elevating circulating PRL and, therefore, ocular vasoinhibin is the basis of an ongoing clinical trial investigating levosulpiride for the

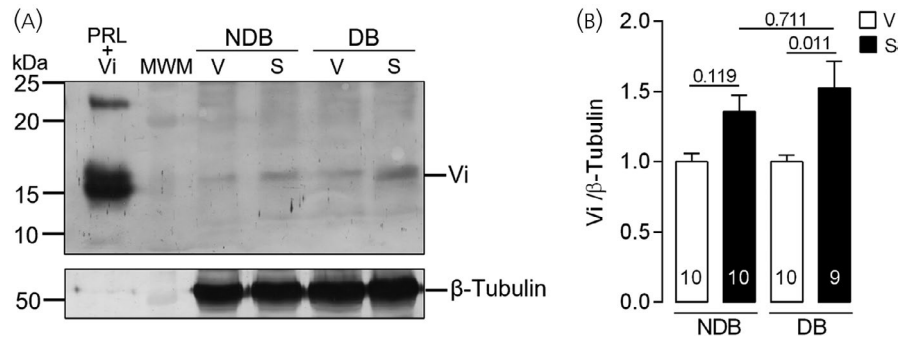


FIGURE 2 Sulpiride increases vasoinhibin in the retina of diabetic rats. (A) Representative Western blot evaluation of retinal lysates from nondiabetic (NDB) and diabetic (DB) rats treated with vehicle (V) or 20 mg/kg sulpiride (S) for 2 weeks, starting 4 weeks after inducing or not diabetes with streptozotocin (STZ). A combination of prolactin (PRL) and vasoinhibin standards (PRL + Vi) and molecular weight markers (MWM) are shown. Numbers on the left indicate the molecular weight markers in kDa. (B) Densitometric analysis of the Vi bands after normalization for β -tubulin. Values are means \pm SEM. Numbers inside the bars indicate the number of retinas evaluated per group

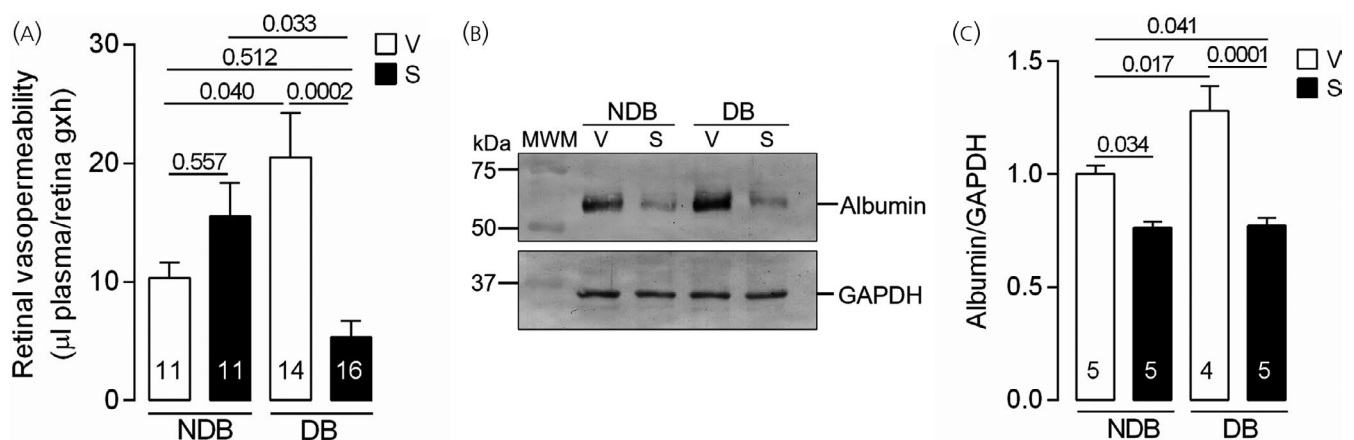


FIGURE 3 Sulpiride inhibits the diabetes-induced increase in retinal vasopermeability. (A) Retinal vasopermeability evaluated by the Evans blue method in nondiabetic (NDB) and diabetic (DB) rats treated with vehicle (V) or 20 mg/kg sulpiride (S) for 2 weeks, starting 4 weeks after inducing or not diabetes with streptozotocin (STZ). (B) Western blot evaluation of albumin in retinal extracts from NDB and DB rats treated with vehicle (V) or 20 mg/kg sulpiride (S) for 2 weeks, starting 4 weeks after inducing or not diabetes with STZ. Molecular weight markers (MWM) are shown. Numbers on the left indicate the molecular weight markers in kDa. (C) Densitometric analysis of the albumin bands after normalization for GAPDH. Values are means \pm SEM. Numbers inside the bars indicate the number of retinas analysed

