



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**INIBIÇÃO DO TRANSITO GASTRINTESTINAL POR ANTISSICOTICOS:
ESTUDO EXPERIMENTAL DA CLOZAPINA**

ANDRÉ CORDEIRO MARQUES

FORTALEZA-CE

2015

ANDRÉ CORDEIRO MARQUES

**INIBIÇÃO DO TRANSITO GASTRINTESTINAL POR ANTISSÍCÓTICOS:
ESTUDO EXPERIMENTAL DA CLOZAPINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador (a):

Prof^a. Dra. Flávia Almeida Santos

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- M315i Marques, André Cordeiro.
Inibição do transito gastrintestinal por antipsicóticos: estudo experimental da clozapina./ André Cordeiro Marques. – 2015.
77 f.: il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Farmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Flávia Almeida Santos.
1. Clozapina. 2. Constipação Intestinal. 3. Receptor CB1 de Canabinoide. I. Título.

CDD 616.3428

ANDRÉ CORDEIRO MARQUES

**INIBIÇÃO DO TRANSITO GASTRINTESTINAL POR ANTISSICOTICOS:
ESTUDO EXPERIMENTAL DA CLOZAPINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador (a):

Prof^a. Dra. Flávia Almeida Santos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Flávia Almeida Santos (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Adriana Rolim Campos Barros

Universidade de Fortaleza

Profa. Dra. Danielle Macêdo

Universidade Federal do Ceará

"Se consegui ver mais além foi porque estava sentado nos ombros dos gigantes."

(Isaac Newton)

A Deus, por ter me provido de saúde, força e coragem para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Antônio Marques e Simone Maria Cordeiro Marques, pelo carinho, dedicação e incentivo nessa caminhada

Aos meus irmãos, Felipe e Tiago, por me apoiarem nos momentos mais importantes da minha vida

À minha esposa, Krsna e ao meu filho Pedro, pela compreensão e presença constante

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Flávia Almeida Santos, pela oportunidade, orientação, amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao, pela importante contribuição neste trabalho.

Aos meus familiares e amigos que me incentivaram e me deram força para esta conquista.

Às doutorandas Talita Cavalcante e Ana Flávia Viana, pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos bolsistas de iniciação científica Bruno Rodrigues, Iury Nunes, Raphaela Jerônimo, Ítalo Bonfim, Solimar Parente, Ana Virgínia e Karina Moura pela contribuição nos experimentos.

Aos técnicos de laboratório Aguinéa Rocha e Felipe Rodrigues, pela organização do laboratório e pela contribuição nos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pelo apoio indispensável.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro, de extrema importância para realização deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta colaboraram no desenvolvimento desta pesquisa e para esta realização pessoal.

RESUMO

INIBIÇÃO DO TRANSITO GASTRINTESTINAL POR ANTIPSICOTICOS: ESTUDO EXPERIMENTAL DA CLOZAPINA. André Cordeiro Marques. Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, 2015.

A eficácia da clozapina (CLZ) como um agente antipsicótico atípico foi reconhecida desde o início dos anos 1960, sendo ainda nos dias atuais a droga de escolha no tratamento de casos de esquizofrenia refratários a outros antipsicóticos. Dentre os efeitos adversos da CLZ, a constipação é relatada com frequência, podendo progredir para obstrução intestinal, necrose intestinal, sepse intrabdominal e morte. O presente estudo avaliou o mecanismo de ação da CLZ sobre a motilidade gastrintestinal através da análise da taxa de trânsito intestinal (TI) e da excreção de pelotas fecais em camundongos. Foram utilizados camundongos Swiss, machos, peso 25-30g, provenientes do Biotério Central da UFC e o projeto foi aprovado pela CEPA/UFC (Proc. No. 57/2014). As drogas utilizadas foram: CLZ (2,5; 5; 10; 20mg/kg), neostigmina (NEO, 1mg/kg i.p.), serotonina (5-HT, 10mg/kg v.o.), alilisitocianato (AITC 10mg/kg v.o.), domperidona (DOM, 20mg/kg v.o.), L-NAME (80 mg/kg i.p.), naloxona (2mg/kg s.c.), glibenclamida (5mg/kg i.p.) e AM251 (1mg/kg i.p.). A administração oral de CLZ 10 e 20 mg/kg reduziu significativamente ($p<0,05$) o transito gastrintestinal (TI) em relação ao veículo a partir desse resultado optou-se pela menor dose efetiva de CLZ sobre a função motora intestinal para as avaliações subsequentes. A CLZ 10mg/kg reduziu significativamente ($p<0,05$) a excreção de pelotas fecais. O pré-tratamento com naloxona (antagonista opióide), com DOM (antagonista dopaminérgico), ou com L-NAME (inibidor da oxido nítrico sintase) não inibiu efeito da CLZ (10mg/kg) sobre o transito intestinal. Contudo o pré-tratamento com a NEO (anticolinesterásico), com 5-HT, com o AITC (agonista TRPA1), com a glibenclamida (bloqueador de canais de potássio ATP dependentes) ou com o AM251 (antagonista CB1) reduziram significativamente ($p<0,05$), o efeito da CLZ sobre o TI. Enquanto o AM 251 inibiu completamente o efeito da CLZ sobre o TI, este não alterou o efeito da CLZ sobre a excreção de pelotas fecais. O efeito da CLZ sobre o transito gastrintestinal e sobre a expulsão de pelotas fecais são característicos de seu efeito de constipação e consistente com as observações clínicas em pacientes esquizofrênicos tratados com CLZ. Podemos concluir que a CLZ inibe a função motora gastrintestinal através de um mecanismo de ação multifatorial envolvendo a modulação de vários neurotransmissores dentre aqueles avaliados no presente estudo ressalta-se uma ação inibitória da clozapina sobre as vias colinérgicas, serotoninérgicas e de canais de cátions TRPA1 e excitatória sobre os canais de cátions sensíveis ao ATP e receptores CB1.

