

M. en
C.
Carlo

s el



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

ANÁLISIS
DEL EFECTO
DE LA HIPERPROLACTINEMIA
INDUCIDA POR LEVOSULPIRIDA SOBRE LA
PROGRESIÓN DEL EDEMA MACULAR DIABÉTICO

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA HIPERPROLACTINEMIA INDUCIDA POR LEVOSULPIRIDA SOBRE LA PROGRESIÓN DEL EDEMA MACULAR DIABÉTICO

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
doctor en ciencias biológicas

Presenta:

M. en C. Carlos Daniel Núñez Amaro

Dirigida por:

Dra. Ma. Ludivina Robles Osorio

202
2

Querétaro, Qro. a 3 de diciembre de 2022

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

TESIS

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA HIPERPROLACTINEMIA INDUCIDA POR LEVOSULPIRIDA
SOBRE LA PROGRESIÓN DEL EDEMA MACULAR DIABÉTICO”**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta:

M. en C. Carlos Daniel Núñez Amaro

Dirigido por:

Dra. Ma. Ludivina Robles Osorio

SINODALES

Dra. Ma. Ludivina Robles Osorio
Presidente

Firma

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L
Secretario

Firma

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez
Vocal

Firma

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel
Suplente

Firma

Dr. Jorge Luis Chávez Servín
Suplente

Firma

Directora de la Facultad de Ciencias Naturales

Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
3 de diciembre de 2022
Querétaro, México

***“Demolí todos los puentes detrás de mí
para no tener otra opción
que seguir adelante”***

Fridtjof Nansen.

RESUMEN

La retinopatía diabética (RD) y el edema macular diabético (EMD) son las causas principales de pérdida de visión en pacientes con diabetes, las cuales se caracterizan por la proliferación y permeabilidad excesivas, que en etapas avanzadas conducen a la ceguera irreversible. Objetivo. investigar si la hiperprolactinemia inducida por levosulpirida aumenta los niveles de prolactina (PRL) y vasoinhibina en el vítreo de pacientes con RD y, si la levosulpirida reduce la progresión del EMD en la clínica. Métodos. Estudio prospectivo, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, donde el tratamiento se administró vía oral tres veces al día, en pacientes voluntarios con RD proliferativa sometidos a vitrectomía y con EMD. Los pacientes fueron aleatorizados para recibir placebo o levosulpirida durante 1 u 8 semanas. Cada ojo de los grupos de DME se evaluó en cuanto a los cambios desde el inicio en la agudeza visual (IA), el grosor foveal central (GF) y el volumen macular medio (VM). Se reclutaron un total de 37 pacientes por cada grupo de estudio: 19 tratados con placebo y 18 con levosulpirida para el grupo de vitrectomía y 18 tratados con placebo y 19 tratados con levosulpirida para el grupo de EMD. La levosulpirida elevó los niveles sistémicos (101 ± 13 vs 9.2 ± 1.3 ng/mL; $p < 0.0001$) y vítreos (3.2 ± 0.4 vs 1.5 ± 0.2 ng/mL; $p < 0.001$) de PRL y ambos niveles se correlacionaron directamente ($r = 0.58$, $p = 0.0002$). El vítreo de pacientes con RD tratados con levosulpirida inhibió la proliferación de células endoteliales en cultivo y la inhibición fue bloqueada por anticuerpos neutralizantes de vasoinhibina. Estos hallazgos indican que el tratamiento con levosulpirida se asocia con un aumento significativo de la agudeza visual ($p = 0.041$), disminución del grosor macular ($p = 0.009$) y reducción del volumen de la mácula ($p = 0.047$) en relación con el placebo, demostrando el valor terapéutico de la levosulpirida contra el EMD. No se detectaron efectos adversos de la levosulpirida.

Trabajo apoyado por CONACYT (proyectos 247164 y 289568) y UNAM (proyecto 405-PC).

Palabras clave: retinopatía diabética, edema macular diabético, prolactina, vasoinhibina, levosulpirida, antagonistas de los receptores D2 de la dopamina.

SUMMARY

Diabetic retinopathy (DR) and diabetic macular edema (DME) are the causes of vision loss in patients with diabetes, which are characterized by the overproliferation and hyperpermeability of blood vessels that interfere with visual outcomes and, in advanced stages, lead to retinal detachment and irreversible blindness. Objective. investigate whether levosulpiride-induced hyperprolactinemia increases the levels of PRL and vaso-inhibin in the vitreous of patients with DR and whether levosulpiride improves DME in the clinic. Methods. The study was prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, where the treatment was administered orally three times a day in volunteer patients with proliferative DR undergoing elective vitrectomy and in volunteer patients with DME. Patients were randomized to receive placebo or levosulpiride for 8 weeks or 1 week. Each eye from DME groups was evaluated for changes from baseline in visual acuity (BCVA), central foveal thickness (CFT) and mean macular volume (MMV). A total of 37 patients were recruited (19 treated with placebo and 18 with levosulpiride) in the vitrectomy groups and DME groups (18 treated with placebo and 19 treated with levosulpiride). Levosulpiride elevated the systemic (101 ± 13 vs 9.2 ± 1.3 ng/mL; $p < 0.0001$) and vitreous (3.2 ± 0.4 vs 1.5 ± 0.2 ng/mL; $p < 0.001$) levels of PRL and both levels were directly correlated ($r = 0.58$, $p = 0.0002$). The vitreous from patients with DR treated with levosulpiride, but not from placebo-treated DR patients, inhibited the proliferation of endothelial cells in culture, and inhibition was blocked by vaso-inhibin-neutralizing antibodies. These findings indicated that treatment with levosulpiride was associated with a significant increase in visual acuity ($p = 0.041$), decrease in macular thickness ($p = 0.009$), reduction in macula volume ($p = 0.047$) and an improvement in the appreciation index of all DME parameters ($p = 0.013$) relative to placebo, and support the therapeutic value of levosulpiride against DME. No adverse effects of levosulpiride were detected.

Work supported by CONACYT (grants 247164 and 289568) and UNAM (grant 405-PC).

(Key words: diabetic retinopathy, diabetic macular edema, prolactin, vasoinhibin, levosulpiride, dopamine D2 antagonists).

DEDICATORIAS

A mi esposa Carmen y a mi hija Minerva

Mi mundo se volvió un lugar mejor desde que están ustedes dos en él, nada de esto sería posible sin su apoyo y compañía. Las amo con todo el corazón.

A todas y cada una de las hermosas personas que día con día me hacen un mejor profesionalista y ser humano

A mi familia, amigos, compañeros, a mis jefas y a los pacientes que me han dado la oportunidad de orientar y ayudar gracias a este proyecto de investigación, todo esto es para ustedes.

Y a ti Wendy Hernández, donde quiera que te encuentres, gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dras. Ma. Ludivina Robles Osorio y Carmen Clapp

Por su comprensión, su estima y por darme la oportunidad de trabajar a su lado. Si llegué a terminar un doctorado fue completamente por ustedes, por su infinita paciencia y su increíble capacidad como docentes. Gracias por todo doctoras.

Al Instituto de Neurobiología (UNAM) campus Juriquilla

Por su soporte universitario, monetario y burocrático que posibilitó la conclusión de este proyecto de investigación

Al Instituto Mexicano de Oftalmología

Por hacerme parte de su equipo de trabajo, por las ocasiones de crecimiento y las comodidades para la consumación de este trabajo

A la Universidad Autónoma de Querétaro

Por concederme refugio y la posibilidad de concluir mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt)

Por el respaldo financiero para la culminación de este proyecto

ÍNDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	III
DEDICATORIAS	V
AGRADECIMIENTOS	VI
ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	5
2.1 Diabetes mellitus, generalidades.	5
2.2 Retinopatía diabética	6
2.2.2 Desarrollo de la retinopatía diabética	7
2.2.2.1 Cambios bioquímicos	7
2.2.2.2 Cambios histológicos	10
2.2.2.3 Cambios fisiológicos	11
2.2.2.4 Cambios clínicos	11
2.3 Edema macular	12
2.4 Tratamiento actual y sus limitaciones	13
2.5 Prolactina (PRL)	14
2.6 Vasoinhibina	15
2.6.1 Propiedades de la vasoinhibina	16
2.7 Hiperprolactinemia como tratamiento alternativo contra la RD	17
2.8 Levosulpirida	18
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos específicos	22
V. MATERIAL Y MÉTODOS	23
5.1 Formación de los grupos de estudio	24

5.2 Seguimiento	25
5.3 Mediciones y análisis	26
5.4 Evaluación de los niveles de vasoinhibina en el vítreo (grupos 1 y 2)	29
5.5 Asignación de tratamientos	29
5.6 Análisis estadístico	30
5.7 Aspectos bioéticos del estudio	30
VI. RESULTADOS	31
6.1 La levosulpirida eleva los niveles de PRL en el vítreo de pacientes con RDP.	31
6.2 La levosulpirida eleva los niveles de una vasoinhibina bioactiva en el vítreo de pacientes con RDP.	34
6.3 La levosulpirida mejora parámetros oftalmológicos de pacientes con EMD	36
6.4 Agudeza visual (AV)	37
6.5 Volumen macular (VM)	38
6.6 Grosor foveal (GF)	39
6.7 Índice de apreciación de la progresión del EMD realizado por oftalmólogos con especialidad en retina	40
VII. DISCUSIÓN	42
VIII. CONCLUSIÓN	51
IX. LITERATURA CITADA	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación establecidos para este estudio.	24
Tabla 2. Grupos de pacientes que se incluyeron en el estudio.	25
Tabla 3. Determinaciones bioquímicas y oftalmológicas realizadas a los pacientes (grupos 3 y 4).	26
Tabla 4. Control de calidad interno y externo en las pruebas de interés realizado por Laboratorios GOCA.	28
Tabla 5. Características clínicas y demográficas de los sujetos de estudio correspondientes a los grupos 1 y 2.	31
Tabla 6. Características clínicas y demográficas de los grupos con EMD sometidos al tratamiento con placebo o levosulpirida.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Correlación entre los niveles de PRL en el suero y vítreo.	32
Figura 2. Inmunoprecipitación-Western blot (IP-WB) representativo de proteínas del vítreo de pacientes con RD tratados con placebo o con levosulpirida	34
Figura 3. Efecto del vítreo de pacientes con RD tratados con placebo o levosulpirida sobre la proliferación de células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) en cultivo.	35
Figura 4. Número de letras percibidas de la cartilla de ETRS que evalúa la agudeza visual de los grupos de pacientes con EMD antes y después del tratamiento con placebo o con levosulpirida.	38
Figura 5. Volumen macular registrado mediante OCT en cada uno de los ojos de los grupos de pacientes en el estudio antes y después de iniciar el tratamiento.	39
Figura 6. Grosor de la fóvea registrado mediante OCT para cada uno de los ojos de los grupos de pacientes en el estudio antes y después de iniciar el tratamiento.	40
Figura 7. Evaluación global del cambio en los parámetros oftalmológicos por parte de 5 especialistas en retina respecto al desempeño del tratamiento con levosulpirida contra la progresión del EMD.	41
Figura 8. Representación esquemática de los hallazgos del estudio que respaldan el mecanismo por el cual la terapia con levosulpirida podría limitar la progresión de DME y DR	51

I. INTRODUCCIÓN

La diabetes de tipo 2 (DM2) representa 95% de los casos de esta enfermedad en el mundo y es causada principalmente por la resistencia a la acción de la insulina, esto como resultado de un estilo de vida sedentario, obesidad y predisposición genética (OMS 2021). Una de las complicaciones más importantes que los pacientes con DM2 pueden llegar a padecer es la retinopatía diabética (RD), una microangiopatía la cual se considera como la causa más frecuente de pérdida de visión en adultos en edad laboral, principalmente en países en desarrollo (Shukla-UV., et al., 2021).

Una característica inicial en el desarrollo de la RD es la pérdida de pericitos, células murales que revisten a los vasos sanguíneos y la muerte de las células endoteliales, lo que resulta en un aumento en la vasopermeabilidad y es un rasgo distintivo en la retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) (Spencer-BG., et al. 2019). La RDNP representa la etapa temprana de la RD y es durante esta etapa donde las patologías retinianas, tales como edema, microaneurismas, hemorragias y exudados duros, pueden detectarse mediante fotografía de fondo de ojo, si bien la visión de los pacientes aún no se encuentra comprometida, a menos que dichos cambios ocurran a nivel de la mácula, definiendo al edema macular diabético (Wang-C., et al., 2018). Estas alteraciones funcionales van seguidas de oclusiones microvasculares, que conducen a una isquemia retiniana progresiva que induce la expresión de factores proangiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV).

El FCEV pertenece a la familia de genes denominados Factor de Crecimiento Endotelial Vascular –Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (FCEV-FCDP), en los que se incluyen al FCEV-A, B, C, D y E, siendo el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A (FCEV-A) el miembro principal y más estudiado en esta familia de genes, desprendiéndose de este 6 isoformas importantes; FCEV-A₁₂₁, FCEV-A₁₄₅, FCEV-A₁₈₃, FCEV-A₁₈₉, FCEV-A₂₀₆ Y FCEV-A₁₆₅ (Martínez-Ezquerro

JD., Herrera-LA. 2006). FCEV-A₁₆₅ es la isoforma predominante del FCEV-A, la cual tiene un papel principal en la promoción de la hiperpermeabilidad vascular, además de ser un mitógeno importante para las células endoteliales, desencadenando su proliferación, migración y formación de nuevos vasos sanguíneos en la retina diabética (*Bucolo-C., et al. 2021*). Esta nueva vasculatura y los cambios a nivel tisular, tales como hemorragias vítreas y el desprendimiento de retina, son características distintivas de la retinopatía diabética proliferativa (RDP) la cual es la etapa de mayor gravedad de esta complicación (*Chaudhary-S., et al. 2021*).

Las alternativas terapéuticas con las que se cuenta actualmente para aminorar la progresión de la RD comprenden principalmente a la fotocoagulación con láser y las aplicaciones intraoculares de factores antiangiogénicos (*Wang-C., et al., 2018*). Estos tratamientos, aunque efectivos en conjunto han demostrado ser eficaces contra la RD, son por lo general agresivos y poco accesibles en nuestro país, además de que necesitan frecuentemente de más de una aplicación (*Santana-Pérez F., et al. 2013*). La retina que aquellos ojos que ha recibido terapia fotocoagulante sufre coagulación intravascular, desnaturalización proteica y necrosis tisular, situación que compromete de manera irreversible el área tratada (*Allan-W., et al. 2013*), mientras que la terapia con agentes antiangiogénicos puede originar sangrado, desgarros o desprendimientos de la retina (*Santana-Pérez F., et al. 2013*). Uno de los principales medicamentos intravítreos utilizados y con más evidencia científica que avala su uso con este fin en el ranibizumab (Lucentis®), el cual se encuentra aprobado desde el 2011 y sus efectos secundarios parecen estar más asociados con la vía de administración del fármaco en sí, tal es el caso de endoftalmitis (<0.8%), lesión del cristalino (0-0.7%), o desprendimientos de retina (<0.03-0.17%) (*Elman-MJ., et al. 2010*). Sin embargo, es importante mencionar que el empleo de fármacos anti-FCEV en la RD está aún en etapa de ensayo clínico, por lo que su uso debe contar con el consentimiento aprobado por el paciente, previniendo de la falta de experiencia de

manera prolongada y de los posibles inconvenientes (*Unidad de terapia intravítrea: consenso clínico. SERV 2021*).

Con el propósito de investigar una nueva alternativas terapéuticas frente al desarrollo y progresión de la RD, y que además carezca de los inconvenientes de las tratamientos ya establecidos, en este trabajo se propuso la opción de valorar el impacto de un tratamiento oral de un fármaco procinético, el cual comprende entre sus efectos incrementar los valores séricos de la hormona prolactina (PRL). Este planteamiento se basa en diversos trabajos preclínicos, los cuales han demostrado la capacidad de la PRL sérica de atravesar la barrera hemato-ocular e incorporarse al ojo en roedores, donde es convertida proteolíticamente a su metabolito, la vasoinhibina (*Arnold et al., 2010*). La vasoinhibina comprende una familia de segmentos provenientes de la PRL, los cuales tienen la capacidad suprimir la vascularización a consecuencia de la isquemia en la retina del ratón (*Pan H., et al. 2004*) y el aumento de la vasopermeabilidad en la retina de la rata (*Garcia et al. 2008*). Se sabe que la vasoinhibina actúa específicamente sobre el endotelio vascular, impidiendo el funcionamiento de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (SONe) la cual es estimulada principalmente por factores vasoactivos, entre los que se encuentra el FCEV₁₆₅ (*Bucolo-C., et al. 2021*). También se sabe que los valores sistémicos de PRL y de vasoinhibinas disminuyen en personas con RD (*Triebel-J., et al. 2011*) por lo que elevar los niveles séricos de la hormona PRL (hiperprolactinemia) pudiera funcionar como una nueva alternativa terapéutica frente a la RD.

