

ARTÍCULO

Estudio *in vitro* de las propiedades antioxidantes de olanzapina en neutrófilos humanos.



Franklin Vargas¹, Cristy León², Belén Betancourt², Kerly Pérez², Andrea Quezada², Luis E. Ojeda², Marla Paredes², Mait Velásquez², Germán Fraile².

RESUMEN

Existe suficiente evidencia para sugerir que la formación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede jugar un papel crítico en la etiología de la esquizofrenia. Además, se ha mostrado que los tratamientos *in vivo* con las drogas antipsicóticas atípicas, puede disminuir los marcadores de estrés oxidativo en la sangre. Sin embargo, un estudio previo indicó que la droga antipsicótica clozapina (CLZ) es tanto cebadora del estallido respiratorio como inhibidora de la apoptosis espontánea en los neutrófilos humanos (PMNs). Debido a esos hallazgos, el presente estudio se emprendió para evaluar los efectos de olanzapina (OLZ), una droga antipsicótica relacionada estructuralmente con CLZ, sobre la función y viabilidad de los PMNs. Resultados: Los efectos de OLZ fueron claramente diferentes a los reportados para CLZ. Por ejemplo, después del tratamiento con 20-50 $\mu\text{mol/L}$ OLZ, se observó una inhibición significativa del estallido respiratorio mientras que bajo idénticas condiciones, la apoptosis espontánea fue acelerada. Al contrario, cuando se añadió peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la apoptosis inducida fue inhibida de modo dosis-dependiente en el rango completo de concentraciones, mientras que cuando H_2O_2 fue generado intracelularmente, la apoptosis disminuyó solamente a 2 $\mu\text{mol/L}$ OLZ. Finalmente, mediante espectrofotometría se demostró que OLZ reacciona con cantidades equimolares de H_2O_2 o de ácido hipocloroso (HOCl). En su conjunto, estos resultados sugieren que OLZ es una droga antioxidante debido a que puede inhibir tanto la apoptosis inducida por ROS como el estallido respiratorio en los PMNs. Tales efectos se deben probablemente al secuestro extracelular de los ROS secretados.

Palabras clave: Olanzapina, neutrófilos, apoptosis, estallido respiratorio, cambio de forma.

In vitro study of olanzapine's antioxidant properties in human neutrophils.

Increasing evidence suggests that excessive free-radical formation may play a critical role in the etiology of schizophrenia. In addition, it has been shown that *in vivo* treatments with atypical antipsychotic drugs can decrease oxidative stress markers in blood. However, a previous *in vitro* report has indicated that the antipsychotic drug clozapine (CLZ) primes the respiratory burst, and also delays the spontaneous apoptosis of human polymorphonuclear cells (PMN). Based on such findings, the present study assessed the effects of olanzapine (OLZ), a CLZ-structurally related antipsychotic drug, on PMN function and viability. Results: the OLZ effects on PMN viability and function were clearly different from those previously reported for CLZ. For example, after treatment with 20-50 $\mu\text{mol/L}$ OLZ, a significant inhibition of the respiratory burst in activated PMN was observed whereas, under the same conditions, spontaneous apoptosis was accelerated. Conversely, when hydrogen peroxide (H_2O_2) was exogenously added, the PMN apoptosis was dose-dependently inhibited by OLZ in the entire range of concentrations; but, when H_2O_2 was intracellularly generated, the induced apoptosis was only decreased at 2 $\mu\text{mol/L}$ OLZ. Absorbance scans revealed that OLZ reacts with equimolar quantities of either H_2O_2 or hypochlorous acid (HOCl). Overall, results suggest that OLZ is an antioxidant agent because it can inhibit both ROS-induced PMN apoptosis and the respiratory burst. These effects are probably due to extracellular scavenging of released ROS.

