

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA HIPERPROLACTINEMIA INDUCIDA POR  
LEVOSULPIRIDA SOBRE LOS NIVELES DE PROLACTINA EN EL VITREO DE  
PACIENTES CON RETINOPATÍA DIABÉTICA

2017



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales



Tesis

“ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA HIPERPROLACTINEMIA  
INDUCIDA POR LEVOSULPIRIDA SOBRE LOS NIVELES  
DE PROLACTINA EN EL VITREO DE PACIENTES CON  
RETINOPATÍA DIABÉTICA”

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta:

QBP. Carlos Daniel Núñez Amaro

Dirigida por:

Dra. Ma. Ludivina Robles Osorio



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

**TESIS**

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA HIPERPROLACTINEMIA INDUCIDA POR LEVOSULPIRIDA  
SOBRE LOS NIVELES DE PROLACTINA EN EL VITREO DE PACIENTES CON RETINOPATÍA  
DIABÉTICA**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

**Presenta:**

QBP. Carlos Daniel Núñez Amaro

**Dirigido por:**

Dra. Ma. Ludivina Robles Osorio

**SINODALES**


Dra. Ma. Ludivina Robles Osorio  
Presidente



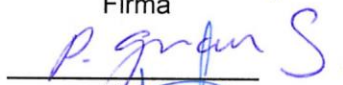

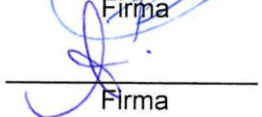
Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora  
Secretario

Dr. Pablo García Solís  
Vocal

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel  
Suplente

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez  
Suplente

  
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Directora de la Facultad de Ciencias Naturales

  
Firma  
  
Firma  
  
Firma  
  
Firma  
  
Firma

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre de 2017  
México

**No podemos cambiar la dirección del viento, pero tampoco podemos  
permitir que el viento nos lleve a cualquier dirección que elija.  
Actuamos, decidimos y se nos supera en contra.**

**Fragmento del diario de los whills.**

## RESUMEN

La retinopatía diabética (RD) es la primera causa de la pérdida de la visión en los pacientes con diabetes y se caracteriza por la formación de nuevos vasos que pueden llegar a desprender la retina, ocasionando una ceguera irreversible. Estudios en roedores muestran que la hormona prolactina (PRL) presente en la circulación se incorpora al ojo en donde es procesada proteolíticamente hacia vaso-inhibinas, una familia de fragmentos moleculares de la PRL con actividades bien caracterizadas de inhibición en la vasopermeabilidad y la angiogénesis ocular. Por lo tanto, el elevar los niveles de la PRL circulante pudiera representar un tratamiento para la RD. La levosulpirida es un antagonista de los receptores D2 de la dopamina que se utiliza en pacientes diabéticos por sus efectos procinéticos en el tracto digestivo y que tiene como efecto secundario inducir hiperprolactinemia. En este estudio investigamos si la administración oral de levosulpirida eleva los niveles de la PRL en el vítreo de pacientes voluntarios con RD que fueron sometidos a vitrectomía por indicación médica. El tratamiento con levosulpirida (25 mg 3 veces al día) fue por 7 días y elevó los niveles séricos ( $111.7 \pm 12.51$  vs  $10.08 \pm 1.46$  ng/ml,  $p < 0.0001$ ) y vítreos ( $3.59 \pm 0.45$  vs  $1.65 \pm 0.26$  ng/ml,  $p < 0.0008$ ) de la PRL en relación al tratamiento con placebo. Los niveles de la PRL en el vítreo se correlacionaron directamente con los niveles circulantes de la hormona ( $r=0.56$ ,  $R^2=0.31$ ,  $p<0.05$ ) en los 31 pacientes del estudio (16 tratados con placebo y 15 con levosulpirida). Estos resultados muestran por primera vez la presencia de PRL en el vítreo humano y la incorporación de la PRL sistémica al ojo de pacientes con RD. Estudios en proceso están evaluando los niveles vítreos de las vaso-inhibinas y ampliando estos hallazgos a un grupo mayor de pacientes. Nuestro trabajo es consistente con el uso de la levosulpirida como un tratamiento potencial contra la RD.

(Palabras clave: retinopatía diabética, vaso-inhibinas, levosulpirida, bloqueadores de receptores D2 de dopamina).

## SUMMARY

Diabetic retinopathy (DR) is a major microvascular diabetic complication characterized by excessive vasopermeability and the proliferation of new blood vessels (angiogenesis) that can lead to retinal detachment and blindness. Preclinical studies have shown that the hormone prolactin (PRL) enters the retina from the systemic circulation where it is proteolytically cleaved to vaso-inhibins, a family of PRL fragments that inhibit ischemia-induced retinal angiogenesis and diabetes-derived retinal vasopermeability. Therefore, medications causing hyperprolactinemia have therapeutic potential in DR. Levosulpiride is a dopamine D2 receptor antagonist effective for inducing hyperprolactinemia used as a prokinetic. In this study, we investigated whether the oral administration of levosulpiride elevates PRL levels in serum and vitreous of volunteer patients with DR undergoing medically prescribed vitrectomy. PRL was measured by immunoassay. The treatment with levosulpiride (25 mg, 3 times a day) was given for 7 days, ending on the day of vitrectomy. Levosulpiride elevated circulating ( $111.7 \pm 12.51$  vs  $10.08 \pm 1.46$  ng/ml,  $p < 0.0001$ ) and vitreous ( $3.59 \pm 0.45$  vs.  $1.65 \pm 0.26$  ng/ml,  $P < 0.0008$ ) levels of PRL compared to placebo treatment. PRL levels in the vitreous correlated directly ( $r = 0.56$ ,  $R^2 = 0.31$ ,  $p < 0.05$ ) with the circulating levels of PRL in the whole study population (16 patients treated with placebo and 15 with levosulpiride). These results show for the first time the presence of PRL in human vitreous and the incorporation of systemic PRL into the eye of patients with DR. On going studies are evaluating vitreous levels of vaso-inhibins and of other vasoactive and proinflammatory mediators known to influence DR. Our work is consistent with the use of levosulpiride to elevate intraocular PRL as potential treatment for DR.

(Key words: diabetic retinopathy, vaso-inhibins, levosulpiride, dopamine D2 receptor blockers).

## **DEDICATORIAS**

### **A María del Carmen González López**

Mi amor, sin ti nada de esto sería posible, pues me consta que a tu lado las imposibilidades no existen. Te amo y estoy muy feliz por todos estos años que haz compartido conmigo, te prometo serán muchos más.

### **A mi familia**

A mi madre, mi abuela, mis tías y tíos, a mis hermanos, primos y primas. Parte de este proyecto fue por ustedes, y quiero que así se quede. Todo por darle honor a la familia.

### **A todo el STAFF del Laboratorio del Parque**

A la Qca. Guadalupe Hernández, a las Químicas; Rossy, Arianda, Karla, Socorro, y al Qco. René. A la Srita. Mariel, a Isa, a Luz y al Sr. Ángel. Gracias a todos por la oportunidad y por verme crecer como profesionista a lo largo de todos estos años. Pero sobre todo, gracias por hacerme parte de su familia, ¡gracias jefa!

### **A mis amigos y compañeros de la MCNH**

A Ana Vega, Miris, Mony, Mely, Bren, Yessy, May, Gaby, Kary, Ana E, Hector, Nacho, Max, Paco, Rulo, Aarón y toda la gente increíble de la FCN. Chicos, valió la pena esperar cinco años para conocerlos, ahora se que no estaba loco. Si hay una definición de “hacer maestría”, es definitivamente esta.

### **A todas las personas que hicieron inolvidable esta experiencia**

Al Sr. Enrique Carreto, a Gerardo Rivera, Esquivel, Job, Lau, Emmanuel y Socorro. A los amigos que hice en el PROPAC, al personal del Hospital del Sagrado Corazón de Jesús y a todo el STAFF del IMO por hacerme parte de su equipo y hacerme sentir como en casa.

### **Y a mis hermosos fantasmas...**

A mi abuelo, a mis tíos y a mis amigos, por fin terminamos. A ustedes que me animaron a seguir adelante y no pudieron verme concluir este proyecto, los llevaré por siempre en mi corazón.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A la Dra. Ma. Ludivina Robles Osorio**

Por la oportunidad que me otorgó a pesar de las circunstancias que toda lógica podía impedir. Gracias por no dejarme solo, por guiarme y enseñarme a ser mejor profesionalista. A usted siempre le voy a estar agradecido.

### **A las Dras. Carmen Clapp y Carmen Mejía**

Por las toneladas de paciencia y comprensión a lo largo de este viaje. Gracias por todo el tiempo que invirtieron en mi preparación. Por su confianza, apoyo y cariño, siempre estaré orgulloso de ser su alumno.

### **A los Dres. Hebert Hernández y Pablo García**

Por la presión y sus oportunos consejos. Mi titulación y proyectos no hubieran llegado a una oportuna conclusión sin sus importantes intervenciones. Por hacerme leer más de la cuenta y a cuestionarme cosas que por error ya daba por hecho.

### **A las Dras. Renata García, Ximena Mira y Paulina Ramirez**

Por darme la oportunidad de trabajar a su lado y aprender de ustedes. Por su gran apoyo y paciencia en el desarrollo de este trabajo.

### **Al Instituto de Neurobiología (UNAM) campus Juriquilla**

Por todo el apoyo académico, económico y administrativo que permitieron la culminación de este proyecto de investigación

### **Al Instituto Mexicano de Oftalmología**

Por todo el apoyo especializado y las facilidades para la realización de este proyecto

### **A la Universidad Autónoma de Querétaro**

Por darme cobijo, hacerme parte de ella y darme la oportunidad de culminar mis estudios de maestría.

### **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt)**

Por el apoyo económico para la realización de este trabajo

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>II</b>
<b>DEDICATORIAS</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>VIII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
<b>2.1 <i>Diabetes mellitus</i>, generalidades.</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Retinopatía diabética</b>	<b>5</b>
2.2.1 Epidemiología	<b>6</b>
2.2.2 Fisiopatología	<b>6</b>
2.2.3 Diagnóstico y clasificación	<b>8</b>
2.2.3.1 Retinopatía diabética no proliferativa (RDNP)	<b>8</b>
2.2.3.2 Retinopatía diabética proliferativa (RDP)	<b>9</b>
2.2.4 Cambios clínicos	<b>11</b>
2.2.4.1 Edema macular	<b>11</b>
2.2.4.2 Hemorragia vítrea y desprendimiento de retina	<b>12</b>
2.2.5 Tratamiento actual y sus limitaciones	<b>13</b>
2.2.5.1 Fotocoagulación con láser	<b>14</b>
2.2.5.2 Terapia intravítrea antiangiogénica	<b>15</b>
2.2.5.3 Vitrectomía	<b>17</b>
<b>2.3 Prolactina</b>	<b>18</b>
<b>2.4 Vasoinhibinas</b>	<b>19</b>
2.4.1 Características de las vasoinhibinas	<b>22</b>
<b>2.5 Hiperprolactinemia como tratamiento alternativo contra la RD</b>	<b>22</b>
<b>2.6 Levosulpirida</b>	<b>23</b>



<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	<b>28</b>
<b>V. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
5.1 Objetivo general	29
5.2 Objetivos específicos	29
<b>VI. METODOLOGÍA</b>	<b>30</b>
6.1 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	30
6.2 Formación de los grupos de estudio	31
6.3 Seguimiento	32
6.4 Mediciones y análisis	32
6.5 Identificación de tratamientos	33
6.6 Asignación de tratamientos	33
6.7 Análisis estadístico	34
6.8 Aspectos bioéticos del estudio	34
<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>44</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>45</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Efectos secundarios de levosulpirida en 840 pacientes dispépticos	<b>25</b>
<b>Cuadro 2.</b> Criterios de inclusión, exclusión y eliminación establecidos para este estudio	<b>30</b>
<b>Cuadro 3.</b> Grupos de pacientes que se integraron para el estudio.	<b>31</b>
<b>Cuadro 4.</b> Determinaciones realizadas a los pacientes	<b>32</b>
<b>Cuadro 5.</b> Asignación aleatoria de tratamientos para pacientes de género femenino	<b>34</b>
<b>Cuadro 6.</b> Asignación aleatoria de tratamientos para pacientes de género masculino	<b>34</b>
<b>Cuadro 7.</b> Características clínicas y demográficas de los sujetos del estudio	<b>35</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema que muestra la unión capilar-pericito	<b>7</b>
<b>Figura 2.</b> Imagen que muestra microaneurismas en la retina	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema que ilustra la proliferación de los nuevos vasos sanguíneos anormales, hemorragias y el desprendimiento de retina por tracción	<b>10</b>
<b>Figura 4.</b> A, Ubicación de la mácula dentro del globo ocular B, Acumulación de líquido por debajo del área macular	<b>11</b>
<b>Figura 5.</b> A, Fotografía que muestra una gran hemorragia vítrea B, Desprendimiento de retina causado por RDP	<b>13</b>
<b>Figura 6.</b> A, Esquema que muestra el proceso de fotocoagulación con láser B, Quemaduras ocasionadas por la fotocoagulación	<b>15</b>
<b>Figura 7.</b> A, Esquema que muestra la aplicación de la terapia intravítrea B, Esquema que muestra en fundamento de esta terapia	<b>16</b>
<b>Figura 8.</b> A, Esquema que muestra la aplicación de la vitrectomía B, Fotografía tomada a un paciente durante la vitrectomía	<b>18</b>
<b>Figura 9.</b> Esquema que muestra la proteólisis en la prolactina por catepsina-D y metaloproteasas de matriz	<b>20</b>
<b>Figura 10.</b> Esquema que muestra los diferentes sitios específicos de corte de la prolactina utilizados por las diferentes proteasas	<b>21</b>
<b>Figura 11.</b> Acción de las vasoinhibinas dentro del tejido ocular	<b>21</b>
<b>Figura 12.</b> Levosulpirida	<b>23</b>
<b>Figura 13.</b> Identidad a los tratamientos establecidos en el estudio	<b>33</b>
<b>Figura 14.</b> La levosulpirida induce hiperprolactinemia	<b>36</b>
<b>Figura 15.</b> La hiperprolactinemia debida a levosulpirida es mayor en mujeres que en hombres	<b>36</b>
<b>Figura 16.</b> Niveles de PRL vítreos en pacientes masculinos y femeninos	<b>37</b>
<b>Figura 17.</b> Correlación entre los niveles séricos de PRL post-tratamiento y los niveles vítreos	<b>37</b>
<b>Figura 18.</b> La hiperprolactinemia inducida por levosulpirida desaparece una vez suspendido el tratamiento	<b>38</b>

## I. INTRODUCCIÓN

La diabetes de tipo 2 (DM2) representa la mayoría de los casos de diabetes y se debe en gran medida a sobrepeso u obesidad, inactividad física y herencia (OMS 2017). Las alteraciones fisiopatológicas son resistencia a la insulina y falla de las células beta pancreáticas. De las principales complicaciones que sufren los pacientes con DM2 debidas a la hiperglucemia crónica se encuentra la retinopatía diabética (RD), una microangiopatía que es una de las causas más importantes de ceguera en personas entre los 20 y los 65 años de edad, principalmente en países en desarrollo (Santana-Pérez F., et al. 2013).