La finalidad de este trabajo fue llevar a cabo un estudio clínico para investigar si la hiperprolactinemia inducida mediante el fármaco levosulpirida (25 mg cada 8 horas) incrementa los valores intravítreos de PRL y de vasoinhibina, en personas con RD y, en virtud de las acciones inhibitorias de la vasoinhibina sobre los vasos de la retina, mejora la agudeza visual, disminuye el grosor foveal, el volumen macular, por lo que pudiera significar una nueva alternativa terapéutica frente a la RD y el EMD. La levosulpirida incrementa los valores sistémicos de la PRL gracias

a su capacidad para bloquear de los receptores dopaminérgicos tipo 2 localizados en los lactotrofos, los cuales regulan la inhibición dopaminérgica sobre la formación y descarga de la PRL a la circulación (*Mucci-A., et al. 1995*). Levosulpirida es un fármaco que se emplea para disminuir los síntomas de la gastroparesis presentes en la diabetes, la cual es causada por la neuropatía autonómica, además de que cuenta con un perfil de seguridad aceptable, ya que sus efectos secundarios son inusuales a las dosis diarias recomendadas (*Serra-J. 2010*).

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Diabetes mellitus, generalidades.

La *Diabetes mellitus* (DM) es un padecimiento crónico degenerativo el cual se produce debido a un descenso en la generación de insulina pancreática y/o resistencia a la acción de esta (IDF, 2021).

A nivel mundial, se estima que cuatrocientos quince millones de personas entre 20 y los 79 años viven con diabetes, y de estos, 193 millones de personas cursan con la enfermedad aún sin diagnosticar, siendo la diabetes tipo 2 la que contiene más del 90% de los pacientes con esta enfermedad (IDF 2021). Esta condición genera complicaciones microvasculares y macrovasculares, provocando un profundo desgaste psicológico, físico y económico, tanto a los pacientes como en sus familias, lo cual amenaza con saturar en un futuro los sistemas de salud (Chatterjee-S., et al. 2017)

La DM se trata de manera general con actividad física y un régimen alimenticio adecuado. Conforme al control metabólico y la enfermedad avanza se va requiriendo terapia farmacológica hipoglucemiante y/o terapia insulínica, además de asistencia médica calificada (Friege-F., et al. 2016).

Un reporte generado en México mostró que existen diferencias geográficas y de sexo entre las complicaciones y comorbilidades de la DM2, y que estas se acentuaban con la edad y el tiempo de diagnóstico de la enfermedad (Ovalle-Luna OD., et al. 2019). En este reporte se compararon los resultados de la encuesta nacional de salud (ENSANUT) del 2012 y del 2016, encontrando un aumento en los casos de disminución en la agudeza visual (47.6 % vs. 54.5 %), deterioro en la estructura de la retina (13.9 % vs. 11.2 %), ceguera (6.6 % vs. 9.9 %) además de otras complicaciones producto de la DM2 como úlceras (7.2 % vs. 9.1 %), infección y necrosis en miembros inferiores (2 % vs. 5.4 %), coma diabético (2.9

% vs. 1.7 %), paro cardíaco (2.8 % vs. 3.2 %) y daño renal (1.4 % vs. 1.2 %) (ENSANUT 2012. ENSANUT 2016. Rojas-Martínez R., et al. 2018).

En las personas con DM2 se generan complicaciones con forme la enfermedad avanza a través de los años, esto es principalmente facilitado por un estado constante de descontrol metabólico crónico, al incremento en la presión arterial, la elevación en las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos y el tabaquismo. Las complicaciones consideradas graves generadas por la DM se clasifican principalmente en macrovasculares y microvasculares. Las complicaciones consideradas graves generadas por la DM se clasifican principalmente en macrovasculares (deteriorando las arterias en general) que ocasionan enfermedad coronaria, cerebrovascular y vascular periférica (Viigimaa, M., et al. 2020) y microvasculares (dañando los vasos sanguíneos más pequeños) y que producen nefropatía, neuropatía y retinopatía diabéticas (Faselis, C., et al. 2020). Dado el enfoque de nuestro proyecto hacia la RD a continuación se realizará una revisión minuciosa al respecto a la complejidad de la enfermedad.

2.2 Retinopatía diabética

La RD es una complicación microvascular asociada frecuentemente a la DM, la cual se encuentra directamente relacionada con la de pérdida de visión en personas en edad laboral, principalmente en naciones en vías de desarrollo (Shukla-UV., et al., 2021).

20 años posterior al diagnóstico de DM, la RD ya se encuentra en el 90% de los pacientes con DM1 y 60% con DM2 y, de estos, el 5% ya necesitará de terapia especializada para prevenir la ceguera (Von-Bischhoffshausen F.B., et al. 2011).

Investigaciones previas a cerca de la RD en México han observado una elevada incidencia en grupos de personas enfermas con DM (Prado-Serrano A., et al. 2009). De acuerdo con reportes obtenidos por la Encuesta Nacional de Salud y

Nutrición del 2012, tres de cada cuatro pacientes con DM requieren de tratamiento oftalmológico especializado que les dé la posibilidad de disminuir el daño generado por la RD, como son el descenso en la agudeza visual con 47.6% (3 millones) y el deterioro en las estructuras retinianas con 13.9% (889 mil) (*ENSANUT 2012*).

En un estudio realizado de 2014 a 2017 por parte del Centro de Atención Integral del Paciente con Diabetes (*CAiPADi*) donde se incluyeron a 1,232 pacientes de los cuales, en el 17,3% (n=213) se observó que la RD ya se encontraba desarrollada en al menos un ojo y el EMD en el 6,7% (n=82) de los pacientes. La RD bilateral se observó en el 54,5% (116/213) y el EMD bilateral en el 50,0% (41/82). Cabe destacar que estas observaciones se realizaron en personas enfermas con DM2, con menos de 5 años de haber diagnosticado el padecimiento, lo cual destaca la importancia en la detección temprana de esta complicación (*Graue-Hernandez EO., et al. 2020*). Con base en estas observaciones, podemos discernir que la RD representa un fuerte problema para el sistema de salud pública en nuestro país y, al encontrarse ineficiente para enfrentar la problemática, es conveniente concientizar a los pacientes sobre la trascendencia de la RD, sus perjuicios y la importancia de un seguimiento adecuado con el fin de disminuir el riesgo de ceguera permanente (*CENETEC 2015*).

2.2.2 Desarrollo de la retinopatía diabética

2.2.2.1 Cambios bioquímicos

Como responsables de los cambios bioquímicos iniciales a consecuencia de la hiperglucemia se incluyen las vías de señalización alteradas del sorbitol y la hexocinasa, los resultados de la glicación no enzimática, la proteína cinasa C (PKC), especies reactivas de oxígeno generadas por estrés oxidativo (EROs), el FCEV, la hormona del crecimiento, el factor de crecimiento de fibroblastos y la angiotensina (*Bucolo-C., et al. 2021*).

En un estado de hiperglicemia se eleva la acción de los transportadores de glucosa de las células que no requieren de la intervención de la insulina para internalizarla, por lo que el acceso de glucosa en las células de la retina (tanto nerviosas como vasculares) se incrementa (*Tarr-JM., et al. 2013*).

De manera normal, la glucosa se metaboliza por las vías glucolítica y de las pentosas fosfato, pero en pacientes con diabetes la capacidad de estas vías metabólicas se ve rebasada y la glucosa en exceso es procesada por vías alternas poco activas de manera común, como son las vías del sorbitol y la hexoquinasa, así como la glicación no enzimática de proteínas y la activación de la vía diacilglicerol-PKC (DAG_PKC) (*Safi-SZ., et al. 2014*).

Los anteriores mecanismos producen estrés oxidativo, el cual genera radicales libres provenientes de la cadena de transporte de electrones, ocasionando así lesiones de carácter oxidativo en las proteínas. Estos cambios bioquímicos originan la producción de factores de crecimiento proangiogénicos, los cuales son importantes en el avance de la RD (*Alizadeh-E., et al. 2018*).

Durante la glicosilación no enzimática la glucosa se une a las proteínas, alterando de forma irreversible su funcionamiento. Estos productos son responsables de estimular la migración y proliferación del endotelio, la degeneración de las células del epitelio pigmentario de la retina y provocar la muerte de pericitos (*Goldin-A., et al. 2006*).

En el transcurso de la DM, el incremento en la glucosa central eleva el diacilglicerol dentro de las células de la retina, al tiempo que aumenta la actividad de la PKC. La PKC está directamente relacionada con la acción del VEGF, tanto en el incremento de la permeabilidad de las células del endotelio (que genera edema macular) así como en la respuesta a la isquemia en la retina, procesos que estimulan la generación de neovasos (*Capitão-M., et al. 2016*).

Por su parte, la vía de la hexoquinasa facilita el avance en las complicaciones generadas por la diabetes, además de facilitar la resistencia a la insulina obstruyendo su efecto neuroprotector (Yu-LY., et al. 2015). En esta vía se genera glutamato, que puede llegar a ser neurotóxico y que además se ha asociado con cambios en la expresión de agentes proangiogénicos (Ishikawa-M. 2013).

Todas las vías anteriormente descritas producen especies reactivas de oxígeno (ROS) en la cadena mitocondrial, lo que a su vez provoca lesiones oxidativas en el endotelio vascular. Las ROS se generan debido a la autooxidación de la glucosa y por cualquiera de las vías metabólicas antes mencionadas (Safi-SZ., et al. 2014).

La formación de los vasos sanguíneos (angiogénesis) es moderada de una forma muy precisa debido un equilibrio entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos, pero durante el curso de la DM este equilibrio que se fractura a favor de una vascularización descontrolada que, a la larga, puede llegar a separar el tejido retiniano, dando como resultado un estado de ceguera irreversible (Crabtree-GS. & Chang-JS. 2021).

Entre los agentes vasoproliferativos y vasoinhibidores endógenos más importantes, destacan por su acción el FCEV, la hormona de crecimiento, el factor de crecimiento de fibroblastos y la angiotensina (Tarr-JM., et al. 2013).

El FCEV es actualmente el más importante y más estudiado factor de crecimiento por su fuerte relación con el progreso y avance de la RD, es altamente selectivo hacia las células del endotelio y su regulación es dependiente de los niveles bajos de oxígeno (hipoxia). El FCEV actúa sobre las células endoteliales promoviendo las diferentes fases del proceso angiogénico, a saber: la permeabilidad, proliferación, migración, capilarización y supervivencia (Le-YZ. 2017). Hasta el día de hoy, los antagonistas del FCEV representan la única terapia antiangiogénica aceptada en clínica y estas se emplean solas o asociadas a otros agentes terapéuticos (Chekhonin-ES., et al. 2021).

En la diabetes aumenta también la actividad de la renina y de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). Como consecuencia, se produce un exceso de angiotensina II que produce una disminución anormal en la luz de las arteriolas retinianas, elevando de manera local de la presión sanguínea y reduciendo de flujo sanguíneo retiniano (*Behl-T., et al. 2017*).

2.2.2.2 Cambios histológicos

Los cambios histológicos son consecuencia de los cambios bioquímicos anteriormente mencionados, estos se aprecian principalmente a nivel vascular y neurodegenerativo (*Bonafonte-Royo S., et al. 2006*).

La muerte pericitaria es la observación a nivel histológico más común, la cual está relacionado con la acumulación de sorbitol intracelular. Los pericitos producen el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) el cual impide la migración y proliferación de las células del endotelio. La muerte de estas células desgasta la pared vascular, modificando su estructura en la membrana basal de los capilares (*Moreno-Páramo D., et al. 2007*). Además de otros eventos como el aumento en la concentración de colágeno, la disminución en la producción la fibronectina y la glicosilación de proteínas de la membrana basal de los vasos capilares, dan como resultado un engrosamiento y pérdida de estructura vascular, generando lesiones en las células endoteliales que favorecen la aparición del edema macular diabético (EMD) y neovascularización (*Crabtree-GS. & Chang-JS. 2021*).

También tienen lugar cambios neurodegenerativos en la retina a consecuencia de la diabetes, los cuales se traducen en una apoptosis neuronal temprana con un decremento en el volumen de las membranas retinianas, principalmente las capas internas (ganglionar y nuclear) y la activación de células gliales (*Simó-R., et al. 2018*). El glutamato es un neurotransmisor sináptico que de manera normal se transforma en glutamina en la glía de Müller, pero en la diabetes se produce una

alteración en los transportadores de este compuesto, lo que dificulta su acceso a las células de Müller y, por ende, su acumulación dentro y fuera de las neuronas ganglionares (lo que es tóxico) promoviendo muerte tisular (*Ishikawa-M. 2013*).

2.2.2.3 Cambios fisiológicos

La interacción entre los astrocitos, pericitos y las células endoteliales controla la permeabilidad retiniana determinante de la barrera hematorretiniana (BHR), la cual regula el paso de moléculas hacia dentro y fuera de la retina. La integridad de la BHR se rompe en la diabetes, debido al daño vascular antes mencionado (*Miyamoto-N., et al. 2008*). Además, el engrosamiento de la pared vascular y su menor elasticidad (a consecuencia de la diabetes), altera el mecanismo autorregulador del flujo sanguíneo retiniano, que disminuye y se asocia con una vasoconstricción mediada por angiotensina (*Behl-T., et al., 2017*).

La disminución en el flujo sanguíneo motiva a que los glóbulos blancos de adhieran al endotelio, aglomeración que es la causante de oclusión capilar y lesiones endoteliales (los glóbulos rojos y las plaquetas conglomeran con mayor facilidad, favoreciendo la aparición de microtrombos) mientras que los basófilos extravasados se pueden transformar en mastocitos y liberar histamina, lo que también aumenta la permeabilidad vascular (*Tarr-JM., et al. 2013*). Estos cambios son los que, de mantenerse con el paso del tiempo, favorecen la manifestación del EMD.

2.2.2.4 Cambios clínicos

En ausencia de tratamiento, la RD progresa de forma escalonada, partiendo de lesiones leves hasta importantes, como son las hemorragias vítreas, desprendimiento traccional de la retina (DRT) y edema macular diabético (EMD).

2.3 Edema macular

La mácula comprende una zona diminuta (de 5 a 6 mm de diámetro) la cual se caracteriza por su coloración amarillenta (esto debido a la alta concentración de carotenoides como luteína y zeaxantina). Dentro de su perímetro se concentra la mayor cantidad de fotorreceptores (conos) en toda el área de la retina, por lo que se considera que cualquier alteración patológica en su estructura puede afectar la agudeza visual (*Verdaguer-J. 2010*). El edema macular diabético (EMD) es una de las disfunciones principales y causa importante de baja en la visión en los pacientes con diabetes, la cual puede manifestarse tanto al principio como en la fase avanzada de la enfermedad (*Von-Bischoffshausen F.B., et al. 2011*).

La alteración estructural característica del EMD consiste en la acumulación de líquido en las capas de Henle y nuclear interna de la retina. Este fluido emana del compartimiento intravascular y su secreción (como en el resto de los tejidos) está modulado por el equilibrio entre la presión osmótica y la presión hidrostática. La causa más importante que promueve la acumulación de fluido extracelular en la retina es la modificación en la permeabilidad de la barrera hemato-retiniana, ya sea en su componente interno (endotelio vascular) o externo (epitelio pigmentado). Una mayor permeabilidad es consecuencia de la sobreexpresión del VEGF proveniente de las células pigmentadas, el revestimiento endotelial y la neuroglia (*Browning-DJ., et al. 2018*) debido al aumento crónico de la glucemia de manera prolongada, derivado de un mal control metabólico.

Otros factores sistémicos que además pueden facilitar la manifestación del edema son la hipertensión y la hipoalbuminemia. La hipertensión incrementa la presión hidrostática de los capilares de la retina, al mismo tiempo que la disminución en la concentración de albúmina aminora la presión coloidosmótica, lo que se traduce en una elevación en la vasopermeabilidad, favoreciendo la aparición o el empeoramiento del EMD (*Bandello-F., et al. 2017*).

2.4 Tratamiento actual y sus limitaciones

La recomendación más importante en el tratamiento médico es el control de la glucosa y la presión arterial elevada. También participa el efecto benéfico del control de los lípidos en el caso de dislipidemia, la supresión del tabaco y el alcohol (*Wang-W. & Lo-A. 2018*). La terapia con láser busca disminuir la expresión de VEGF por parte de las células pigmentadas de la retina, favoreciendo el transporte de oxígeno a través de la coroides. Este tratamiento, si bien es efectivo en un 50% de los casos (*Santana-Pérez F., et al. 2013*) es altamente invasivo, causa lesiones en la retina y puede producir pérdida visual central y periférica, por lo que es importante buscar nuevos tratamientos médicos (*Boyer-DS., et al. 2013*).