Keywords: Olanzapine, neutrophils, apoptosis, respiratory burst, shape change

INTRODUCCION

Olanzapina (OLZ) es una droga antiesquizofrénica atípica que ha demostrado ser tan efectiva como los antipsicóticos tradicionales en el tratamiento de los llamados síntomas positivos de la enfermedad, pero generando menores efectos adversos. Aunque su eficacia como antipsicótico depende de sus propiedades bloqueadoras dopaminérgicas, los mecanismos de acción específicos por los cuales OLZ ejerce sus efectos terapéuticos, son desconocidos. En este sentido, se ha sugerido que para muchas enfermedades del sistema nervioso central, las drogas más efectivas tienen afinidades por numerosos blancos moleculares. Por ejemplo, se ha indicado que OLZ protege a las células PC12 (células derivadas de un feocromocitoma de rata) contra la apoptosis inducida por el ión N-metil-4-fenilpiridinio (MPP^+) (1). MPP^+ es un metabolito proveniente de la oxidación de N-metil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (un contaminante de la droga ilícita denominada "super heroína") que se ha identificado como el responsable de la degeneración de al-

¹ Laboratorio de Fotoquímica, Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC, Caracas.

² Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC), Facultad de Ciencias de la Salud-Sede Aragua, Maracay, Venezuela.

Correspondencia: Germán Fraile
E-mail: gfraile@interlink.net.ve
Tel.: +58-414-4919578
Telefax: +58-243-2425333

Recibido: Abril 2008

Aceptado: Julio 2008

ABSTRACT

gunas células neuronales y de los síntomas parkinsonianos en algunos drogadictos. Igualmente, OLZ también es capaz de inhibir la apoptosis de las células PC12 inducida por peróxido de hidrógeno (2). Estos hallazgos concuerdan con la noción de que la patogénesis de la esquizofrenia pueda estar relacionada con situaciones de estrés oxidativo (3). Mas recientemente, se demostró que clozapina (CLZ), una droga antipsicótica de estructura similar a OLZ, puede rescatar a los neutrófilos humanos (PMNs) de sufrir apoptosis espontánea *in vitro* (4). Este tipo de apoptosis, el cual representa un ejemplo clásico de muerte celular provocada por la remoción de una señal de supervivencia, ha sido propuesto que surge como consecuencia de la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (5). No obstante, también se demostró que la preincubación con CLZ induce un elevado incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que ocurre después de activar los PMNs con estímulos dependientes de receptores (4).

Sobre la base de los hallazgos mencionados, se llevó a cabo el presente estudio *in vitro* para determinar si OLZ puede afectar tanto la apoptosis espontánea como la inducida por estrés oxidativo de los PMNs. Además, se estudiaron los efectos de esta droga sobre el estallido respiratorio y el cambio morfológico que los PMNs experimentan después de ser activados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Olanzapina fue extraída a partir del medicamento comercial Ziprexa® (Laboratorio Eli Lilly, Inglaterra) mediante un extractor soxhlet usando etanol como solvente, purificando por cromatografía en capa fina y recrystalizando desde el mismo solvente. La pureza fue del 99% según datos de espectrometría de masas y de resonancia magnética de protones (^1H -RMN). Forbol miristato acetato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), glucosa oxidasa (de *Aspergillus niger*, 18.000 unidades/g) y luminol, fueron adquiridos de Sigma (St Louis, USA). Una solución 0,01 mol/L en peróxido de hidrógeno fue preparada a partir de una dilución de H_2O_2 al 30% en agua destilada. La solución balanceada de Hank (HBSS) se preparó mediante disolución del medio comercialmente disponible (Sigma).

Aislamiento de PMNs. Después del consentimiento y la debida información, la sangre venosa fue obtenida de donantes voluntarios saludables. Los PMNs se aislaron a partir de sangre anticoagulada con EDTA mediante un método de centrifugación diferencial previamente descrito (6). Las células separadas fueron suspendidas a una concentración de $1 \times 10^7/\text{mL}$ de HBSS.

Cultivo y tratamiento de las células. Para evaluar los efectos de larga duración (24 h), los PMNs (concentración final: 5×10^6 células/mL) suspendidos en un medio RPMI 1640 (pH

7,4) suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina (2 mM), 100 unidades/mL de penicilina y estreptomina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), fueron incubados por tiempos diferentes con OLZ (2-50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) o con el solvente (dimetil-sulfóxido, DMSO; concentración final: 1% v/v) a 37°C y 5% de CO_2 . En otros experimentos, los PMNs tratados con OLZ fueron incubados con PMA o con una mezcla de glucosa-glucosa oxidasa a diferentes dosis.