En la diabetes, el descontrol metabólico crónico produce un aumento en la pérdida de pericitos, las células encargadas de regular el calibre y flujo vascular de los vasos en la retina, lo que vuelve a los vasos sanguíneos anormalmente permeables (Arnold-E., 2010). Conforme esta permeabilidad aumenta, ocurren pequeñas hemorragias y exudados de origen lipídico y proteico en la retina que deterioran la visión proporcionalmente a su dimensión y localización (Tenorio-G., et al. 2010). El engrosamiento de la pared de los vasos sanguíneos conlleva a una disminución severa en la perfusión sanguínea (isquemia) y a la consecuente hipoxia que estimula la expresión de factores proangiogénicos tales como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Moreno-Páramo D., et al. 2007). Este conjunto de cambios caracteriza a la retinopatía diabética no proliferativa (RDNP). Posteriormente, la mayor producción de factores proangiogénicos conducen a la neovascularización en la retina. Los nuevos vasos son frágiles y proliferan de manera rápida y aleatoria, ocasionando complicaciones aún más graves en el tejido, tales como edema macular, hemorragias vítreas más grandes y desprendimiento de la retina (Arnold-E., 2010). La nueva vascularización y los cambios tisulares acentuados caracterizan a la retinopatía diabética proliferativa (RDP) que es el grado más avanzado de este padecimiento (Bonafonte-S., et al. 2006).

Los tratamientos que se practican actualmente en pacientes con RD incluyen a la fotocoagulación con láser, inyecciones intravítreas de factores antiangiogénicos y el tratamiento quirúrgico mediante vitrectomía, aunque esta última modalidad se reserva para pacientes con retinopatía diabética proliferativa avanzada (Fouces-Gutiérrez Y., et al. 2007). Estos tratamientos, aunque en conjunto han demostrado ser efectivos contra la complicación, tienen en común ser invasivos y de poca accesibilidad en nuestro país, además de que suelen requerir de más de una intervención (Santana-Pérez F., et al. 2013). La retina fotocoagulada sufre coagulación intravascular, desnaturalización proteica y necrosis tisular, por lo que la pérdida de función del área retinal impactada es definitiva (Allan-W., et al. 2013), mientras que el uso de antiangiogénicos por su administración intravítrea, puede generar hemorragias, desgarros o desprendimientos de la retina (Santana-Pérez F., et al. 2013). En enero de 2008, se publicó un estudio retrospectivo por el Pan-American Collaborative Retina Study Group (PACORES; Wu-L., et al. 2008) sobre la seguridad y complicaciones de las inyecciones intravítreas aplicadas de 1,25 mg y 2,5 mg de bevacizumab con un seguimiento de 12 meses. Reportaron que de un total de 4303 inyecciones intravítreas aplicadas en 1.310 ojos de 1.173 pacientes, solamente el 1,5% de estos presentaron complicaciones sistémicas (0,59% de elevación de la tensión arterial, 0,5% de accidentes cerebro-vasculares, 0,4% de infartos de miocardio, 0,17% de aneurismas arteriales ilíacos y 0,4% de muertes). Concluyeron que repetidas inyecciones intravítreas de 1,25 mg o 2,5 mg de bevacizumab parecen ser seguras y bien toleradas durante el primer año de tratamiento.

Con la intención de explorar nuevas terapias para la RD menos invasivas, en este proyecto se plantea la posibilidad de evaluar el efecto de la administración oral de un fármaco procinético que tiene entre sus acciones aumentar los niveles circulantes de la hormona prolactina (PRL). Esta estrategia se basa en múltiples estudios preclínicos que demuestran que la PRL sistémica puede incorporarse al ojo de roedores donde es procesada proteolíticamente a sus metabolitos las

vaso-inhibinas (Arnold et al 2010). Las vaso-inhibinas son fragmentos de la PRL que inhiben la neovascularización de la retina debida a isquemia en el ratón (Pan H., et al. 2004) y la vasopermeabilidad inducida por diabetes en la rata (Garcia et al JCI 2008). Se conoce que las vaso-inhibinas actúan directamente sobre el endotelio vascular bloqueando la activación de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) en respuesta a factores vasoactivos que incluyen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (González-E., et al. 2004). Además, se ha reportado que los niveles séricos de PRL y de vaso-inhibinas se reducen en pacientes con RD (Triebel-J., et al. 2011). Por lo tanto, el incremento en los niveles circulantes de la PRL (hiperprolactinemia) pudiera representar un nuevo tratamiento contra la RD.

El objetivo de este estudio clínico fue analizar si la PRL se incorpora al ojo de pacientes con RD y, por ende, si la hiperprolactinemia inducida farmacológicamente con levosulpirida, pudiera representar un nuevo tratamiento contra la RD al poder promover la generación de vaso-inhibinas oculares. La levosulpirida aumenta los niveles séricos de PRL gracias a sus propiedades como bloqueador de los receptores D2 de dopamina presentes en las células hipofisarias que secretan a la PRL y que median la inhibición de la dopamina hipotalámica sobre la síntesis y liberación de la PRL a la circulación (Mucci-A., et al. 1995). La levosulpirida es un medicamento que se utiliza rutinariamente para combatir la gastroparesis de la diabetes, tiene un buen perfil de seguridad ya que sus efectos adversos son poco frecuentes a las dosis recomendadas (Serra-J. 2010).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 *Diabetes mellitus*, generalidades.

La *Diabetes mellitus* (DM), es una enfermedad crónica que se desarrolla por una disminución en la producción de insulina en el páncreas y/o resistencia periférica a la insulina, la cual, una vez unida a su receptor en las células periféricas, permite la entrada por difusión (vía los transportadores GLUT4) de la glucosa circulante proveniente de la absorción intestinal de los carbohidratos digeridos que es utilizada como fuente de energía por el organismo (IDF, 2015).

En el 2014, el 9% de los adultos de 18 años tuvo DM. En 2012 fallecieron 1,5 millones de personas como consecuencia directa de esta enfermedad, de estas muertes, más del 80% se registra en países de ingresos bajos y medios (OMS, 2015).

La DM es tratada en todas sus etapas con ejercicio y modificación de la dieta. Según avanza la enfermedad y de acuerdo al control metabólico se va requiriendo tratamiento farmacológico con hipoglucemiantes y tratamiento con insulina, así como de atención especializada (Friege-F., et al. 2016).

En la mayoría de los casos de DM2, ésta se diagnostica tarde. Es por eso que alrededor de un 30 - 50% de las personas desconocen su problema por meses o años (en zonas rurales esto ocurre casi en el 100% de los casos) y en los estudios de sujetos con DM2 recién diagnosticada, la prevalencia de retinopatía oscila entre 16 y 21%, la de nefropatía entre 12 y 23% y la de neuropatía entre 25 y 40% (OPS, 2008).

Los pacientes con DM2 desarrollan complicaciones a largo plazo, principalmente al estar expuestos a un descontrol metabólico crónico. En este proceso intervienen también otros factores de riesgo, como son la hipertensión arterial, la dislipidemia

y el tabaquismo fundamentalmente. Las complicaciones crónicas de la DM se clasifican principalmente en macrovasculares y microvasculares. Las complicaciones macrovasculares (como la aterosclerosis), son aquellas que afectan a las arterias en general y conducen a las enfermedades cardíacas coronaria, cerebrovascular y vascular periférica (Mediavilla-Bravo J., et al. 2010). Dentro de las complicaciones microvasculares o microangiopatías incluyen a la nefropatía, neuropatía y retinopatía diabéticas (Fowler-M. 2003), dado que este trabajo está relacionado con la retinopatía diabética a continuación se hace una revisión detallada al respecto de esta complicación.

## **2.2 Retinopatía diabética**

La retinopatía diabética (RD) es una de las complicaciones microangiopáticas que se asocian con frecuencia a la DM y es una de las causas más frecuentes de ceguera en personas entre los 20 y los 65 años de edad, esto principalmente en países en desarrollo (Santana-Pérez F., et al. 2013).

La RD comienza de manera general por una pérdida de pericitos, lo cual hace a las células de los vasos sanguíneos de la retina anormalmente permeables. En las primeras etapas de la enfermedad, conforme la permeabilidad va en aumento, proliferan los exudados y micro-hemorragias dentro de la retina que, además de la constricción vascular, van formando áreas de no perfusión, donde la irrigación capilar llega a quedar bloqueada por completo (Antonetti-DA., et al. 2012, Rechtman-E., et al 2007, Cohen-SR., et al. 2016). En la retina, estas alteraciones ocasionan una reducción severa en la perfusión sanguínea (isquemia) y la consecuente hipoxia. La hipoxia promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) a través de estimular la producción de factores angiogénicos y de inhibir la de los antiangiogénicos, siendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que es el principal factor angiogénico y el más estudiado en relación con la neovascularización retiniana (Moreno-Páramo D., et al. 2007, Bonafonte-Royo S., et al 2006). Estos vasos nuevos son



defectuosos y se extienden y sangran dentro del vítreo, causando finalmente la separación por tracción de la retina, lo que provoca la pérdida de la visión (Antonetti-DA., et al. 2006).

### **2.2.1 Epidemiología**

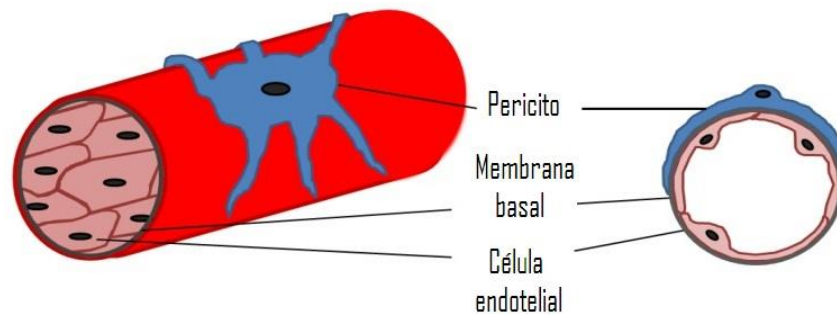
Después de 20 años con DM, la RD se presenta en el 90% de los casos de pacientes con DM1 y 60% de los pacientes con DM2, de los cuales el 5% requerirá de tratamiento para evitar una ceguera irreversible (Von-Bischhoffshausen F.B., et al. 2011).

Estudios sobre RD en México han reportado una alta prevalencia en poblaciones estudiadas de pacientes con DM. (Prado-Serrano A., et al. 2009). De acuerdo con los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del año 2012, tres de cada cuatro pacientes con DM requieren de tratamiento oftalmológico que les permita reducir las complicaciones que se presentan a largo plazo, tales como la disminución de la visión con 47.6% (3 millones) y daño a la retina con 13.9% (889 mil) (ENSANUT 2012). Podemos estimar que la RD en la población representa un grave problema de salud pública, ante el cual el sistema de salud resulta evidentemente insuficiente. También es conveniente exponer la falta de conocimiento acerca de la RD por parte de los pacientes con DM y en consecuencia la búsqueda de un seguimiento adecuado por parte de los mismos, factor que incrementa el riesgo a desarrollar la complicación y consecuentemente ceguera (CENETEC 2015).

### **2.2.2 Fisiopatología**

Los microvasos de la retina consisten en células endoteliales (CE) que yacen sobre una membrana basal (MB) la cual está rodeada de células contráctiles llamadas pericitos (*Figura 1*). Los pericitos se encuentran en íntimo contacto con la MB, poseen filamentos de actina y receptores de endotelina, lo cual les permite

actuar como una célula muscular lisa en los capilares, regulando su calibre y flujo vascular a nivel de retina. La pérdida de pericitos es una de las primeras alteraciones histológicas de la RD (Canonge-S. 1999).



**Figura 1. Esquema que muestra la unión capilar-pericito.** (Mills-SJ., Cowin-AJ., Kaur-P. 2013. *Pericytes, Mesenchymal Stem Cells and the Wound Healing Process Cells*; 2(3): 621–634).

El factor de riesgo más importante que promueve las alteraciones microvasculares de la diabetes es la hiperglucemia crónica (Triebel-J., et al. 2011). Esta condición deriva de las reacciones que desencadenan los altos niveles de glucosa a través de diversas vías metabólicas, como son la vía de la aldosa reductasa, la síntesis *de novo* de diacilglicerol (DAG), la glicosilación no enzimática de las proteínas y el estrés oxidativo (Canonge-S. 1999). La sobreexpresión de estas vías metabólicas trae como consecuencia la producción de citocinas proinflamatorias, la muerte de por apoptosis de células vasculares y la expresión endotelial de moléculas de adhesión. Estas alteraciones conllevan a una mayor vasopermeabilidad, engrosamiento de la MB y a la oclusión capilar debido a la mayor adhesión endotelial de leucocitos y conducen una reducción severa en la perfusión sanguínea (isquemia) y la consecuente hipoxia (Moreno-Páramo D., et al. 2007).

En condiciones de hipoxia en la retina, el VEGF es secretado por los pericitos, el endotelio vascular, las células del epitelio pigmentario y las células gliales (Santana-Pérez F., et al. 2013). Hasta la fecha el VEGF es el factor de

angiogénico más estudiado y esto se debe a su papel primordial en la génesis de enfermedades que se caracterizan por neovascularización en el cuerpo. La expresión de citocinas como el IGF-1 y el VEGF se encuentra aumentada en la DM, cerrando el círculo de hipoxia retiniana con un daño vascular progresivo, edema y neovascularización (Tenorio-G., et al. 2010).