En teoría, cualquier fármaco que interfiera con alguno de los mecanismos etiopatogénicos de la RD y del EMD tendría potencialidad terapéutica. Han sido muchos los agentes analizados, pero hasta este momento los antagonistas del FCEV representan la única terapia antiangiogénica aceptada clínicamente. El bloqueo del FCEV se ha intentado mediante el uso de aptámeros como el pegaptanib (Macugen®) o con anticuerpos monoclonales humanizados como son el ranibizumab (Lucentis®) o el bevacizumab (Avastin®) los cuales son un tipo de inmunoglobulinas producidas mediante la combinación de un anticuerpo humano y un fragmento monoclonal FAB (fragmento de unión a antígeno) proveniente de un ratón o una rata (un modelo murino) (*Smith-AG & Kaiser-PK. 2016. Browning-DJ., et al. 2018. Sun-JK., & Jampol-LM. 2019*).

Los medicamentos intravítreos que inhiben la angiogénesis tienen un efecto transitorio que varía alrededor de 30 días, por lo que deben ser administrados de manera frecuente (incrementando el riesgo de contagio por parte de patógenos oportunistas e irritación) además de no ser eficaces en la mayoría de los pacientes, por lo que no reemplazan la terapia fotocoagulante; de hecho, se recomienda el uso combinado de ambos tratamientos (*Von-Bischoffshausen F.B., et al. 2011. Corcostegui-B., et al. 2017*).

Nuevos abordajes a cerca de la fisiología y patogenia de la RD y el EMD están permitiendo identificar nuevos blancos terapéuticos con la esperanza de mejorar su tratamiento (*Chekhonin-ES., et al. 2021*). Entre los mediadores químicos con influencia en la RD se encuentra la hormona prolactina y, en particular, su metabolito la vasoinhibina.

2.5 Prolactina (PRL)

La PRL es una hormona de carácter proteico, la cual es generada principalmente por la adenohipófisis y cuya liberación al torrente sanguíneo está sujeta a la inhibición de la dopamina procedente del hipotálamo (*Clapp-C., et al. 2006*).

La PRL actúa mediante la unión a receptores específicos encontrados en las membranas celulares, los receptores de PRL (RPRL), de los cuales se han divulgado tres isoformas distintas; una elongada y dos reducidas. La cantidad y configuración de los RPRL cambian dependiendo de la fisiología del paciente, lo que propone que una elevada concentración de estas isoformas se encuentra relacionada con ciertas funciones determinadas a nivel tisular (*Ben-Jonathan N., et al. 2008*).

En enlace de la PRL con su receptor da como resultado la expresión de distintas cascadas de señalización en el interior de las células, destacando la vías JAK-STAT (cinasas de tirosina Janus - proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción) y las MAP cinasas (proteínas cinasas activadas por mitógenos) relacionadas directamente en especialización y desarrollo celulares (*Pascual-Mathey LI., et al. 2009*).

La PRL ejerce una amplia gama de acciones relacionadas con la reproducción, el balance osmótico, el sistema inmune, el comportamiento, biotransformación y la generación de vasos sanguíneos (*Bole-Feysot., et al. 1998. Clapp., et al. 2009*). Entre estos efectos, principalmente los dos últimos son los que tienen una relación

con la DM y la RD. El mecanismo más importantes por el cual la PRL puede evitar el desarrollo y generar un retroceso en el avance de la RD es mediante su conversión a vaso inhibina (*Triebel et al 2011*).

2.6 Vaso inhibina

La vaso inhibina corresponde a una familia de fragmentos generados a partir de la proteólisis de la PRL, los cuales son capaces de inhibir el desarrollo de vasos sanguíneos en la retina generada por una condición isquémica (*Pan H., et al. 2004*) y el aumento en la permeabilidad vascular retiniana frente a una condición diabética generada experimentalmente (*García-C., et al. 2008*). La vaso inhibina está presente en la circulación, en la cara interior de la hipófisis y en distintos tejidos, entre los que destacan la pared endotelial, los fibrocitos, el tejido cartilaginoso, las neuronas y en la retina (*Clapp-C., et al 2015*). La vaso inhibina endógena expone la capacidad de proteasas extra hipofisarias capaces de generarlas fuera de este tejido (*Moreno-Páramo D., et al. 2007*).

Dentro del grupo de enzimas encargadas de la conversión proteolítica de PRL a vaso inhibinas destacan las metaloproteasas de matriz (MMP) siendo los tipos 1, 2, 3, 8, 9 y 13 los más importantes (*Kowluru-RA., 2012*), la catepsina D, la proteína morfogenética de hueso (BMP) y a la trombina (*Zamora., et al. 2021*). Estas proteasas seccionan a la PRL en distintas zonas próximas e interiores al asa que une a las α -hélices 3 y 4 de la proteína, obteniendo una gran cantidad de isoformas de las cuales, su masa molecular siempre dependerá del tipo enzima involucrada en su generación (*Clapp-C., et al. 2006*).

La vaso inhibina actúa específicamente sobre la pared vascular, disminuyendo su permeabilidad, crecimiento, desplazamiento y promoviendo la muerte del tejido tisular generado a partir de la hipoxia, interfiriendo de esta manera con la señalización del FCEV y de otras sustancias vasoactivas, bloqueando la señalización de la sintasa endotelial del óxido nítrico (SEON) y la posterior

generación de óxido nítrico endotelial (NO) (*González-C., et al. 2004, Garcia., et al. 2008*).

Considerando que la vaso inhibina resulta de la escisión proteolítica de la PRL, esta observación sugiere que los pacientes con concentraciones altas de PRL en sangre, pudieran contar con un agente protector frente a la manifestación y avance de la RD debido a la vaso inhibina (*Arnold-E., et al. 2010*). De hecho, la hiperprolactinemia promueve la generación de la vaso inhibina a través de proveer de más sustrato para las proteasas capaces de generarlas. Ratones hiperprolactinémicos que sobre expresan PRL en el hígado tienen niveles incrementados de vaso inhibina en la circulación (*Chang., et al. 2016*) y la inducción farmacológica de hiperprolactinemia resulta en niveles altos de vaso inhibina en la retina de ratas sanas (*Arnold., et al. 2010*) y diabéticas (*Adan-Castro., et al. 2022*).

2.6.1 Propiedades de la vaso inhibina

La vaso inhibina es parte de un grupo de agentes que inhiben la angiogénesis, los cuales surgen a partir de proteínas de una densidad más grande, tales como la angiostatina (derivado del plasminógeno) y la endostatina. La endostatina se deriva del colágeno XVIII, uno de los 28 tipos de colágenos descritos con funciones y localizaciones específicas dentro del organismo, perteneciendo éste y la isoforma XV, a la familia de las multiplexinas (*Herrera-Batista AJ., et al. 2017*). El plasminógeno, el colágeno XVIII y la PRL en su forma completa, no poseen acciones inhibitorias de la angiogénesis (*Clapp-C., et al. 2006, 2209*). La vaso inhibina es producida en órganos muy vascularizados (hipófisis anterior) pero también en órganos donde la vascularización es restringida (retina) o ausente (córnea, cartílago) (*Clapp-C., et al. 2006, 2009*). La vaso inhibina se ha identificado mediante Western blot por medio de su acoplamiento con anticuerpos monoclonales dirigidos sobre la región NH₂ terminal de la PRL, la cual es la región de la PRL que mantiene pese a su conversión a vaso inhibina (*Aranda-J., et al.*

2005) además de sus propiedades funcionales. La inyección intravítrea e intracorneal de anticuerpos anti-N-terminal de la PRL en modelos animales generó nuevos capilares en la retina (*Aranda-J., et al. 2005*) y en la esclerótica (*Dueñas., et al. 1999*) esto de manera consistente con el bloqueo de la angiogénesis por efecto de la vasoinhibina endógena presente en dichos órganos.

2.7 Hiperprolactinemia como tratamiento alternativo contra la RD

Las primeras observaciones a cerca de la relación entre la hipófisis respecto a la fisiología y patología de la RD fueron realizadas aproximadamente hace sesenta años (*Poulsen-JE., et al. 1953*) pues los reportes anteriores a cerca de su aportación específica a dicha complicación no eran evidentes (*Clapp-C., et al. 2008*).

En 1985 Mooradian y colaboradores (*Mooradian-A.D., et al. 1985*) descubrieron valores elevados de PRL sérica en un grupo de pacientes con DM que no podían ser atribuidos a medicamentos o causas asociadas al padecimiento. Estos pacientes presentaban valores de PRL elevados en comparación con un grupo de pacientes saludables control y, al estudiar de los subconjuntos de pacientes con DM, no se observó alguna discrepancia entre pacientes con o sin manifestaciones clínicas de RD. En un estudio distinto (*Harter-M., et al. 1976*) se observaron niveles séricos elevados de PRL en hombres con RD no proliferativa (RDNP) con respecto aquellos con RD proliferativa (RDP). En concordancia, en un estudio en el 2010 se reportó que un grupo de personas con RDP mostraban valores inferiores de PRL sérica, en relación con aquellos pacientes con DM sin RD (*Arnold., et al. 2010*). Es a partir de estas investigaciones donde nace la idea de que bajas concentraciones de PRL fueran responsables de la manifestación y desarrollo de la RD (*Triebel et al 2011*) así como la noción de que los fármacos capaces de elevar las concentraciones de PRL en la circulación podrían funcionar como una alternativa terapéutica frente a esta complicación. De hecho, la influencia benéfica de la hiperprolactinemia se apoya en los estudios preclínicos

donde la inducción farmacológica de hiperprolactinemia resulta en niveles altos de vaso-inhibina en la retina de ratas sanas (*Arnold., et al. 2010*) y diabéticas (*Adan-Castro., et al. 2022*) y se traduce en la disminución del aumento en la vasopermeabilidad de la retina derivada de la diabetes (*Arnold., et al. 2020; Adan-Castro., et al. 2022*).

2.8 Levosulpirida

La levosulpirida está clínicamente aprobada y disponible en diferentes países (Italia, España, Alemania, Bélgica, México, Corea del Sur, etc.) y se utiliza de manera general en dosis bajas (25–75 mg / día) como procinético para favorecer la motilidad y tránsito intestinal (*Guslandi-M. 1993. Lozano-R., et al. 2007*). Los trastornos generados por la dispepsia funcional si bien son habituales, usualmente no son de gravedad, y se distinguen por una mezcla de desórdenes sensoriales y motoras, frecuentemente relacionadas a circunstancias psicosociales como el estrés. Por otro lado, las alteraciones que involucran la motilidad digestiva (como el vaciamiento gástrico prolongada) son esporádicas pero de mayor gravedad, y suelen relacionarse con trastornos neurológicos y/o musculares del tracto digestivo (*Serra-J. 2010*).

Levosulpirida es el isómero de la sulpirida que desvía la luz polarizada hacia la izquierda, configuración le da una mayor afinidad por los receptores dopaminérgicos tipo 2 y por lo que tiene una mayor efectividad con dosis inferiores que la forma opuesta (sulpirida) (*Serra-J. 2010*).

El mecanismo de acción principal de la levosulpirida es la restricción de los receptores tipo 2 de la dopamina (D2) los cuales se encuentran en la musculatura lisa del tracto gastrointestinal, favoreciendo la labor del sistema dependiente de acetilcolina (*Kuchay-MS., et al. 2017*).

La levosulpirida tiene como efecto secundario la estimulación de la secreción hipofisiaria de la PRL y la consecuente hiperprolactinemia, a través del bloqueo de los receptores dopaminérgicos D2 adenohipofisarios, los cuales median el efecto inhibitorio de la dopamina hipotalámica sobre la síntesis y liberación de esta hormona a la circulación (*Singh., et al. 2015*). Entre los efectos adversos más frecuentes de la hiperprolactinemia destacan la presencia de crecimiento mamario (ginecomastia), la galactorrea, la reducción de la libido y la amenorrea. Efectos adversos de la levosulpirida, no dependientes de PRL, incluyen acciones neurolépticas como la somnolencia y la sedación, que dependen de dosis altas (≥ 400 mg diarios) mayores a las utilizadas (75 mg diarios) en su tratamiento como procinético (*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 que la glándula pituitaria se encuentra fuera de la barrera hematoencefálica, por lo que bajas dosis de levosulpirida (25 mg/8 horas.) son suficientes para elevar los niveles de PRL sérica (*Kuchay-MS., et al. 2017*), la cual es la dosis utilizada en el desarrollo de este estudio.

Además de su alta efectividad inhibitoria sobre los receptores dopaminérgicos tipo 2, la levosulpirida es capaz de estimular a los receptores tipo 4 de la serotonina (5HT₄) ubicados en las terminaciones presinápticas de las neuronas colinérgicas del plexo mesentérico. La estimulación de estos receptores aumenta la concentración de acetilcolina, la cual facilita la actividad motora y el vaciamiento gástrico (*González-JC. 2007*). Estudios clínicos estrictos han reportado que la terapia con levosulpirida estimula el descargo gástrico y biliar, además de ser mejor al placebo al mejorar la sintomatología epigástrica (mareo, vómitos, dolor y ardor estomacal) en sujetos con síntomas recurrentes de indigestión y con vaciamiento gástrico prolongado.

La duración del tratamiento con levosulpirida en diversos estudios (así como en la clínica) varía desde 1 semana, hasta más de 2 años (*Andrade-C. 2013*). Respecto a otros efectos adversos derivados al uso de procinéticos respecto a la terapia con

levosulpirida, la frecuencia cardíaca y el electrocardiograma no son alterados durante su uso (Guslandi-M. 1993) y la sedación es rara (Lozano-R., et al. 2007).

Se ha determinado la tolerancia de levosulpirida en más de 1,300 pacientes en diversas investigaciones clínicas (*Serra-J. 2010*) donde se reportan efectos adversos de un 11–13%, aunque solamente ha sido necesario suspender la terapia en menos del 1% de los pacientes (*Corazza-GR., et al. 2000*). Un estudio multicéntrico, doble ciego, ensayo controlado con placebo de 408 sujetos dispépticos los cuales recibieron levosulpirida oral (25 mg TID durante 4 semanas) la incidencia total de los trastornos relacionados con hiperprolactinemia fue del 7% en mujeres (*Corazza-GR., et al 1996*). Más recientemente, en un estudio que incluía 342 mujeres y hombres dispépticos (utilizando el mismo tratamiento con levosulpirida) 40 pacientes (11%) informaron efectos adversos (26.7% galactorrea, 17.8% somnolencia, 11% de fatiga y 11,5% de dolor de cabeza). Ninguno de los pacientes reclutados renunció al tratamiento por efectos secundarios (Lozano-R., et al. 2007).

III. HIPÓTESIS

El incremento de la PRL circulante derivada de la terapia oral con levosulpirida, aumenta la concentración intravítrea de PRL y vasoinhibina, disminuyendo la progresión del EMD.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar si la hiperprolactinemia inducida mediante levosulpirida eleva los niveles intravítreos de PRL y vasoinhibina en pacientes con RD sometidos a vitrectomía y mejora la agudeza visual, disminuye el grosor foveal y el volumen macular en pacientes con EMD.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Comparar efectos del tratamiento con levosulpirida o placebo durante 1 semana previa a una vitrectomía indicada médicamente como parte de su tratamiento sobre:
 - A. Las concentraciones séricas e intravítreas de PRL (ELISA)
 - B. Las concentraciones intravítreas de vasoinhibina (Western blot y bioensayo)

- 2) Comparar efectos del tratamiento con levosulpirida y placebo en los pacientes con EMD sobre:
 - A. Las variaciones en la capacidad visual determinada mediante los optotipos ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study).
 - B. Las modificaciones en el grosor foveal y el volumen macular por medio tomografía de coherencia óptica (OCT).
 - C. El índice de apreciación global de los cambios en los parámetros oftalmológicos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio clínico prospectivo, randomizado, doblemente enmascarado, controlado en sujetos voluntarios (hombres y mujeres) con DM2 y RD a ser sometidos a vitrectomía y tratados oralmente con placebo (grupo 1) o levosulpirida (25 mg) (grupo 2) tres veces al día durante los 7 días previos a la vitrectomía; y en pacientes con EMD e involucro foveal tratados con placebo vía oral (grupo 3) o levosulpirida (25 mg) (grupo 4) tres veces al día durante 8 semanas.

Como criterios de inclusión para los 4 grupos se establecieron:

- a) Edad (entre 40 a 69 años),
- b) Ausencia de hiperprolactinemia (PRL sérica, >20 ng/mL), daño hepático (transaminasa glutámico-pirúvica (>50 U/L) y una tasa de filtración glomerular mayor a 30 mL/min (Tabla 1).

El estudio fue realizado en las instalaciones del Instituto Mexicano de Oftalmología (IMO) I.A.P., con sede en la ciudad de Querétaro, respetando los procedimientos estándar de atención médica y respetando los principios bioéticos de la Declaración de Helsinki y de la Ley General de Salud, así como su Reglamento en materia de Investigación en Humanos. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del IMO. El protocolo clínico se encuentra publicado (*Robles Osorio-ML., et al. 2018*) y contó con el apoyo del CONACYT (proyectos 247164, 289568) y la UNAM (405PC).