Quimioluminiscencia en los PMNs. Las muestras para las determinaciones de la quimioluminiscencia (QL) de los PMNs se prepararon añadiendo 50 μL de las suspensiones en RPMI de los PMNs tratados con OLZ, a una solución de HBSS suplementada con luminol (volumen total: 700 μL . Concentraciones finales: $3,6 \times 10^5$ PMNs/mL, 52 $\mu\text{mol}/\text{L}$ en luminol). La QL fue medida en un luminómetro Bio-Orbit 1251 (Labsystems Oy, Helsinki, Finlandia) usando tubos de polipropileno de 4 mL. Los tubos fueron equilibrados por 5 min a 37°C después de los cual se añadieron 50 μL de zimosan opsonizado (ZO; concentración final: 0,21 mg/mL), o 2,4 μL de PMA (concentración final: 0,22 $\mu\text{mol}/\text{L}$). La emisión de luz se registró a intervalos de 30 segundos y su intensidad se determinó mediante integración del área bajo la curva de QL versus tiempo (en mV.s) durante 30 min.

Opsonización de zimosan. Se hirvió una suspensión de zimosan en NaCl isotónico durante 1 h, se lavó tres veces por centrifugación y se suspendió en HBSS (3 mg/mL). La opsonización se llevó a cabo incubando 1 volumen de esa suspensión con 1 volumen de suero humano fresco por 30 minutos a 37°C . Luego, se lavó tres veces con HBSS antes de dividirlos en alícuotas y conservarlos a -80°C hasta el momento de su uso (7).

Cambio de forma de los PMNs. Este evento metabólico se evaluó mediante microscopía óptica. Después de 4 h ó 24 h de incubación, las suspensiones de los PMNs tratados con OLZ fueron sedimentados, resuspendidos en RPMI a 5×10^6 células/mL e incubados por 15 minutos en la presencia de fMLP (0,1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) a 37°C y 5% de CO_2 . Se fijaron las células con glutaraldehído al 2% y se evaluaron morfológicamente ya sea con "cambiadas" o esféricas.

Evaluación de la apoptosis de los PMNs mediante observación morfológica. Después de los diversos tratamientos, 150 μL de los PMNs (5×10^6 células/mL) fueron sedimentados (120 g, 6 minutos) sobre láminas de vidrio usando una citocentrífuga (Hermle, Z 323 K, Alemania). Las láminas se secaron al aire y se tiñeron con solución de Wright-Giemsa para la evaluación al microscopio. El porcentaje de células con cambios apoptóticos característicos (condensación nuclear, formación de vacuolas y de protuberancias) se evaluó contando al menos 300 PMNs/lámina con el uso de un objetivo 40X (Axiolab, Zeiss, Alemania).

Determinación de apoptosis en PMNs por citometría de flujo mediante la doble tinción con Annexina V/ioduro de propidio. Este ensayo se adaptó a partir del protocolo propuesto por McNamee y colaboradores (8), con algunas modificaciones. Brevemente, la sangre venosa fue recogida en tubos vacutainer heparinizados (BD Biosciences, San Jose, CA). La sangre completa de cada donante fue diluida 1:10 con RPMI (concentración final de leucocitos: $0,5-1,0 \times 10^6$ células/mL) y fracciones de 1 mL fueron transferidas en placas de cultivo de 10 mm. Olanzapina, a una concentración final entre 2 y 50 $\mu\text{mol/L}$, se añadió a los cultivos de sangre completa, los cuales fueron incubados a 37°C y 5% CO_2 durante 24 h. Se removieron alícuotas de 1 mL desde cada pozo de cultivo para el análisis por citometría de flujo. Para medir la apoptosis de los PMNs, se añadió 1 mL de la sangre diluida a un tubo del citómetro y se centrifugó a $250 \times g$. Se removió el sobrenadante y se añadieron 1,5 mL de solución de lisis de NH_4Cl a cada tubo y se incubó a T ambiental por 15 min. Se centrifugaron las muestras por 6 min a $250 \times g$ y se lavaron 2 veces con 2 mL de PBS. Las células fueron resuspendidas en 100 μL del buffer unión 1x de Annexina V (BD Biosciences, San Jose, CA) y fueron marcadas para la detección de las células apoptóticas mediante la adición de 5 μL de Annexina V-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA). Inmediatamente antes del análisis en el citómetro (FACSCanto, BD Biosciences, San Jose, CA), se añadieron 2 μL de iodo de propidio (PI) (1 mg/mL) (BD Biosciences, San Jose, CA) a cada muestra. Los PMNs se identificaron por su patrón de dispersión hacia adelante y lateral (forward-/side scatter). Las células apoptóticas se identificaron como Annexina V positivas.

