

30. Salud humana

Toxicidad metabólica y resistencia a insulina por antipsicóticos: efectos en el músculo esquelético.

Catalina Salamanca¹, Catalina Bustos¹, Francisco Díaz², Rodrigo Troncoso², Andrea del Campo^{1,3}, Leonel E. Rojo¹.

1 Departamento de Biología, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

2 Laboratorio de Investigación en Nutrición y Actividad Física, Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Universidad de Chile.

3 Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Ingeniería, Ciencia y Tecnología, Universidad Bernardo O'Higgins.

Resumen

Uno de los efectos secundarios más severos de los antipsicóticos de segunda generación es la toxicidad metabólica, que afecta a millones de individuos a nivel mundial. Al respecto, se ha descrito que Olanzapina (OLZ) produce resistencia a insulina y Diabetes tipo II en periodos tan cortos como 12 semanas. Los mecanismos a través de los cuales OLZ causa estos efectos no se han dilucidado completamente, estudios postulan efectos a nivel central y periférico, sin abordar los mecanismos de toxicidad en músculo esquelético. Para el desarrollo de esta investigación se utilizó la línea celular L6 de músculo de rata neonata, pre incubada con OLZ 50 µg/mL por 24 h e Insulina 100 nM por 3h. Ensayos realizados mediante citometría de flujo y microscopía confocal muestran que OLZ impide la captación de glucosa inducida por Insulina en células L6. Estos resultados indican que la toxicidad metabólica de OLZ, va más allá de los efectos en el sistema nervioso, afectando la respuesta fisiológica del tejido muscular estriado.

Palabras clave: Olanzapina, síndrome metabólico, Diabetes II, insulina, captación de glucosa, 2-NBDG.

Introducción

Antipsicóticos de segunda generación y efectos metabólicos

Los antipsicóticos de segunda generación (ASG) son medicamentos ampliamente utilizados en el tratamiento de la Esquizofrenia, y otros trastornos

psiquiátricos [1]. Algunos de los ASG pueden controlar los síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia a las 6 semanas de uso, sin embargo, se generan también alteraciones cardiometabólicas que producen un aumento de la morbi-mortalidad [1] induciendo resistencia a la

insulina, esteatosis hepática y ganancia de peso [2].

Estudios recientes han descrito algunos de los mecanismos asociados a la generación de síndrome metabólico generado por el uso de ASG. Algunos autores describen mecanismos moleculares responsables de la hiperfagia, de la diferenciación anormal [3] de los adipocitos incrementando la acumulación de lípidos [4] y la disminución de acumulación de glucógeno en células musculares [5]. Adicionalmente se ha descrito que existe un antagonismo selectivo de 5HT₂ que podría estar relacionado con la disminución de la sensibilidad a insulina [2].

De los ASG disponibles en el mercado, uno de los más tóxicos en lo que se refiere a efectos metabólicos se encuentra la Olanzapina (OLZ) (**Figura 1**) [6, 7], cerca del 20-50% de los pacientes tratados con este ASG desarrolla Diabetes Mellitus II (DMII) en un período de tiempo acelerado, provocando graves complicaciones en la salud y calidad de vida de estas personas [8, 9].

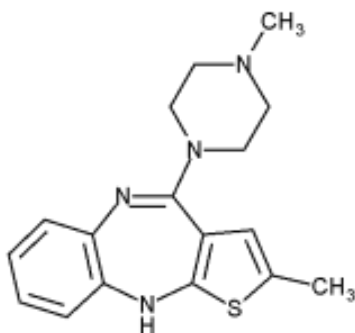


Figura 1: Estructura química Olanzapina.

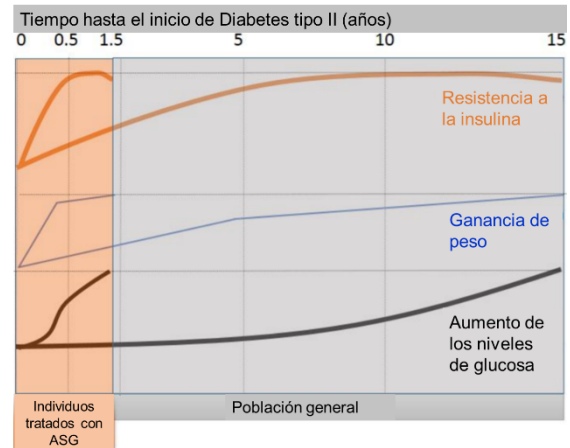


Figura 2: Representación esquemática del tiempo requerido para el desarrollo de alteraciones metabólicas en individuos tratados con ASG y pacientes con DMII. [1]