Tabla 1. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación establecidos para este estudio.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
Pacientes con DM2	Pacientes con características de alto riesgo (catarata, rubeosis, glaucoma)	Que decida abandonar el estudio
Edad entre 40-69 años	Hiperprolactinemia (>20 ng/mL)	Que presente algún efecto adverso al medicamento
Que presenten RDNP	Tasa de filtración glomerular <30 ml/min.	Aumento en el avance de la RD
Con RDP y prescripción de vitrectomía	Hipotiroidismo (TSH >4.5 μ UI/mL.)	Que sea inconstante y/o abandone el tratamiento
Con EMD con involucro foveal >300 μ m	Enfermedad hepática (TGP >32 U/L)	
Sin tratamiento previo de antiangiogénicos o láser		
PRL sérica normal (\leq 20 ng/mL)		
Tasa de filtración glomerular >30 ml/min.		

5.1 Formación de los grupos de estudio

Una vez verificado que el sujeto cumplía con requerimientos clínicos de admisión se obtuvo su consentimiento informado, se midió su antropometría y se obtuvo una muestra de sanguínea (aproximadamente 10 ml) para estudios de laboratorio, esto con el propósito de detectar alguna complicación que pudiera interferir en la permanencia en el estudio, o que pudiera dificultar la interpretación de los

resultados de la terapia con levosulpirida, como el aumento previo en los niveles séricos de PRL (PRL \geq 20ng/ml) y daño renal severo (tasa de filtración glomerular $<$ 30 ml/min).

Cada sujeto fue sometido a exámenes de evaluación visual en el IMO para conocer su progresión de RDP y EMD, como agudeza visual, oftalmoscopia indirecta, tomografía de coherencia óptica y fluorangiografía. Todos estos estudios fueron realizados por optometristas y especialistas retinólogos empleando los parámetros mundiales establecidos.

Tabla 2. Grupos de pacientes que se incluyeron en el estudio.

Grupo	No. de participantes	Tratamiento	Tiempo de tratamiento
1	19 pacientes	Placebo	7 días previos a vitrectomía
2	18 pacientes	Levosulpirida	7 días previos a vitrectomía
3	18 pacientes	Placebo	8 semanas
4	19 pacientes	Levosulpirida	8 semanas

5.2 Seguimiento

A cada sujeto incluido en los grupos 1 y 3 del estudio se les suministraron comprimidos de placebo (almidón) y para los grupos 2 y 4 levosulpirida (25 mg; Dislep®, laboratorio Ferrer) que corresponden a la terapia de 7 días (grupos 1 y 2) o dos meses (grupos 3 y 4), esto con la finalidad de que los pacientes estuvieran bajo tratamiento al momento de la vitrectomía (grupos 1 y 2) o bien durante las revisiones médicas llevadas a cabo cada 2 semanas. Los pacientes de los grupos sometidos a vitrectomía solo fueron valorados (niveles de PRL y parámetros de

función renal y hepática; parámetros oftalmológicos) antes de ser incorporados al protocolo. Durante cada visita se aplicó un cuestionario respecto la existencia de sintomatología relacionada con los probables efectos adversos del tratamiento y su apego al mismo (cumplimiento con la ingesta del fármaco) el cual debía encontrarse arriba del 95%, tomando en cuenta la cantidad de pastillas devueltas y las concentraciones séricas de PRL (esto último en los pacientes tratados con levosulpirida). También se tomó una nueva muestra de sangre para determinar sus niveles séricos de PRL, glucosa y creatinina, así como todos los estudios oftalmológicos anteriormente mencionados, mismos que fueron evaluados por un médico especialista en retina cegado al tratamiento del protocolo.

Tabla 3. Determinaciones bioquímicas y oftalmológicas realizadas a los pacientes (grupos 3 y 4).

	Semanas				
	Inicio	2	4	6	8
Glucosa	X	X	X	X	X
Prolactina	X	X	X	X	X
Creatinina	X	X	X	X	X
Hemoglobina glucosilada (HbA1c)	X				X
Hormona estimulante de la tiroides (TSH)	X				
Alanina aminotransferasa (TGP)	X				
Agudeza Visual	X	X	X	X	X
Tomografía óptica de coherencia (OCT)	X	X	X	X	X
Fotos del fondo del ojo	X	X	X	X	X
Fluorangiografía	X				X

5.3 Mediciones y análisis

Tamaño de muestra. Se calculó de acuerdo con las diferencias esperadas en la agudeza visual (principal parámetro de función visual) usando la fórmula para las diferencias de promedios en cuanto a los cambios en la agudeza visual (*Chow-S.*,

et al. 2008, Wells-JA., et al. 2016). Se consideró una diferencia de 10 letras en la prueba de la cartilla de ETDRS antes de iniciar el tratamiento y al concluir el mismo, una desviación estándar de 10, una potencia $1 - \beta = 80\%$ y una tasa de error tipo I del 5%, dando como resultado 12 pacientes para cada grupo de estudio. Sin embargo, este número fue ampliado a 19 con el fin de apreciar mejor las diferencias estadísticas. Para resultados de nivel de PRL y vasoinhibinas, el tamaño de la muestra fue acorde con los modelos experimentales de DR y la experiencia en protocolos clínicos (*Triebel-J., et al. 2011*).

Cambios en el EMD. En los grupos 3 y 4 del estudio se evaluaron los cambios en la agudeza visual por medio de la clasificación propuesta por el Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) (*Bailey & Lovie. 1976*). El grosor de la fóvea ($\geq 300 \mu\text{m}$) (*Willman-G., et al. 2017*), el volumen de la mácula y la imagen de la retina se evaluaron por medio de tomografía de coherencia óptica (OCT), de acuerdo con los valores reportados de forma estándar en cada estudio realizado.

Índice de progresión global del EMD. Un parámetro común de estudios clínicos oftalmológicos es contar con la evaluación ciega por parte de especialistas en retina, la cual consiste en comparar los datos previos al tratamiento con aquellos obtenidos al final del tratamiento. Esta evaluación fue llevada a cabo por 5 oftalmólogos con especialidad en retina y se basó en los parámetros antes mencionados (agudeza visual, grosor foveal, volumen macular, imagen macular). La evaluación se expresó en una escala que inicia en -4 como un empeoramiento grave, 0 que denotaría una falta de cambio y +4, máxima calificación que correspondería a un mejoramiento óptimo.

Parámetros bioquímicos. Se cuantificó a la PRL en el suero y en el vítreo (grupos 1 y 2) y la PRL y a la hormona estimulante de la tiroides (TSH) séricas (grupos 3 y 4) mediante inmunoensayo (ELISA) revelado por quimioluminiscencia; la creatinina se determinó

por el método de Jaffé modificado; y la glucosa y la alanina-aminotransferasa (TGP) por química seca.

Por último, se determinó en la sangre total la hemoglobina glicosilada (HbA1c) por el método de afinidad del boronato. Es de importancia aclarar que, si bien el estándar de oro para la cuantificación de la hemoglobina glicosilada es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), esta tiene como desventaja el tiempo en la obtención de los resultados y el costo del procedimiento, por lo que en este estudio optamos por una prueba rápida que, como ya se mencionó, se basa en la afinidad del boronato.

En la actualidad, se cuenta con varios sistemas de detección de hemoglobina A1c, pero no existen suficientes estudios que comparen sus resultados con un método de referencia que evalúe su precisión. Sin embargo, aquellos que tienen como fundamento la afinidad por el boronato, muestran una mayor concordancia al compararlos con los procedimientos de referencia establecidos. Además de que estos sistemas rápidos ya se encuentran comercializados, y en su manual de instrucciones aseguran cumplir los estándares de calidad. Si a esto sumamos un control de calidad interno y externo por parte del laboratorio, podemos asegurar en la confiabilidad de los resultados obtenidos (*Torregrosa-ME., et al. 2015*).

Todas las evaluaciones se realizaron en Laboratorios GOCA (Ignacio Pérez 31 sur, 76000 Querétaro, QRO) registrando los coeficientes de variación para las pruebas anteriores, así como su evaluación en el control de calidad externo por parte del Programa

de Aseguramiento de la Calidad para los Laboratorios (PACAL) en la tabla 4.

Tabla 4. Control de calidad interno y externo en las pruebas de interés.

Prueba	Control de calidad interno	Control de calidad externo (PACAL)	
	Coefficiente de variación	Puntuación	Evaluación
Glucosa	1.26 %	28	Excelente
Prolactina	3.06 %	28	Excelente
Creatinina	2.22 %	20	Excelente
TSH	3.65 %	36	Excelente
TGP	3.16 %	33	Excelente
HbA1c	1.82 %	-	-

5.4 Evaluación de los niveles de vasoinhibina en el vítreo (grupos 1 y 2)

5.4.1 Western blot

La técnica por inmunoprecipitación Western Blot (IP-Wb) analizó los niveles de vasoinhibina en el vítreo. Por la noche se inmunoprecipitaron 200 µL de vítreo con 2 µL de anticuerpos policlonales anti-PRL humano (anti-hPRL-IC5, suministrado por los Institutos de Salud de EUA) seguidos de una incubación de 2 horas con proteína A unida a microesferas de sefarosa. La muestra se centrifugó, lavó, y el precipitado final se sometió a electroforesis de gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE, 15% de acrilamida). Las proteínas inmunoprecipitadas se transfirieron a nitrocelulosa y se incubaron a 4°C en una dilución 1:500 de un antisero anti-PRL humana (HC1) el cual fue caracterizado previamente (*Corbacho-AM., et al. 2000*). Para la reacción, se reveló con anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina y un kit colorimétrico.

5.4.2 Bioensayo de proliferación de células endoteliales

La presencia de vasoinhibina en el vítreo se valoró también en función de sus propiedades antiangiogénicas sobre cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), estimuladas a proliferar mediante la adición del FCEV y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (FCBF) en presencia o ausencia

del vítreo de pacientes con PDR tratados con levosulpirida o con placebo.

Con la finalidad de investigar si la vasoinhibina es responsable del efecto antiangiogénico del vítreo de los pacientes tratados con levosulpirida, se utilizó un antisuero anti-PRL (HC1) que se sabe neutraliza la acción de la vasoinhibina (González-C., *et al.* 2007). En estos experimentos se utilizaron como controles vasoinhibina (control positivo) y PRL (control negativo) recombinantes.

5.5 Aleatorización de tratamientos

El tratamiento destinado a cada paciente fue establecido con la ayuda de una tabla de aleatorización elaborada en: <http://www.alazar.info/generador-de-datos-aleatorios>. Los pacientes que participaron, así como los oftalmólogos involucrados en el proyecto fueron ciegos al tratamiento (placebo o levosulpirida).

5.6 Análisis estadístico

Los resultados en el caso de las variables continuas se expresaron como promedios \pm desviación estándar (evaluación de características clínicas y demográficas) y error estándar (niveles séricos y vítreos de la hormona PRL, y análisis de diferencias entre agudeza visual, volumen macular y grosor foveal). Las diferencias entre los dos grupos de tratamiento (placebo y levosulpirida) se determinaron mediante la prueba t de Student y las comparaciones entre varios grupos mediante ANOVA de una vía seguida, de las pruebas post hoc Bonferroni o pruebas de Tukey. En el caso de las variables dicotómicas se expresan en porcentajes. Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de p fue <0.05 . Todo este análisis fue realizado utilizando el programa estadístico Graphpad Prism versión 9.0.

5.7 Aspectos bioéticos del estudio

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética en Investigación del IMO, se registró internacionalmente (ClinicalTrials.gov, ID: NCT03161652) y cumplió con los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki (WMA 2022, <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>) y de la Ley General de Salud, así como su reglamento en materia de Investigación, los cuales se encuentran mencionados en el título segundo “De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos” capítulo uno de este tratado “Disposiciones comunes”, comprendidos a partir del artículo 13 al artículo 27. Cada uno de los candidatos a participar en el estudio se les leyó y explicó el consentimiento informado, mismo que fue revisado y autorizado por el Comité de Bioética como lo dicta el reglamento.

VI. RESULTADOS

6.1 La levosulpirida incrementa la concentración vítrea de PRL en sujetos con RDP.

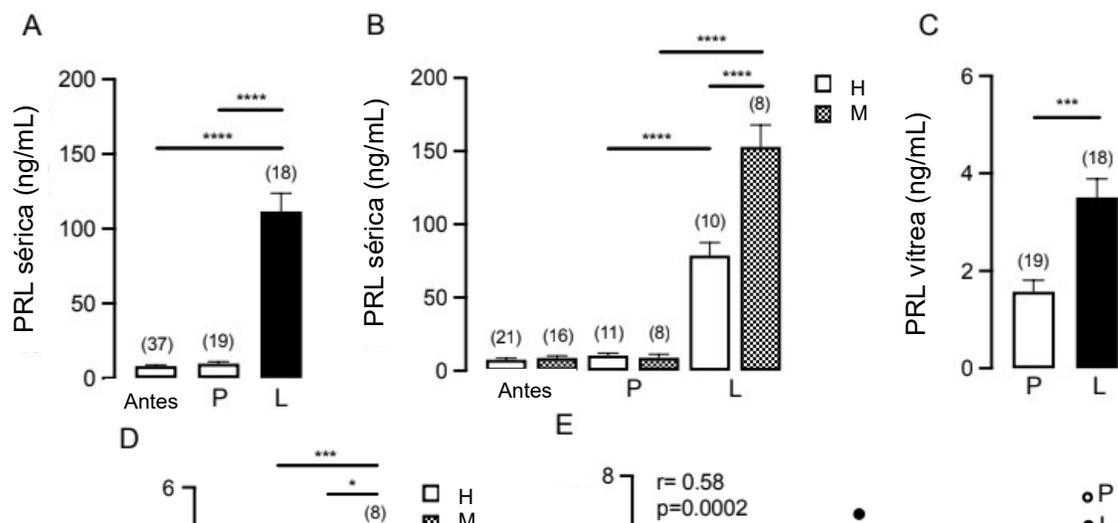
Un total de 37 pacientes (19 para el grupo tratado con placebo y 18 para el grupo tratado con levosulpirida) fueron sometidos a vitrectomía por presentar hemorragias vítreas o desprendimiento traccional de la retina.. Antes del tratamiento, ambos grupos fueron similares en edad, tiempo de diagnóstico de la diabetes (DM2 años), hemoglobina glucosilada (HbA1c), tasa de filtración glomerular (TFG) y niveles séricos de PRL (Tabla 5).

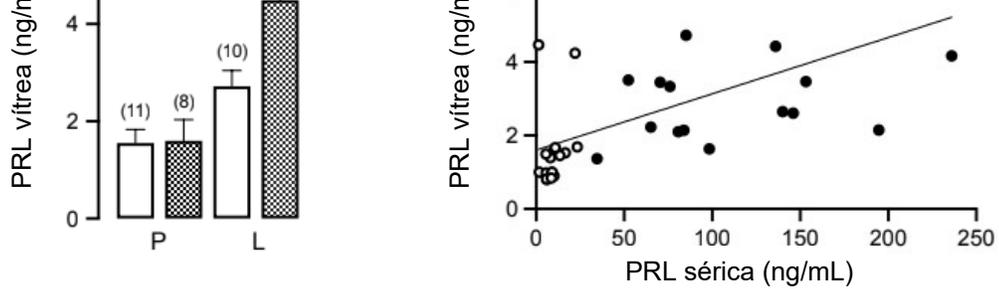
Tabla 5. Características clínicas y demográficas de los pacientes incluidos correspondientes a los grupos 1 y 2. Valores expresados en promedio \pm desviación estándar.

Previo al tratamiento			Posterior al tratamiento		
Placebo	Levosulpirida	<i>p</i>	Placebo	Levosulpirida	<i>p</i>

	(n=19)	(n=18)		(n=19)	(n=18)	
Edad (años)	56.58 ± 5.55	57.44 ± 7.45	0.69			
Sexo (fem) (%)	8 (42.1%)	9 (47.3%)	1.00			
DM2 (años)	17.53 ± 5.04	15.27 ± 6.75	0.25			
HbA1c (%)	7.50 ± 1.37	7.81 ± 1.69	0.54			
TFG (ml/min)	67.50 ± 28.4	73.80 ± 26.0	0.48			
PRL sérica (ng/mL)	6.89 ± 3.57	9.26 ± 6.02	0.153	9.79 ± 5.78	111.7 ± 51.03	<0.0001

Los niveles séricos y vítreos de la PRL en los grupos 1 y 2 del protocolo se muestran en la Figura 1. La PRL circulante aumentó en el 100% de los pacientes que recibieron levosulpirida, elevándose más de once veces en relación con aquellos pacientes que recibieron placebo (101 ± 13.0 vs 9.2 ± 1.3 ng/mL, $p < 0.0001$; Figura 1A). La hiperprolactinemia inducida por el tratamiento con levosulpirida fue superior en el sexo femenino que en el masculino (152.8 ± 14 vs. 78.7 ± 8.4 ng/mL; $p < 0.0001$, Figura 1B) y se tradujo en un aumento en los niveles de la hormona en el vítreo que fue el doble del observado bajo tratamiento con placebo (3.2 ± 0.4 vs 1.5 ± 0.2 ng/mL, $p < 0.001$; Figura 1C). El aumento en la PRL del vítreo inducido por la levosulpirida también se mostró superior en el sexo femenino que en el masculino (4.5 ± 0.3 vs 2.7 ± 0.3 ng/mL; Figura 1D), de manera consistente con las concentraciones séricas de PRL. De hecho, se observó una correlación directa entre los niveles en ambas concentraciones de suero y vítreo ($r = 0.58$, $p = 0.0002$, Figura 1E). Esta correlación sugiere que los niveles altos de PRL circulante favorecen la incorporación de la hormona al vítreo.