Palavras-chave: Clozapina, antipsicóticos atípicos, sistema endocanabinóide, constipação, trânsito gastrintestinal, receptores CB1

ABSTRACT

IMPAIRED GASTRINTESTINAL MOTOR FUNCTION INDUCED BY ANTIPSYCHOTICS, AN EXPERIMENTAL ASSAY ON CLOZAPINE. André Cordeiro Marques. Master's thesis in Pharmacology. Federal University of Ceará, in 2015.

Clozapine (CLZ) an atypical antipsychotic agent recognized for its efficacy since the early 1960s stills nowadays the drug of choice in treating refractory schizophrenia cases to other antipsychotics. Among the adverse effects of CLZ, constipation, often reported, may progress to bowel obstruction, intestinal necrosis, intraabdominal sepsis and death. This study evaluated the mechanism of action of CLZ on gastrointestinal motility by analyzing the intestinal transit rate (IT) and excretion of fecal pellets in mice. Animals used were Swiss males, weight 25-30g, from the UFC Central Animal Facility and the project approved by the CEPA / UFC (Proc. No. 57/2014). The drugs used were: CLZ (2.5, 5, 10, 20mg/kg p.o.), neostigmine (NEO 1mg /kg i.p.), serotonin (5-HT, 10mg/kg p.o.), alilisotiocianate (AITC 10mg/kg p.o.) , domperidone (DOM 20mg/kg p.o.), L-NAME (80 mg/kg i.p.), naloxone (2 mg/kg s.c.), glibenclamide (5 mg/kg i.p.) and AM251 (1 mg/kg i.p.). Oral administration of CLZ 10 and 20 mg/kg significantly ($p < 0.05$) inhibited IT from the vehicle. Based on the results we decided for the smallest effective dose of CLZ active on intestinal motor function (10mg/kg) for subsequent evaluations. The CLZ inhibited significantly ($p < 0.05$) the excretion of fecal pellets. Pretreatment with naloxone (opioid antagonist), DOM (dopamine antagonist) or with L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) did not inhibit the effect of CLZ (10mg / kg) on gastrointestinal transit. However pretreatment with NEO (anticholinesterasic agent) with 5-HT, with the AITC (TRPA1 agonist), with glyburide (blocker dependent ATP potassium channel) or with AM251 (CB1 antagonist) inhibited significantly ($p < 0.05$), the effect of CLZ on IT. While the AM 251 inhibited completely the effect of CLZ on IT, it does not alter the effect of CLZ on the excretion of fecal pellets. The effect of CLZ on the gastrointestinal transit and the expulsion of fecal pellets are characteristic of its constipation side effect, consistent with clinical observations in schizophrenic patients treated with CLZ. We can conclude that CLZ inhibits gastrointestinal motor function through a multifactor mechanism of action, involving the modulation of various neurotransmitters among those evaluated in this study points to an inhibitory effect of clozapine on cholinergic and serotonergic pathways and cation channels TRPA1 and excitatory on the ATP sensitive cation channel and on CB1 receptors

Keywords: Clozapine, atypical antipsychotics, endocannabinoid system, constipation, gastrointestinal transit, CB1 receptors

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
Figura 1 –	Relação entre neurônios entéricos e sistema nervoso central.....	19
Figura 2 –	Modelo de reflexo peristáltico gastrintestinal no camundongo.....	21
Figura 3 –	Varicosidade colinérgica excitatória.....	22
Figura 4 –	Varicosidade inibitória.....	23
Figura 5 –	Fórmula molecular estrutural da clozapina.....	28
Figura 6 –	Efeito da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.....	45
Figura 7 –	Investigação da participação da acetilcolina (ACh) e dos receptores colinérgicos no mecanismo de ação da clozapina sobre o trânsito gastrintestinal em camundongos.....	47
Figura 8 –	Investigação da participação da serotonina (5-HT) sobre a inibição do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.....	48
Figura 9 –	Investigação da participação dos receptores TRPA1 sobre a redução do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.....	49
Figura 10 –	Investigação da participação dos receptores dopaminérgicos no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.....	51
Figura 11 –	Investigação da participação do óxido nítrico no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.....	52
Figura 12 –	Investigação da participação dos receptores opióides no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.....	53
Figura 13 –	Investigação da participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP no mecanismo de ação da clozapina sobre o trânsito gastrintestinal em camundongos.....	55
Figura 14 –	Participação dos receptores canabinóides CB1 no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
Tabela 1 – Efeito da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.....		45
Tabela 2 – Investigação da participação da acetilcolina (ACh) e dos receptores colinérgicos no mecanismo de ação da clozapina sobre o trânsito gastrintestinal em camundongos.....		47
Tabela 3 – Investigação da participação da serotonina (5-HT) na inibição do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.....		48
Tabela 4 – Investigação da participação dos receptores TRPA1 sobre a redução do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.....		49
Tabela 5 – Investigação da participação dos receptores dopamínérgicos no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.....		51
Tabela 6 – Investigação da participação do óxido nítrico no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.....		52
Tabela 7 – Investigação da participação dos receptores opióides no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.....		53
Tabela 8 – Investigação da participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP no mecanismo de ação da clozapina sobre o trânsito gastrintestinal em camundongos.....		55
Tabela 9 – Participação dos receptores canabinóides CB1 no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.....		56
Tabela 10 – Efeitos da clozapina e AM251 sobre 3h de excreção cumulativa de pelotas fecais em camundongos.....		57