treatment of DME and DR.¹⁸ Levosulpiride elicits hyperprolactinaemia through blockage of dopaminergic D2 receptors at the anterior pituitary level.²⁰ The clinical trial has demonstrated that levosulpiride increases PRL and its conversion to bioactive vasoinhibin in the vitreous of patients with proliferative DR.²¹ However, the beneficial outcome of the use of levosulpiride in DME and DR awaits completion of the trial. Here, we provide preclinical evidence that hyperprolactinaemia induced by racemic sulpiride results in the accumulation of retinal vasoinhibin and reduces retinal vascular alterations in diabetic rats.

As anticipated from a dopamine D2 receptor antagonist, sulpiride induces a dose-dependent elevation of PRL in the circulation, with the highest dose increasing PRL to values like those (>100 ng/ml) elicited by levosulpiride in the clinical study.²¹ The hyperprolactinaemic effect of sulpiride was lower in diabetic animals. This is expected since STZ causes the apoptosis of PRL-producing cells (lactotropes) in the anterior pituitary gland³⁶ and results in reduced levels of circulating PRL.²⁸

IP-Western blot, a semiquantitative method that may not be sensitive enough to detect vasoinhibin in the circulation,²¹ was not able to show an elevation of systemic vasoinhibin. However, sulpiride did enhance the Western blot detection of a vasoinhibin-like protein in the retina of diabetic rats. The protein has the molecular mass (~16 kDa) of a common vasoinhibin and contains the N-terminal region of PRL that defines vasoinhibin.³¹ This result is consistent with the clinical trial showing that levosulpiride increases bioactive vasoinhibin in the vitreous of patients with DR²¹ and suggests that sulpiride-induced hyperprolactinaemia favours the incorporation of PRL into the eye of diabetic rats where it gets cleaved to vasoinhibin. In agreement, sulpiride inhibited retinal hypervasopermeability in diabetes, a well-known effect of vasoinhibin.¹⁵⁻¹⁷ Also, vasoinhibin blocks the increase in retinal vasopermeability induced by the intraocular injection of VEGF¹⁵⁻¹⁷ and sulpiride prevented the retinal haemorrhages that follow intravitreal VEGF administration.

Vascular endothelial growth factor is a major vasopermeability factor in DME and DR. It is upregulated in eyes from patients with

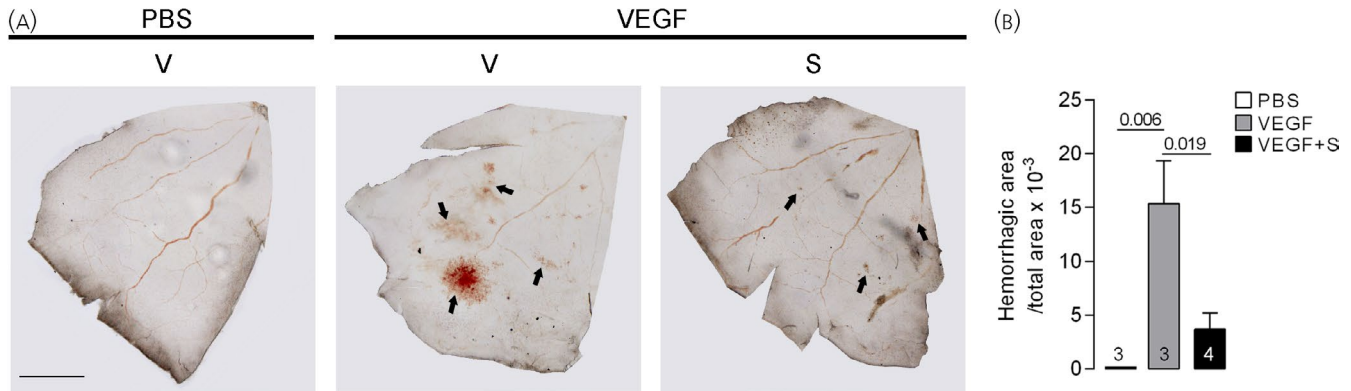


FIGURE 4 Sulpiride reduces the VEGF-induced increase in retinal haemorrhages. (A) Representative light-field micrograph showing a portion of flat-mounted retinas 24 h after the intravitreal injection of PBS or VEGF in healthy rats pretreated with vehicle (V) or 20 mg/kg sulpiride (S) for 5 days. Some retinal haemorrhages are indicated (arrows) and the scale bar: 100 μ m. (B) Quantification of haemorrhagic areas per retinal area. Values are means \pm SEM. Numbers inside the bars indicate the number of retinas analysed