*Figura 1. Niveles de PRL en el suero, vítreo y su correlación entre sí. Niveles séricos de PRL antes y después del tratamiento con placebo (P) o levosulpirida (L) en todos los pacientes (A) y haciendo distinción entre los hombres (H) y mujeres (M) reclutados en el estudio (B). Niveles de PRL en el vítreo de todos los pacientes (C) y separando los valores nuevamente de acuerdo con el sexo de los pacientes reclutados (H y M) (D). Correlación entre los niveles de PRL en el suero y en el vítreo de todos los pacientes del estudio (E). Los resultados son promedios \pm ES. * $p < 0.02$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.*

Con el propósito de saber si la levosulpirida también eleva los niveles de vaso inhibina en el vítreo, investigamos la presencia de vaso inhibina en el vítreo de los pacientes tratados con placebo o con levosulpirida, mediante inmunoprecipitación-Western Blot (IP-WB) (Figura 2). Debido a que no se cuenta con anticuerpos que permitan discriminar entre la PRL y la vaso inhibina, la IP-WB es el único método que se tiene para la valoración independiente de ambas proteínas a través de separarlas por su tamaño (peso molecular). La inmunoprecipitación recuperó prácticamente toda la PRL y la vaso inhibina estándares adicionadas al amortiguador del ensayo tanto cuando el WB se reveló con anticuerpos anti-PRL policlonales (carriles 1-4, Figura 2A) y monoclonales (carriles 1 y 2, Figura 2B). Esto muestra la efectividad del método para valorar ambas proteínas. El vítreo de pacientes tratados con levosulpirida mostró una

mayor concentración de una proteína inmurreactiva de 23 kDa, comparada con el tratamiento con placebo. Esta proteína posee la masa molecular de la PRL y fue revelada tanto con anticuerpos anti-PRL policlonales como monoclonales, lo que apoya su naturaleza de PRL y confirma la elevación de esta hormona en el vítreo bajo tratamiento con levosulpirida. Los anticuerpos policlonales detectaron proteínas inmunorreactivas más pequeñas pero inespecíficas ya que también estuvieron presentes en ausencia del vítreo (Figura 2A, carriles 5, 7, 8) y no fueron detectadas por los anticuerpos monoclonales anti-PRL (Figura 2B, carriles 3, 5, 6). Estos resultados sugieren que este método no tuvo la sensibilidad suficiente para detectar a la vasoinhbina en el vítreo (el límite de detección del proceso en cuestión son 5 ng).

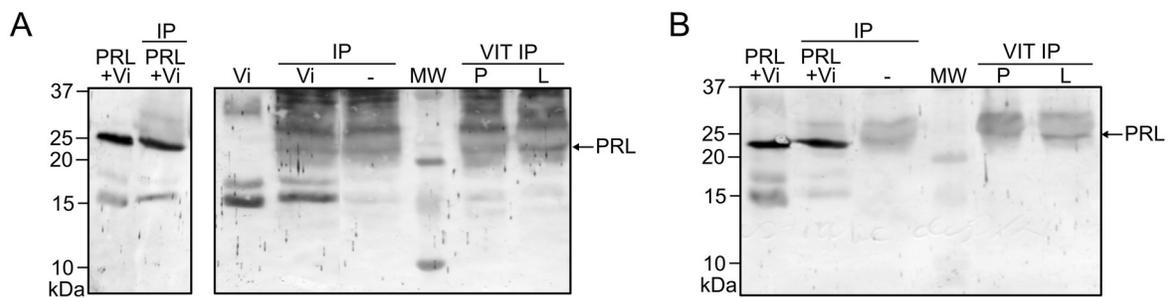
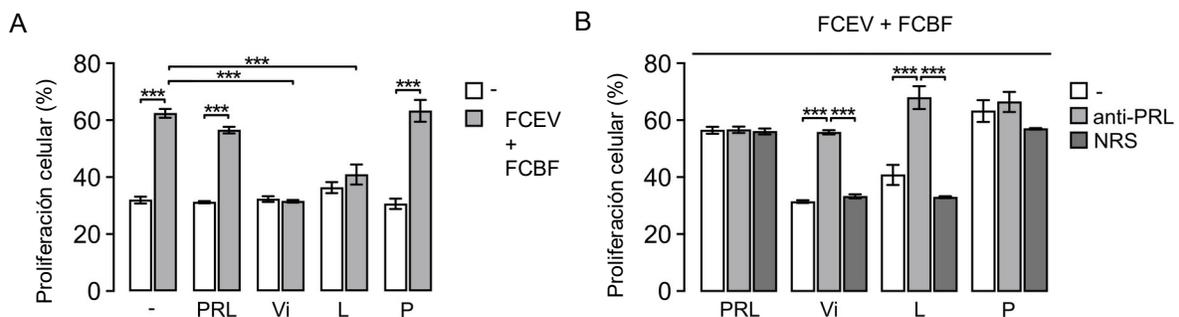


Figura 2. Inmunoprecipitación-Western blot (IP-WB) representativo de proteínas del vítreo de pacientes con RD tratados con placebo (P) o con levosulpirida (L) revelado con antisuero anti PRL humana (A) o anticuerpos monoclonales anti PRL humana (B). La combinación de estándares de PRL y vasoinhbina (PRL+Vi) o solo vasoinhbina (Vi) se adicionaron al amortiguador del ensayo para ser sometidas (IP) o no a la inmunoprecipitación. Los números en el lado izquierdo indican los pesos moleculares (MW) de proteínas marcadoras.

6.2 La levosulpirida incrementa la concentración de una vasoinhbina bioactiva en el vítreo de sujetos con RDP.

Dada la alta potencia de la vasoinhibina para inhibir la proliferación de células endoteliales en cultivo ($EC_{50}=1$ nM, 1.6 ng en el volumen del ensayo) se estimó que este bioensayo pudiera ser más sensible para detectar a la vasoinhibina en el vítreo. Así, se investigó si el vítreo de pacientes con RD tratados con levosulpirida contenía una proteína tipo-PRL capaz inhibir la proliferación de células endoteliales, que es un efecto bien conocido de la vasoinhibina (Figura 3). Células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) fueron estimuladas a proliferar con una combinación de FCEV+FCBF en ausencia o presencia de PRL (control negativo), vasoinhibina (control positivo), vítreo de pacientes tratados con levosulpirida o con placebo (Figura 3A). La proliferación se evaluó a través de la determinación de la síntesis de ADN con el análogo de timidina (EDU) (Robles-JP., et al. 2018). El efecto proliferativo del FCEV y FCBF se bloqueó con la vasoinhibina y el vítreo de pacientes tratados con levosulpirida, mientras que la PRL y el vítreo de pacientes tratados con placebo, no tuvo efecto (Figura 3A). La proliferación basal en ausencia de FCEV y FCBF no se modificó por PRL, vasoinhibina o los dos tipos de vítreos. Para determinar si la vasoinhibina endógena es responsable de la inhibición de la proliferación endotelial producida por el vítreo de pacientes tratados con levosulpirida, adicionamos un antisuero anti-PRL que se sabe, neutralizan el efecto antiangiogénico de la vasoinhibina (González-C., et al. 2007). El antisuero anti-PRL, pero no un suero normal de conejo (NRS), inhibió el efecto antiangiogénico del vítreo de pacientes tratados con levosulpirida (Figura 3B). Ninguno de los sueros modificó la falta de efecto de la PRL o de los vítreos de pacientes tratados con placebo. Estos resultados sugieren que la levosulpirida aumenta las propiedades antiangiogénicas del vitreo de pacientes con RD, a través de elevar la PRL intraocular y su conversión a vasoinhibina.



*Figura 3. Efecto del vítreo de pacientes con RD tratados con placebo (P) o levosulpirida (L) sobre la proliferación de células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) en cultivo. Las HUVEC se incubaron durante 24 horas en ausencia (-) o presencia de FCEV + FCBF solo o en combinación con PRL, vaso inhibina (Vi) o el vítreo de pacientes con DR tratados con P o L (A). HUVEC incubadas durante 24 horas con FCEV + FCBF con PRL, vaso inhibina (Vi) o el vítreo de pacientes con DR tratados con P o L en ausencia (-) o presencia de un antisuero anti PRL (anti-PRL) o suero normal de conejo (NRS). La proliferación se evaluó a través de la síntesis de DNA vía la incorporación del análogo de timidina (EDU) revelado mediante una reacción fluorescente. Los resultados se expresan como el promedio \pm ES de al menos 3 experimentos independientes y corresponden al porcentaje de células positivas a EDU vs el total de células en el campo. *** $P < 0.001$.*

6.3 La levosulpirida mejora parámetros oftalmológicos de pacientes con EMD.

Para llevar a cabo esta parte de la investigación, se reclutaron un total de 44 pacientes con EMD. Cabe aclarar en este apartado que sólo 7 de los 44 pacientes quedaron excluidos de la investigación al interrumpir el tratamiento, esto por no cumplir con el porcentaje de apego al mismo.

De estos 7 pacientes eliminados, 6 recibieron el tratamiento con levosulpirida. De estos últimos, 3 refirieron efectos adversos al tratamiento, de los cuales solo uno aludió malestar estomacal y dos somnolencia (esto entre las primeras dos y cuatro semanas de tratamiento). Sólo uno de los pacientes que refirió somnolencia decidió abandonar el estudio, mientras que los dos pacientes restantes continuaron el tratamiento, hasta cumplir las 8 semanas, sin reportar efectos adversos posteriores. Los 3 pacientes restantes que recibieron levosulpirida,

afirmaron interrumpir el tratamiento por cuestiones ajenas al mismo (infección por COVID-19, hospitalización por cuestiones relacionadas a su control metabólico y dificultad para trasladarse al instituto por cuestiones económicas o familiares), observando como resultado una disminución en sus niveles séricos de PRL. Sólo un paciente que recibió placebo refirió taquicardia y decidió abandonar el estudio. De esta manera, se incluyeron 37 pacientes, 18 que fueron tratados con placebo (grupo 3) y 19 con levosulpirida (grupo 4).

Antes de iniciar los tratamientos, ambos grupos fueron similares en sus características demográficas y clínicas, a saber: edad, sexo (prueba de Fisher), tiempo de diagnóstico de diabetes, concentraciones de hemoglobina glucosilada y glucosa, parámetros de función renal y PRL sérica (prueba *t* de Student). Al finalizar las 8 semanas de tratamiento, el único parámetro alterado fue la concentración de PRL que como se esperaba, se elevó significativamente sobre el nivel basal por efecto de la levosulpirida (Tabla 6).

Tabla 6. Características clínicas y demográficas de los grupos con EMD sometidos al tratamiento con placebo o levosulpirida.

	Previo al tratamiento			Posterior al tratamiento		
	Placebo (n=18)	Levosulpirida (n=19)	<i>p</i>	Placebo (n=18)	Levosulpirida (n=19)	<i>p</i>
Edad (años)	61.4 ± 7.35	59.3 ± 6.88	0.36			
Sexo Fem (%)	5 (27.8%)	9 (47.4%)	0.31			
DM2 (años)	15.9 ± 7.78	18 ± 13.1	0.56			
HbA1c (%)	8.6 ± 1.6	8.2 ± 1.8	0.43	8.1 ± 1.8	7.9 ± 1.7	0.63
Glucosa (mg/dL)	182.3 ± 69.0	192.5 ± 116.4	0.82	158.3 ± 93.4	188.2 ± 87.9	0.25
Creatinina (mg/dL)	1.1 ± 0.32	1.2 ± 0.42	0.62	1.2 ± 0.29	1.3 ± 0.52	0.93
TFG (mL/min)	64.3 ± 17.9	57.9 ± 17.5	0.28	61.3 ± 14.0	60.3 ± 26.7	0.89
Presión arterial (mmHg) Sistólica	149.9 ± 19.5	148.9 ± 20.9	0.78	146.3 ± 12.3	152.8 ± 19.9	0.50

Diastólica	83.7 ± 11.3	88.6 ± 16.4	0.29	87.2 ± 10.6	93.8 ± 13.7	0.11
Presión intraocular (mmHg)	13.5 ± 2.4	14.1 ± 2.9	0.41	14.5 ± 3.0	13.5 ± 3.1	0.31
PRL sérica (ng/ml)	7.0 ± 2.5	8.2 ± 3.6	0.28	7.5 ± 3.5	145.7 ± 106.6	0.0001

Valores expresados en promedio ± desviación estándar.

A continuación, se presentan los resultados de las evaluaciones correspondientes a la agudeza visual, el volumen macular y grosor foveal de los ojos en el estudio.

6.4 Agudeza visual (AV)

En la Figura 4 se muestra la evaluación de la agudeza visual a través de determinar el número de letras visualizadas por cada ojo con la cartilla de ETRS. Si bien existe una gran variabilidad en la percepción visual en los grupos de tratamiento, que imposibilita observar diferencias significativas entre ellos, el análisis entre la cantidad de letras ganadas o perdidas por cada ojo en estudio previo y posterior a las 8 semanas de tratamiento, demuestra una tendencia significativa a observar una mayor cantidad de letras por parte de los ojos de pacientes tratados con levosulpirida, en comparación con el grupo de ojos que fueron tratados con placebo, en el que tienden a percibir menos letras. Es importante mencionar que, con base en los resultados obtenidos en el grupo de pacientes tratados con levosulpirida (26 ojos), hay una mejora de <5 letras en el 56.7% y de >5 letras en el 42.3%, lo que sugiere que este tratamiento mejora la agudeza visual.

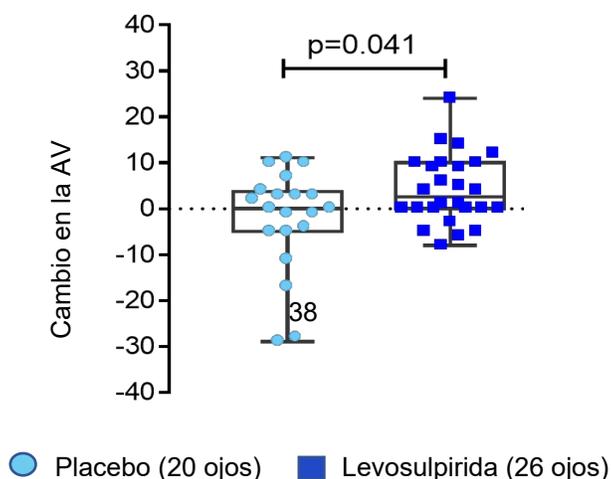


Figura 4. Comparación en la cantidad de letras percibidas por un mismo ojo previamente y posterior al tratamiento de 8 semanas con placebo o levosulpirida. Se grafican la mediana y la distribución de los valores para cada grupo.

6.5 Volumen macular (VM)

El volumen macular (expresado en mm^3) corresponde al área total de la mácula determinado mediante OCT. Este parámetro se analizó al inicio (semana 0) y final al tratamiento (semana 8), tal y como se indica en la Figura 5.

Al igual que con el parámetro de la agudeza visual, un análisis preliminar de los resultados del volumen macular, mostraba una alta variabilidad entre los pacientes de ambos grupos de estudio y no permitía observar diferencias significativas. Sin embargo, la diferencia del cambio en el volumen macular de un mismo ojo previamente y posterior al tratamiento, demostró una tendencia significativa a disminuir el volumen macular en ojos de pacientes tratados con levosulpirida, en comparación con los ojos de pacientes tratados con placebo, en el cual tienden a elevar sus valores. Resultados que sugieren una mejora estructural en cuanto al edema de la mácula por efecto de la levosulpirida (Figura 5).

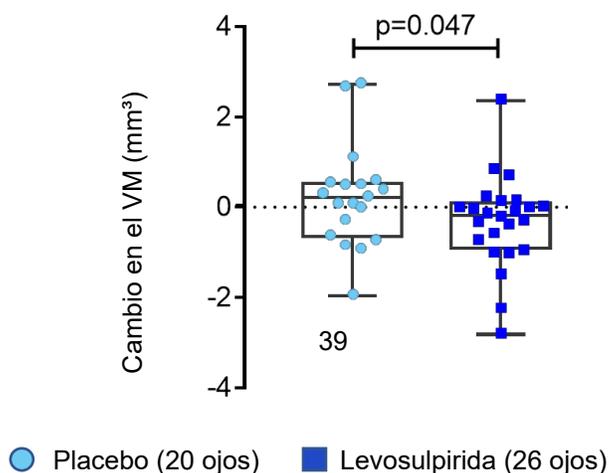


Figura 5. Diferencia entre el volumen macular (VM) (mm^3) de un mismo ojo antes y después de las 8 semanas del tratamiento. Se grafican la mediana y el rango de los valores para cada uno de los ojos en estudio.