LISTA DE SIGLAS

μ L	Microlitro
μ g	Micrograma
μ M	Micromol
5-HT	Serotonina
5-HTR	Receptor de serotonina
ACh	Acetilcolina
AP	Antipsicóticos
APG	Antipsicóticos de primeira geração
ASG	Antipsicóticos de segunda geração
RAChM	Receptor muscarínico de acetilcolina
RAChN	Receptor nicotínico de acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CB ₁	Receptor canabinóide tipo 1
CB ₂	Receptor canabinóide tipo 2
CCK	Colecistocinina
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CMM	Complexo motor migratório
CPK	Creatinofosfoquinase
DA	Dopamina
DAE	Drogas antiepilepticas
DRD2	Receptores dopaminérgicos tipo 2
ECC	Células enterocromafins
ECS	Sistema endocannabinóide
EPM	Erro padrão da média
ERT	Esquizofrenia resistente ao tratamento
et al.	e colaboradores
ex.	Exemplo
g	Gram
GI	Gastrintestinal

h	Hora
i.p.	Via intra-peritoneal
IPAN	Neurônio aferente primário intrínseco
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação da serotonina
Kg	Kilograma
K _{ATP}	Canais de potássio ATP-dependentes
L NAME	Ng-nitro-L-arginina-metilester
mg	Miligramma
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimol
NE	Noradrenalina
ng	Nanograma
NMD	Núcleo motor dorsal do vago
NO	Óxido nítrico
NPY	Neuropeptídeo Y
PM	Plexo mioentérico
PS	Plexo submucoso
p	Nível de confiança
s.c.	Via subcutânea
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNE	Sistema nervoso entérico
SNM	Síndrome neuroléptica maligna
SP	Substancia P
TGI	Trato gastrintestinal
TI	Trânsito intestinal
TRPA1	Receptor de potencial transiente ankirina tipo 1
TRPV1	Receptor de potencial transiente vanilóide tipo 1
EUA	Estados Unidos da América
UFC	Universidade Federal do Ceará
v.o.	Via oral
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Motilidade Gastrintestinal.....	17
1.2. Antipsicóticos e a inibição da Motilidade Gastrintestinal.....	26
1.3. Clozapina.....	28
1.4. Justificativa.....	33
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivo Geral.....	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
3. MATERIAIS	37
3.1. Animais experimentais.....	37
3.2. Aparelhos.....	37
3.3. Drogas e reagentes.....	37
4. MÉTODOS.....	38
4.1. Avaliação do Transito Gastrintestinal em camundongos.....	38
4.1.1. Efeito da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos...	38
4.1.2. Avaliação do efeito dos receptores colinérgicos sobre a inibição do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.....	39
4.1.3. Investigação da participação da serotonina (5-HT) sobre a inibição do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.....	39
4.1.4. Avaliação da participação dos receptores TRPA1 sobre a inibição do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.....	40
4.1.5. Avaliação do efeito dos receptores dopaminérgicos sobre a inibição do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos....	40
4.1.6. Avaliação do efeito dos receptores de óxido nítrico sobre o retardo do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.....	40
4.1.7. Avaliação do efeito dos receptores opióides sobre a inibição do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.....	41
4.1.8. Avaliação da participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP sobre o retardo do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.....	41
4.1.9. Avaliação do efeito dos receptores canabinóides CB1 sobre o retardo do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.....	42
4.2. Avaliação da excreção de pelotas fecais em camundongos.....	42
4.2.1. Efeito da clozapina e do AM251 sobre a excreção de pelotas fecais em camundongos.....	41
5. ANÁLISE ESTATISTICA.....	43
6. RESULTADOS.....	45
6.1. Avaliação do transito gastrintestinal em camundongos.....	45
6.1.1. Efeito da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos...	45

6.1.2. Investigaçāo da participação dos receptores colinérgicos sobre a redução do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.....	46
6.1.3. Investigaçāo da participação da serotonina (5-HT) sobre a inibição do trānsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.....	46
6.1.4. Investigaçāo da participação dos receptores de corticoesteróides sobre o retardo no transito gastrintestinal induzido pela clozapina em camundongos.....	46
6.1.5. Investigaçāo da participação dos receptores dopaminérgicos no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.....	50
6.1.6. Investigaçāo da participação do óxido nítrico no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.....	50
6.1.7. Investigaçāo da participação dos receptores opioides no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.....	50
6.1.8. Investigaçāo da participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP no mecanismo de ação da clozapina sobre o trānsito gastrintestinal em camundongos.....	54
6.1.9. Investigaçāo da participação dos receptores canabinóides CB1 no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.....	54
6.2. Avaliação da excreção de pelotas fecais em camundongos.....	57
6.2.1. Efeito da clozapina e do AM251 sobre a excreção de pelotas fecais em camundongos.....	57
7. DISCUSSĀO.....	59
8. CONCLUSĀES.....	67
REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS.....	69

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Motilidade Gastrintestinal (GI)