### **2.2.3 Diagnóstico y clasificación**

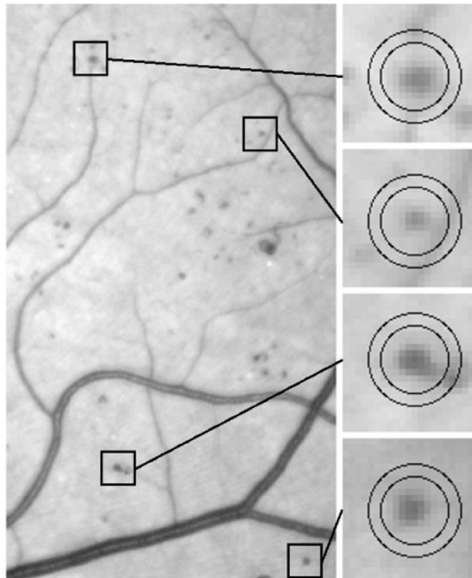
Los factores de riesgo comúnmente aceptados para RD incluyen la duración de la diabetes, la edad del paciente, el aumento de la hemoglobina glucosilada (HbA1c), la presencia de enfermedad renal, la hipertensión arterial y las alteraciones del metabolismo lipídico (hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia). Dichos factores no solamente predisponen a la aparición de una RD, sino que también contribuyen a una progresión más rápida de la misma (Ignacio-García E., et al. 2012).

El diagnóstico de la RD se hace mediante la exploración clínica. En 2003 el grupo del proyecto global de retinopatía diabética desarrolló la “Escala Clínica Internacional de Gravedad de Retinopatía Diabética y Edema macular”, con la finalidad de facilitar la clasificación en el ámbito clínico. Aunque esta escala no sustituye a la del Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) para fines de pronóstico e indicación de tratamiento, tiene la intención de simplificar la calificación de la enfermedad (AAO, 2003).

#### **2.2.3.1 Retinopatía diabética no proliferativa (RDNP)**

Esta se divide en leve, moderada y severa. En la RDNP leve se pueden apreciar microaneurismas (*Figura 2*), que se observan como puntos rojos pequeños de bordes muy nítidos (nivel 20 de la EDTRS). En la RDNP moderada son frecuentes las hemorragias retinianas en número inferior a 20 en los cuatro cuadrantes. Pueden existir exudados duros o lipídicos y además dilataciones venosas que se

asemejan a las cuentas de un rosario en un solo cuadrante. Las dilataciones venosas consisten en zonas bien localizadas de dilatación con zonas de estrechez venosa. Estas alteraciones se incrementan en número e intensidad en la RDNP severa, donde el trayecto venoso se vuelve tortuoso y en ocasiones parece bifurcado con probabilidad de progresión a RD proliferativa (Tenorio-G., et al. 2010).

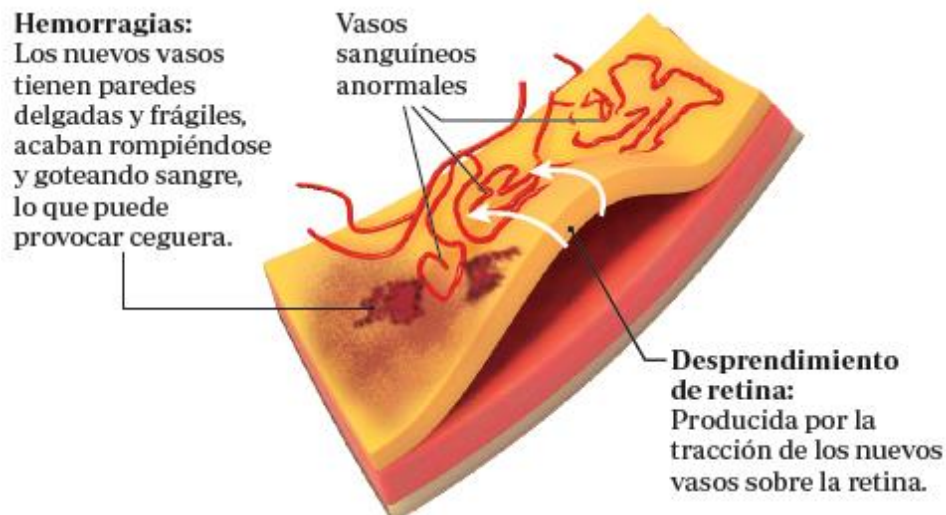


**Figura 2. Imagen que muestra microaneurismas en la retina.** (Quellec-G., Lamard-M., Josselin-PM., Cazuguel-G., Cochener-B., et al. 2008. *Optimal wavelet transform for the detection of microaneurysms in retina photographs. IEEE; 27(9): 1230–1241*).

### 2.2.3.2 Retinopatía diabética proliferativa (RDP)

La isquemia progresiva que se produce en la RDNP debido a las alteraciones vasculares descritas, tiene como consecuencia la formación de nuevos vasos o angiogénesis en la retina, lo que se conoce como RDP. La RDP evoluciona en tres etapas de menor a mayor severidad: temprana, de alto riesgo y avanzada. Esta progresión se define por la presencia, expansión y ubicación de los neovasos, que en sus etapas avanzadas invaden y sangran en el cuerpo vítreo

interfiriendo con la visión y llegando a desprender la retina por tracción la presencia o ausencia de hemorragia vítrea y la presencia o ausencia de desprendimiento de retina (*Figura-4*) (Alvarez-R. 2011). Además, en la RDP se observan exudados vasculares algodonosos (infartos en las capas más externas de la retina los cuales se ven como manchas blancas con bordes mal definidos), hemorragias retinianas (producidas en las capas más externas con distribución lineal), tortuosidad y dilatación venosa y las anomalías microvasculares intrarretinianas o IRMA (lesiones intrarretinales en forma de mallas que interfieren opacando la visión oftalmoscópica de la retina). La pérdida de visión puede ser muy severa e incluso irreversible en los estadios más avanzados (Viswanath-K., et al. 2003).



**Figura 3. Esquema que ilustra la proliferación de los nuevos vasos sanguíneos anormales, las hemorragias causadas por la fragilidad de estos y el desprendimiento de retina por tracción que puede resultar en ceguera.** (Clínica universidad de navarra. 2014. Recuperado de: <http://www.cun.es/material-audiovisual/infografia/retinopatia-diabetica>).

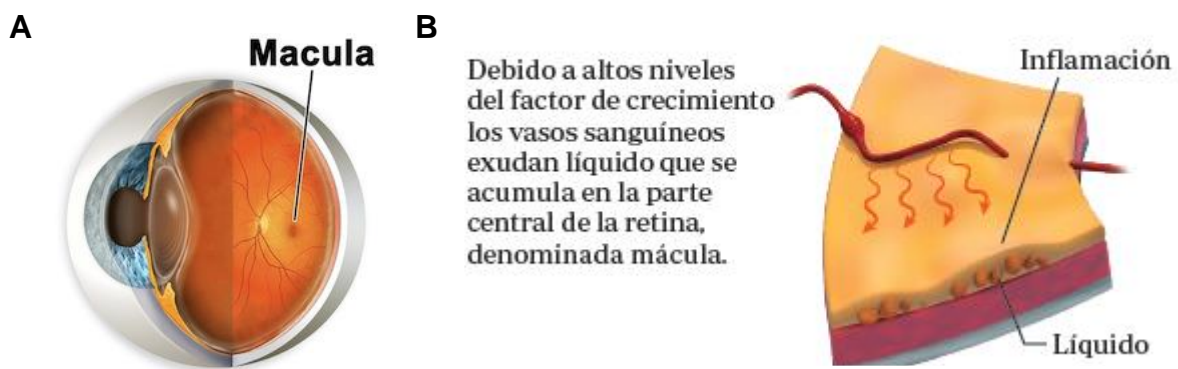
## 2.2.4 Cambios clínicos

Normalmente si no se trata, la RD evoluciona de forma gradual, desde lesiones leves hasta formas graves, tales como edema macular (EMD), hemorragias vítreas y desprendimiento de retina por tracción (DRT).

### 2.2.4.1 Edema macular

La mácula es un área pequeña (5 a 6 mm de diámetro) de la retina posterior conocida como mácula lútea por el color amarillo que le confieren sus carotenoides (luteína y zeaxantina) (*Figura 3-A*). En la mácula se concentra el mayor número de fotorreceptores (conos) por lo que sus alteraciones patológicas afectan la visión fina, como es la lectura o el reconocimiento de los rostros (Verdaguer-J. 2010).

El edema macular diabético (EMD) forma parte de las alteraciones que se presentan en la RD y es la principal causa de pérdida visual en los pacientes con diabetes. Esta complicación puede aparecer en la fase inicial de la RDNP como en la RDP (Von-Bischhoffshausen F.B., et al. 2011).

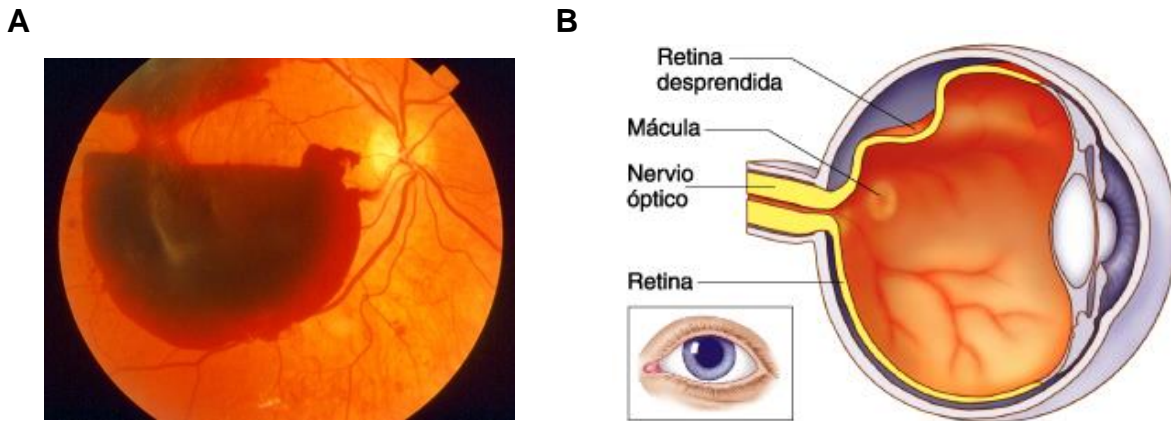


**Figura 4. A, Ubicación de la mácula dentro del globo ocular.** (MacuHealt. 2015. Recuperado de: <http://macuhealth.com/>). **B, Acumulación de líquido por debajo del área macular.** (Clínica universidad de navarra. 2014. Recuperado de: <http://www.cun.es/material-audiovisual/infografia/retinopatia-diabetica>).

La alteración histológica encontrada en el EMD es una acumulación de líquido en la capa de Henle y la capa nuclear interna de la retina (*Figura 3-B*). Este líquido proviene del compartimiento intravascular y su flujo, como en el resto de los tejidos, está modulado por el balance entre la presión hidrostática y la presión osmótica. El principal mecanismo que conduce al acúmulo extracelular de líquido en la retina es una alteración en la permeabilidad de la barrera hematorretiniana, tanto en su componente interno (endotelio vascular) como externo (epitelio pigmentado). Como se mencionó, la hiperglucemia crónica resulta en isquemia y en hipoxia lo que provoca un aumento en la producción de VEGF por parte del epitelio pigmentario, el endotelio vascular y las células gliales de la retina (Antonetti-DA., et al. 2012). Otros factores sistémicos también pueden favorecer el desarrollo del EMD. La hipertensión provoca un incremento en la presión hidrostática de los capilares retinianos, mientras que la hipoalbuminemia disminuye la presión oncótica. Ambas situaciones conducen a un aumento de la permeabilidad vascular y favorecen la aparición de edema en la retina (Andonegui-J., et al. 2008).

#### **2.2.4.2 Hemorragia vítrea y desprendimiento de retina**

Los nuevos vasos sanguíneos en la retina son frágiles, se colapsan y permiten la difusión de exudados, lo que puede traducirse en hemorragias vítreas y desprendimiento de retina. Las hemorragias vítreas pequeñas pueden percibirse como defectos en la visión. En casos más graves, las hemorragias pueden ocupar gran parte del humor vítreo, mermando por completo la visión (*Figura 5-A*). Las hemorragias vítreas no causan una pérdida de visión irreversible; de acuerdo a su gravedad pueden desaparecer después de unas semanas o meses, sin embargo de no ser el caso, se requiere de una cirugía (vitrectomía) a través de la cual se extirpa y sustituye el vítreo y se reestablece la visión (Boyd-K., 2015).



**Figura 3. A, Fotografía que muestra una gran hemorragia vítrea.** (Galenus. 2015. Recuperado de: <http://www.galenusrevista.com/Retinopatia-diabetica.html>). **B, Desprendimiento de retina causado por RDP.** (Acilis. 2014. Recuperado de: <http://drasilis.com/condiciones-comunes/desprendimiento-de-retina/>).

El desprendimiento de retina por otro lado (*Figura 5-B*), puede deberse al tejido cicatricial que se forma en el vítreo invadido por capilares y sus exudados. Este tejido ejerce tracción sobre la retina y la separa de su ubicación normal, lo que se conoce como desprendimiento de retina por tracción (DRT). Esta complicación puede causar una visión borrosa u oscurecida, y en casos graves una pérdida total de visión (ceguera) (Claramunt-J., 2010).

### 2.2.5 Tratamiento actual y sus limitaciones

Los tratamientos que se practican actualmente en pacientes con RD incluyen a la fotocoagulación láser, la terapia intravítrea con agentes antiangiogénicos y tratamiento quirúrgico mediante vitrectomía, aunque esta última modalidad se reserva para pacientes con RDP avanzada (Fouces-Gutiérrez Y., et al. 2007).

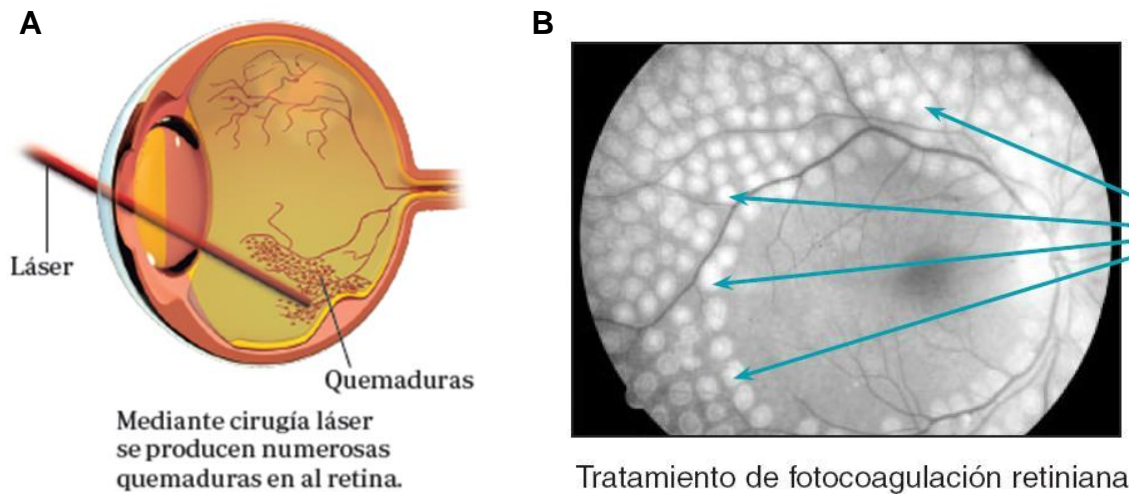
El control metabólico estricto de la glicemia y dislipidemia y de la hipertensión arterial retarda la progresión de la RD. Sin embargo, ante la RD ninguno de los tratamientos médicos utilizados suelen ser efectivos por si solos y generalmente



requieren ser administrados en combinación (Barria-Von-Bischhoffshausen F., et al. 2011).