Seguimiento de la reacción de OLZ con H_2O_2 y con HOCl. Soluciones equimolares (100 $\mu\text{mol/L}$) de OLZ y H_2O_2 o con hipoclorito de sodio (NaOCl) fueron preparadas en PBS pH 6,0 y mezcladas en cubetas de cuarzo. Se midieron los espectros de un modo repetitivo cada 30 s en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 35.

Tratamiento estadístico de los resultados. Todos los valores fueron expresados como el promedio $\pm$ S.E.M de al menos 3 ensayos diferentes. Se empleó un análisis de varianza de una sola vía ($p < 0,05$) y una prueba de comparación de los promedios de las condiciones experimentales contra el control (Dunnett, $p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efectos de OLZ sobre la viabilidad de los PMNs. Para examinar los efectos de OLZ sobre la muerte de los PMNs, las células aisladas fueron incubadas durante 24 h y analizadas por el método de exclusión de azul tripano (necrosis) o mediante tinción de Wright-Giemsa (apoptosis). Además, para evitar artefactos *in vitro* provocados por la purificación de las células, se investigó la apoptosis en sangre completa mediante un análisis por citometría de flujo. La figura 1

muestra que en PMNs aislados, la necrosis no fue alterada de modo significativo (Fig 1A), mientras que la apoptosis espontánea fue acelerada de un modo dosis-dependiente (Fig 1B). En contraste, el análisis por citometría de flujo no mostró efecto significativo alguno (fig 1C). Estos hallazgos contradictorios podrían atribuirse al empleo de PMNs purificados versus el uso de un ensayo de sangre completa con la presencia añadida de varias citocinas y otros tipos celulares incluyendo linfocitos y monocitos. Alternativamente, es posible que la presencia de albúmina u otros agentes competitivos en la sangre completa puedan explicar la ausencia de efectos de OLZ sobre la apoptosis de los PMNs. En este sentido, se ha reportado que *in vivo*, OLZ se enlaza predominantemente con la albúmina y con la alfa-1-glicoproteína ácida (9). Estos resultados son claramente contrastantes con los previamente reportados para clozapina, cuyos efectos antiapoptóticos fueron notables (4). Este es un tópico que amerita ser investigado en detalle, debido a que podría guardar relación con las diferencias terapéuticas entre ambas drogas

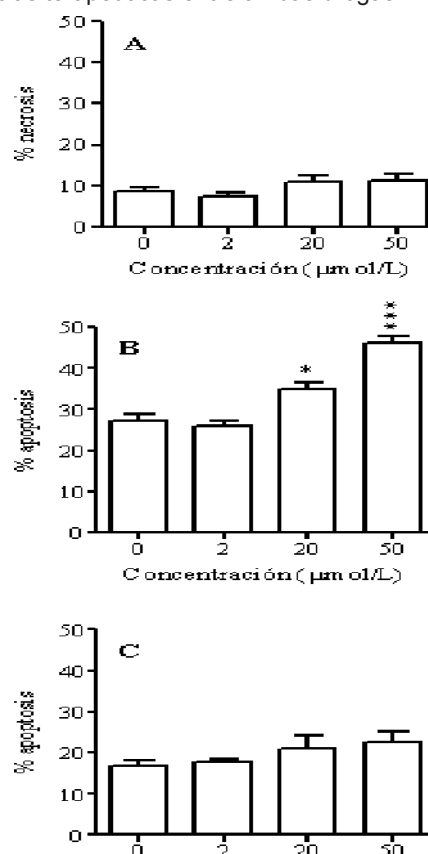


Fig.1. Muerte celular dosis-dependiente de PMNs tratados con OLZ. Se muestran los porcentajes de necrosis (A) y apoptosis (B) cuando los PMNs aislados ($1 \times 10^6/\text{mL}$) fueron incubados con el medio o con OLZ durante 24 h. La necrosis se evaluó por el método de exclusión de azul tripano y la apoptosis mediante observación morfológica. El porcentaje de PMNs apoptóticos en sangre completa (C) se determinó mediante citometría de flujo (Annexina V + iodo de propidio). Los datos representan el promedio $\pm$ S.E.M. de 5 experimentos. El análisis estadístico se hizo comparando incubaciones conteniendo concentraciones diferentes de OLZ, con respecto del control con el solvente: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