A motilidade GI é definida como importante função do sistema digestório no transporte e mistura do alimento em proporções adequadas para uma exposição otimizada do mesmo às enzimas digestivas. O controle da motilidade GI é regulado por uma complexa rede neuronal autonômica intrínseca, o sistema nervoso entérico (SNE) e extrínseca através de neurônios simpáticos e parassimpáticos e do sistema endócrino (OLSSON; HOLMGREN, 2001). Langley classifica o SNE como sendo a terceira divisão do sistema nervoso autônomo (SNA), o qual mantém íntimas interconexões com as divisões simpática e parassimpática do SNA (GIBBINS, 2013). Uma complexa rede integrativa intrínseca capacita o SNE a funcionar independentemente do controle central e a manter a regulação das diferentes funções gastrintestinais. O SNE compreende os plexos nervosos intrínsecos de trato gastrintestinal (TGI) e divide-se em plexo mioentérico (PM), profundamente entre as camadas musculares circulares e longitudinais, e o plexo submucoso (PS) mais superficialmente na submucosa intestinal. O PM exerce atividade proeminente sobre a função motora GI, enquanto o PS regula a secreção, transporte de líquidos e fluxo sanguíneo GI. O SNE funciona como uma interface semi-autonômica entre estruturas mucosas, musculares e glandulares no TGI e o sistema nervoso central (SNC). Nos neurônios do SNE é possível identificar virtualmente todos os neurotransmissores e peptídeos presentes no SNC, incluindo a acetilcolina (ACh), serotonina (5-HT), óxido nítrico (NO), ATP, peptídeo vasoativo intestinal (VIP), substancia P (SP), neuropeptídio Y (NPY), neurocininas, leuencefalina, metencefalina, bombesina, noradrenalina (NA) e dopamina (DA), muitos dos quais tem suas funções ainda parcialmente determinadas (OLSSON; HOLMGREN, 2001).

A divisão parassimpática do SNA, através do X par craniano (nervo vago), inerva o TGI superior (esôfago, estomago e intestino delgado) onde faz sinapse com os neurônios pós-ganglionares nos plexos intramurais do SNE, os quais também recebem eferências simpáticas dos gânglios pré-vertebrais e paravertebrais. Da divisão sacral do SNA parassimpático partem fibras pré-ganglionares que fazem sinapses com os neurônios efetores entéricos, responsáveis pela inervação do TGI inferior (GIBBINS, 2013).

Com relação a função motora GI os sistemas simpático e parassimpático exercem ações antagônicas. A noradrenalina (NA), principal neurotransmissor do SNA simpático ativa de forma tônica os receptores adrenérgicos α_1 e β_2 , pós-sinápticos induzindo diminuição da motilidade GI e constrição dos esfíncteres durante o jejum (FURNESS, 2004), enquanto a estimulação de receptores α_2 pré-sinápticos inibe a liberação de NA. A acetilcolina (ACh), principal neurotransmissor parassimpático estimula de maneira fásica durante o período alimentar a motilidade GI ao ativar receptores colinérgicos muscarínicos nas junções neuromusculares e nicotínicos neuronais periféricos, centrais e ganglionares de maneira oposta ao SNA simpático (GIBBINS, 2013; HONS et al., 2013).

As terminações aferentes sensoriais do epitélio gastrintestinal, sensíveis a distensão, presença de bolo alimentar, agentes irritativos ou infecciosos presentes no lúmen intestinal, regulam a função motora GI (GIBBINS, 2013). Essas terminações enviam fibras aos plexos intramurais do SNE, gânglios pré-vertebrais parassimpáticos, medula espinhal ou tronco cerebral via nervo vago (Figura 1) de onde partem eferências capazes de modular a fisiologia do TGI.

Os neurônios aferentes intrínsecos primários (IPAN) do SNE são responsáveis pela neuromodulação sensorial local no TGI através de uma alça curta de ativação dos neurônios peptidérgicos excitatórios os quais expressam a substância P (SP) responsável por aumentar a contração muscular lisa e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) que promove vasodilatação (GIBBINS, 2013). A substância P liberada por neurônios entéricos estimula a despolarização e a geração de ondas lentas espontâneas pelas células intersticiais de Cajal e facilita a contração rítmica e espontânea do músculo liso intestinal. A ativação de neurônios entéricos inibitórios e a consequente liberação do óxido nítrico (NO) e do peptídeo vasoativo intestinal (VIP) amplifica a inibição da geração de ondas lentas espontâneas pelas células intersticiais de Cajal, inibindo a contração e promovendo relaxamento muscular intestinal (OLSSON; HOLMGREN, 2001).

As eferências centrais simpáticas e parassimpáticas partem dos gânglios pré-vertebrais e do núcleo motor dorsal do vago (NMD) respectivamente. A combinação das atividades simpáticas e parassimpáticas sobre o TGI diminuem ou aumentam a força e a intensidade das contrações musculares tónicas ou rítmicas e influenciam a diminuição ou o aumento da velocidade das ondas de contração excitatórias, respectivamente. Dessa forma o trânsito GI é determinado pela atividade autonômica simpática, parassimpática e entérica sobre o ritmo das

contrações musculares intestinais, a atividade esfincteriana GI e a peristalse gastrintestinal. (Figura 1). Para uma regulação adequada da função motora GI existe uma complexa coordenação entre neurotransmissores excitatórios e inibitórios nos diversos locais de sinapse entre o SNC, SNE e o músculo liso GI (ANNERINO et. al., 2012).