6.6 Grosor foveal (GF)

La Figura 6 compara el grosor foveal (expresado en micras) determinado mediante OCT. Nuevamente, la variabilidad entre los grupos de estudio (placebo y levosulpirida) respecto al grosor foveal es alta y no permite mostrar diferencias significativas cuando se comparan sus promedios. Sin embargo, al realizar el análisis entre la diferencia de micras por cada ojo en estudio, de acuerdo con el tratamiento recibido por el paciente, antes y después del tratamiento, mostró una dispersión mayor hacia fóveas más gruesas en ojos de pacientes tratados con placebo y fóveas más delgadas en ojos de pacientes tratados con levosulpirida, lo cual es consistente con una mejora en la estructura de la mácula por efecto de la levosulpirida.

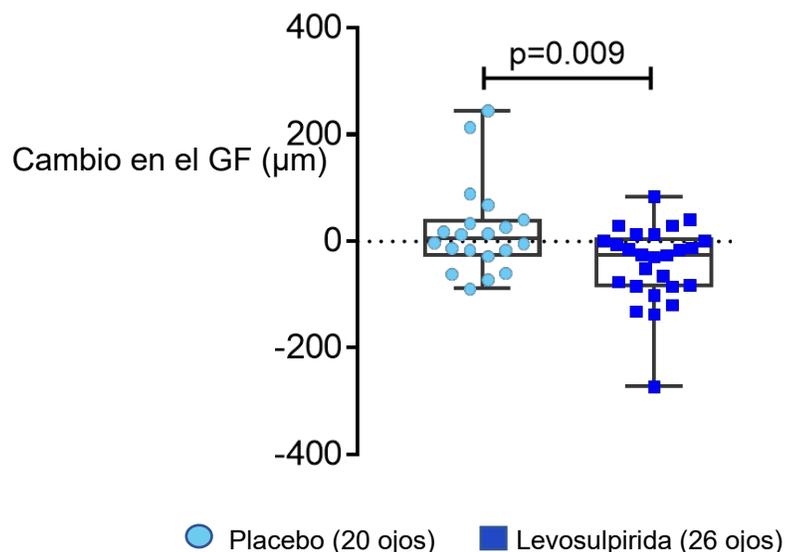
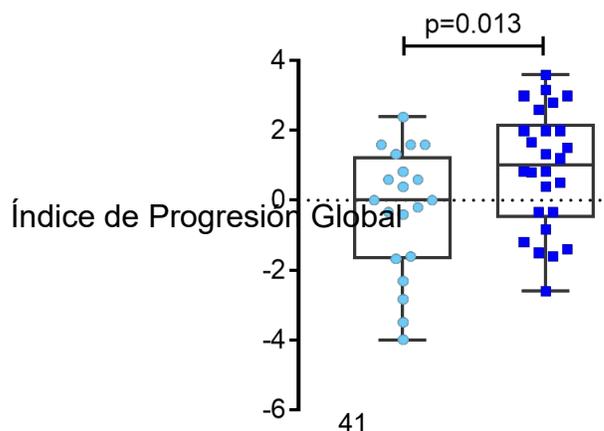


Figura 6. Comparación de la diferencia antes y después de ambos grupos (placebo y levosulpirida) del cambio en el grosor de la fovea (GF) de un mismo ojo a las 8 semanas del tratamiento. Se grafican la mediana y el rango de los valores para cada uno de los ojos en estudio.

6.7 Índice de apreciación de la progresión del EMD realizado por oftalmólogos con especialidad en retina

En la figura 7 se muestran graficadas las evaluaciones llevadas a cabo por oftalmólogos especializados en retina, quienes compararon el cambio en los parámetros oftalmológicos. Esta evaluación es muy común en estudios de carácter clínico-oftalmológico y ayuda a conocer la eficacia de cualquier tratamiento con base en el criterio de distintos especialistas del área clínica. Para esta evaluación se compararon simultáneamente los valores de agudeza visual, las imágenes por OCT de la mácula, el grosor foveal, el volumen macular, el fondo de ojo y la fluoroangiografía de cada ojo, antes y después de las 8 semanas del tratamiento.

El promedio de las 5 valoraciones expertas indicó una distribución hacia calificaciones más altas para los ojos de pacientes tratados con levosulpirida, en comparación con aquellos que recibieron el tratamiento con placebo, lo que implica que todos los parámetros oftalmológicos mejoran bajo levosulpirida y tienden a empeorar bajo placebo.



● Placebo (20 ojos) ■ Levosulpirida (26 ojos)

Figura 7. Evaluación global del cambio en los parámetros oftalmológicos por parte de 5 especialistas en retina respecto al desempeño del tratamiento con levosulpirida contra la progresión del EMD. Se grafican la mediana y el rango de los valores alcanzados en cada grupo. Dentro de las barras se indica el número de ojos evaluados.

VII. DISCUSIÓN

La DM2 es uno de los padecimientos crónicos de mayor importancia en la actualidad, de la cual se estima que la población de pacientes que sufren de esta condición se encuentra superando los 350 millones en todo el mundo (OMS 2022).

Como parte de las complicaciones propias de esta enfermedad se encuentra la RD, la cual es la principal causa de pérdida de la visión en adultos en edad laboral en países en desarrollo y, el EMD (una manifestación asociada a la RD) la causa más importante de la pérdida de visión en personas con diabetes.

Las alternativas terapéuticas actuales con las cuales se cuenta para disminuir el desarrollo de la RD y el EMD, como fotocoagulación con láser de la retina y la terapia antiangiogénica, son invasivos, dolorosos, no siempre efectivos, de baja disponibilidad y de alto costo (Boyer-DS., et al. 2013, Gupta-A., et al 2018, Sun-JK., & Jampol-LM. 2019). Además, la viabilidad de proporcionar estas terapias de manera oportuna, de fácil disponibilidad y económica es desafiante,

particularmente en los países en desarrollo (*Wentzel-A. & Mchiza-ZJ. 2021. Bascaran-C., et al. 2021*), por lo que es de principal interés encontrar una alternativa terapéutica mejor.

Nuestra propuesta se basa en el aumento de la hormona PRL con la ayuda del procinético levosulpirida.

Estudios previos en modelos animales demuestran que el incremento en la concentración de la PRL sistémica disminuye la RD mediante la conversión intraocular a vasoinhibina, un conjunto de segmentos de PRL con propiedades en contra de la excesiva vasopermeabilidad y proliferación vascular determinantes del EMD y la RD, respectivamente (*Arnold et al., 2010, Chang., et al. 2016, Adan-Castro., et al. 2022*). En este trabajo demostramos que el incremento en la concentración sistémica de PRL por medio de la terapia con levosulpirida aumentan los niveles de PRL y de vasoinhibina bioactiva en el vítreo de pacientes con RD. Además, y de forma consistente con la posibilidad de que el aumento en la vasoinhibina intraocular inhibe alteraciones vasculares retinianas, encontramos que el tratamiento con levosulpirida mejora parámetros oftalmológicos en pacientes con EMD. Estos hallazgos sostienen que la terapia con levosulpirida puede tener un potencial importante frente a la manifestación y desarrollo del EMD.

Los grupos de pacientes del estudio no mostraron diferencias significativas respecto a características demográficas (edad, sexo, tiempo de diagnóstico de DM2) y clínicas (control metabólico, función renal o hepática). Respecto a las concentraciones séricas de PRL no hubo diferencias importantes en los niveles basales de la hormona previos al tratamiento. Se sabe que las concentraciones séricas de la PRL son semejantes entre sujetos sanos de ambos sexos, pero mientras que en mujeres la concentración de PRL sérica decrementa con el avance del tiempo (entre los 45 y 65 años) en hombres se eleva de manera sutil con el avance la edad (*Vekemans-M., Robyn-C. 1975*) sin embargo, nosotros no

logramos observar tal diferencia. Existen investigaciones donde se ha mencionado un probable vínculo respecto a los años que cursa un paciente con diabetes y un decremento en las concentraciones sistémicas de PRL (*Harter-M., et al. 1976. Moradian-A.D., et al. 1985; Arnold-E., et al. 2010*). Por su parte, otras investigaciones de carácter poblacional sugieren un probable vínculo entre concentraciones disminuidas de PRL y la manifestación de factores de riesgo frente al desarrollo de DM2 (*Wang-T., et al. 2013, Balbach-L., et al. 2013*).

La levosulpirida resalta del resto de antagonistas dopaminérgicos por su eficiencia en incrementar a la PRL sistémica y mejorar la motilidad gastrointestinal. Estudios comparativos aleatorizados, doble ciego, que comparan los efectos de levosulpirida frente a otras alternativas farmacéuticas antagonistas de la dopamina como domperidona o metoclopramida, los cuales han mostrado que levosulpirida pudiera disponer de un efecto terapéutico mayor en la disminución de la sintomatología de la dispepsia y su rapidez para alcanzar esta sensación (*Hasler-WL., et al. 2007*). La levosulpirida induce hiperprolactinemia al interferir con la restricción hipotalámica sobre los lactotrofos ubicados en la adenohipófisis, aumentando de esta manera la liberación de PRL al torrente sanguíneo (*Singh., et al. 2015*). Debido a un aumento en su uso como procinético, se tienen más reportes acerca de sujetos que incrementan sus niveles de PRL séricos como un efecto adverso propio de este tratamiento. La eficacia para generar hiperprolactinemia parece ser más acentuada en la terapia con levosulpirida en comparación con la de otros fármacos procinéticos (*Kuchay-MS., et al. 2017*), cualidad por la que le utilizó como intervención para elevar las concentraciones séricas de PRL en nuestros sujetos de estudio que cursan con DM2 y RD

Como suponíamos, la terapia con levosulpirida incrementó las concentraciones séricas de PRL por encima de 100 ng/mL y la elevación se presentó en el 100% de los pacientes a quienes se les administró la levosulpirida. El nivel del efecto coincide con valores reportados que incluso llegan a superar los 200 ng/mL (*Kuchay-MS., et al. 2017*). También, como ya se conoce (*Andrade-C. 2013*).

Kuchay-MS., et al. 2017, Nunez-Amaro CD., et al. 2020), la hiperprolactinemia inducida por levosulpirida fue más pronunciada en el sexo femenino que en su contraparte masculina. Al respecto, se ha propuesto que esta diferencia se debe a que en las mujeres existe un tono dopaminérgico inhibitorio más intenso respecto a la liberación de PRL, por lo que su bloqueo resulta en un incremento más elevado de PRL circulante respecto a los hombres (*Manzanares-J., et al. 1992*).

El aumento de las concentraciones séricas de PRL generada con el uso de levosulpirida elevó a más del doble las concentraciones intraoculares de esta hormona. Esta es la primera demostración de que la PRL está presente en el vítreo humano y que la levosulpirida incrementa dichos niveles, además de una relación directa entre sus niveles circulantes y vítreos, lo que implica que la hiperprolactinemia inducida por levosulpirida favorece la incorporación intraocular de la PRL sistémica. Se ha mostrado que la PRL radioactiva inyectada sistémicamente se incorpora en tejidos oculares como la retina, la coroides y los cuerpos ciliares (*O'Steen-WK. 1982*). La incorporación puede ser mediada a través de su receptor, dado que se ha detectado al receptor de la PRL en elementos de la barrera hemato-retiniana (epitelio pigmentario) (*Meléndez-García R., et al. 2016*) y de la barrera hemato-ocular (cuerpos ciliares) (*Arnold-E., et al. 2010*). En apoyo a esta posibilidad, la PRL se incorpora al líquido cefalorraquídeo a través de sus receptores en el plexo coroideo (*Walsh-RJ., et al. 1987*) y la hiperprolactinemia inducida por domperidona (bloqueador de los receptores D2 de la dopamina) eleva los niveles de la PRL en el líquido cefalorraquídeo (*Felicio-LF., Bridges-RS. 1992*). Alternativamente, la ruptura de la barrera hemato-ocular en la RD (*Zhang-C., et al. 2014*) seguramente coadyuva a la incorporación intraocular de la PRL.

El efecto de la levosulpirida sobre el aumento de la PRL ocular fue mucho menor al observado en el suero, sin embargo, podría generar la suficiente vasoinhibina para frenar la progresión de la RD. Estudios en roedores han mostrado que la hiperprolactinemia resulta en el aumento en la concentración de vasoinhibina en la

retina, lo cual resulta en la tanto en la interrupción del efecto del FCEV como de la diabetes sobre la elevación en la permeabilidad de la retina (*Arnold-E., et al. 2010. Adan-Castro., et al. 2022*). De hecho, estos hallazgos incluyeron el efecto de la hiperprolactinemia inducida mediante levosulpirida (*Adan-Castro., et al. 2022*).

No se tiene un método cuantitativo para evaluar a la vasoinhibina, por lo que sus niveles endógenos se analizan semi cuantitativamente mediante IP-Wb (*González-C., et al. 2007*). Con este método confirmamos la elevación de la PRL intraocular en los sujetos tratados con levosulpirida, pero no pudimos detectar a la vasoinhibina. Este resultado negativo implica que, si la vasoinhibina está presente, sus niveles en este medio son inferiores al límite de detección de este ensayo. Efectivamente, el uso del bioensayo de la proliferación endotelial, donde concentraciones muy bajas (<5 ng) de vasoinhibina pueden ser detectadas (*Robles-JP., et al. 2022*), permitió mostrar la presencia de una vasoinhibina activa solamente en el vítreo de pacientes tratados con levosulpirida. Así, observamos que el vítreo de pacientes tratados con levosulpirida, pero no el de los tratados con placebo, se inhibió la proliferación de células endoteliales en cultivo inducida por factores angiogénicos (FCEV y FCBF), y este efecto se bloqueó con anticuerpos que inmunoneutralizan a la vasoinhibina. Estos hallazgos se apoyaron en controles donde la vasoinhibina, mas no la PRL, bloqueó el efecto proliferativo y este bloqueo desapareció en presencia de los anticuerpos neutralizantes.

En su conjunto, los hallazgos de esta primera sección del estudio nos permitieron concluir que la hiperprolactinemia inducida por levosulpirida resulta en la acumulación de vasoinhibina intraocular en sujetos que padecen RD, capaz de inhibir el desarrollo de vasos sanguíneos en la retina.

A continuación, la pregunta relevante fue si la vasoinhibina endógena producida por el tratamiento con levosulpirida puede limitar la progresión de la RD y del EMD. Al respecto, se tienen evidencias preclínicas que indican que la vasoinhibina es un inhibidor natural de la angiogénesis en la retina (*Aranda-J., et al. 2005*) y en

la córnea (*Dueñas-Z., et al. 1999*) de ratas adultas sanas y que participa en la regresión natural del sistema hialoideo fetal en ratas y humanos (*Dueñas-Z., et al. 2004*).

Para investigar si la levosulpirida es capaz de proteger contra el EMD en la clínica, llevamos a cabo un estudio conformado por pacientes con DM2 y EMD tratados oralmente con placebo o levosulpirida por 8 semanas, los cuales continuaron en su seguimiento convencional. En estos pacientes se evaluó la progresión del EMD a través de determinar la agudeza visual, el volumen macular y el grosor foveal antes y después del tratamiento. Además, se otorgó una calificación global al cambio de todos los parámetros por parte de especialistas en retina cegados al tratamiento. Cabe mencionar que los parámetros se reportaron por ojo y no por paciente dado que los dos ojos de una misma persona difieren en sus características fisiopatológicas. Además, solo en pocos casos los dos ojos de un mismo paciente se incluyeron en el estudio. Las razones de exclusión de los ojos en el estudio fueron: no presentar el padecimiento (EMD) o presentar alteraciones además de la RD tales como catarata, membrana epirretiniana, neovascularización y hemorragia vítrea, ya que estos padecimientos podrían interferir con la interpretación de los resultados respecto a la eficacia de nuestro tratamiento, específicamente en el parámetro de la agudeza visual.

La primera consideración que se desprende de este análisis es la alta variabilidad que presentaron los ojos en todos los parámetros oftalmológicos evaluados. A pesar de ello, fue claro que el análisis longitudinal de los cambios en un mismo ojo antes y después del tratamiento fue consistentemente indicativo de una mejora bajo el tratamiento con levosulpirida. La mejora fue significativa tanto en agudeza visual como en los parámetros estructurales de la mácula (grosor foveal y volumen macular) y se corroboró a través del consenso en las calificaciones globales otorgadas a dichos cambios. La coincidencia de todas las evaluaciones apoya fuertemente la potencialidad terapéutica de la levosulpirida contra la progresión del EDM.