Efectos de OLZ sobre la funcionalidad de los PMNs. La quimioluminiscencia dependiente del luminol (LCL) fue empleada para evaluar la formación de especies reactivas de oxígeno en PMNs tratados con OLZ durante 4 o 24 h en el rango 0-50 $\mu\text{mol/L}$. Los activadores ZO, fMLP y PMA fueron seleccionados debido a que la apoptosis constitutiva de los PMNs está acompañada con un decrecimiento en la generación del anión superóxido si la estimulación depende de la presencia de receptores (ZO, fMLP) mientras que los PMNs apoptóticos preservan este evento metabólico si el estímulo no depende de receptores (PMA) (10). La figura 2 muestra que en PMNs activados con ZO o con PMA después del tratamiento con OLZ durante 4 o 24 h, la LCL fue disminuida significativamente. Sin embargo, en PMNs activados con fMLP, la LCL fue inhibida solamente a la concentración de 50 $\mu\text{mol/L}$, independientemente de los tiempos de incubación, mientras que adicionalmente, el perfil dosis-respuesta fue claramente diferente de aquellos observados con los otros estímulos.

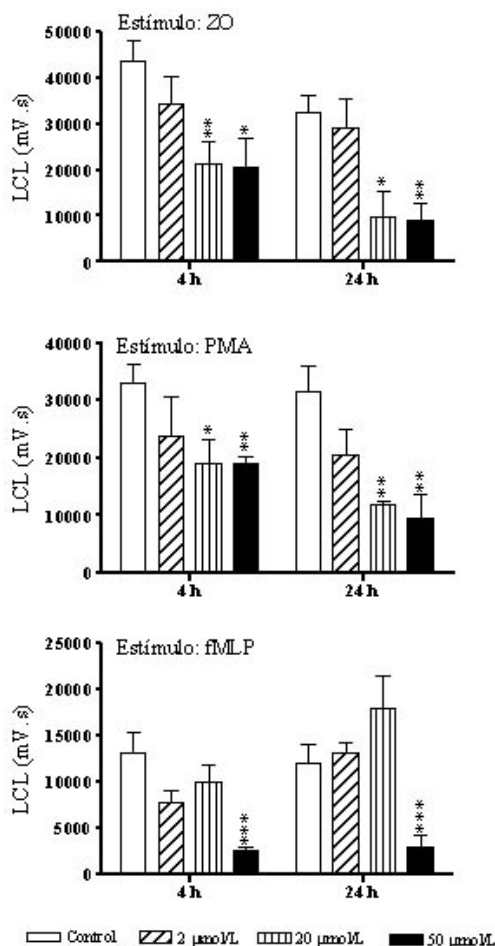


Fig.2. Efectos de diferentes concentraciones de OLZ sobre la LCL de PMNs (concentración final: 3.6×10^5 /mL) incubados por 4 h o 24 h antes de activarlos con ZO (0.21 mg/mL), PMA (0.22 $\mu\text{mol/L}$) o fMLP (0.57 $\mu\text{mol/L}$). Los datos representan los promedios obtenidos a partir de ocho donantes diferentes $\pm$ S.E.M. Las áreas bajo las curvas de LCL versus tiempo se calcularon sobre un período de 30 min (ZO, PMA) o 6 min (fMLP). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001, al comparar con los controles.