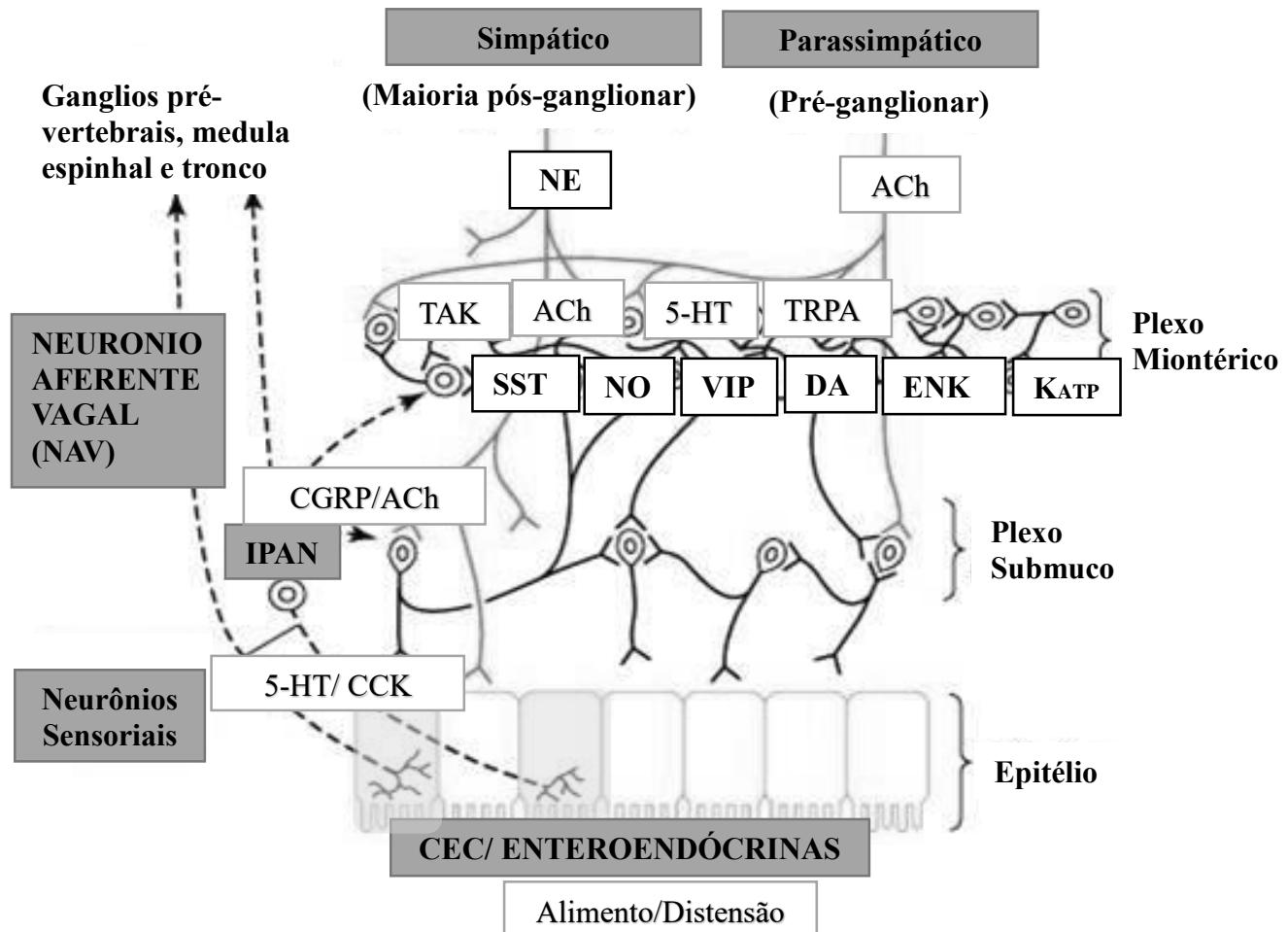


Figura 1 – Relação entre neurônios entéricos e sistema nervoso central (SNC). Aferências sensoriais ativam eferências simpáticas e parassimpáticas através de via reflexas longas diretamente ao SNC e gânglios pré-vertebrais e via reflexas curtas ao SNE (Plexos mioentérico e submucoso) (Modificado de Guyton; Hall, 2006).

Diferentes padrões motores GI são resultantes de uma complexa interação entre neurônios pós-ganglionares simpáticos, pré-ganglionares parassimpáticos, aferências sensório motoras, células endócrinas na mucosa GI, células intersticiais de cajal, neurônios entéricos e músculo liso intestinal. O complexo motor migratório (CMM) predomina durante o jejum e mantém o trofismo GI e o equilíbrio da flora bacteriana intestinal, evitando a proliferação de microrganismos patogênicos entre os períodos de alimentação.

O controle endócrino da motilidade GI ocorre através da síntese e liberação de neuropeptídios a partir do próprio TGI e glândulas anexas que vão exercer sua atividade localmente ou à distância sobre a função motora GI. A gastrina produzida por células endócrinas na mucosa estomacal, a colecistocinina (CCK) duodenal, o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP) e neuropeptídio Y retardam o esvaziamento gástrico, e atuam na manutenção do trofismo gastrointestinal através do complexo motor migratório GI, enquanto a grelina gástrica e a insulina hepática aceleram o esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal (MARATHE et. al., 2011).

Durante a fase alimentar diferentes padrões motores são ativados. A antecipação da alimentação, a visão, o odor do alimento ou sua mastigação e deglutição promovem relaxamento receptivo e esvaziamento gástrico. A presença alimentar no TGI e a consequente atividade autonômica central e periférica sobre o TGI coordenam a ocorrência da peristalse intestinal e das contrações misturadoras ou estáticas que caracterizam essa fase da motilidade GI (Figura 2).

. Interneurônios excitatórios projetam-se em direção oral e liberam ACh, taquicininas como a substância P e neurocininas, estimulando neurônios motores colinérgicos e a consequentemente contrações musculares ascendentes em direção oral. De forma oposta interneurônios descendentes liberam óxido nítrico e VIP inibindo neurônios motores colinérgicos ou agindo diretamente sobre o músculo liso intestinal, promovendo consequente relaxamento muscular em direção aboral

Na junção efetora do músculo liso GI, acetilcolina (ACh), serotonina (5-HT) e taquicininas apresentam na maioria das vezes atividade excitatória sobre a motilidade GI (Figura 3). Neurotransmissores como VIP, GABA, ATP e NO exercem geralmente uma ação inibitória sobre a atividade motora GI (Figura 4).