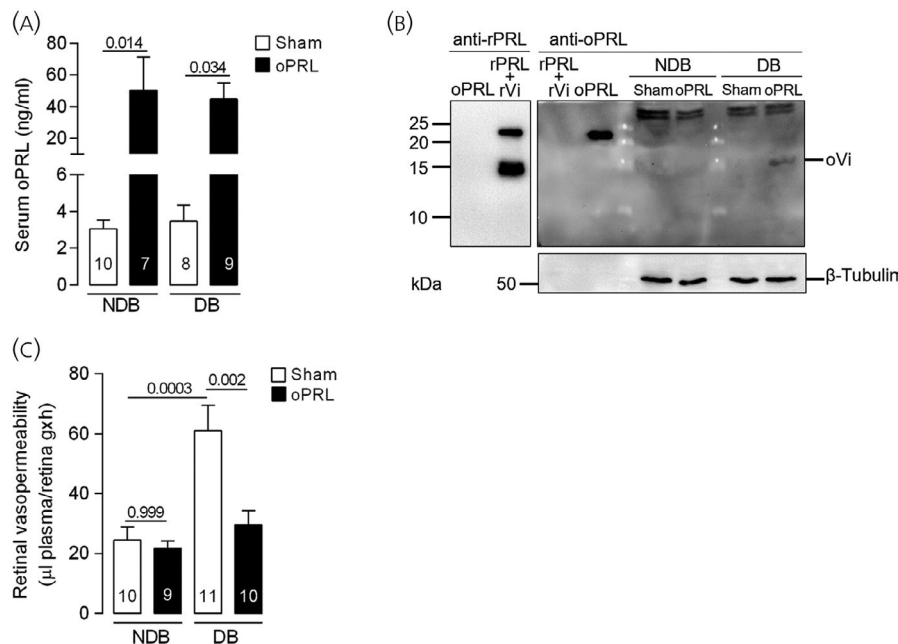


FIGURE 5 Osmotic minipumps delivering ovine PRL elevate retinal ovine vasoinhibin and inhibit diabetes-induced increase in retinal vasopermeability. (A) Serum prolactin (PRL) levels in nondiabetic (NDB) and diabetic (DB) rats subjected to sham surgery or carrying osmotic minipumps delivering ovine PRL (oPRL) 2 weeks, starting 4 weeks after inducing or not diabetes with streptozotocin (STZ). (B) Representative Western blot evaluation of ovine vasoinhibin (oVi) in the retinas of sham- or oPRL-treated NDB and DB rats. Standards of oPRL, rat PRL (rPRL) and rat vasoinhibin (rVi) were probed with anti-rPRL and anti-oPRL antibodies to show lack of reaction of the anti-oPRL antibodies with the rat hormones (PRL and Vi). Numbers on the left indicate the molecular weights of marker proteins. (C) Retinal vasopermeability evaluated by the Evans blue method in sham- or oPRL-treated NDB and DB rats. Values are means \pm SEM. The numbers within the bars indicate the number of retinas analysed

DME and DR,^{37,38} and the clinical efficacy of treatments with anti-VEGF agents indicates that VEGF contributes to their pathophysiology.^{29,32} Vasoinhibin inhibits the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) that leads to stimulation of vasopermeability and vasoproliferation in response to VEGF.^{15,39} VEGF stimulates eNOS activity by promoting the PI3K-Akt-dependent phosphorylation/activation of eNOS⁴⁰ and the Ca²⁺-calmodulin activation of eNOS⁴¹; whereas vasoinhibin activates protein phosphatase 2A that

dephosphorylates eNOS¹⁵ and inhibits Ca²⁺ mobilization resulting from phospholipase C-induced inositol 1,4,5-triphosphate production and the expression of transient receptor potential canonical (TRPC) channels.^{39,42}

Altogether, our findings show that sulpiride reduces excessive retinal vasopermeability in diabetes by a mechanism that may involve the elevation of circulating PRL and the subsequent increase in retinal vasoinhibin able to block the action of VEGF. In support of