Aunque los hallazgos mencionados en el párrafo anterior son algo confusos, debe destacarse que en células productoras de especies reactivas de oxígeno tales como los PMNs, el anión superóxido (O_2^-) es generado por una NADPH oxidasa a partir del dioxígeno (O_2) y dismutado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la superóxido dismutasa (SOD). El peróxido de hidrógeno puede ser metabolizado a hipoclorito (OCl^-) por la mieloperoxidasa (MPO) o convertido al radical hidroxilo ($\text{HO}^\cdot$) mediante reacciones de Haber-Weiss o de Fenton (11). Por otra parte, se ha mostrado que la LCL de PMNs estimulados con fMLP refleja predominantemente la generación del radical hidroxilo ($\text{HO}^\cdot$) mientras que la LCL de PMNs estimulados por PMA o ZO, refleja fundamentalmente la formación del hipoclorito (OCl^-) y/o el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (12). Entonces, cabe suponer que la atenuación de la LCL en PMNs estimulados por PMA o por ZO proviene de una reacción directa de OLZ con H_2O_2 o con OCl^- . Esta posibilidad fue examinada mediante los registros de los cambios en los espectros ultravioleta que se observan durante las reacciones OLZ- H_2O_2 y OLZ- OCl^- . La figura 3 muestra que la adición de H_2O_2 o de OCl^- causó cambios notables en los espectros de absorción de OLZ, lo cual es indicativo de la formación de nuevos productos. Es interesante destacar que en ensayos similares, clozapina ha mostrado claras diferencias con OLZ. Por ejemplo, en un reciente estudio, se pudo observar una respuesta sustancialmente elevada en la LCL de los PMNs tratados con clozapina (20-50 $\mu\text{mol/L}$) y activados por ZO o fMLP (4). Es también notable que, en la ausencia de una peroxidasa activadora, clozapina no fue oxidada después de mezclar la droga con H_2O_2 sugiriendo que no hubo una reacción química directa entre las dos sustancias (13).

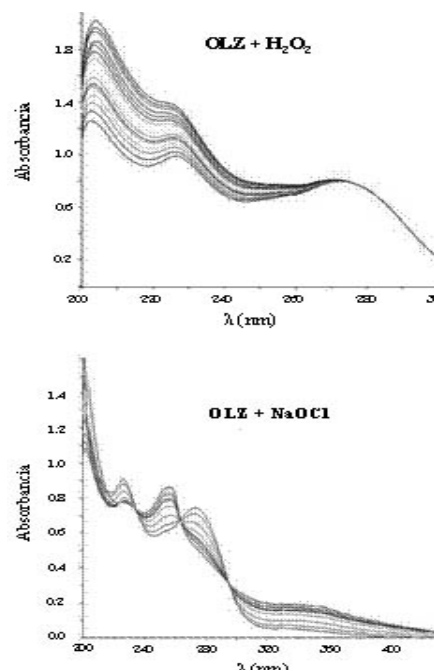


Fig.3. Espectros de absorción obtenidos después de mezclar cantidades equimolares (100 μM) de OLZ con peróxido de hidrógeno (arriba) o con hipoclorito de sodio (abajo). Las mediciones individuales se llevaron a cabo a intervalos de 30 s.

La polarización de los PMNs es un cambio característico que sufren estas células en respuesta a un estímulo quimiotáctico tal como el fMLP. En la figura 4 puede observarse que los PMNs tratados con OLZ generan respuestas complejas cuando se estimulan con 10 $\mu\text{mol/L}$ fMLP. Por ejemplo, en el ensayo de 4 horas, 2 $\mu\text{mol/L}$ OLZ indujo un ligero incremento en la polarización mientras que en el rango 20-50 μM , una inhibición dosis-dependiente fue evidente. En contraste, tras 24 h de incubación no se observó inhibición alguna. En realidad, a 20 $\mu\text{mol/L}$ OLZ, ocurrió una estimulación significativa, sugiriendo un efecto protector. Evidentemente, cuando los PMNs son activados por fMLP, los resultados obtenidos tanto en quimioluminiscencia como en cambio de forma son complejos y de difícil interpretación.