A ação desses e outros neurotransmissores sobre o músculo liso GI é efetivada através da mobilização do cálcio extracelular, condutância do potássio intracelular e dos níveis de AMPc e GMPC intracelular. Essa variabilidade de respostas depende dos receptores presentes nas células-alvo e da co-transmissão de neuromoduladores na fenda sináptica. (OLSSON; HOLMGREN, 2001). A dopamina, o ATP, encefalinas, e neuropeptídio Y, bombesina e outros peptídeos biologicamente ativos também participam nessa integração do SNE e TGI (GIBBINS, 2013).

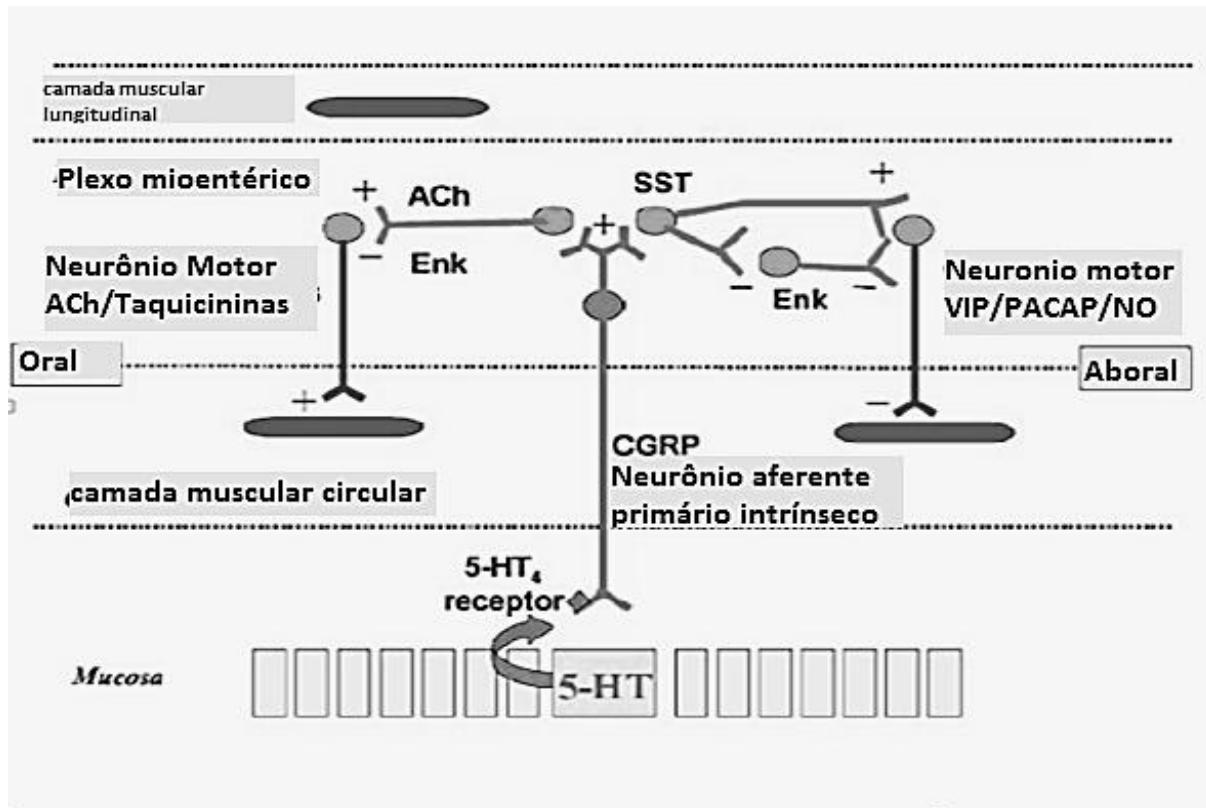


Figura 2 – Modelo de reflexo peristáltico gastrintestinal no camundongo. Estimulação mucosa (ex. passagem do alimento), liberação de serotonina (5-HT) pelas células enterocromafins (ECC), ativação dos receptores 5-HT₄ em neurônios aferentes primários (IPAN). IPAN's através do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) ou acetilcolina (ACh). A estimulação das vias ascendentes excitatórias e descendentes inibitórias e inibição de interneurônios inibitórios encefalinérgicos resulta em contração da camada muscular circular em direção oral e relaxamento em direção aboral pela ação de neurônios motores excitatórios, via ACh e taquicininas (TK) e inibitórios via liberação de óxido nítrico (NO), peptídeo vasoativo intestinal (VIP) e polipeptídeo pituitário ativados de adenilato ciclase (PACAP), respectivamente (Modificado de GRIDER, 2003).

A Serotonina (5-HT) é um dos principais neurotransmissores envolvidos na regulação da função motora intestinal. 95% do total de serotonina de todo o organismo é encontrada no TGI (GERSHON, 2013). A serotonina é responsável por eliciar potenciais excitatórios pós-sinápticos rápidos ou lentos em neurônios entéricos a depender do microambiente farmacológico intestinal. A estimulação serotoninérgica dos neurônios excitatórios ou inibitórios periféricos vai promover através da liberação de mediadores químicos contração ou relaxamento do músculo liso intestinal em direção oral ou aboral respectivamente (MAWE; HOFFMAN, 2013). A síntese e armazenamento da 5-HT ocorre principalmente nas células enterocromafins (ECC) da mucosa gástrica e do intestino delgado e em neurônios do PM sendo co-armazenada em vesículas é liberada juntamente com hormônios ou neuropeptídos entre os quais a somatostatina (SST), SP, encefalinas e VIP (MCLEAN et. al., 2007; GERSHON, 2013).