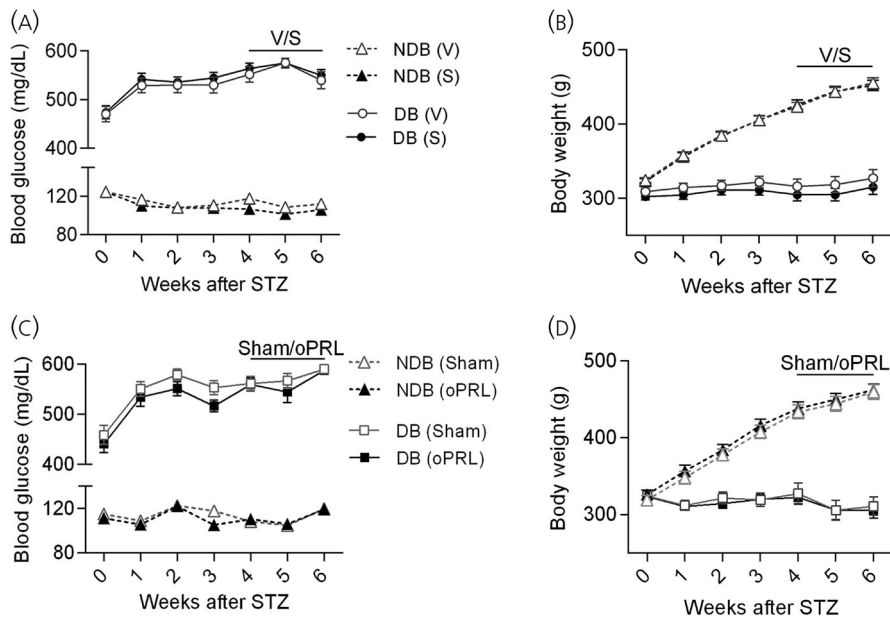


FIGURE 6 Blood glucose and bodyweight do not change after sulpiride or ovine PRL treatments. Blood glucose (A, C) and bodyweight (B, D) values of nondiabetic (NDB) and diabetic (DB) rats treated with vehicle (V), sulpiride (S), untreated (Sham) or implanted with osmotic pumps delivering ovine prolactin (oPRL). All treatments started 4 weeks after inducing or not diabetes with streptozotocin. Values are means \pm SEM from 21 to 26 rats per group

sulpiride acting through its hyperprolactinaemic effect, the chronic administration of exogenous ovine PRL closely mimicked the action of sulpiride on both the retinal accumulation of vasoinhibin and the inhibition of retinal hypervasopermeability. The fact that exogenous ovine PRL got converted to ovine vasoinhibin in the diabetic condition, further supports that the increase in retinal vasoinhibin originates from the incorporation of systemic PRL into the eye. However, sulpiride induced a higher level of hyperprolactinaemia under the nondiabetic condition and yet similar levels of vasoinhibin were detected in the retina between sulpiride-treated nondiabetic rats and diabetic rats. This finding indicates that proportionally less PRL is being converted to vasoinhibin in the healthy rat retina relative to the diabetic rat retina. The reason for this difference may relate to the integrity of the blood ocular barrier of the nondiabetic condition limiting access of systemic PRL into the eye. It may also be possible that the activity of PRL cleaving proteases is reduced under normal health conditions, albeit the opposite has been reported for the vitreous of nondiabetic patients compared to patients with proliferative DR.²¹ Clarification of these possibilities warrants further research.

Sulpiride may also impact blood vessels by mechanisms independent of the PRL/vasoinhibin axis. Dopamine D2 receptors are expressed in vascular endothelium,⁴³ and the activation of D2 receptors in endothelial cells inhibits VEGF-mediated angiogenesis⁴⁴ and vasopermeability.⁴⁵ However, the fact that D2 receptors inhibit the action of VEGF in endothelial cells makes it unlikely that inhibition of retinal hypervasopermeability in response to sulpiride results from a direct vascular effect of the drug. Neither sulpiride nor exogenous PRL affected the bodyweight and blood glucose levels in healthy and diabetic rats. These observations are consistent with previous results in healthy rats⁴⁶ and suggest that there are no adverse effects of the drug in diabetic rodents. In agreement, sulpiride and levosulpiride, are a prokinetic medication used for the treatment of diabetic gastroparesis, a complication found in 5% of

diabetic patients.⁴⁷ Also, large cohort clinical data and preclinical studies⁴⁸ indicate that high circulating PRL levels within the normal- and hyperprolactinaemic-range protect against diabetes and other metabolic diseases.⁴⁸