Diabetes Tipo II y ASG

La DMII es una de las enfermedades con mayor prevalencia a nivel mundial [10], tarda alrededor de 5-10 años en desarrollarse. La causa de esta enfermedad es multifactorial, involucra factores medioambientales y cierta predisposición genética [11]. Primeramente, cursa un estado pre-diabético que genera resistencia a insulina con hiperinsulinemia (pudiendo ser asintomático durante varios años), provocando una progresiva disfunción pancreática que finalmente termina en DMII [11, 12].

En pacientes tratados con OLZ el desarrollo de DMII se produce en cortos periodos de tiempo; 6-12 semanas de comenzada la terapia [13], tal como se muestra en la **Figura 2**.

La DMII se produce por una alteración en el metabolismo de la glucosa, en donde el músculo esquelético tiene un rol

protagónico, ya que, una de sus principales funciones, es mantener la homeostasis de la glicemia tras la ingesta alimentaria [11].

A pesar de la importancia del músculo esquelético en el metabolismo de la glucosa, existen pocos registros de lo que sucede a este nivel tras el uso de ASG.

Señalización de insulina y mitocondrias

El metabolismo de la glucosa, proceso dependiente de insulina, tiene por objetivo la conversión de glucosa en ATP [14].

Cuando existe un aumento en los niveles de glucosa en sangre, se estimula la síntesis de insulina [11]. La unión de insulina a su receptor induce un cambio conformacional que permite la autofosforilación de las subunidades β , proporcionándoles la actividad tirosina quinasa intrínseca, produciendo finalmente la activación de su cascada de transducción de señales. Una de las vías de señalización desencadena la captación

de glucosa, este proceso es dependiente de la translocación del transportador GLUT-4. En células musculares no estimuladas entre el 4 y 10% de este transportador se localiza en la membrana mientras que el 90% restante se encuentra en compartimentos intracelulares. El tráfico de GLUT-4 hacia la superficie depende de la cascada de señalización de insulina río abajo de PI3-K [15].

El ATP intracelular se produce principalmente dentro de las mitocondrias. En el caso del músculo esquelético la producción de ATP se realiza a partir del metabolismo de lípidos, de la fosforilación oxidativa y del ciclo de Krebs [16].

Olanzapina e insulina

Estudios in vivo en los que se utilizaron modelos de ratones hiperinsulinémicos/euglicémicos demostraron que OLZ disminuye la sensibilidad a insulina en el hígado [17], en músculo esquelético y

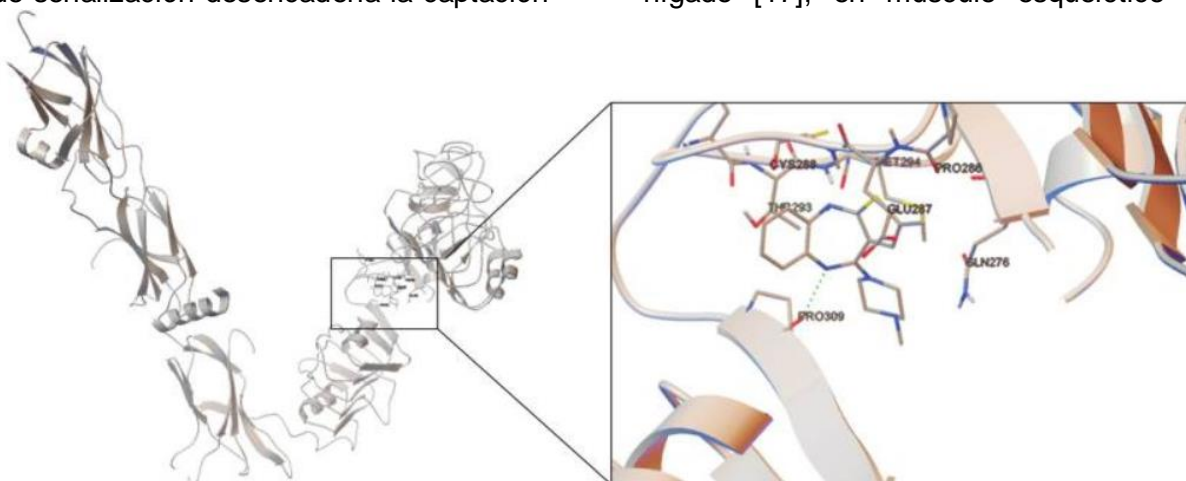


Figura 3: Representación gráfica de los sitios de interacción para olanzapina y el dominio extracelular del receptor de insulina según Docking Studies. El modelo de receptor de insulina humana y la estructura de olanzapina se obtuvieron utilizando el paquete AutoDock4 [2].