### **2.2.5.1 Fotocoagulación con láser**

La fotocoagulación retiniana con láser (*Figura 6-A*) es esencialmente una forma destructiva de tratamiento que depende de la absorción de energía luminosa por los pigmentos oculares (melanina, hemoglobina y xantófila) y su conversión en calor. El propósito de la terapia con láser es producir una quemadura terapéutica en un área preseleccionada de la retina, a la vez que se lesiona de forma ínfima el tejido circundante (*Figura 6-B*) (Fouces-Gutiérrez Y., et al. 2007). Se propone que el valor terapéutico de dicha quemadura reside en que lesiona al tejido productor de factores proangiogénicos y aumenta la difusión de oxígeno a la retina lo que interfiere con su neovascularización (Antonetti-DA., et al 2012). El tratamiento con láser no mejora la visión, pero evita su progresión y previene la pérdida visual grave. Cuando el tratamiento con láser se efectúa en el momento apropiado, el riesgo de ceguera a los 5 años se reduce en un 90% en pacientes con RDP y el riesgo de pérdida de agudeza visual en un 50% en pacientes con edema macular diabético (Hernández-Pascual C., et al. 2008). Sin embargo, este tratamiento solamente es efectivo en el 50% de los casos y puede comprometer el campo visual y la adaptación a la obscuridad (Boyer-DS., et al. 2013). Otras complicaciones de la terapia láser incluyen hemorragias vítreas, fotocoagulación accidental de la fovea y desprendimiento exudativo de la retina o de la capa coroidea (Barria-Von-Bischhoffshausen F., et al. 2011).



**Figura 4. A, Esquema que muestra el proceso de fotocoagulación con láser.** (Clínica universidad de navarra. 2014. Recuperado de: <http://www.cun.es/material-audiovisual/infografia/retinopatia-diabetica>). **B, Quemaduras ocasionadas por la fotocoagulación.** (Altavisión. 2012. Recuperado de: <http://www.altavision.com/como-se-trata-el-edema-macular.html>).

### 2.2.5.2 Terapia intravítrea antiangiogénica

La terapia intravítrea antiangiogénica (*Figura 7-A*) se basa en tratar de inhibir la producción o, en su defecto, los efectos biológicos de moléculas involucradas en la angiogénesis ocular, en especial el VEGF (*Figura 7-B*). Los principales fármacos utilizados en la terapia intravítrea son agentes anti-VEGF e incluyen el bevacizumab (Avastín®), el ranibizumab (Lucentis®) y el aflibercept (Wetlia®) (Avery-RL. 2014).

El bevacizumab fue el primer inhibidor de angiogénesis en conseguirse comercialmente. Es un anticuerpo completo humanizado dirigido contra el VEGF que neutraliza a todas las formas moleculares de la proteína, inhibiendo los efectos del VEGF sobre la formación de vasos sanguíneos anormales en el ojo y las alteraciones vasculares que caracterizan a la RD y al EMD (Avery-RL., et al. 2014). Las inyecciones intravítreas parecen ser seguras y bien toleradas durante el primer año (Wu-L., et al. 2008). Limitaciones en estudios clínicos que incluyen



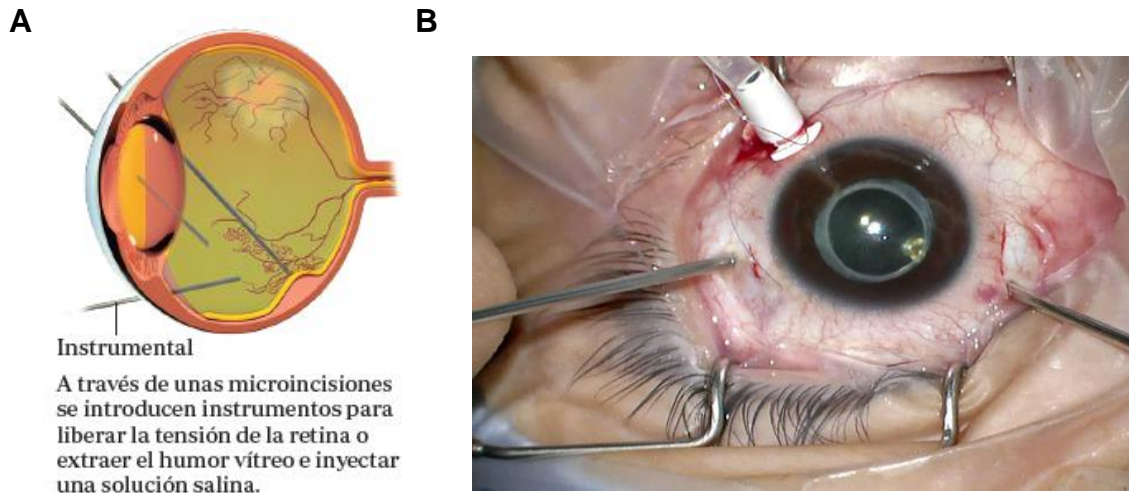
y mantener la visión con una administración bimestral, lo que representa menos riesgos e independencia para los pacientes (Bressler-SB., et al. 2017).

Los medicamentos antiangiogénicos intravítreos tienen un efecto temporal, deben ser administrados en forma repetida lo que aumenta el riesgo de infecciones e inflamación y no son efectivos en la totalidad de los pacientes, por lo cual no substituyen al tratamiento con láser y no deben ser utilizados en forma aislada o como monoterapia (Corcostegui-B., et al. 2017). Además, no existe evidencia de su comportamiento a largo plazo y no existen guías clínicas que orienten en su retratamiento (Barria-Von-Bischhoffshausen F., et al. 2011).

### **2.2.5.3 Vitrectomía**

El objetivo fundamental de una vitrectomía es la remoción quirúrgica del vítreo para eliminar las hemorragia vítreas o bien para reposicionar la retina a consecuencia de su desprendimiento por tracción evitando la progresión de la retinopatía. La combinación de la vitrectomía con la fotocoagulación láser estabiliza la RD en muchos casos (Barria-Von-Bischhoffshausen F., et al. 2011).

El procedimiento requiere del uso de un sofisticado sistema de aspiración y corte en miniatura (*Figura 8-A*). La punta cortadora es de 1mm de diámetro y es introducido al ojo a través de una pequeña incisión en la pared ocular por detrás del iris. Dos incisiones adicionales pequeñas son hechas en el ojo, una permite la inyección, de solución salina balanceada similar al vítreo, el cual está siendo removido por el cortador del vítreo (vitreófago). La otra incisión permite insertar una fibra óptica, que iluminará el interior del ojo. La operación es realizada usando un microscopio quirúrgico especial y un lente de contacto que da una clara visualización del interior del ojo (*Figura 8-B*).



**Figura 8. A, Esquema que muestra la aplicación de la vitrectomía.** (Clínica universidad de navarra. 2014. Recuperado de: <http://emedicine.medscape.com/article/1844160-overview>). **B, Fotografía tomada a un paciente durante la vitrectomía.** (IMO 2015. Recuperado de: <http://www.imo.es/profesionales/casos/cirugía-de-vitrectomía-y-catarata-con-láser-femtosegundo/>).

Esta combinación de fuente de luz intraocular, lente de contacto y microscopio, proveen una buena visión de la retina y vítreo. El cirujano está en capacidad de remover el vítreo anormal, delgadas fibras y procesos cicatrizales en retina, con gran precisión (Gupta-V., et al. 2013). El vítreo se sustituye por solución salina, aire o distintas mezclas de gases expansivos que eventualmente son reemplazadas por sustancias producidas por el ojo.

A continuación ser revisará la fisiología de la prolactina y de sus metabolitos (vasoinhíbinas) que son el punto central de la intervención en el presente estudio.

### 2.3 Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona proteica sintetizada principalmente por la adenohipófisis y cuya regulación se lleva a cabo por la inhibición dopaminérgica hipotalámica.

Su función la realiza a través de la unión a receptores de membrana específicos, los receptores de prolactina (RPRL) de los cuales se han reportado en el humano la existencia de tres isoformas diferentes; una larga y dos cortas. Su densidad y tipo varían dependiendo del estado hormonal y fisiológico del sujeto, lo que sugiere que la abundancia variable de estas isoformas está involucrada con funciones específicas dentro de cada uno de los tejidos (Ben-Jonathan N., et al. 2008).

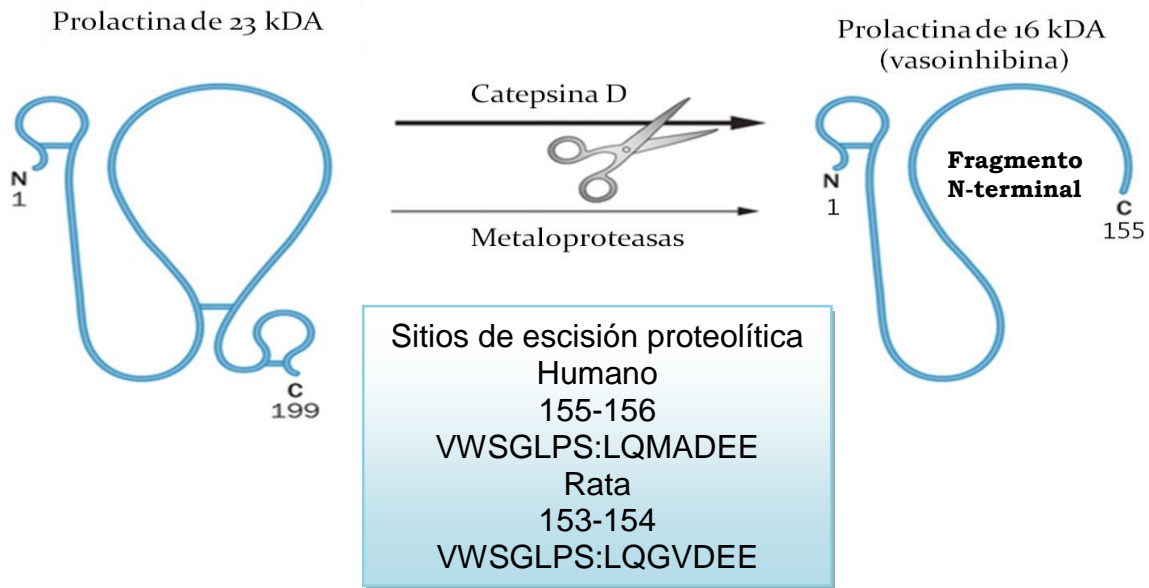
La unión PRL-receptor produce la activación de diferentes vías de señalización intracelular, dentro de las que se encuentran las STAT (proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción) y las MAP cinasas (proteínas cinasas activadas por mitógenos), que están involucradas en procesos de diferenciación y proliferación celular (Pascual-Mathey LI., et al. 2009).

La PRL comprende en si un amplio espectro de acciones ubicadas en la reproducción, la osmorregulación, la respuesta inmune, el metabolismo energético y la angiogénesis. Entre estos efectos, principalmente los dos últimos son los que tienen un efecto protector contra la DM y la RD. El principal mecanismo por el cual la PRL puede prevenir la progresión y promover la regresión de la RD, es la conversión proteolítica a vaso-inhibinas (Triebel et al 2011).

## **2.4 Vaso-inhibinas**

Las vaso-inhibinas representan a una familia de péptidos derivados de la proteólisis de la hormona PRL que inhiben la angiogénesis en la retina inducida por isquemia (Pan H., et al. 2004) y la excesiva vasopermeabilidad retiniana en respuesta al a diabetes experimental (García-C., et al. 2008). Están presentes en la circulación, en la hipófisis anterior y en diferentes tejidos extrahipofisarios, e incluyendo el endotelio de diversos lechos vasculares, los fibroblastos, el cartílago, el tejido nervioso y la retina, entre otros (Clapp-C., et al 2015). La presencia de

vasoinhibinas endógenas indica la acción fisiológica de proteasas capaces de generarlas (Moreno-Páramo D., et al. 2007).

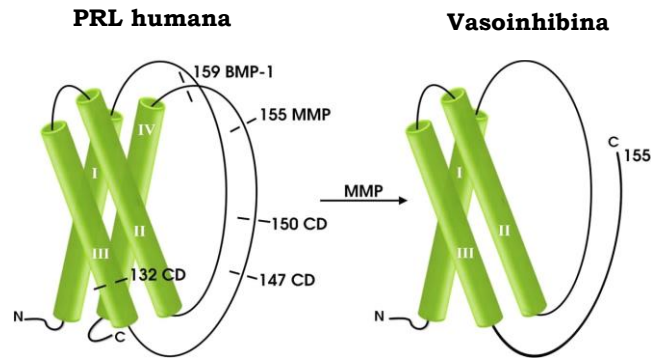


**Figura 9. Esquema que muestra la proteólisis en la prolactina por catepsina-D y metaloproteasas de matriz.** (Bernard-V. 2015. *New insights in prolactin: pathological implications*. Recuperado de:<http://www.nature.com/nrendo/journal/v11/n5/full/nrendo.2015.36.html>).

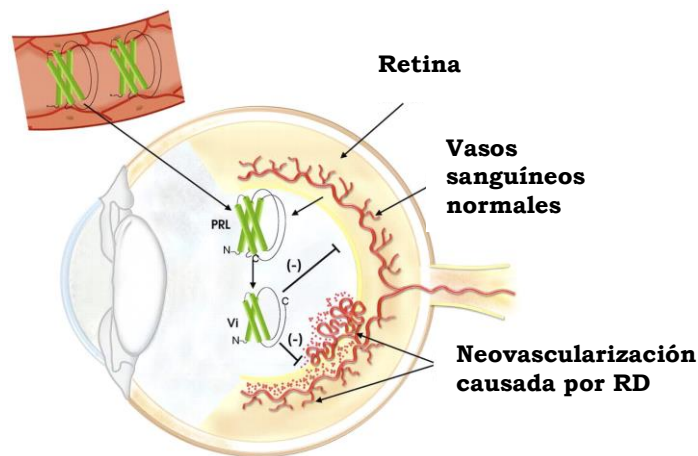
Las proteasas responsables de la proteólisis de PRL a vasoinhibinas incluyen a las metaloproteasas de matriz (MMP) principalmente de los tipos 1, 2, 3, 8, 9 y 13 (Kowluru-RA., 2012), a la catepsina D (Figura 9) y a la proteína morfogenética de hueso (BMP). Estas proteasas cortan a la PRL en diferentes regiones cerca y dentro del asa que conecta las  $\alpha$ -hélices 3 y 4 de la molécula y, por ende, la masa molecular de las vasoinhibinas resultantes depende de qué enzima realice la proteólisis y de su sitio de corte en la PRL (Figura 10) (Clapp-C., et al. 2006).