We conclude that high levels of circulating PRL inhibit excessive retinal vasopermeability in response to diabetes or VEGF by promoting the intraocular conversion of PRL to vasoinhibin. Our findings provide preclinical evidence of the beneficiary outcome of sulpiride in experimental DR in terms of a vasoinhibin-mediated antagonization of VEGF-induced retinal vascular alterations. Clinical proof awaits completion of the ongoing trial investigating levosulpiride as a potential treatment to impact the loss of vision in people with diabetes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Fernando López Barrera, Alejandra Castilla, María A. Carbajo, and Martín García Servín for excellent technical assistance and Jessica González Norris for proofreading the manuscript. This study was supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT, grant 289568) and UNAM (grant 405PC) to CC. Elva Adán Castro is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 588869 from CONACYT.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that no competing interest exists.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Elva Adan-Castro: Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing – original draft. **Lourdes Siqueiros-Marquez:** Formal analysis; Investigation; Methodology. **Gabriela Ramirez-Hernandez:** Formal analysis; Methodology. **Nundehui Diaz-Lezama:** Formal analysis; Methodology.

Xarubet Ruiz-Herrera: Methodology. **Francisco Freinet Nuñez:** Methodology. **Carlos D. Nuñez-Amaro:** Methodology. **Ma. Ludivina Robles-Osorio:** Conceptualization; Writing – review & editing. **Thomas Bertsch:** Conceptualization; Writing – review & editing. **Jakob Triebel:** Conceptualization; Writing – review & editing. **Gonzalo Martinez de la Escalera:** Conceptualization; Investigation; Writing – review & editing. **Carmen Clapp:** Conceptualization; Funding acquisition; Investigation; Project administration; Supervision; Validation; Writing – original draft.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/jne.13091>.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

ORCID

Carmen Clapp  <https://orcid.org/0000-0002-7670-6718>

REFERENCES

- International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. International Diabetes Federation; 2019: 1-170p.
- Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012;35:556-564.
- Cohen SR, Gardner TW. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Dev Ophthalmol*. 2016;55:137-146.
- Kim EJ, Lin WV, Rodriguez SM, et al. Treatment of diabetic macular edema. *Curr Diab Rep*. 2019;19:68.
- Clapp C, Aranda J, González C, et al. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17:301-307.
- Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, et al. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev*. 2009;89:1177-1215.
- Clapp C, Thebault S, Macotela Y, et al. Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins. *Adv Exp Med Biol*. 2015;846:83-95.
- Triebel J, Bertsch T, Bollheimer C, et al. Principles of the prolactin/vasoinhibin axis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;309:R1193-R1203.
- Dueñas Z, Torner L, Corbacho AM, et al. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:2498-2505.
- Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, et al. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:2947-2953.
- Zepeda-Romero LC, Vazquez-Membrillo M, Adan-Castro E, et al. Higher prolactin and vasoinhibin serum levels associated with incidence and progression of retinopathy of prematurity. *Pediatr Res*. 2017;81:473-479.
- Vázquez-Membrillo M, Siqueiros-Márquez L, Núñez FF, et al. Prolactin stimulates the vascularisation of the retina in newborn mice under hyperoxia conditions. *J Neuroendocrinol*. 2020;32:e12858.
- Triebel J, Huefner M, Ramadori G. Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol*. 2009;161:345-353.
- Pan H, Nguyen NQ, Yoshida H, et al. Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:2413-2419.
- García C, Aranda J, Arnold E, et al. Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest*. 2008;118:2291-2300.
- Ramírez M, Wu Z, Moreno-Carranza B, et al. Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:8944-8950.
- Díaz-Lezama N, Wu Z, Adán-Castro E, et al. Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vectors in the retina: therapeutic effect of AAV2 encoding vasoinhibin and soluble VEGF receptor 1. *Lab Invest*. 2016;96:283-295.
- Robles-Osorio ML, García-Franco R, Núñez-Amaro CD, et al. Basis and design of a randomized clinical trial to evaluate the effect of levosulpiride on retinal alterations in patients with diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Front Endocrinol*. 2018;9:242.
- Ratnani I, Panchal B, Gandhi R, et al. Role of levosulpiride in the management of functional dyspepsia. *J Fam Med*. 2015;2:1034.
- Kuchay MS, Mithal A. Levosulpiride and serum prolactin levels. *Indian J Endocrinol Metab*. 2017;21:355-358.
- Núñez-Amaro CD, Moreno-Vega AI, Adan-Castro E, et al. Levosulpiride increases the levels of prolactin and antiangiogenic vasoinhibin in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Transl Vis Sci Technol*. 2020;9:27.
- Clapp C. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology*. 1987;121:2055-2064.
- Akbarzadeh A, Norouzi D, Mehrabi MR, et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem*. 2007;22:60-64.
- Guillou A, Romanò N, Steyn F, et al. Assessment of lactotroph axis functionality in mice: longitudinal monitoring of PRL secretion by ultrasensitive-ELISA. *Endocrinology*. 2015;156:1924-1930.
- Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, et al. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980;51:1058-1063.
- Scammell JG, Luck DN, Valentine DL, et al. Epitope mapping of monoclonal antibodies to bovine prolactin. *Am J Physiol*. 1992;263:E520-E525.
- Xu Q, Qaum T, Adamis AP. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:789-794.
- Lemini M, Ruiz-Herrera X, Ledesma-Colunga MG, et al. Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels are reduced in obese and diabetic rats: Role of TGF- β and TNF- α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;308:R792-R799.
- Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med*. 2012;366:1227-1239.
- Macotela Y, Aguilar MB, Guzmán-Morales J, et al. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci*. 2006;119:1790-1800.
- Zamora M, Robles JP, Aguilar MB, et al. Thrombin cleaves prolactin into a potent 5.6 kDa vasoinhibin: implication for tissue repair. *Endocrinology*. 2021;162(12):bqab177.
- Boyer DS, Hopkins JJ, Sorof J, et al. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for diabetic macular edema. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2013;4:151-169.
- Dueñas Z, Rivera JC, Quiróz-Mercado H, et al. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:2049-2055.
- O'Steen WK, Sundberg DK. Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injection of iodinated prolactin. *Ophthalmic Res*. 1982;14:54-62.
- Arnold E, Rivera JC, Thebault S, et al. High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes*. 2010;59:3192-3197.