tejido adiposo [18]. Otros estudios demostraron que OLZ perjudica el efecto regulador que disminuye la producción hepática de glucosa estimulado por Insulina a nivel central [19]. Estos resultados son congruentes con estudios in vitro que describen que OLZ induce resistencia a la Insulina en diversos tejidos [5].

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron a través de la realización de un Docking molecular que simula la interacción de Olanzapina y el receptor de insulina (RI), que, por las energías favorables de unión, existe una alta afinidad entre éste y OLZ [2] (**Figura 3**). Este ASG, podría interactuar perjudicialmente en el receptor de Insulina bloqueando la cascada de señalización tras su estimulación, viéndose afectados algunos de los procesos como la captación de glucosa en células musculares.

Debido al alto uso y toxicidad inherente al tratamiento con Olanzapina, es que se ha determinado estudiar los mecanismos involucrados en los efectos metabólicos producidos por este medicamento, más específicamente los efectos de OLZ sobre la captación de glucosa estimulada por insulina en una línea celular de músculo esquelético.

Por lo anteriormente mencionado se plantea que Olanzapina disminuye la captación de glucosa inducida por Insulina en células musculares esqueléticas L6.

Objetivos

Objetivo General

Determinar el efecto de Olanzapina en la captación de 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) Amino)-2-Deoxiglucosa (2-NBDG) en células musculares esqueléticas L6 estimuladas con insulina.

Objetivos Específicos

1. Realizar ensayo de viabilidad con Yoduro de Propidio a distintas concentraciones de Olanzapina.
2. Evaluar la captación de 2-NBDG en células musculares por Citometría de Flujo.
3. Evaluar la captación de 2-NBDG en células musculares por Microscopía Confocal.

Materiales y Métodos

Línea Celular

Se trabajó con la línea celular L6 wild type (L6 WT) y L6 GLUT-4-myc cultivadas en medio de α -MEM Gibco® al 1% de antibiótico-antimicótico, suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% para proliferación y al 2% para su mantenimiento. Los cultivos se incubaron a 37°C y 5% CO₂.

Viabilidad celular con Yoduro de Propidio (PI).

Se incubaron durante 24 h células L6 WT bajo las siguientes condiciones experimentales: control, olanzapina (0.0320 μ M, 0.3201 μ M, 3.201 μ M, 32.01

μM , 160.0 μM , 320.1 μM , 960.2 μM y 1600 μM). Pasado el tiempo de tratamiento se guardaron los sobrenadantes. Se procedió a la tripsinización de los pocillos y se agregó cada contenido a su correspondiente tubo (donde se había agregado previamente el sobrenadante).

A cada tubo se le agregó PI a 10 $\mu\text{g/mL}$, se dejó actuar durante 1-5 minutos y se hizo pasar por el Citómetro de Flujo Acuri C6 con FLV-2.

Los datos de fluorescencia obtenidos de cada concentración de Olanzapina fueron promediados y normalizados, restando previamente los valores arrojados por el control sin sonda. Se analizaron en Graphpad Prism 7.

Captación de 2-NBDG

Citometría de flujo

En L6 GLUT-4 myc se realizaron las siguientes condiciones experimentales: control, Insulina 100nM, Olanzapina 160 μM , Insulina 100nM + Olanzapina 160 μM . Los tratamientos con OLZ se realizaron durante 24 h privando los cultivos de FBS durante las últimas 3 h.

Tras completar las 24 h de tratamiento con Olanzapina 160 μM , se agregó el estímulo de insulina 100 nM (disuelta en buffer de Krebs sin glucosa) durante 20 min. A los pocillos restantes se les agregó Krebs sin glucosa. Cumplido los 20 min se agregó la sonda 2-NBDG 300nM (disuelta en Buffer de Krebs sin glucosa) durante 5

minutos y se lavó con Buffer de Krebs con glucosa 3-4 veces.