Las vasoinhibinas actúan directamente sobre el endotelio vascular, reduciendo su proliferación, migración, y estimulando su apoptosis (Figura 11). Además, las vasoinhibinas inhiben el efecto vasoproliferativo y vasodilatador del VEGF y de otras sustancias vasoactivas, y lo hacen a través de bloquear su acción sobre la

activación de la sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS) y la subsecuente producción de NO endotelial (González-C., et al. 2004).



**Figura 10; Esquema que muestra los diferentes sitios específicos de corte de la prolactina utilizados por las diferentes proteasas. (Clapp-C., et al. 2008. Recuperado de: <http://ajpendo.physiology.org/content/295/4/E772>).**



**Figura 11. Acción de las vasoinhibinas dentro del tejido ocular. (Clapp-C., et al. 2008. Recuperado de: <http://ajpendo.physiology.org/content/295/4/E772>).**

Considerando que las vasoinhibinas se derivan de la PRL, estas observaciones sugieren que los pacientes con niveles más altos de PRL, pudieran tener un



menor riesgo para el desarrollo y la progresión de la RD, por el papel protector de las vasoinhibinas (Arnold-E., et al. 2010).

#### **2.4.1 Características de las vasoinhibinas**

Las vasoinhibinas pertenecen al grupo de los factores antiangiogénicos derivados de precursores proteicos más grandes, tales como la angiostatina (derivado del plasminógeno) y la endostatina (derivada de la colágena 18). El plasminógeno, la colágena 18 y la PRL, en su forma completa, en su forma completa no cuentan con acciones inhibitorias de la angiogénesis (Clapp et al Trends Endo Metab 17:301, 2006). Estos péptidos son producidos en la glándula hipofisaria y muchos tejidos extrahipofisarios, en tejidos muy vascularizados, y en otros donde el aporte de sangre es muy restringido como es el caso de la retina (Clapp-C., et al. 2006). En esta última, las vasoinhibinas fueron identificadas a través de su unión con anticuerpos monoclonales, contra la porción NH2 terminal de la PRL en un análisis de Western blot (Aranda-J., et al. 2005).

#### **2.5 Hiperprolactinemia como tratamiento alternativo contra la RD**

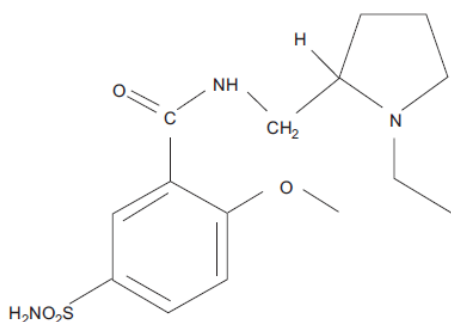
La influencia de la glándula hipofisaria en la fisiopatología de la RD fue reconocida aproximadamente seis décadas atrás (Poulsen-JE., et al. 1953) pero la contribución específica de las hormonas secretadas por la glándula respecto a esta complicación aún no está del todo clara (Clapp-C., et al. 2009).

Con respecto a la PRL, en 1985, Mooradian y colaboradores (Mooradian-A.D., et al. 1985) encontraron en un grupo de pacientes con DM valores elevados de PRL sérica, que no pudieron ser atribuidos a enfermedades, medicamentos o ninguna causa conocida que pudiera justificar este fenómeno. Estos pacientes tenían valores de PRL más altos comparados con los controles sanos, y en el análisis de los subgrupos de las personas con DM no se encontró ninguna diferencia significativa entre aquellos con o sin signos clínicos de RD. Sin embargo, otros

estudios (Harter-M., et al. 1976) encontraron niveles circulantes de PRL significativamente altos en hombres con DM sin signos severos de RD, comparados con aquellos con signos clínicos de hemorragia, y por tanto, de RD proliferativa (RDP). Recientemente, se reportó en un grupo mayor de hombres con DM que los pacientes con RDP presentaban menores niveles de PRL, que aquellos sin RD. De estos estudios se desprende la posibilidad de que niveles bajos de PRL pudieran influir sobre la presencia y progresión de la RD (Triebel et al 2011) y, por ende, que fármacos que inducen hiperprolactinemia pudieran tener valor terapéutico en este padecimiento.

## 2.6 Levosulpirida

Levosulpirida (*Figura 11*) es un fármaco procinético que actúa de forma dual inhibiendo la acción dopaminérgica y facilitando la acción colinérgica. Se trata del enantiómero levógiro de la sulpirida, es decir, el isómero de la sulpirida que desvía la luz polarizada hacia la izquierda. Esta configuración le da una mayor afinidad por los receptores tipo 2 de la dopamina, por lo que tiene mayor potencia de acción con dosis menores que la forma racémica (sulpirida) (Serra-J. 2010).



**Figura 12, Levosulpirida.** (Serra-J. 2010. Conformación química de la levosulpirida. Recuperado de: <http://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-levosul-pirida-el-manejo-dispepsia-funcional-13156020>).

El mecanismo principal de acción procinética de la levosulpirida es la inhibición de los receptores tipo 2 de la dopamina (D2) localizados en la musculatura lisa del

tracto gastrointestinal. Como consecuencia, la acción de la dopamina sobre la innervación intrínseca del tracto gastrointestinal es antagonizada, favoreciéndose la acción del sistema colinérgico. El resultado es un incremento de la actividad motora del tracto digestivo mediada por la acción de la acetilcolina (Kuchay-MS., et al. 2017).

Entre los efectos secundarios más frecuentes de la levosulpirida (*Cuadro 1*) destacan la presencia de tensión mamaria, ginecomastia (1.7%) o galactorrea (0.7%), que son debidos a un incremento en la concentración de PRL por el bloqueo de los receptores dopaminérgicos D2 en la adenohipófisis que median la acción inhibitoria de la dopamina hipotalámica sobre la síntesis y liberación hipofisiaria de esta hormona (Singh., et al. 2015). Sin embargo, los efectos neurolépticos como la somnolencia y la sedación, que son frecuentes a dosis altas de levosulpirida (50mg tres veces al día), son poco frecuentes a la dosis recomendadas para sus efectos procinéticos y asociadas con la inducción de hiperprolactinemia (Lozano-R., et al. 2007). Esto se explica debido a que la levosulpirida tiene una baja eficacia para atravesar la barrera hematoencefálica (Kapur-S., et al. 2002).

Además de la potente actividad antagonista D2, levosulpirida también posee actividad agonista sobre los receptores tipo 4 de la serotonina (5HT4). Estos receptores se hallan localizados en las terminaciones presinápticas de las neuronas colinérgicas del plexo mesentérico. La activación de estos receptores resulta en un incremento en la liberación de acetilcolina que a su vez estimulará la actividad motora intestinal (González-JC. 2007).

**Cuadro 1. efectos secundarios de levosulpirida en 840 pacientes despépticos.** (Serra-J. 2010. conformación química de la levosulpirida. recuperado de: <http://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-levosulpirida-el-manejo-dispepsia-funcional-13156020>).

Acontecimiento adverso	%	Dosis
Tensión mamaria/ginecomastia	1,7	25 mg/8 h
Disfonia	1	25 mg/8 h
Dolor/retortijón abdominal	0,7	25 mg/8 h
Dismenorrea/metrorragias	0,7	25 mg/8 h
Aumento de peso	0,7	25 mg/8 h
Galactorrea	0,6	25 mg/8 h
Sialorrea	0,3	25 mg/8 h
Somnolencia	0,2	25 mg/8 h
Estreñimiento	0,2	25 mg/8 h
Vértigo y fatiga	0,2	25 mg/8 h
		50 mg/8 h
Somnolencia/sedación	2,5	50 mg/8 h
Otros	2,2	25 mg/8 h
<i>Total</i>	11	

Ensayos clínicos controlados han demostrado que la levosulpirida reduce el vaciamiento gástrico y el vaciamiento de la vesícula biliar, y que es superior a placebo en la mejora de los síntomas epigástricos (náuseas, vómitos, malestar epigástrico, pirosis) en pacientes con dispepsia funcional y pacientes con gastroparesia. El perfil de seguridad del fármaco es bueno, y los efectos secundarios a las dosis recomendadas poco frecuentes (Serra-J. 2010).

### III. JUSTIFICACIÓN

En el mundo hay más de 347 millones de personas con DM. Se calcula que en 2012 fallecieron 1,5 millones de personas como consecuencias del descontrol metabólico y sus complicaciones (OMS, 2015), mientras en México, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT, 2012), el 9.2% de los adultos en México tienen un diagnóstico de DM y este padecimiento constituye la segunda causa de muerte (INEGI, 2015). El total de personas adultas con DM podría ser incluso el doble, de acuerdo a la evidencia previa sobre el porcentaje de diabéticos que no conocen su condición. En el reporte “The Global Burden of Disease Study”, la DM ocupó la segunda causa de muerte durante el año 2010, convirtiendo este padecimiento en un problema epidemiológico de gran importancia (GBD, 2010).

Una de las complicaciones más graves de este padecimiento es la RD, una entidad patológica muy frecuente. La retinopatía diabética es la tercera causa de ceguera irreversible en el mundo, pero la primera en personas en edad productiva (16 a 64 años) de países en vías de desarrollo lo que genera grandes pérdidas económicas (Barria-Von-Bischoffshausen F., et al. 2011). En México, la RD representa la primera causa de ceguera prevenible y debilidad visual en los pacientes atendidos por los servicios de salud pública de nuestro país (Prado-Serrano A, 2009).

Los tratamientos con los que actualmente se cuentan para controlar esta complicación (fotocoagulación con láser, las terapias intravítreas con fármacos antiangiogénicos y los procedimientos quirúrgicos como la vitrectomía) tienen altos costos por lo que su disponibilidad para la mayoría de los pacientes en el país es restringida (Santana-Pérez F., et al. 2013). Además, estos métodos lesionan la retina y no siempre son eficaces a largo plazo, por lo que es deseable contar con tratamientos menos invasivos que puedan disminuir las manifestaciones severas de esta complicación.

Estudios en modelos experimentales han demostrado que la hiperprolactinemia tiene un efecto positivo en la regresión y protección de alteraciones vasculares debidas a la diabetes. Esto se debe principalmente a la presencia de péptidos conocidos como vasoinhibinas, moléculas con acciones inhibitoras de la vasopermeabilidad y la angiogénesis que derivan de la proteólisis de la hormona PRL mediante enzimas específicas encontradas en diversos tejidos del cuerpo, entre ellos la retina (Moreno-Paramo D, 2007).

La opción terapéutica propuesta para inducir hiperprolactinemia es la levosulpirida, un fármaco con efecto procinético que incrementa los niveles de PRL en sangre debido a un efecto inhibitorio de los receptores dopaminérgicos en la adenohipófisis (Serra J, 2010). Destaca además como una posible opción farmacológica inocua, de administración oral, con un perfil de seguridad bueno y con efectos neurológicos poco frecuentes a las dosis recomendadas.

La posible implementación de este nuevo tratamiento requiere de la demostración de que en humanos, como ocurre en roedores (Arnold et al 2010), la PRL sistémica se incorpora al ojo para poder ser procesada hacia vasoinhibinas. Esta demostración será relevante para continuar con el desarrollo de esta nueva opción terapéutica cuya administración oral la hace económicamente accesible, y no invasiva en comparación de los tratamientos actuales y, en consecuencia benéfica para coadyuvar a las terapias establecidas.

#### **IV. HIPÓTESIS**

El aumento de la PRL sérica mediante el tratamiento con levosulpirida elevará significativamente los niveles de PRL en el vítreo de pacientes con RDP sometidos a vitrectomía.

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Elevar la PRL sérica en pacientes con RDP con indicación de vitrectomía mediante el tratamiento con levosulpirida y evaluar los niveles de la hormona en el vítreo.

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Generar hiperprolactinemia en pacientes con DM2 mediante un tratamiento oral de comprimidos de levosulpirida de 25mg.
2. Cuantificar los niveles de PRL séricos y vítreos después de una semana de tratamiento.



## VI. METODOLOGÍA

Se trata de un estudio clínico controlado, aleatorizado y doble ciego. Para el cual se incluyeron 32 pacientes. Se llevó a cabo en el Instituto Mexicano de Oftalmología (IMO) ubicado en la ciudad de Querétaro, donde fue aprobado por el Comité de Bioética de esta institución para su posterior desarrollo. Este proyecto contó con el apoyo del CONACYT con el número de subvención 247164

### 6.1 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

**Cuadro 2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación establecidos para este estudio.**

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
<b>Pacientes del IMO programados a vitrectomía por primera vez con indicación médica.</b>	Vitrectomía por segunda ocasión o más	Que decida abandonar el estudio
<b>Edad entre 40-69 años</b>	<40 años y $\geq$ 70 años	Que presente algún efecto adverso al medicamento
<b>Que presenten RD que requiera vitrectomía</b>	Que no presenten RD	Cancelación de la vitrectomía
<b>Con o sin desprendimiento de retina</b>	Que muestren desprendimiento de retina mixto o regmatógeno	Que sea inconstante y/o abandone el tratamiento
<b>Con o sin tratamiento previo de antiangiogénicos o láser</b>		
<b>PRL sérica normal (<math>\leq</math>20 ng/mL)</b>	Hiperprolactinemia (>20 ng/mL)	
<b>Tasa de filtración glomerular &gt;30 ml/min.</b>	Tasa de filtración glomerular <30 ml/min.	

Una vez corroborado que el paciente reunía los criterios oftalmológicos y bioquímicos de inclusión (*Cuadro 2*), se le elaboró un expediente clínico y posteriormente, se le asignó a cada uno de manera aleatoria el tipo de tratamiento (*Cuadro 3*).