36. Arroba AI, Frago LM, Pañeda C, et al. The number of lactotrophs is reduced in the anterior pituitary of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*. 2003;46:634-638.
37. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 1994;118:445-450.
38. Funatsu H, Yamashita H, Noma H, et al. Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humor of diabetics with macular edema. *Am J Ophthalmol*. 2002;133:70-77.
39. Gonzalez C, Corbacho AM, Eiserich JP, et al. 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology*. 2004;145:5714-5722.
40. Six I, Kureishi Y, Luo Z, et al. Akt signaling mediates VEGF/VPF vascular permeability in vivo. *FEBS Lett*. 2002;532:67-69.
41. Gélinas DS, Bernatchez PN, Rollin S, et al. Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways. *Br J Pharmacol*. 2002;137:1021-1030.
42. Thebault S, González C, García C, et al. Vasoinhibins prevent bradykinin-stimulated endothelial cell proliferation by inactivating eNOS via reduction of both intracellular Ca²⁺ levels and eNOS phosphorylation at ser1179. *Pharmaceuticals*. 2011;4:1052-1069.
43. Zarei S, Frieden M, Rubi B, et al. Dopamine modulates von Willebrand factor secretion in endothelial cells via D2-D4 receptors. *J Thromb Haemost*. 2006;4:1588-1595.
44. Basu S, Nagy JA, Pal S, et al. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med*. 2001;7:569-574.
45. Sarkar C, Chakroborty D, Mitra RB, et al. Dopamine in vivo inhibits VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2, MAPK, and focal adhesion kinase in endothelial cells. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2004;287:H1554-H1560.
46. Baptista T, Lacruz A, Páez X, et al. The antipsychotic drug sulpiride does not affect bodyweight in male rats. Is insulin resistance involved? *Eur J Pharmacol*. 2002;447:91-98.
47. Mansi C, Savarino V, Vigneri S, et al. Gastrokinetic effects of levosulpiride in dyspeptic patients with diabetic gastroparesis. *Am J Gastroenterol*. 1995;90:1989-1993.
48. Macotela Y, Triebel J, Clapp C. Time for a new perspective on prolactin in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2020;31:276-286.

How to cite this article: Adán-Castro E, Siqueiros-Márquez L, Ramírez-Hernández G, et al. Sulpiride-induced hyperprolactinaemia increases retinal vasoinhibin and protects against diabetic retinopathy in rats. *J Neuroendocrinol*. 2022;34:e13091. doi:[10.1111/jne.13091](https://doi.org/10.1111/jne.13091)