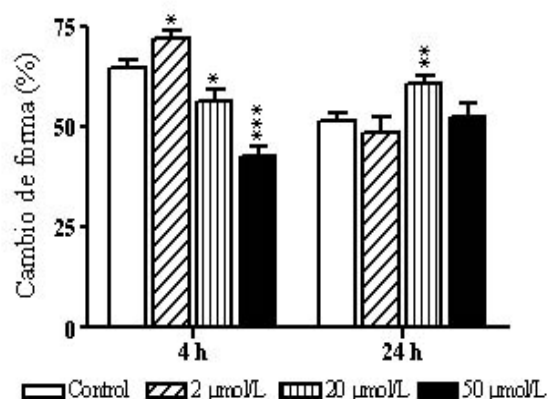


Fig. 4. Efectos de la preincubación con OLZ durante 4-24 h sobre los cambios morfológicos de los PMNs (concentración final: $3.6 \times 10^5/\text{mL}$) en respuesta a fMLP ($0.1 \mu\text{mol/L}$). Los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ S.E.M. de 5 experimentos. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Efectos de OLZ sobre la apoptosis inducida en PMNs por PMA o por H_2O_2 . Para determinar si OLZ podría alterar la apoptosis de los PMNs inducida por H_2O_2 generado intracelularmente, se empleó un protocolo que incluye un breve período de incubación (30 min) con PMA, seguido por lavados con el medio y re-incubación por otros 180 min. Se ha demostrado que este tratamiento conduce a la generación intracelular de H_2O_2 , mientras que la muerte no apoptótica fue minimizada mediante los lavados con el medio de cultivo (14). La figura 5A indica que PMA indujo un marcado efecto apoptótico sobre los PMNs en comparación con las células tratadas solamente con el medio ($P < 0.001$, $N=5$), mientras que en células co-incubadas con 2 $\mu\text{mol/L}$ OLZ, se observó una modesta inhibición. Además, los experimentos en paralelo llevados a cabo por el método de exclusión de azul tripano mostraron que OLZ no afectó el porcentaje de células necróticas.

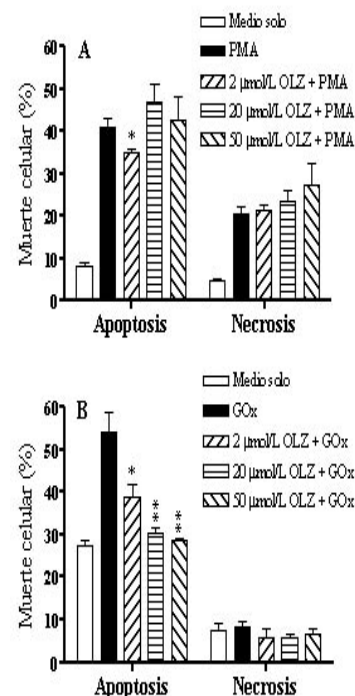


Fig. 5. Efectos de OLZ sobre la muerte de los PMNs después del tratamiento con PMA (A) o con glucosa + glucosa oxidasa (B). En (A), las células fueron expuestas a OLZ por 5 min antes de tratarlas con $0.05 \mu\text{mol/L}$ PMA o con el medio. Entonces, se lavaron y reincubaron por otras 3 h. En (B), las células ($1 \times 10^5/\text{mL}$) tratadas con OLZ fueron expuestas a 40 mili-unidades/mL de glucosa oxidasa (GOx), la cual genera aproximadamente $1.2 \text{ nmol de } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ por mL/min}$ durante 6 h. Luego, las células fueron teñidas con Wright-Giemsa). Los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ S.E.M. de 4 experimentos. La significancia estadística con respecto a los controles tratados con PMA o con GOx: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Para dilucidar el mecanismo exacto por el cual algunas drogas tales como clozapina y OLZ inducen neutropenia o agranulocitosis letal, se han diseñado muchos experimentos que revelan sus comportamientos frente a la oxidación en la presencia de algún agente activante añadido (peroxidasa de rábano o mieloperoxidasa) mas H_2O_2 o NaOCl (13, 15). Sin embargo, en el presente estudio, el interés se centró en examinar cuán susceptibles son los PMNs al H_2O_2 en ausencia de peroxidasas. Así, para evaluar los efectos de OLZ sobre los PMNs tratados con peróxido exógeno, se añadió rápidamente una porción (bolo) de H_2O_2 a las células. Bajo estas circunstancias, se observó un grado de variabilidad considerable con respecto a la viabilidad de los PMNs. En contraste, cuando las células fueron expuestas a un suministro lento, pero continuo de H_2O_2 a través de su generación enzimática por la mezcla glucosa-glucosa oxidasa, los resultados fueron reproducibles. La figura 5B muestra que este tratamiento indujo un efecto apoptótico significativo sobre los PMNs en comparación con el medio sólo ($P < 0.001$, $N=5$) mientras que la preincubación con OLZ en el rango 2-50 $\mu\text{mol/L}$ inhibió este efecto de un modo dosis-dependiente, sin afectar la inte-

gridad de la membrana plasmática. De nuevo, la atenuación de la apoptosis inducida por H_2O_2 en los PMNs tratados con OLZ, podría ser, al menos en parte, debida a efectos secuestradores de las especies reactivas de oxígeno. Debe destacarse que se han reportado resultados similares cuando las células PC12, tratadas con H_2O_2 , fueron expuestas a OLZ a concentraciones iguales o mayores que $100 \mu\text{mol/L}$ (2), sugiriendo adicionalmente que la reacción OLZ- H_2O_2 no genera productos tóxicos.