Previa tripsinización, se pasaron las células a tubos Eppendorf, cuidándolas en todo momento de la exposición a la luz. Se centrifugaron 7 minutos 2000rpm, se botó el sobrenadante y se resuspendieron en 200 μL de PBS.

Se hizo pasar cada tubo por el Citómetro de flujo Acuri C6 con FLV-1.

Los datos de fluorescencia obtenidos de cada condición experimental fueron promediados y normalizados restando previamente los valores arrojados por el control sin sonda. Se analizaron en Graphpad Prism 7.

Microscopía confocal

Se utilizaron con cover de vidrio redondos de 25mm. Se realizaron las siguientes condiciones experimentales: control, Olanzapina 160 μM , Insulina 100nM + Olanzapina 160 μM .

Los tratamientos con OLZ se realizaron durante 24 h privando los cultivos de FBS durante las últimas 3 h.

Se retiraron los covers de las placas, se lavaron con Krebs sin glucosa y se les agregó 2-NBDG 300 μM , se incubó durante 15 min. Finalmente se lavó con Krebs con glucosa 3-4 veces.

Los cover con las células se pusieron en una cámara con 967 μL de Krebs con glucosa. Se instaló la cámara en el Microscopio invertido Carl Zeiss modelo LSM 800, equipado con láser de estado

sólido a 488nm de 10mW. A los 60 s se agregó 33 μ L de insulina 3 μ M para estimular.

Las imágenes de fluorescencia se adquirieron a través de una cinética celular. Las fotos se tomaron cada 0.5 s. Se utilizó el lente objetivo Plan-Apochromat 40X/1.4 oil DIC (UV) VIS-IR M27. El análisis digital de las imágenes confocales fue realizado mediante el programa Image J.

Resultados y Discusión

Viabilidad celular con PI

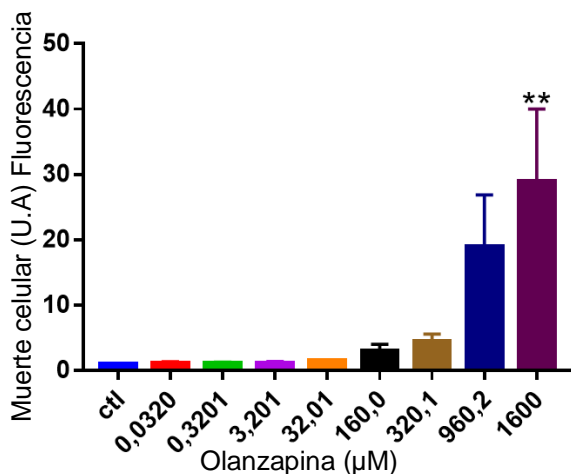


Figura 4: muerte de células L6 en función de la concentración de Olanzapina (μ M). Test ANOVA, $p < 0.01$. $n=3$.

En la **Figura 1** donde se muestra la muerte celular en unidades arbitrarias de fluorescencia de células L6 WT, se puede observar que, si bien 960 μ M y 1600 μ M de Olanzapina se generó una alta tasa de muerte celular, solo a 1600 μ M se mostró significancia estadística.

En base a este ensayo, a la literatura relacionada con el tema y a experimentos

previos realizados en el laboratorio, se definió la realización de los siguientes experimentos a una concentración de 160 μ M de OLZ, donde no se produjo una alta tasa de muerte celular.

Si bien los experimentos de captación de glucosa fueron hechos en L6 GLUT-4 myc, el ensayo de viabilidad mostrado en la figura 1, corresponde ensayos de viabilidad realizados en células L6 WT. Se realizó el mismo el mismo ensayo para L6 GLUT-4 myc, y éste seguía exactamente la misma tendencia mostrada por L6 WT, por tanto, se decidió mostrar solamente estos resultados de viabilidad.

Captación de 2-NBDG en células L6 GLUT-4 myc por citometría de flujo.

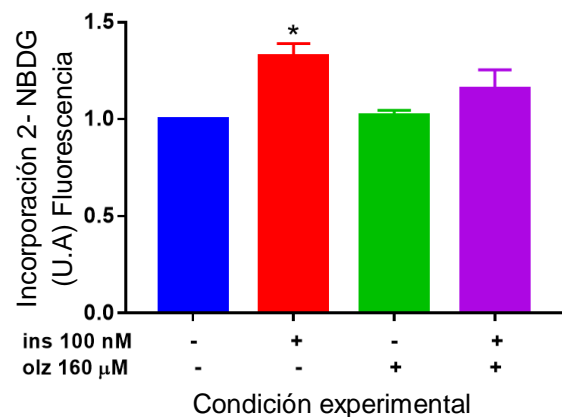


Figura 5: captación de 2-NBDG, según la fluorescencia emitida por células L6 WT en función de la condición experimental. Test ANOVA, $*p < 0.05$. $n=4$.