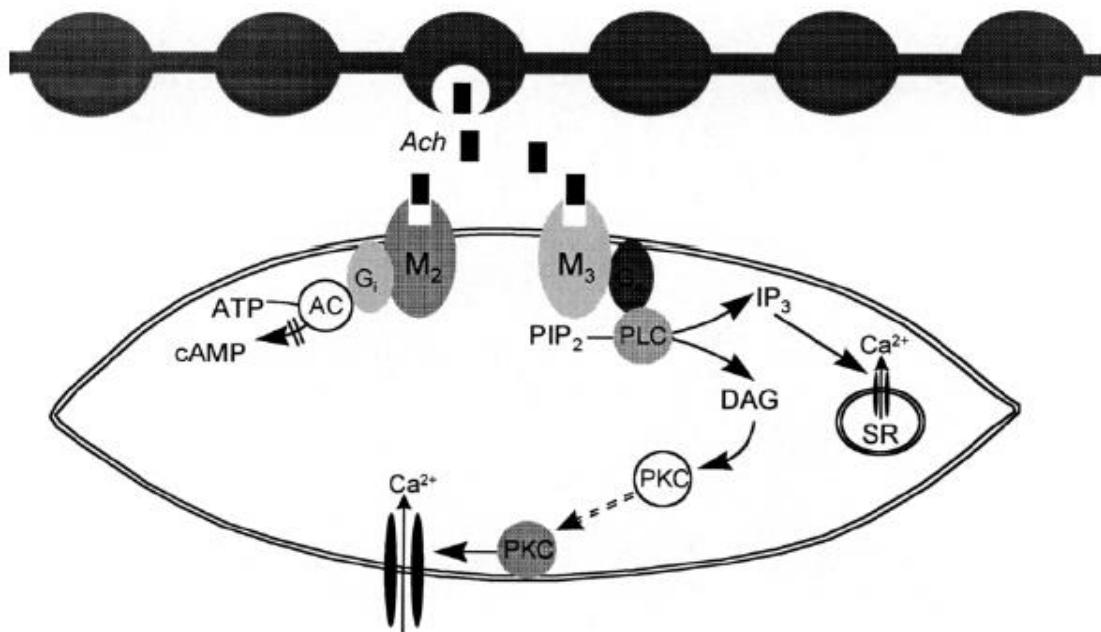


Figura 3 – Varicosidade colinérgica excitatória no músculo liso intestinal, ACh, acetilcolina; M₂ e M₃, receptores colinérgicos muscarínicos; G, proteína G; ATP, trifosfato de adenosina; cAMP, adenosina monofosfato cíclico; AC, adenilato ciclase; PIP, fosfatidil inositol; PLC, fosfolipase C; IP₃, trifosfato de inositol; DAG, diacilglicerol; SR, retículo sarcoplasmático; PKC, fosfoquinase C (OLSSON; HOLMGREN, 2001).

A 5-HT apresenta funções neurotransmissoras e parácrinas em resposta a presença de bolo alimentar, agentes irritantes (quimioterápicos), toxinas microbianas no lúmen intestinal e atua como iniciador e promotor do peristaltismo (GERSHON e TACK, 2007). Receptores neuronais serotoninérgicos 5-HT₃ centrais disparam o reflexo do vômito e perifericamente em interneurônios induzem aumento do peristaltismo GI. Receptores 5-HT₄, 5-HTR₂ e 5-HT_{1p} expressos em neurônios motores no PM e junções efetoras periféricas modulam a peristalse GI (Figura 4) e o esvaziamento gástrico (KUEMMERLE et. al., 1995). Receptores 5-HT₇, presentes em interneurônios descendentes modulam a atividade inibitória de neurônios motores sobre o músculo liso intestinal em direção aboral, inibindo a liberação de acetilcolina nas varicosidades do músculo liso intestinal ou liberando neurotransmissores inibitórios como o óxido nítrico. (GERSHON, 2013).

A dopamina age sobre receptores DRD2 periféricos em todo o TGI exercendo efeito inibitório sobre a motilidade GI, promovendo o relaxamento do esfíncter esofágico inferior e redução da pressão intragástrica suprimindo a liberação de ACh pelos neurônios mioentéricos

(GIBBONS; FARRUGIA 2004; ZHANG et al. 2012). A inibição da dopamina no SNC, via bloqueio dos receptores D₁ estimula a hiperexpressão de receptores D₂ e consequente inibição da motilidade GI (ANNERINO, 2012).

Entre os neurotransmissores não adrenérgicos e não colinérgicos (NANC) produzidos no SNE, o óxido nítrico (NO) tem importante papel inibitório na regulação da peristalse intestinal, esvaziamento gástrico e tônus esfincterianos no TGI (TAKAHASHI, 2003). Receptores opioides periféricos localizados em interneurônios do PM inibem a função motora GI e estão associados à constipação induzida pelo uso de analgésicos opioides (HAWKES et. al., 2002). Neuropeptídos como a substância P (SP), neurocinina A, bombesina e motilina exercem ação moduladora excitatória sobre o músculo liso GI. Exemplos de moléculas inibitórias da motilidade GI são peptídeo vasoativo intestinal (VIP), GABA e ATP. De sua ação coordenada ocorre a peristalse GI (OLSSON; HOLMGREN, 2001).