**Cuadro 3: Grupos de pacientes que se integraron para el estudio.**

Grupo	No. de participantes	Género	Tratamiento	Tiempo de tratamiento
1	16 pacientes	Femenino (8)	Levosulpirida	1 semana
		Masculino (8)		
2	16 pacientes	Femenino (8)	Placebo	1 semana
		Masculino (8)		

## 6.2 Formación de los grupos de estudio

Una vez confirmada la participación de los pacientes, se tomaron medidas antropométricas y una muestra de sangre venosa (aproximadamente 10 ml) para pruebas de laboratorio y con la finalidad de descartar alguna condición que pudiera comprometer su permanencia en el estudio, o que pudiera interferir con los resultados del tratamiento tales como hiperprolactinemia (niveles séricos de PRL  $\geq$  20ng/ml) e insuficiencia renal (tasa de filtración glomerular  $<$ 30 ml/min).

A cada paciente se le realizaron pruebas de evaluación oftalmológica en el IMO para determinar su grado de RD, las que incluyeron agudeza visual y oftalmoscopia indirecta. Cada una de estas pruebas fue realizada por oftalmólogos utilizando criterios internacionales convencionales. Además de cumplir con los criterios de inclusión establecidos, todos los pacientes tuvieron indicación médica de vitrectomía por parte de un oftalmólogo de IMO.

### 6.3 Seguimiento

A cada uno de los pacientes que integraron los dos grupos de estudio se les suministraron 22 comprimidos de levosulpirida (25 mg; Dislep, Ferrer) o placebo (lactosa) correspondientes al tratamiento de una semana (3 diarios) más un comprimido adicional correspondiente a la dosis matutina del día de la cirugía. Al final de la semana de tratamiento se les realizó un interrogatorio acerca de la presencia de síntomas o signos relacionados con los efectos secundarios de la levosulpirida y el cumplimiento con la ingesta del fármaco.

Antes de que el paciente pasara a quirófano, se le tomaron nuevamente muestras sanguíneas (4 mililitros) con la finalidad de evaluar los niveles de PRL antes y después del tratamiento (*Cuadro 3*). Por último, justo al iniciar la vitrectomía el oftalmólogo tomó una muestra de cuerpo vítreo sin perfundir que se utilizó para determinar PRL.

**Cuadro 4: Determinaciones realizadas a los pacientes**

	Inicio	1 semana
Hemoglobina glucosilada	X	
PRL sérica	X	X
Creatinina sérica	X	X
PRL vítrea		X

### 6.4 Mediciones y análisis

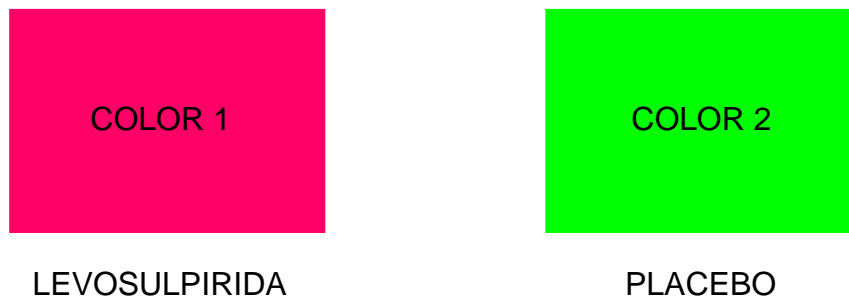
La evaluación oftalmológica incluyendo agudeza visual y oftalmoscopia indirecta por especialistas oftalmólogos. La PRL en el suero y en el vítreo se determinaron mediante inmunoensayo (IMMULITE 2000 XPi), la hemoglobina glucosilada por afinidad al boronato y la creatinina mediante el método de jaffé modificado. Estos

análisis fueron llevados a cabo en el laboratorio GOCA de análisis clínicos de la ciudad de Querétaro (con certificación APPLUS e ISO 9001).

### **6.5 Identificación de tratamientos**

Con la finalidad de enmascarar la identidad de los tratamientos frente a los pacientes, así como prevenir cualquier posible confusión del equipo de trabajo utilizamos de manera práctica colores en la etiqueta de los tratamientos.

Para la identificación de tratamientos utilizamos un código de colores para cada uno, siendo el color 1 (rosa) para el tratamiento con levosulpirida y el color 2 (verde) para el tratamiento con placebo (Figura 13).



***Figura 13; Identidad a los tratamientos establecidos en el estudio***

### **6.6 Asignación de tratamientos**

La asignación de tratamientos para los grupos que conforman el estudio tomó en consideración el género y tipo de intervención (levosulpirida o placebo), esto se hizo mediante un generador de números al azar consultado en: <http://www.alazar.info/generador-de-datos-aleatorios> (Cuadros 4 y 5). Los pacientes participantes y oftalmólogos tratantes siempre ignoraron el tipo de tratamiento (placebo o levosulpirida) recibido.

**Cuadro 5: Asignación aleatoria de tratamientos para pacientes de género femenino**

1		5		9		13	
2		6		10		14	
3		7		11		15	
4		8		12		16	

**Cuadro 6: Asignación aleatoria de tratamientos para pacientes de género masculino**

1		5		9		13	
2		6		10		14	
3		7		11		15	
4		8		12		16	

### 6.7 Análisis estadístico

Se calcularon promedio y desviaciones estándar para el análisis descriptivo. Se realizaron pruebas de t de Student para establecer diferencias entre dos grupos. Se evaluó el coeficiente de correlación de Pearson para analizar la correlación entre los valores de PRL en el suero y en el vítreo. Las diferencias fueron consideradas significativas para valores de  $p < 0.05$ .

### 6.8 Aspectos bioéticos del estudio

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética en Investigación del IMO y se apega a los lineamientos Internacionales de la Declaración de Helsinki.

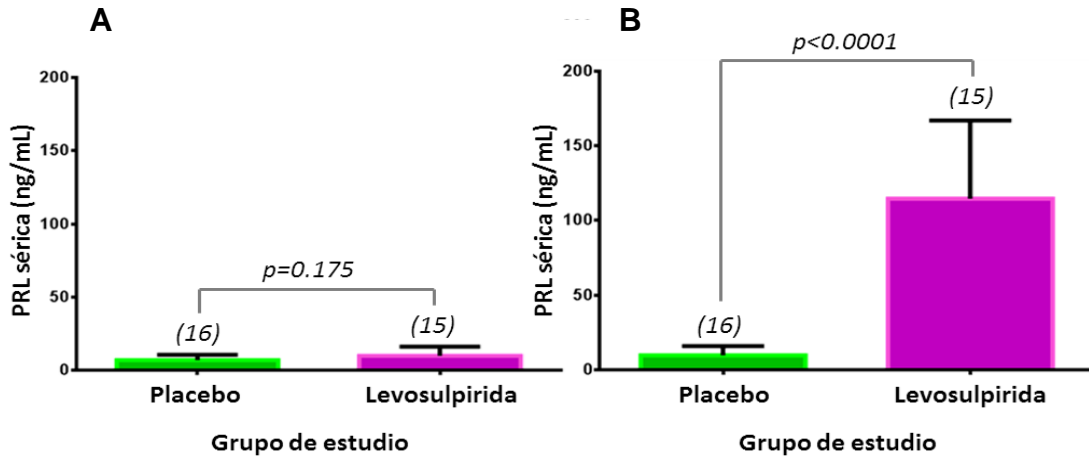
## RESULTADOS

Se incluyeron 32 pacientes en total. Los grupos de estudio fueron integrados por 16 pacientes, 8 de género femenino y 8 de género masculino respectivamente, todos ellos habían tenido hemorragias vítreas, desprendimiento de retina o ambas condiciones como resultado de RD. Una de las participantes del sexo femenino en el grupo de levosulpirida, de 44 años de edad, con 15 años de diagnóstico de diabetes y con niveles de PRL, creatinina y hemoglobina glucosilada dentro de los parámetros establecidos, al concluir los 7 días de tratamiento sus niveles de PRL sérica alcanzaron los 745 ng/mL, mientras que los niveles de PRL vítrea llegaron a 38.4 ng/mL. Estos valores extremos, si bien corroboran la hipótesis del trabajo, aumentan la varianza del grupo y no permiten observar diferencias significativas en todos los análisis anteriores utilizando la prueba t de Student, por lo que fue excluida del análisis estadístico a pesar de que los niveles son favorables para la comprobación de la hipótesis. No hubo diferencias significativas previas al tratamiento entre los grupos de estudio respecto a la edad, género, tiempo de diagnóstico de la diabetes, niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) y tasa de filtración glomerular (Cuadro 7).

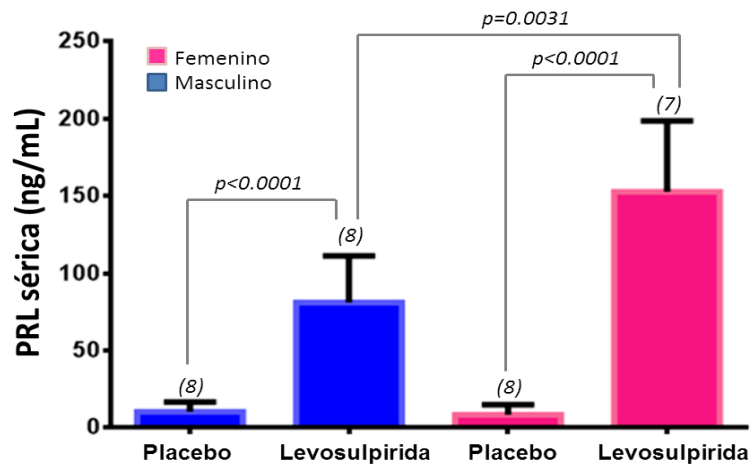
**Cuadro 7. Características clínicas y demográficas de los sujetos del estudio.** Valores expresados en promedio  $\pm$  error estándar.

	Control (n=16)	Levosulpirida (n=15)	<i>p</i>
Edad (años)	56.7 $\pm$ 1.4	57.3 $\pm$ 2.0	0.67
Diagnóstico de DM2 (años)	16.9 $\pm$ 1.18	14.8 $\pm$ 1.89	0.35
Hb1Ac en %	7.42 $\pm$ 0.35	7.88 $\pm$ 0.47	0.44
Tasa de Filtración Glomerular (mL/min)	70.8 $\pm$ 6.35	77.1 $\pm$ 7.22	0.52
PRL sérica basal (ng/mL)	7.31 $\pm$ 0.89	9.68 $\pm$ 1.64	0.17
PRL sérica post-tratamiento (ng/mL)	10.08 $\pm$ 1.460	111.7 $\pm$ 12.51	0.0001
PRL en vítreo (ng/mL)	1.65 $\pm$ 0.26	3.59 $\pm$ 0.45	0.0008

La PRL sérica no fue diferente entre los grupos previo al tratamiento (niveles de PRL basales). Al finalizar la semana del tratamiento, la levosulpirida elevó más de 11 veces los niveles de la PRL. Hubo diferencias significativas en los niveles de PRL séricos y vítreos entre ambos grupos (Cuadro 7 y Fig. 13), notoriamente, el efecto de la levosulpirida fue mayor en mujeres (Fig. 14)



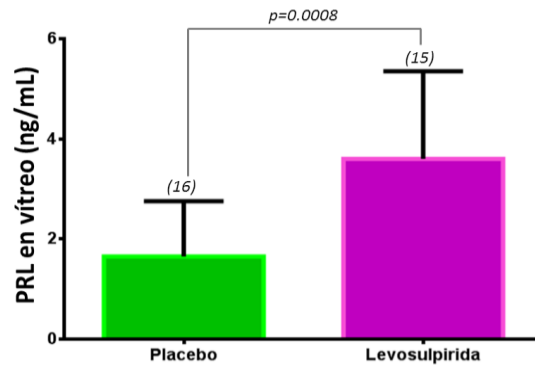
**Figura 14. La levosulpirida induce hiperprolactinemia.** Niveles séricos de PRL en los pacientes con retinopatía diabética proliferativa antes (A) y después (B) de ser sometidos al tratamiento con placebo (control) o levosulpirida. El número de pacientes (n) se indica en los paréntesis. Los valores son medias  $\pm$  errores estándar.



**Figura 15. La hiperprolactinemia debida a levosulpirida es mayor en mujeres que en hombres.** Niveles séricos de PRL en pacientes masculinos ( $81 \pm 10.6$  ng/uL) y femeninos ( $152.7 \pm 17.36$  ng/uL) con RDP e indicación de vitrectomía que fueron tratados con placebo (grupo control) o con levosulpirida. El número de

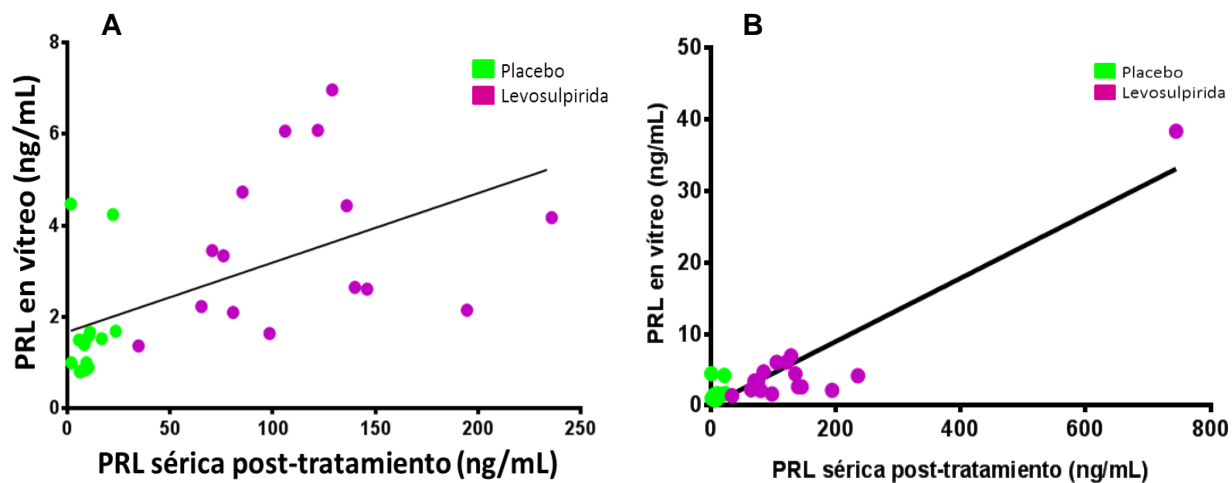
pacientes (n) se indica en los paréntesis. Los valores son medias  $\pm$  errores estándar.

La levosulpirida elevó más de dos veces los niveles de PRL en el vítreo (Fig. 15).