En la **Figura 2**, donde se simula la captación de glucosa generada en el músculo esquelético, se tiene que; las células control, muestran una captación basal de **2-NBDG**, niveles casi igualmente

alcanzados por aquellas células que fueron tratadas solo con Olanzapina.

Esta captación basal, es probable que ocurra porque, constitutivamente existen transportares de glucosa en las membranas celulares, en el caso del músculo esquelético no estimulado con insulina están en un 4-10% [20, 21]. Al existir niveles similares de captación en las condiciones control y OLZ, podría pensarse que el ASG, aparentemente no perjudica a los transportadores basales.

En aquellas en que sólo se agregó el estímulo de insulina, se muestra un aumento de la captación de **2-NBDG** en comparación con las demás condiciones experimentales, siendo estadísticamente significativa al comparar con la condición control. Era de esperarse que en las células que sólo recibieron insulina, existiera una mayor captación de glucosa, ya que, la translocación de los transportadores GLUT-4 hacia la membrana celular, es un proceso dependiente de hormona [22] (**Figura 2**), demostrando que el modelo propuesto es correcto.

Los valores de captación, de aquellas células que se trataron con OLZ y además se estimularon con insulina, si bien se muestra un aumento de la incorporación del **2-NBDG** en comparación con el control, los valores de fluorescencia dados no fueron los alcanzados por las muestras que sólo recibieron estímulo de insulina. Esto podría ser un indicio que OLZ,

efectivamente, interrumpe la cascada de señalización de insulina por la interacción con su receptor, viéndose bloqueada y/o disminuida la translocación de los transportadores GLUT-4.

Como se mencionó, los valores de fluorescencia arrojados en las células con insulina + OLZ, eran mayores a los del control, no eran igualables a los de las células incubadas únicamente con insulina, pudiendo ser que OLZ no bloquee la totalidad de los receptores de insulina, que la translocación de GLUT-4, en muy baja medida, se genere por otros estímulos, existiendo mecanismos compensatorios de captación de glucosa. Algunos autores han descrito que la translocación de GLUT-4 podría ser un proceso independiente de Insulina [20,21].

Captación de 2-NBDG de células L6 GLUT-4 myc por Microscopía Confocal.

La fluorescencia mostrada por el control una vez agregado el estímulo de Insulina, que pueden apreciarse en la figura 3, no muestra un cambio significativo hasta alrededor de los 340 segundos en donde si se ve un aumento de la fluorescencia, que da cuenta de la captación del **2-NBDG** por parte de las células L6 GLUT-4myc. Las células tratadas con Olanzapina, a pesar de haber recibido el estímulo de insulina mantienen los mismos niveles de fluorescencia a lo largo de las mediciones.

Es decir, se muestra una tendencia a la disminución de captación de glucosa en

células que fueron tratadas con OLZ. Cabe destacar que este experimento, fue realizado en un modelo celular vivo.

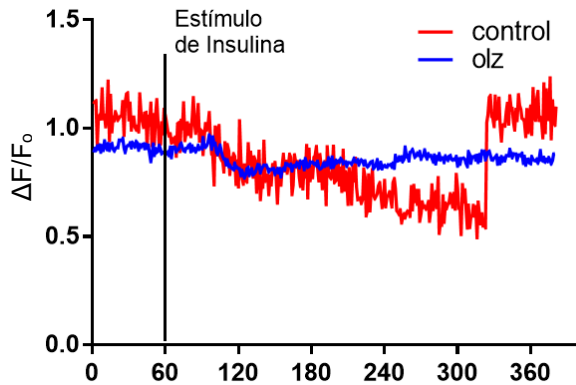


Figura 6: ΔF de fluorescencia mostrada en el microscopio confocal tras estímulo de insulina a los 60 s agregado a L6 GLUT-4myc control y tratadas con olanzapina. ΔF : Fluorescencia inicial - fluorescencia basal; F_0 : Fluorescencia basal. Datos obtenidos en el Software ImageJ. $n=1$

Conclusiones

Los resultados obtenidos de los métodos de fluorescencia indican una tendencia en la disminución de la captación de glucosa inducida por Olanzapina, lo que podría ser un antecedente útil en la búsqueda de los mecanismos asociados al síndrome metabólico generado por los antipsicóticos de segunda generación.