La variabilidad observada entre los ojos de los pacientes es un resultado común por lo que el análisis longitudinal de un mismo ojo se utiliza convencionalmente en este tipo de estudios oftalmológicos (*Lee-CF., et al. 2012. Murdoch-IE., et al. 1998*). Resalta el hecho de que a pesar del número reducido de los ojos en estudio hayamos encontrado diferencias significativas.

Para valorar el significado de nuestros hallazgos los comparamos con un reporte previo utilizando la terapia convencional del EMD, a saber, terapia láser y administración intravítrea de un anticuerpo monoclonal anti-FCEV (ranibizumab) (*Gonzalez-VH., et al. 2016*). En este estudio, se analizan los datos del estudio Diabetic Retinopathy Clinical Research Network's Protocol I (*Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. Elman-MJ., et al. 2010*) donde se evalúa el efecto de Ranibizumab + terapia láser por 3 y 12 meses sobre el cambio longitudinal de la agudeza visual del mismo ojo antes y después del tratamiento. La población de análisis fue de 340 ojos y no se tiene un grupo placebo. A los 3 meses, se reporta una mejora de <5 letras en el 39.7% de los casos y una mejora de >5 letras en el resto de los ojos (60.3%). En nuestro estudio, observamos bajo tratamiento con levosulpirida (26 ojos) una mejora de <5 letras en el 56.7% y de >5 letras en el 42.3%. La comparación es muy limitada dada la gran discrepancia en los tamaños de ambas poblaciones y la diferencia en la duración de los estudios (3 vs 2 meses), pero permite apreciar que el tratamiento standard de oro (Ranibizumab + terapia láser) no es efectivo (al menos en el 40% de los casos) y nuestro estudio arroja resultados no muy distantes. Esto es relevante, particularmente si se considera que estamos aplicando un tratamiento oral y, por ende, menos invasivo que el convencional.

Es importante comentar sobre las propiedades y seguridad de la levosulpirida. Las dosis orales utilizadas en este estudio (75 mg diarios) son bajas y son recomendadas para su uso como procinético (*Guslandi-M. 1993*); sin embargo, a dosis altas (400-3200 mg diarios) se utiliza como antipsicótico (*Mauri-MC., et al.*

2018) ya que tiene poca capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (Kapur-S., et al. 2002). Dado que la adenohipófisis se encuentra fuera de la barrera hematoencefálica, las dosis bajas de levosulpirida elevan la PRL circulante (Kuchay-MS., et al. 2017). Como efectos secundarios alejados del aumento de PRL se encuentran principalmente anestesia, cansancio, adormecimiento, dolor de cabeza y efectos extrapiramidales como contracciones musculares y movimientos involuntarios, mientras que aquellos relacionados con el aumento de PRL se encuentran la anafrodisia, agrandamiento en las glándulas mamarias (hombres y mujeres) y secreción de leche (Ratnani-I., et al. 2015. Mauri-MC., et al. 1996. Wagstaff-AJ., et al. 1994). Respecto a nuestro estudio, solo tres pacientes refirieron efectos adversos al tratamiento durante 8 semanas de seguimiento; un paciente que refirió malestar estomacal y dos pacientes que refirieron somnolencia entre las primeras dos y cuatro semanas de tratamiento. De ellos, solo uno de los pacientes que refirió somnolencia decidió abandonar el estudio, mientras que los dos pacientes restantes continuaron el tratamiento hasta cumplir las 8 semanas sin reportar efectos adversos.

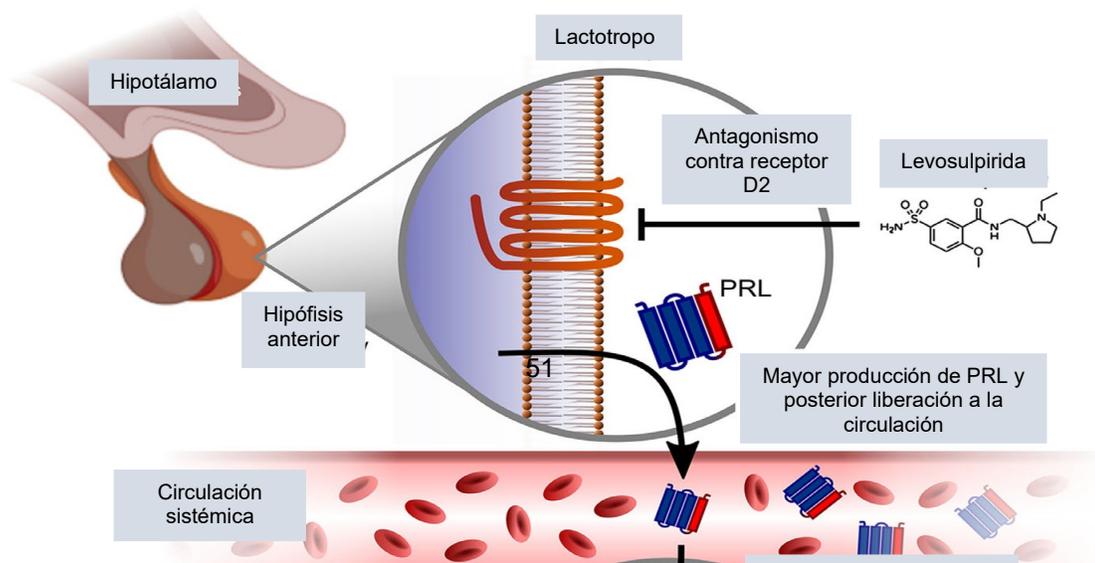
La terapia con levosulpirida se tolera bien, tanto a corto (de 2 a 16 semanas) como a largo plazo (de 4 a 42 meses) (Ratnani-I., et al. 2015. Mauri-MC., et al. 1996. Wagstaff-AJ., et al. 1994). Un estudio multicéntrico en 342 pacientes femeninos y masculinos dispépticos que recibieron levosulpirida vía oral (25 mg cada 8 horas, durante 4 semanas), reportó 40 pacientes (11%) con efectos adversos: galactorrea (26.7%), somnolencia (17.8 %), fatiga (11%) y dolor de cabeza (11.5 %), ninguno de los cuales abandonó el estudio (Lozano-R., et al. 2007). Utilizando la misma dosis oral de levosulpirida, en un ensayo aleatorizado, controlado, con placebo de 6 meses de duración, con 40 pacientes con diabetes insulino dependiente y vaciado gástrico retardado, se reportaron dos pacientes tratados con levosulpirida (5%) y un paciente con placebo (2.5%) con eventos adversos (sensibilidad mamaria, pérdida de la libido y/o somnolencia), pero no se retiraron del estudio (Melga-P., et al. 1997).

Otro detalle importante es el hecho de que la dopamina juega también un papel en la función visual. Recientemente, se ha destacado la importancia del sistema dopaminérgico y los subtipos de receptores de dopamina en el ojo (*Bucolo-C., et al. 2019. Leggio-GM., et al. 2016*). Los receptores de dopamina y dopamina tipo 2 se han localizado en células amacrinas y fotorreceptores (bastones y conos) de la retina, respectivamente, y se ha sugerido que desempeñan un papel en la regulación del flujo de información visual y en los circuitos de adaptación a la luz (*Archibald-NK., et al. 2009*). Además, la dopamina puede influir en la presión arterial intraocular al modular el flujo sanguíneo ciliar y la producción de humor acuoso (*Reitsamer-HA., et al. 2002*). Por lo tanto, la terapia con levosulpirida puede afectar la visión comprometida en pacientes con DR y DME por mecanismos independientes de las acciones vasculares del eje PRL-vasoinhibina. Es también importante destacar que el examen ocular completo, incluida la evaluación con lámpara de hendidura, no reveló ningún cambio oftalmológico en 16 pacientes esquizofrénicos gravemente enfermos tratados con sulpirida durante 12 semanas, los cuales fueron tratados con dosis iniciales de 400 mg/24 horas, alcanzando algunos pacientes hasta los 2600 mg/24 horas (*Mielke-DH., et al. 1977*). Niveles sumamente elevados si los comparamos con nuestro estudio, ya que en nuestro protocolo alcanzamos una dosis de 75 mg/24 horas, disminuyendo así, la probabilidad del desarrollo de efectos adversos.

Es claro que nuestro estudio debe ser extendido a un mayor número de pacientes. Otra limitación es el tiempo corto (2 meses) de tratamiento que contrasta con los estudios más prolongados (>3 meses) llevados a cabo con tratamientos convencionales, particularmente si se considera que el EMD no desaparece. Estos parámetros se decidieron tomando en cuenta el carácter exploratorio del estudio. Sin embargo, dados los resultados positivos, se fortalece la necesidad de extender el estudio a más pacientes y por más tiempo.

VIII. CONCLUSIÓN

En conclusión, hemos llevado a cabo un estudio clínico, prospectivo, doble-ciego, aleatorizado cuyos resultados demuestran los beneficios del tratamiento con levosulpirida como una alternativa terapéutica oral para el tratamiento del EMD. Brindamos evidencia de que el aumento en las concentraciones séricas de PRL inducidas por el tratamiento oral con levosulpirida eleva las concentraciones vítreas de esta hormona y, como consecuencia, su conversión intraocular a vasoinhibina capaz de frenar la excesiva vasopermeabilidad retiniana determinante de EMD (*Figura 9*).



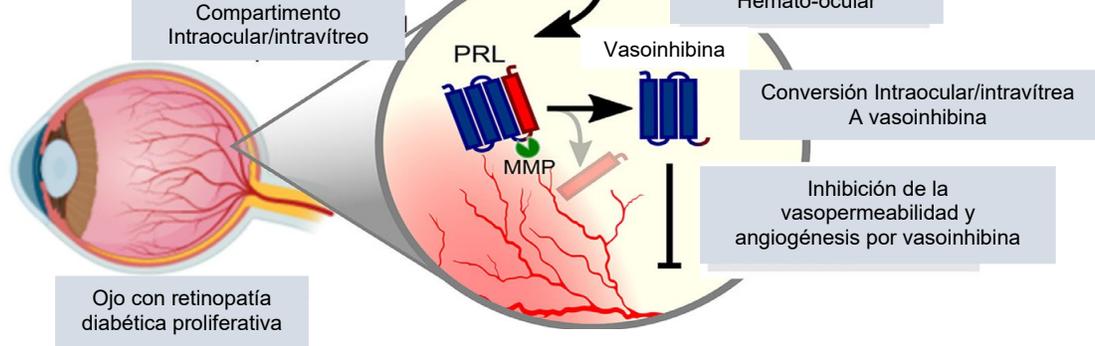


Figura 8. Representación esquemática de los hallazgos del estudio que respaldan el mecanismo por el cual la terapia con levosulpirida podría limitar la Progresión del EMD y RD. La levosulpirida, un antagonista del receptor de dopamina D2, bloquea los receptores de dopamina D2 ubicados en la membrana de células de la hipófisis anterior que producen PRL (lactotropos). Dado que la dopamina hipotalámica inhibe la liberación de PRL, la levosulpirida conduce a niveles elevados de PRL en la circulación (hiperprolactinemia) que, a su vez, favorecen la penetración de la PRL a través de la barrera hemato-ocular. Dentro del compartimento intraocular/vítreo, las MMP's escinden a la PRL en vasoinhibina, que puede reducir la vasopermeabilidad retiniana y la angiogénesis en EMD y RD. Figura creada por Juan Pablo Robles Álvarez en Biorender.com.

Estos hallazgos apoyan la importancia de continuar este estudio con la perspectiva de frenar la pérdida de la visión en la diabetes, así como la necesidad de continuar haciendo estudios clínicos que exploren y demuestren sus efectos

sobre la vasopermeabilidad y la neovascularización o angiogénesis, con la perspectiva de tener una opción terapéutica para mejorar la pérdida de la visión en pacientes con retinopatía diabética proliferativa.

IX. LITERATURA CITADA

1. Adán-Castro E., Siqueiros-Márquez L., Ramírez-Hernández G., Díaz-Lezama N., Ruíz-Herrera X., et al. 2022. Sulpiride-induced hyperprolactinaemia increases retinal vasoinhibin and protects against diabetic retinopathy in rats. *Journal of neuroendocrinology*, e13091. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/jne.13091>.
2. Agrawal-S., Joshi-M., Christoforidis-JB. 2013. Vitreous Inflammation Associated with Intravitreal Anti-VEGF Pharmacotherapy. *Mediators Inflamm*; 1-6.

3. Alizadeh-E., Mammadzada-P., André-H. 2018. The Different Facades of Retinal and Choroidal Endothelial Cells in Response to Hypoxia. *Int J Mol Sci.* 19.
4. Allan-W., Louis-N., Medina-J. 2013. Advances in our understanding of diabetic retinopathy. *Clinical Science*; 125: 1-17.
5. Andonegui-J., Jimenez-L. 2008. Edema macular diabético. *An Sist Sanit Navar*; 31: 35-44.
6. Andrade-C. 2013. Low dose amisulpride and elevation in serum prolactin. *The Journal of clinical psychiatry*, 74, e558–e560. <https://doi.org/10.4088/JCP.13f08510>.
7. 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.
8. Antonetti-DA., Klein-R. 2012., Gardner-TW. 2012. Mechanisms of Disease Diabetic Retinopathy. *N Engl J Med*; 366: 1227-1239.
9. Aranda-J., Rivera-J., Michael-C., Jeziorski., Riesgo-Escovar J., et al. 2005. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 46: 2947–2953.
10. Archibald-NK., Clarke-MP., Mosimann-UP., Burn-DJ. 2009. The retina in Parkinson's disease. *Brain J Neurol.* 2009; 132:1128–1145.
11. Arnold-E., Rivera-J.C., Thebault-S., Moreno-Páramo D., Quiroz-Mercado H., et al. 2010. High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vaso-inhibins. *Diabetes*; 59: 3192-3197.

12. Bailey-IL, Lovie-JE. New design principles for visual acuity charts. *Am J Optom Physiol Opt.* 1976; 53:740-5.
13. Bandello-F., Battaglia-Parodi M., Lanzetta-P., Loewenstein-A., Massin-P., et al. 2017. Diabetic Macular Edema. *Developments in ophthalmology*, 58, 102–138. <https://doi.org/10.1159/000455277>.
14. Bascaran-C., Mwangi-N., D'Esposito-F., Cleland-C., Gordon-I., et al. 2021. Effectiveness of interventions to increase uptake and completion of treatment for diabetic retinopathy in low- and middle-income countries: a rapid review protocol. *Systematic reviews*, 10, 27. <https://doi.org/10.1186/s13643-020-01562-9>
15. Baudin-B., Bruneel-A., Bosselut-N. 2007. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc* 2, 481–485. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.54>.
16. Behl-T., Kotwani-A. 2017. Potential of angiotensin II receptor blockers in the treatment of diabetic retinopathy. *Life Sci* 176:1-9.
17. Ben-Jonathan N, LaPensee-CR, LaPensee-EW. 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev*; 29, 1–41.
18. Bole-Feysot C., Goffin-V., Edery-M., Binart-N., Kelly-PA. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine reviews*, 19, 225–268. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0334>.
19. Bonafonte-Royo S., García-Charles A. 2006. Retinopatía diabética. Edición: 2; pp. 1-12. Madrid, España. Elsevier Science Health Science Div.

20. Boyer-DS., Hopkins-JJ., Sorof-J., Ehrlich-JS. 2013. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for diabetic macular edema. *Ther Adv Endocrinol Metab*; 4: 151-69.
21. Browning-DJ., Stewart-MW., Lee-C. 2018. Diabetic macular edema: Evidence-based management. *Indian Journal of Ophthalmology*: December 2018 - Volume 66 - Issue 12 - p 1736-1750. doi: 10.4103/ijo.IJO_1240_18.
22. Bucolo-C., Leggio-GM., Drago-F., Salomone-S. 2019. Dopamine outside the brain: the eye, cardiovascular system and endocrine pancreas. *Pharmacol Ther.* 2019; 203:107392.
23. Bucolo-C., Barbieri-A., Viganò-I., Marchesi-N., Bandello-F., et al. 2021. Short-and Long-Term Expression of Vegf: A Temporal Regulation of a Key Factor in Diabetic Retinopathy. *Frontiers in pharmacology*, 12, 707909. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.707909>.
24. Cajero-Juárez M., Avila-B., Ochoa-A., Garrido-Guerrero E., Varela-Echavarría A., et al. 2002. Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *European Journal of Cell Biology*; 81, Issue 1, Pages 1-8. ISSN 0171-9335. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00213>.
25. Capitão-M., Soares-R. 2016. Angiogenesis and Inflammation Crosstalk in Diabetic Retinopathy. *J Cell Biochem* 117:2443-53.
26. 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. Fecha de consulta; 22 de noviembre de 2015.