**Figura 16. La hiperprolactinemia farmacológica eleva los niveles de PRL vítreos.** Vitreos de hombres y mujeres que fueron tratados con placebo ( $1.65 \pm 0.26$  ng/uL) o con levosulpirida ( $3.59 \pm 0.45$  ng/uL). El número de pacientes (n) se indica dentro del paréntesis. Los valores son medias  $\pm$  errores estándar

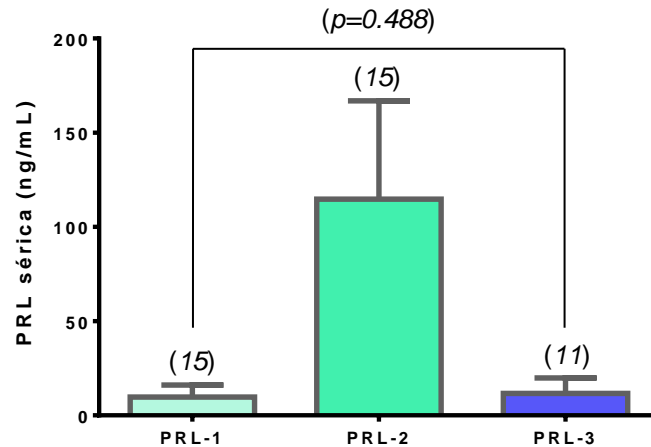
Respecto del caso excluido mencionado anteriormente, cuando se integra este caso al análisis de correlación (Figura 16A) aumenta de forma importante la significancia del análisis (Figura 16B).



**Figura 17. Correlación entre los niveles séricos de PRL post-tratamiento y los niveles vítreos.** Pacientes masculinos y femeninos con retinopatía diabética. A) excluyendo el caso atípico ( $r=0.56$ ,  $R^2=0.3140$ ,  $p<0.05$ ). B) Incluyendo el caso atípico ( $r=0.92$ ,  $R^2=0.85$ ,  $p<0.0001$ ).



De acuerdo con el cuestionario aplicado a cada uno de los pacientes una vez terminado el tratamiento, ninguno de ellos refirió efectos adversos reportados al medicamento (*Cuadro 1*). Posteriormente se citó a los pacientes que recibieron levosulpirida y se les midió PRL sérica nuevamente, encontrando niveles normales de PRL nuevamente en esta última determinación ( $11.69 \pm 2.54$ ) (*Figura 17*).



Determinaciones de PRL sérica a través del estudio

**Figura 18. La hiperprolactinemia inducida por levosulpirida desaparece una vez suspendido el tratamiento.** En la figura se muestran niveles séricos de PRL antes de iniciar el tratamiento (PRL-1) previos a la vitrectomía (PRL-2) y 4 semanas posteriores a la cirugía (PRL-3). El número de pacientes (n) se indica en los paréntesis. Los valores son medias  $\pm$  errores estándar.

## DISCUSIÓN

La RD es la principal causa de ceguera en los adultos en edad laboral. Los tratamientos actuales, si bien pueden reducir su progresión y evitar la ceguera, su aplicación comprende riesgos y posee baja efectividad para revertir el daño, por lo que es importante continuar la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para estos pacientes.

Estudios preclínicos han mostrado que la elevación de los niveles de la PRL circulante puede reducir la RD a través de favorecer la conversión intraocular de esta hormona a vaso-inhibinas, una familia de fragmentos de PRL con acciones inhibitorias de la vasoproliferación, la vasodilatación y la vasoconstricción. En este estudio demostramos que la elevación de los niveles de PRL sistémica inducidos mediante el tratamiento con levosulpirida resultan en la elevación de los niveles de PRL en el vítreo de pacientes con RD. Dado que la PRL es precursora de vaso-inhibinas oculares, la levosulpirida tiene la potencialidad de ser estudiada como un nuevo tratamiento contra la RD. Queda por determinar si el aumento en los niveles sistémicos y vítreos de la PRL inducido por levosulpirida se traduce en la elevación de las vaso-inhibinas intravitréales.

Los grupos de pacientes fueron homogéneos en cuanto a edad, género, tiempo de diagnóstico de la diabetes, niveles de hemoglobina glucosilada (HbA1c) y tasa de filtración glomerular, lo cual descarta que dichos parámetros pudieran haber influido sobre la determinación de la PRL. De hecho, no se observaron diferencias en los niveles de la PRL basal (antes del tratamiento con levosulpirida) entre los dos grupos de estudio (placebo y levosulpirida). Tampoco hubo diferencias de los niveles basales de la PRL entre hombres y mujeres. Se conoce que los niveles circulantes de la PRL son similares entre mujeres y hombres sanos, pero mientras que en las mujeres la PRL sérica disminuye con la edad (entre los 45 y los 65 años de edad), en los hombres se incrementa ligeramente en edades avanzadas (Vekemans-M. & Robyn-C. 1975). Nosotros no observamos esta diferencia,

probablemente debido al número menor de pacientes de nuestro estudio en relación al estudio que describe estas diferencias (15 mujeres y 16 hombres vs 32 mujeres y 42 hombres, respectivamente) (Cuadro 7). Hay estudios que han descrito una posible relación entre el tiempo de diagnóstico de la diabetes y una disminución en los niveles séricos de PRL (Harter-M., et al. 1976. Moradian-A.D., et al. 1985; Arnold-E., et al 2010) mientras que otros estudios de índole poblacional ya contemplan una posible relación de niveles bajos de PRL y síndrome metabólico y una regulación anormal de la glucosa (Wang-T., et al. 2013, Balbach-L., et al. 2013).

La levosulpirida se distingue entre otros antagonistas dopaminérgicos por su eficacia. Estudios comparativos randomizados, doble ciego, de levosulpirida con otros fármacos antagonistas dopaminérgicos como domperidona o metoclopramida, han mostrado que levosulpirida parece tener un efecto clínico superior en la reducción de la intensidad de los síntomas dispépticos y en el tiempo necesario para alcanzar este efecto (Hasler-WL., et al. 2007). Levosulpirida es un potente inhibidor de los receptores D2 en la hipófisis anterior. Debido a este efecto y a su creciente uso como agente procinético, cada vez más pacientes desarrollan hiperprolactinemia como un efecto secundario inevitable. La intensidad de la hiperprolactinemia es mayor en comparación con la de otros agentes procinéticos (Kuchay-MS., et al. 2017), características por las cuales la levosulpirida fue utilizada como intervención en este estudio para inducir un estado de hiperprolactinemia en los pacientes con DM2.

Como se esperaba, la levosulpirida elevó los niveles circulantes de la PRL. La elevación fue cerca de 15 veces más que los valores basales (112 ng/mL vs 9.68 ng/mL, respectivamente). El nivel del efecto es esperado ya que se han reportado incluso valores por encima de los 200 ng/mL (Kuchay-MS., et al. 2017)

Un resultado llamativo fue el que la elevación en los niveles de PRL por la levosulpirida fue mayor en las mujeres que en los hombres. Esta diferencia ya se

había observado previamente (Toney-TW. 1992. Moore-KE. 1987), pero se desconoce su explicación. Es posible que la observación (Vekemans-M. & Robyn-C. 1975) de niveles circulantes de PRL menores en mujeres que en hombres de mayor edad se asocie a un mayor tono dopaminérgico inhibitorio de la secreción de PRL en las mujeres. De ser así, la acción del antagonista dopaminérgico levosulpirida resultaría en una mayor liberación de PRL a la circulación en las mujeres que en los hombres.

La hiperprolactinemia inducida mediante levosulpirida incrementó más de dos veces los niveles intravítreos de PRL y los niveles circulantes de la hormona se correlacionaron significativamente con su concentración en el vítreo. Esta es la primera demostración en humanos de que la PRL atraviesa la barrera hematorretiniana, hallazgo que ya se ha demostrado en modelos experimentales (Arnold-E. et al. 2010), el mecanismo de transporte de la PRL sistémica al interior del ojo parecer ser activo vía su receptor presente en el epitelio pigmentario de la retina (Melendez-García. et al., 2016) y en los cuerpos ciliares (Arnold-E. et al., 2010). De hecho, se sabe que la PRL sistémica atraviesa la barrera hematoencefálica de roedores donde sus concentraciones guardan una relación directa con sus niveles en el líquido cefalorraquídeo (Zamorano-M. et al., 2014). Estas observaciones se llevaron a cabo en roedores sanos lo que sugiere que la PRL circulante tiene acceso a la retina y al cerebro bajo condiciones fisiológicas.

Nuestro estudio se realizó en pacientes con RDP, donde se conoce están presentes cambios fisiológicos importantes de la barrera hematorretiniana. De hecho, es importante mencionar que la mayoría (19) de los pacientes estudiados tuvieron hemorragias vítreas, 9 desprendimientos de retina por tracción y 4 ambas alteraciones, todas ellas como causas principales de vitrectomía. Esto sugiere que el acceso ocular de la PRL sistémica en nuestro estudio pudo tener un componente pasivo debido a la disfunción de la barrera hematorretiniana debida a las complicaciones crónicas de la DM.

Cabe mencionar, el caso de la paciente tratada con levosulpirida cuyos niveles séricos (745 ng/mL) y vítreos (38.4 ng/mL) rebasaron por mucho el promedio del grupo que recibió placebo (111.7 ng/mL y 3.59 ng/mL para el suero y el vítreo respectivamente). Desconocemos la causa de la sensibilidad acentuada de esta paciente al fármaco. Es posible que tenga que ver con su edad, ya que fue la mujer mas joven del grupo tratado con levosulpirida (44 años Vs 57.3, que es el promedio de edad de los pacientes que componen este grupo). Ya se han descrito casos similares de mayor sensibilidad en mujeres jóvenes en la literatura (Kuchay-MS., et al. 2017). Una vez suspendido el tratamiento los valores de PRL bajaron a niveles de ligera hiperprolactinemia (27.5 ng/mL) mayores a sus valores registrados como basales (14.8 ng/ml), por lo que es posible que dicha paciente cursara con alguna condición particular que favorece la hiperprolactinemia. Esto no se observó en los demás pacientes del estudio donde en todos ellos se recuperaron los valores basales de la PRL (9.68±1.64 ng/ml vs. 11.69±2.54, basales y 4 semanas después de la levosulpirida, respectivamente) lo que indica la ausencia de una influencia permanente del fármaco sobre los niveles de la PRL sérica en la mayor parte de los pacientes. En todo caso, los resultados elevados de la PRL en la paciente apoyan claramente la influencia de la PRL sérica sobre la PRL en el vítreo, al incrementar de una manera proporcional esta concentración en comparación con el resto de los pacientes.

La elevación en el vítreo de la PRL debido al tratamiento con levosulpirida puede resultar en una mayor generación de vasoinhibinas oculares. La inducción de hiperprolactinemia mediante implantes hipofisarios en la cápsula renal de ratas resultó en la elevación de vasoinhibinas en la retina y en la inhibición de la vasopermeabilidad debida a la inyección intravítreal de VEGF y a la vasopermeabilidad excesiva a consecuencia de la diabetes (Arnold-E. et al. 2010). Además, se conoce que la actividad de proteasas que generan vasoinhibinas a partir de PRL (catepsina D y metaloproteasas de matriz) se incrementa en la retina y en el vítreo de pacientes con RDP (*Triebel-J. et al., 2011*). Queda por determinar la presencia de vasoinhibinas en las muestras vítreas de los pacientes. Pensamos

que algunas inconsistencias entre niveles séricos y niveles vítreos de la PRL en el grupo tratado con levosulpirida en el que se encontraron niveles semejantes a los del grupo tratado con placebo podrían ser explicadas por su procesamiento diferencial hacia vasoinhibinas, ya que estos péptidos son reconocidos en menor proporción (10%) por el ensayo utilizado para determinar a la PRL.

## **CONCLUSIONES**

- Este trabajo muestra por primera vez la presencia de PRL en el vítreo humano y apoyan la incorporación de la PRL sérica al ojo de pacientes con RD.
- Se apoya la hipótesis de que la hiperprolactinemia inducida por levosulpirida puede incrementar los niveles intraoculares de vasoinhibinas y, por ende, que estas elevaciones potencialmente pudieran incidir en un curso clínico más favorable de la RD.

## **PERSPECTIVAS**

- Se está evaluando el efecto de la levosulpirida sobre los niveles de vasoinhibinas en el vítreo de los pacientes con RD y vitrectomía.
- Se está conduciendo un estudio prospectivo, randomizado, doble-ciego donde se evalúa el efecto de la levosulpirida vs. placebo sobre la progresión del EMD.

## LITERATURA CITADA

1. ADA, 2015. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care*; 36(1): S67-S74.
2. Agrawal-S., Joshi-M., Christoforidis-JB. 2013. Vitreous Inflammation Associated with Intravitreal Anti-VEGF Pharmacotherapy. *Mediators Inflamm*; 2013: 1-6.
3. American Academy of Ophthalmology (AAO), Retina Panel. Diabetic Retinopathy. Preferred Practice Patterns. San Francisco, American Academy of Ophthalmology; 2003. Recuperado de: [www.aaopt.org/clinical-statement/screening-diabetic-retinopathy](http://www.aaopt.org/clinical-statement/screening-diabetic-retinopathy). Fecha de consulta: 16 de Marzo de 2016.
4. Alegría-Ezquerro E., Castellano-Vázquez J.M., Alegría-Barrero A. 2008. Obesity, metabolic syndrome and diabetes: cardiovascular implications and therapy. *Rev Esp Cardiol*; 61(7): 752-764.
5. Allan-W., Louis-N., Medina-J., et al. 2013. Advances in our understanding of diabetic retinopathy. *Clinical Science*; 125(1): 1-17.
6. Álvarez R. 2006. Retinopatía diabética. *Bol Esc Med*; 31(3): 92-97.
7. Andonegui-J., Jimenez-L. 2008. Edema macular diabético. *An Sist Sanit Navar*; 31(3): 35-44.
8. Antonetti-DA., Barber-AJ., Bronson-SK., Freeman-WM., Gardner-TW., et al. 2006. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes*; 55: 2401-2411.



9. Antonetti-DA., Klein-R. 2012., Gardner-TW. 2012. Mechanisms of Disease Diabetic Retinopathy. *N Engl J Med*; 366: 1227-1239.
10. Aranda-J., Rivera-J., Michael-C., Jeziorski., Riesgo-Escovar J., Nava-G., et al. 2005. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 46(8): 2947–2953.
11. Arnold-E., Rivera-J.C., Thebault-S., Moreno-Páramo D., Quiroz-Mercado H., Quintanar-Stéphano A., Binart-N., Martínez-de la Escalera G., Clapp-C. 2010. High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes*; 59(12): 3192-3197.
12. Avery-RL., Castellarin-AA., Steinle-NC., Dhoot-DS., Pieramici-DJ., et al. 2014. Systemic pharmacokinetics following intravitreal injections of ranibizumab, bevacizumab or aflibercept in patients with neovascular AMD. *Br J Ophthalmol*; 98(12): 1636–1641.
13. Balbach-L., Wallaschofski-H., Völzke-H., Nauck-M., Dörr-M., et al. 2013. Serum prolactin concentrations as risk factor of metabolic syndrome or type 2 diabetes? *BMC Endocrine Disorders*; 13: 12.
14. Ben-Jonathan N, LaPensee-CR, LaPensee-EW. 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev*; 29(1): 1–41
15. Bonafonte-Royo S., García-Charles A. 2006. Retinopatía diabética. Edición: 2; pp. 1-12. Madrid, España. Elsevier Science Health Science Div.
16. Boyd-K. 2013. What Is Diabetic Retinopathy? *American Academy of Ophthalmology*. Recuperado de: <http://www.geteyesmart.org/eyesmart-/diseases/diabetic-retinopathy/index.cfm>. Fecha de consulta: 2 de Octubre de 2015.