Bibliografía

1. Rojo, L.E., et al., *Metabolic syndrome and obesity among users of second generation antipsychotics: A global challenge for modern psychopharmacology.*

Pharmacological research, 2015. **101**: p. 74-85.

2. del Campo, A., et al., *Metabolic syndrome and Antipsychotics: the role of Mitochondrial Fission/Fusion imbalance.* *Frontiers in endocrinology*, 2018. **9**.
3. Oh, J.-E., et al., *Inhibition of mouse brown adipocyte differentiation by second-generation antipsychotics.* *Experimental & molecular medicine*, 2012. **44**(9): p. 545.
4. Sertié, A.L., et al., *Effects of antipsychotics with different weight gain liabilities on human in vitro models of adipose tissue differentiation and metabolism.* *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2011. **35**(8): p. 1884-1890.
5. Engl, J., et al., *Olanzapine impairs glycogen synthesis and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells.* *Molecular psychiatry*, 2005. **10**(12): p. 1089.
6. De Hert, M., et al., *Metabolic and cardiovascular adverse effects associated with antipsychotic drugs.* *Nature Reviews Endocrinology*, 2012. **8**(2): p. 114.
7. Wampers, M., et al., *Differential effects of olanzapine and risperidone on plasma adiponectin levels over time: results from a 3-month prospective open-label study.* *European neuropsychopharmacology*, 2012. **22**(1): p. 17-26.

8. Cuerda, C., et al., *The effects of second-generation antipsychotics on food intake, resting energy expenditure and physical activity*. European journal of clinical nutrition, 2014. **68**(2): p. 146.
9. Weston-Green, K., X.-F. Huang, and C. Deng, *Second generation antipsychotic-induced type 2 diabetes: a role for the muscarinic M3 receptor*. CNS drugs, 2013. **27**(12): p. 1069-1080.
10. Wild, S., et al., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes care, 2004. **27**(5): p. 1047-1053.
11. DeFronzo, R.A., et al., *Type 2 diabetes mellitus*. Nature reviews Disease primers, 2015. **1**: p. 15019.
12. Manu, P., et al., *Weight gain and obesity in schizophrenia: epidemiology, pathobiology, and management*. Acta Psychiatrica Scandinavica, 2015. **132**(2): p. 97-108.
13. Kelly, D.L., et al., *Cardiovascular disease mortality in chronic schizophrenia patients treated with clozapine*. The Journal of clinical psychiatry, 2010. **71**(3): p. 304.
14. Holloszy, J., *Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4*. J Physiol Pharmacol, 2008. **59**(Suppl 7): p. 5-18.
15. Del Campo, A., *Dinámica mitocondrial en la regulación del metabolismo de glucosa dependiente de insulina en células musculares esqueléticas.*, in *Tesis doctoral*, U.d. Chile, Editor. 2013.
16. McBride, H.M., M. Neuspiel, and S. Wasiak, *Mitochondria: more than just a powerhouse*. Current biology, 2006. **16**(14): p. R551-R560.
17. Chintoh, A.F., et al., *Insulin resistance following continuous, chronic olanzapine treatment: an animal model*. Schizophrenia research, 2008. **104**(1-3): p. 23-30.
18. Albaugh, V.L., et al., *Olanzapine promotes fat accumulation in male rats by decreasing physical activity, repartitioning energy and increasing adipose tissue lipogenesis while impairing lipolysis*. Molecular psychiatry, 2011. **16**(5): p. 569.
19. Kowalchuk, C., et al., *In male rats, the ability of central insulin to suppress glucose production is impaired by olanzapine, whereas glucose uptake is left intact*. Journal of psychiatry & neuroscience: JPN, 2017. **42**(6): p. 424.
20. Hernández, D.P.D. and L.C.B. Herrera, *¿ Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular?* Iatreia, 2002. **15**(3): p. 179-189.
21. Gómez-Zorita, S. and A. Urdampilleta, *El GLUT4: efectos de la actividad física y aspectos nutricionales en los mecanismos de captación de glucosa y sus aplicaciones en la diabetes tipo 2*. Avances en Diabetología, 2012. **28**(1): p. 19-26.

22. Thorens, B. and M. Mueckler, *Glucose transporters in the 21st Century*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2009. **298**(2): p. E141-E145.