27. Chang-AS., Grant-R., Tomita-H., Kim-HS., Smithies-O., et al. 2016. Prolactin alters blood pressure by modulating the activity of endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 12538–12543. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615051113>.
28. Chaudhary-S., Zaveri-J., Becker-N. 2021. Proliferative diabetic retinopathy (PDR). *Disease-a-month: DM*, 67, 101140. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2021.101140>.
29. Chatterjee-S., Khunti-K., Davies-MJ. 2017. Type 2 diabetes. *Lancet (London, England)*, 389, 2239–2251. <https://doi.org/10.1016/S0140-673630058-2>.
30. Chekhonin-ES., Fayzrakhmanov-RR., Sukhanova-AV., Bosov-ED. 2021. Fármacos anti-VEGF en el tratamiento de la retinopatía diabética. *Boletín de oftalmología*; 137: 136-142.
31. Chow-S., Shao-J., Wang-H. 2008. *Sample Size Calculations in Clinical Research*. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC.
32. 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.
33. Clapp-C., Thebault-S., Arnold-E., Garcia-C., Rivera-JC., et al. 2008. Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 295: E772-E778.

34. 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.
35. Corbacho-AM., Macotella-Y., Nava-G., Torner-L., Dueñas-Z., et al. 2000. Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *The Journal of endocrinology*, 166, 53–62. <https://doi.org/10.1677/joe.0.16600>.
36. 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.
37. Crabtree-GS., Chang-JS. 2021. Management of Complications and Vision Loss from Proliferative Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep* 21, 33. <https://doi.org/10.1007/s11892-021-01396-2>.
38. Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Actualizado el 1 de marzo de 2017. Consultado en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-sereshumanos/>
39. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. Elman-MJ., Aiello-LP., Beck-RW., Bressler-NM., Bressler-SB., et al. 2010. Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 117, 1064–1077.e35. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2010.02.031>.

40. Dueñas-Z., Torner-L., Corbacho-AM., Ochoa-A., Gutiérrez-Ospina G., López-Barrera F., et al. 1999. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Investigative ophthalmology & visual science*, 40, 2498–2505.
41. Dueñas-Z., Rivera-JC., Quiróz-Mercado H., Aranda-J., Macotela-Y., et al. 2004. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45, 2049–2055. [https://doi.org/10.1167 /iovs.03-1346](https://doi.org/10.1167/iovs.03-1346).
42. ENSANUT 2012. Recuperado de: http://www.cenetec.salud.gob.mx-/descargas/gpc/CatalogoMaestro/171_GP_C_RETINOPATIA_DIABETICA/Imss_171ER.pdf. Fecha de consulta: 15 de noviembre de 2015.
43. ENSANUT 2016. Recuperado de: chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcgkclefindmkaj/http://transparencia.insp.mx/2017/auditoriasinsp/12701_Resultados_Encuesta_ENSANUT_MC2016.pdf. Fecha de consulta: 20 de febrero de 2022.
44. Faselis-C., Katsimardou-A., Imprialos-K., Deligkaris-P., Kallistratos-M., et al. 2020. Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus, *Current Vascular Pharmacology*; 18. <https://dx.doi.org/10.2174/1570161117666190502103733>.
45. Felicio-LF., Bridges-RS. 1992. Domperidone induces a probenecid-sensitive rise in immunoreactive prolactin in cerebroventricular perfusates in female rats. *Brain research*, 573, 133–138. <https://doi.org/10.1016/0006-899390122-p>.

46. 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: 1-5
47. 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: 146-158.
48. García-C., Aranda-J., Arnold-E., Thébault-S., Macotela-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: 2291–2300.
49. Geganathan-VS., Verma-N. 2009. Safety and Efficacy of Intravitreal anti VEGF Injections for age-related macular degeneration. Cur Opin Ophthalmol; 20: 223-5.
50. Goldin-A., Beckman-JA., Schmidt-AM., Creager-MA. 2006. “Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury,” Circulation 114:597– 605.
51. González-C., Parra-A., Ramírez-Peredo J., García-C., Rivera-JC., Macotela-Y., et al. 2007. Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 87, 1009–1017. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700662>.
52. 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: 5714-22.

53. González-JC. 2007. Levosulpiride y domperidona en el tratamiento de la dispepsia funcional: estudio comparativo. *Rev la Fac Med*; 30: 146–150.

54. Gonzalez-VH., Campbell-J., Holekamp-NM., Kiss-S., Loewenstein-A., et al. 2016. Early and Long-Term Responses to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Diabetic Macular Edema: Analysis of Protocol I Data. *American journal of ophthalmology*, 172, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2016.09.012>.

55. Graue-Hernandez EO., Rivera-De-La-Parra D., Hernandez-Jimenez S., Aguilar-Salinas CA., Kershenobich-Stalnikowitz D., et al. 2020. Prevalence and associated risk factors of diabetic retinopathy and macular oedema in patients recently diagnosed with type 2 diabetes. *BMJ open ophthalmology*, 5, e000304. <https://doi.org/10.1136/bmjophth-2019-000304>.

56. Guslandi-M. 1993. The clinical use of levosulpiride. *Curr Ther Res* 53: 484–501.

57. Harter-M., Balarac-N., Pourcher-P., Koslowski-JM., Krebs-B., et al. 1976. Diabetic retinopathy and prolactin. *The Lancet*; 308: 961 – 962.

58. Hasler-WL. 2007. Gastroparesis: symptoms, evaluation, and treatment. *Gastroenterology clinics of North America*, 36, 619–ix. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2007.07.004>.

59. Herrera-Batista AJ, Ruiz-C., Héctor-J., Zumeta-D., Melvis-T. 2017. La súper familia de las colágenas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 36, 260-270.

60. IDF. 2021. About Diabetes. Recuperado de: <http://www.idf.org/about-Diabetes>. Fecha de consulta: 4 de marzo de 2022.
61. Ishikawa-M. 2013. Abnormalities in glutamate metabolism and excitotoxicity in the retinal diseases. *Scientifica (Cairo)* 528940.
62. 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: 1129-1134.
63. Kowluru-RA, Zhong-Q, Santos-JM. 2012. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9. *Expert Opin Investig Drugs*; 21: 797-805.
64. Kuchay-MS., Mithal-A. 2017. Levosulpiride and Serum Prolactin Levels. *Indian J Endocr Metab*; 21: 355–358.
65. Le-YZ. 2017. VEGF production and signaling in Müller glia are critical to modulating vascular function and neuronal integrity in diabetic retinopathy and hypoxic retinal vascular diseases. *Vision Res* 139:108-114.
66. Lee-CF., Cheng-AC., Fong-DY. 2012. Eyes or subjects: ¿are ophthalmic randomized controlled trials properly designed and analyzed? *Ophthalmology*, 119, 869–872. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.09.025>.
67. Leggio-GM., Bucolo-C., Platania-CBM., Salomone-S., Drago-F. 2016. Current drug treatments targeting dopamine D3 receptor. *Pharmacol Ther*. 2016; 165:164–177.

68. Ley General De Salud. 2018. página 32, artículos del 96 al 103. Consultado desde: [Chrome-extension://efaidnbnmnibpcjpcglclefindmkaj/https://dispositivosmedicos.org.mx/wpcontent/uploads/2018/12/LEY_GENERAL_DE_SALUD.pdf](https://dispositivosmedicos.org.mx/wpcontent/uploads/2018/12/LEY_GENERAL_DE_SALUD.pdf).
69. 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: 149–155.
70. Manzanares-J., Wagner-EJ., LaVigne-SD., Lookingland-KJ., Moore-KE. 1992. Sexual differences in kappa opioid receptor-mediated regulation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Neuroendocrinology*, 55, 301–307. <https://doi.org/10.1159/000126129>.
71. Martínez-Ezquerro JD., Herrera-LA. 2006. Angiogénesis: VEGF/VEGFR's como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cancer. *Cancerología* 1: 83-96
72. Mauri-MC., Bravin-S., Bitetto-A., Rudelli-R., Invernizzi-G. 1996. A risk-benefit assessment of sulpiride in the treatment of schizophrenia. *Drug Saf*. 1996; 14:288–298.
73. Mauri-MC., Paletta-S., Di-Pace C., Reggiori-A., Cirnigliaro-G., et al. 2018. Clinical Pharmacokinetics of Atypical Antipsychotics: An Update. *Clinical pharmacokinetics*, 57, 1493–1528. <https://doi.org/10.1007/s40262-018-0664-3>.

74. Mediavilla-Bravo J. 2010. Complicaciones de la Diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento. SEMERGEN; 27: 132-145.
75. Meléndez-García R., Arredondo-Zamarripa D., Arnold-E., Ruiz-Herrera X., Noguez-Imm R., et al. 2016. Prolactin protects retinal pigment epithelium by inhibiting sirtuin 2-dependent cell death. *EBioMedicine*, 7, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.048>.
76. Melga-P., Mansi-C., Ciuchi-E., Giusti-R., Sciaba-L., et al. 1997. Chronic administration of levosulpiride and glycemic control in IDDM patients with gastroparesis. *Diabetes Care*. 1997; 20:55–58.
77. Mielke-DH., Gallant-DM., Kessler-C. 1977. An evaluation of a unique new antipsychotic agent, sulpiride: effects on serum prolactin and growth hormone levels. *Am J Psychiatry*. 1977; 134:1371–1375.
78. Miyamoto-N., de-Kozak Y., Normand-N., Courtois-Y., Jeanny-JC., et al. 2008. PIGF-1 and VEGFR-1 pathway regulation of the external epithelial hemato-ocular barrier. A model for retinal edema. *Ophthalmic Res* 40:203-7.
79. Moreno-Páramo D., Rivera-J.C., Aranda-J., Salazar N., Arnold-E., et al. 2007. Retinopatía diabética y vasoinhibinas. *Rev invest clín*; 59: 290-297.
80. Mooradian-AD., Morley-JE., Billington-CJ., Slag-MF., Elson-MK., et al. 1985. Hyperprolactinaemia in male diabetics. *Postgrad Med J*; 61: 11-14.
81. Mucci-A., Nolf-G., Maj-M. 1995. Levosulpiride: a review of its clinical use in psychiatry. *Pharmacol Res*; 31: 95-101.

82. Murdoch-IE., Morris-SS., Cousens-SN. 1998. People and eyes: statistical approaches in ophthalmology. *The British journal of ophthalmology*, 82, 971–973. <https://doi.org/10.1136/bjo.82.8.971>.
83. Nunez-Amaro CD., Moreno-Vega AI., Adan-Castro E., Zamora-M., Garcia-Franco R., et al. 2020. Levosulpiride increases the levels of prolactin and antiangiogenic vasoinhibin in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Trans Vis Sci Tech*; 9:27. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.9.27>.
84. OMS, 2021. Diabetes. Recuperado de: <https://www.who.int/es/newsroom/fact-sheets/detail/diabetes>. Fecha de consulta: 2 de marzo de 2021.
85. 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. Fecha de consulta: 24 de noviembre de 2015.
86. O'Steen-WK., Sundberg-DK. 1982. Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injection of iodinated prolactin. *Ophthalmic research*, 14, 54–62. <https://doi.org/10.1159/000265174>.
87. 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: 36-40.

88. 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: 2413–2419.
89. Poulsen-JE. 1953. Recovery from retinopathy in a case of diabetes with Simmonds' disease. *Diabetes*; 2: 7–12.
90. Prado-Serrano A., Guido-Jiménez M.A., Camas-Benitez J.T. 2009. Prevalencia de retinopatía diabética en población mexicana. *Rev Mex Oftalmol*; 83: 261-266.
91. Ratnani-I., Panchal-B., Gandhi-R., Vala-A., Mandal-K. 2015 Role of levosulpiride in the management of functional dyspepsia. *J FamMed*; 2:1034.
92. Reitsamer-HA., Kiel-JW. 2002. Effects of dopamine on ciliary blood flow, aqueous production, and intraocular pressure in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 43:2697–2703.
93. Robles-Osorio ML., García-Franco R., Núñez-Amaro CD., Mira-Lorenzo X., Ramírez-Neria P., et al. 2018. Basis and Design of a Randomized Clinical Trial to Evaluate the Effect of Levosulpiride on Retinal Alterations in Patients With Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 9:242.
94. Robles-JP., Zamora-M., Velasco-Bolom JL. et al. 2018. Vasoinhibin comprises a three-helix bundle and its antiangiogenic domain is located within the first 79 residues. *Sci Rep* 8, 17111 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35383-7>.

95. Robles-JP., Zamora-M., Siqueiros-Marquez L., Adan-Castro E., Ramirez-Hernandez G., et al. 2022. The HGR motif is the antiangiogenic determinant of vasoinhibin: implications for a therapeutic orally active oligopeptide. *Angiogenesis*, 25, 57–70. <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09800-x>.
96. Rojas-Martínez R., Basto-Abreu A., Aguilar-Salinas CA., et al. 2018. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México. *salud publica mex*; 60:224-232.
97. Safi-SZ., Qvist-R., Kumar-S., Batumalaie-K., Ismail-IS. 2014. Molecular mechanisms of diabetic retinopathy, general preventive strategies, and novel therapeutic targets. *Biomed Res Int* 801269.
98. 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: 94-102.
99. Serra-J. 2010. Levosulpiride in the management of functional dyspepsia and delayed gastric emptying. *Gastroenterol Hepatol*; 33: 586-90.
100. Shukla-UV., Tripathy-K. 2022. Diabetic Retinopathy. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
101. Smith-AG., Kaiser-PK. 2016. Therapeutic Monoclonal Antibodies and Fragments: Ranibizumab. *Developments in ophthalmology*, 55, 246–251. <https://doi.org/10.1159/000431200>

102. Simó-R., Stitt-AW., Gardner-TW. 2018. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter? *Diabetology* 61:1902-1912.
103. Singh-H., Bala-R., Kaur-K. 2015. Efficacy and Tolerability of Levosulipride, Domperidone and Metoclopramide in Patients with Non-Ulcer Functional Dyspepsia: A Comparative Analysis. *JCDR*; 9: FC09-FC012.
104. 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: 211–215.
105. Spencer-BG., Estevez-JJ., Liu-E., Craig-JE., Finnie-JW. 2020. Pericytes, inflammation, and diabetic retinopathy. *Inflammopharmacology*, 28, 697–709. <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00647-9>.
106. Sun-JK., Jampol-LM. 2019. The Diabetic Retinopathy Clinical Research Network (DRCR.net) and Its Contributions to the Treatment of Diabetic Retinopathy. *Ophthalmic research*, 62, 225–230. <https://doi.org/10.1159/000502779>.
107. Tarr-JM., Kaul-K., Chopra-M., Kohner-EM., Chibber-R. 2013. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN ophthalmology*, 343560. <https://doi.org/10.1155/2013/343560>.
108. Tenorio-G., Ramírez-Sánchez V. 2010. Retinopatía diabética; conceptos actuales. *Rev Med Hosp Gen Mex*; 73: 193-201.

109. Triebel-J., Macotela-Y., Martínez-de la Escalera G., Clapp-C. 2011. Prolactin and vasoinhibins: Endogenous players in diabetic retinopathy. *Life*; 63: 806-810.
110. UNIDAD DE TERAPIA INTRAVÍTREA: CONSENSO CLÍNICO. 2021, Sociedad Española de Retina y Vítreo (SERV). Novartis. Editorial Trama Solutions SL. A Coruña.
111. Vekemans-M., & Robyn-C. 1975. Influence of age on serum prolactin levels in women and men. *British medical journal*, 4, 738–739. <https://doi.org/10.1136/bmj.4.5999.738>
112. Verdaguer-J. 2010. Degeneración macular asociada a la edad. *Rev. Med. Clin. Condes*; 21: 949-955.
113. Viigimaa-M., Sachinidis-A., Toumpourleka-M., Koutsampasopoulos-K., Alliksoo-S., et al. 2020. Macrovascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus, *Current Vascular Pharmacology*; 18(2) <https://dx.doi.org/10.2174/1570161117666190405165151>
114. 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 Practica Retinopa ia2011.pdf>. Fecha de consulta: 5 de diciembre de 2019.

115. Wang-W., Lo-A. 2018. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *International journal of molecular sciences*, 19, 1816. <https://doi.org/10.3390/ijms19061816>.
116. Walsh-RJ., Slaby-FJ., Posner-BI. 1987. A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology*, 120, 1846–1850. <https://doi.org/10.1210/endo-120-5-1846>.
117. Wells-JA., Glassman-AR., Jampol-LM., Aiello-LP., Antoszyk-AN., et al. 2016. Association of baseline visual acuity and retinal thickness with 1-year efficacy of aflibercept, bevacizumab, and ranibizumab for diabetic macular edema. *JAMA Ophthalmol* 134:127–34.
118. Willmann-G., Nepomuceno-AB., Messias-K., Barroso-L., Scott-IU., et al. 2017. Foveal thickness reduction after anti-vascular endothelial growth factor treatment in chronic diabetic macular edema. *International journal of ophthalmology*, 10, 760–764. <https://doi.org/10.18240/ijo.2017.05.17>.
119. Wu-L., Martínez-Castellanos MA., Quiroz-Mercado H., Arevalo JF., Berrocal MH., 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: 81-87.
120. Zhang-C., Wang-H., Nie-J., Wang-F. 2014. Protective factors in diabetic retinopathy: focus on blood-retinal barrier. *Discovery medicine*, 18, 105–112.