17. Boyer-DS., Hopkins-JJ., Sorof-J., Ehrlich-JS. 2013. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for diabetic macular edema. *Ther Adv Endocrinol Metab*; 4(6): 151-69.
18. Bressler-SB., Liu-D., Glassman-AR., Blodi-BA., Castellarin-A., et al. 2017. Change in Diabetic Retinopathy Through 2 Years Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial Comparing Aflibercept, Bevacizumab, and Ranibizumab. *JAMA Ophthalmol*; 135(6): 558-568.
19. Canonge-S. 1999. Fisiopatología de la retinopatía diabética. *Soc Esp Diabetes. Av. Diabetol*; 16: 49-53.
20. Carrillo-Alarcón L.C., López-López E., Hernández-Aguilar C., Martínez-Cervantes J.A., 2011. Prevalencia de retinopatía diabética en pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 en Hidalgo, México. *R.M.O*; 85(3): 142-147.
21. CENETEC. 2015. Diagnóstico y tratamiento de retinopatía diabética. Guía de práctica clínica. Secretaría de salud. México: 7-10. Recuperado de: [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/171\\_GP\\_C\\_RETINOPATIA\\_DIABETICA/Imss\\_171RR.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/171_GP_C_RETINOPATIA_DIABETICA/Imss_171RR.pdf). Fecha de consulta; 22 de Noviembre de 2015.
22. Clapp-C., Aranda-J., González-C. 2006. Vasoinhibins: a family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function. *Front Horm Res*; 35: 64-73.
23. Clapp-C., Thebault-S., Arnold-E., Garcia-C., Rivera-JC., Martinez de la Escalera-G. 2008. Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 295(4): E772-E778.

24. Clapp-C., Thebault-S., Macotella-Y., Moreno-Carranza B., Triebel-J., et al. 2015. Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins. *Adv Exp Med Biol*; 846: 83-95.
25. Claramunt-J. 2010. Desprendimiento de retina. *Rev Med Clin Condes*; 21(6): 956-960.
26. Cohen-SR., Gardner-TW. 2016. Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. *Dev Ophthalmol*; 55: 137-146.
27. Corcóstegui-B., Durán-S., González-Albarrán MO., Hernández-C., Ruiz-Moreno JM., et al. 2017. Update on Diagnosis and Treatment of Diabetic Retinopathy: A Consensus Guideline of the Working Group of Ocular Health (Spanish Society of Diabetes and Spanish Vitreous and Retina Society). *J Ophthalmol*: 1-10.
28. ENSANUT 2012. Recuperado de: [http://www.cenetec.salud.gob.mx-/descargas/gpc/CatalogoMaestro/171\\_GPC\\_RETINOPATIA\\_DIABETICA/Imss\\_171ER.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx-/descargas/gpc/CatalogoMaestro/171_GPC_RETINOPATIA_DIABETICA/Imss_171ER.pdf). Fecha de consulta: 15 de Noviembre de 2015.
29. Fouces-Gutiérrez Y., Galindo-Reymond K., Navarro-Scott M., Díaz-Valdivia H. 2007 Nuestra experiencia en el tratamiento de la retinopatía diabética con fotocoagulación en la Misión Milagro, en Jagüey Grande. *MEDISAN*; 11(2). Recuperado de: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/san/vol11\\_2\\_07/san05](http://www.bvs.sld.cu/revistas/san/vol11_2_07/san05) Fecha de consulta; 23 de Noviembre de 2015.
30. Fowler-M. 2003. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clin Diab*; 21: 186-187.

31. Friege-F., Lara-Esqueda A., Suverza-A., Campuzano-R., Vanegas-E., et al. 2016. Consenso de prediabetes. Documento de Posición de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD). *Rev ALAD*; 17(4): 146-158.
32. García-C., Aranda-J., Arnold-E., Thébault-S., Macotella-Y., et al. 2008. Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest*; 118(6): 2291–2300.
33. Geganathan-VS., Verma-N. 2009. Safety and Efficacy of Intravitreal anti VEGF Injections for age-related macular degeneration. *Cur Opin Ophthalmol*; 20(3): 223-5.
34. González-E., Corbacho-AM., Eiserich-JP. 2004. 16K-Prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology*; 145(12): 5714-22.
35. González-JC. 2007. Levosulpiride y domperidona en el tratamiento de la dispepsia funcional: estudio comparativo. *Rev la Fac Med*; 30(2): 146–150.
36. Gupta-V. & Arevalo-JF. 2013. Surgical Management of Diabetic Retinopathy. *Middle East Afr J Ophthalmol*; 20(4): 283–292.
37. Harter-M., Balarac-N., Pourcher-P., Koslowski-JM., Krebs-B., Ramaioli-A. 1976. Diabetic retinopathy and prolactin. *The Lancet*; 308(7992): 961 – 962.
38. Hasler-WL. 2007. Gastroparesis: symptoms, evaluation, and treatment. *Gastroenterol Clin North Am*; 36(3): 619-647.

39. Hernández-Pascual C., Jiralt-Josa J., Simó-Canonge R. 2008. Tratamiento de la retinopatía diabética. *Endocrinol Nutr*; 55(2): 92-8
40. IDF. 2015. About Diabetes. Recuperado de: <http://www.idf.org/about-Diabetes>. Fecha de consulta: 9 de Octubre de 2015.
41. Ignacio-García E., Lorenzo-Martínez S., Mira-Solves J., Peralta-Ortega A., Reyes-Alcázar V. 2012. La calidad en la atención a pacientes con degeneración macular asociada a la edad, edema macular y retinopatía diabética, y oclusión vascular venosa en la retina. Sociedad Española de Calidad Asistencia (SECA), Sociedad Española de Retina y Vítreo (SERV), Red temática de investigación cooperativa en patología ocular (OFTARED). Recuperado de: <http://www.calidadasistencial.es/images/gestion/biblioteca/395.pdf>. Fecha de consulta: 24 de Noviembre de 2015.
42. Kapur-S., Langlois-X., Vinken-P., Megens-AA., De Coster-R., et al. 2002. The differential effects of atypical antipsychotics on prolactin elevation are explained by their differential blood-brain disposition: a pharmacological analysis in rats. *J Pharmacol Exp Ther*; 302(3): 1129-1134.
43. Kowluru-RA, Zhong-Q, Santos-JM. 2012. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9. *Expert Opin Investig Drugs*; 21(6): 797-805.
44. Kuchay-MS., Mithal-A. 2017. Levosulpiride and Serum Prolactin Levels. *Indian J Endocr Metab*; 21(2): 355–358.
45. Lozano-R., Concha-MP., Montealegre-A., de Leon-L., Villalba-JO., et al. 2007. Effectiveness and safety of levosulpiride in the treatment of dysmotility-like functional dyspepsia. *Ther Clin Risk Manag*; 3(1): 149–155.

46. Mediavilla-Bravo J. 2010. Complicaciones de la Diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento. SEMERGEN; 27(3): 132-145.
47. Meléndez-García R., Arredondo-Zamarripa D., Arnold-E., Ruiz-Herrera X., Noguez-Imm R., Baeza-Cruz G., et al. 2016. Prolactin protects retinal pigment epithelium by inhibiting sirtuin 2-dependent cell death. EBioMedicine; 7: 35–49.
48. Moreno-Páramo D., Rivera-J.C., Aranda-J., Salazar N., Arnold-E., Quiroz-Mercado H., Martínez-de la Escalera G., Clapp-C. 2007. Retinopatía diabética y vasoinhibinas. Rev invest clín; 59(4): 290-297.
49. Mooradian-AD., Morley-JE., Billington-CJ., Slag-MF., Elson-MK., Shafer-RB. 1985. Hyperprolactinaemia in male diabetics. Postgrad Med J; 61(711): 11-14.
50. Moore-KE., Demarest-KT., Lookingland-KJ. 1987. Stress, prolactin and hypothalamic dopaminergic neurons. Neuropharmacology; 26(7B): 801–808.
51. Mucci-A., Nolf-G., Maj-M. 1995. Levosulpiride: a review of its clinical use in psychiatry. Pharmacol Res; 31(2): 95-101.
52. Nguyen QD, Shah SM, van Anden E et al. 2003. Supplemental inspired oxygen improves diabetic macular edema: a pilot study. Invest Ophthalmol Vis Sci; 45(2): 617-624.
53. OMS, 2015. Diabetes. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>. Fecha de consulta: 17 de Agosto de 2015.

54. Organización Panamericana de la Salud. 2009. Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de Diabetes mellitus tipo 2. Recuperado de: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2164%3A2010-guias-alad-diagnostico-control-tratamiento-Diabetes-mellitus-tipo-2&catid=911%3ADiabetes-contents&Itemid=40306&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2164%3A2010-guias-alad-diagnostico-control-tratamiento-Diabetes-mellitus-tipo-2&catid=911%3ADiabetes-contents&Itemid=40306&lang=es). Fecha de consulta: 24 de Noviembre de 2015.
55. O'Steen-WK., Sundberg-DK. 1982. Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injection of iodinated prolactin. *Ophthalmic Res*; 14(1): 54-62.
56. Pacual-Mathey LI., Manzo-Denes J., Vincent-Goffi N., Kessal-K., Emiliano-G., et al. 2009. Prolactin: Intracellular mechanisms involved in prostatic function. *Rev Med UV*; 9(1): 36-40.
57. Pan-H., Nguyen-NQ., Yoshida-H., Bentzien-F., Shaw-LC., et al. 2004. Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest. Ophthalmol Vis Sci*; 45(7): 2413–2419.
58. Poulsen-JE. 1953. Recovery from retinopathy in a case of diabetes with Simmonds' disease. *Diabetes*; 2(1): 7–12.
59. Prado-Serrano A., Guido-Jiménez M.A., Camas-Benitez J.T. 2009. Prevalencia de retinopatía diabética en población mexicana. *Rev Mex Oftalmol*; 83(5): 261-266.
60. Rechtman-E., Harris-A., Garzosi-HJ., Ciulla-TA. 2007. Pharmacologic therapies for diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Clin Ophthalmol*; 1(4): 383-391.

61. Ricken-AM., Traenkner-A., Merkwitz-C., Hummitzsch-K., Grosche-J., et al. 2007. The short prolactin receptor predominates in endothelial cells of micro- and macrovascular origin. *J Vasc Res*; 44(1): 19–30.
62. Santana-Pérez F., Maciquez-Rodríguez J.E., Licea-Puig M.E., Díaz-Enamorado Y. 2013. Relation between prolactin and diabetic retinopathy. *Rev Cubana Endocrinol*; 24(1): 94-102.
63. Serra-J. 2010. Levosulpiride in the management of functional dyspepsia and delayed gastric emptying. *Gastroenterol Hepatol*; 33(8): 586-90.
64. Singh-H., Bala-R., Kaur-K. 2015. Efficacy and Tolerability of Levosulpiride, Domperidone and Metoclopramide in Patients with Non-Ulcer Functional Dyspepsia: A Comparative Analysis. *JCDR*; 9(4): FC09-FC012.
65. Sobacı-G., Güngör-R., Özge-G. 2013. Effects of multiple intravitreal anti-VEGF injections on retinal nerve fiber layer and intraocular pressure: a comparative clinical study. *Int J of Ophthalmol*; 6(2): 211–215.
66. Tenorio-G., Ramírez-Sánchez V. 2010. Retinopatía diabética; conceptos actuales. *Rev Med Hosp Gen Mex*; 73(3): 193-201.
67. Toney-TW., Manzanares-J., Moore-KE., Lookingland-KJ. 1992. Sexual differences in the stimulatory effects of bombesin on tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Brain Res*; 598(1-2): 279–285.
68. Triebel-J., Macotella-Y., Martínez-de la Escalera G., Clapp-C. 2011. Prolactin and vasoinhibins: Endogenous players in diabetic retinopathy. *Life*; 63(10): 806-810.



69. Valverde-Megías A., Arriola-Villalobos P., Reche-Frutos J., Donate-López J., Calvo-González. 2010 Intravitreal ranibizumab (Lucentis®) in the treatment of choroidal neovascular membrane secondary to punctate inner choroidopathy. *Arch Soc Esp Oftalmol*; 85(4): 149-52.
70. Vekemans-M., & Robyn-C. (1975). Influence of age on serum prolactin levels in women and men. *BMJ*; 4(5999): 738–739.
71. Verdaguer-J. 2010. Degeneración macular asociada a la edad. *Rev. Med. Clin. Condes*; 21(6): 949-955.
72. Viswanath-K., McGavin-D. 2003. Diabetic Retinopathy: Clinical Findings and Management. *Community Eye Health*; 16(46): 21–24.
73. Von-Bischhoffshausen F.B., Martínez-Castro F. 2010. Guía práctica clínica de retinopatía diabética para latinoamérica. Programa Visión 2020/IAPB latinoamérica. Asociación Panamericana de Oftalmología (APAO). Recuperado de: <https://www.paa.org/images/Downloads/spanish/pdf/Guia PracticaRetinopatia2011.pdf>. Fecha de consulta: 5 de Diciembre de 2015.
74. Wang-T., Lu-J., Xu-Y., Li-M., Sun-J., et al. 2013. Circulating Prolactin Associates With Diabetes and Impaired Glucose Regulation: A population-based study. *Diabetes Care*; 36(7): 1974–1980.
75. Wu-L., Martínez-Castellanos MA., Quiroz-Mercado H., Arevalo JF., Berrocal MH., Farah ME., et al. 2008. Twelve-month safety of intravitreal injections of bevacizumab (Avastin): results of the Pan-American Collaborative Retina Study Group (PACORES). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*; 246(1): 81-87.

76. Zamorano-M., Ledesma-Conlunga MG., Adán-N., Vera-Massieu C., Lemini-M., et al. 2014. Prolactin-derived vasoinhibins increase anxiety-and depression-related behaviors. *Psychoneuroendocrino*; 44: 123-32.