CONCLUSIONES

Los resultados expuestos sugieren que OLZ es capaz de comportarse como un agente antioxidante. En efecto, OLZ puede reaccionar con diferentes especies reactivas de oxígeno, tal como lo indican los ensayos de quimioluminiscencia en PMNs y de registros espectrales en sistemas libres de células. De particular interés es la capacidad de OLZ de inhibir la apoptosis de los PMNs mediada por H_2O_2 exógeno, debido a que esta droga mostró efectos similares cuando se añadió, a las mismas concentraciones, a las células neuronales PC12 tratadas con H_2O_2 (2). Por otra parte, los efectos de OLZ tanto sobre la apoptosis como sobre el estallido respiratorio de los PMNs, contrastan claramente con los reportados para clozapina. En este punto, no se puede precisar si esos efectos contrastantes pudieran estar relacionados con las diferencias en las propiedades tóxicas y terapéuticas de ambas drogas. En este sentido, para aclarar esta situación, se justifica plenamente llevar a cabo experimentos similares en otro tipos celulares del sistema inmune.

BIBLIOGRAFÍA

1. Qing H, Xu H, Wei Z, Gibson K, Li XM. The ability of atypical antipsychotic drugs vs. haloperidol to protect PC12 cells against MPP^+ -induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 2003; 17:1563-1570.
2. Wei Z, Bai O, Richardson JS, Mousseau DD, Li XM. Olanzapine protects PC12 cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *J. Neurosci. Res.* 2003; 73:364-368.
3. Herken H, Uz E, Ozyurt H, Sogut S, Virit O, Akyol O. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Mol. Psychiatry*, 2001; 6:66-73.
4. Vargas F, Rivas C, Perdomo H, Rivas A, Ojeda LE, Velásquez M, Correia H, Hernández A, Fraile G. Clozapine prevents apoptosis and enhances receptor-dependent respiratory burst in human neutrophils. *Pharmazie*, 2005; 60:364-368.
5. Scheel-Toellner D, Wang KQ, Webb PR, Wong SH, Craddock R, Assi LK, Salmon M, Lord JM. Early events in spontaneous neutrophil apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 2004; 32:461-464.
6. Eggleton P, Gargan R, Fisher D. Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. *J. Immunol. Methods*, 1989; 121:105-113.
7. Kroes BH, van den Berg AJ, Quarles van Ufford HC, van Dijk H, Labadie RP. Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Med.* 1992; 58:499-504.
8. McNamee JP, Bellier PV, Kutzner BC, Wilkins RC. Effect of proinflammatory cytokines on spontaneous apoptosis in leukocyte sub-sets within a whole blood culture. *Cytokine*, 2005; 31:161-167.
9. Callaghan JT, Bergstrom RF, Ptak LR, Beasley CM. Olanzapine. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile. *Clin. Pharmacokinet.* 1999; 37:177-193.
10. Whyte MK, Meagher LC, MacDermot J, Haslett C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J. Immunol.* 1993; 150:5124-5134.
11. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Rad. Biol. Med.* 2007; 42:153-164.
12. Takahashi R, Edashige K, Sato EF, Inoue M, Matsuno T, Utsumi K. Luminol chemiluminescence and active oxygen generation by activated neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991; 285: 325-330.
13. Gardner I, Zahid N, MacCrimmon D, Uetrecht JP. A comparison of the oxidation of clozapine and olanzapine to reactive metabolites and the toxicity of these metabolites to human leukocytes. *Mol. Pharmacol.* 1998; 53:991-998.
14. Lundqvist-Gustafsson H, Bengtsson T. Activation of the granule pool of the NADPH oxidase accelerates apoptosis in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 1999; 65:196-204.
15. Kohara T, Koyama T, Fujimura M, Tanaka H, Maeda J, Fujimoto T, Yamamoto I, Arita M. Y-931, a novel atypical antipsychotic drug, is less sensitive to oxidative phenomena. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 2002; 50:818-821.