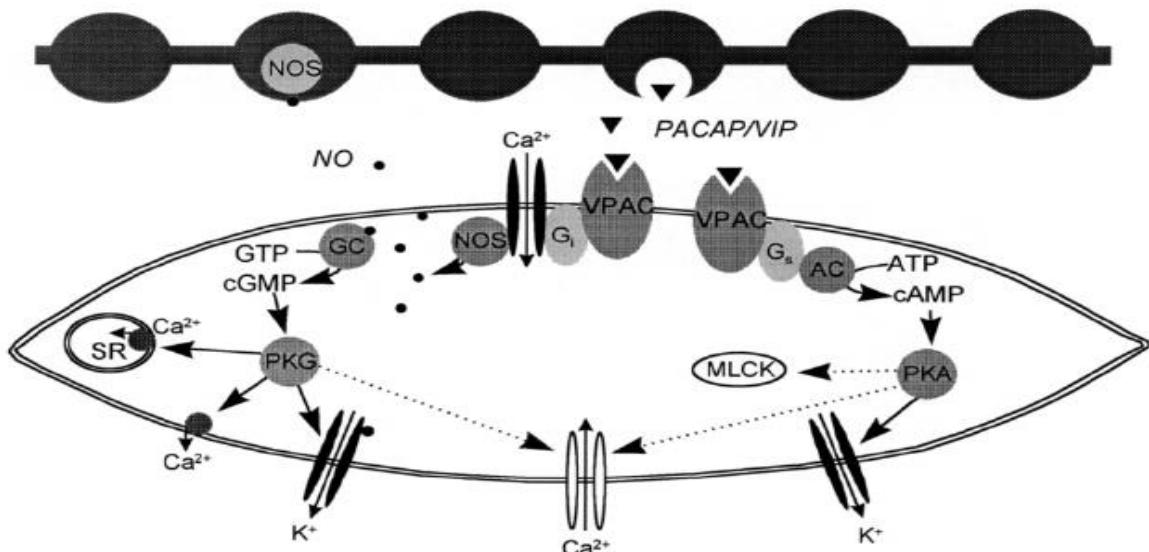


Figura 4 – Varicosidade inibitória no músculo liso intestinal, NO, óxido nítrico; PACAP, peptídeo pituitário ativador de adenilato ciclase; VIP, peptídeo vasoativo intestinal; G, proteína G; ATP, trifosfato de adenosina; cAMP, adenosina monofosfato cíclico; AC, adenilato ciclase; GTP, trifosfato de guanosina; cGMP, monofosfato de guanosina cíclico; PKG, fosfoquinase G; MLCK, quinase de cadeia leve de miosina; PKA, fosfoquinase A; SR, retículo sarcoplasmático (OLSSON; HOLMGREN, 2001).

Receptores de potencial transiente compõem uma família de canais de cátions não seletivos. Apresentam seis domínios transmembrana. Inicialmente estudos em não mamíferos geraram uma classificação em 5 subfamílias de acordo com similaridades estruturais (TRPA, TRPC, TRPM, TRPP, TRPV). Inicialmente identificado na cavidade oral tiveram sua função relacionada à transdução de sensações externas em sinais internos, regulando a interação com

o meio externo (alimento, clima, etc.). Estudos mais recentes utilizando bloqueadores ou agonistas farmacológicos tem elucidado seu papel na transdução de sinais dolorosos e no estudo da analgesia. Hoje sabe-se da distribuição destes receptores por todo o organismo, mediando as mais diferentes funções, incluindo a termogênese e a regulação do metabolismo energético (BLACKSHAW et.al., 2011; KANEKO; MORI et. al., 2011; SZALLASI, 2013).

No presente estudo abordamos em particular os receptores ankirina 1 de potencial transiente (TRPA₁), expressos no SNE em neurônios motores inibitórios, neurônios colinérgicos e aferentes intrínsecos e extrínsecos intestinais de camundongos (KANEKO; SZALLASI, 2013). Contribuem dessa forma para a modulação da motilidade GI estimulando diretamente a liberação de óxido nítrico nas varicosidades sinápticas entéricas ou indiretamente estimulando interneurônios inibitórios entéricos ou colinérgicos no SNE (POOLE et. al., 2011). Os receptores TRPA₁ presentes em células enteroendócrinas do tipo L são responsáveis pela liberação de GLP1 e NPY, os quais vão agir sobre a secreção de hormônios pancreáticos e a motilidade gástrica respectivamente (KIM et. al., 2013). Sua expressão em neurônios nociceptivos no gânglio da raiz dorsal, trigeminais e no gânglio nodoso e sua ativação por estímulos químicos exógenos ou endógenos aumenta sua excitabilidade e condução de estímulos algicos, bem como a transdução químico, termo e mecanoceptiva por neurônios aferentes sensoriais cutâneos e viscerais (BLACKSHAW, 2011).

Estudos sugerem um papel do trifosfato de adenosina (ATP) como um facilitador da liberação de acetilcolina (ACh) em sinapses autonômicas (CUNHA et. al., 2000) bem como em sinapses entéricas (DUARTE-ARAÚJO et. al., 2009) através da ativação de receptores P2X neuronais pré-sinápticos antagonizam a supressão de contrações espontâneas do músculo liso intestinal induzida pela ativação de receptores canabinóides CB1 (BALDASSANO et. al., 2009). A sinalização purinérgica no SNE promove uma facilitação retrógrada da neurotransmissão e está sujeita à dessensibilização (HONS et. al., 2013).

O uso tradicional de derivados canabinóides para tratar variadas condições relacionadas ao trato gastrintestinal (IZZO; COUTS, 2005) e a elucidação de aspectos moleculares e farmacológicos da interação do sistema endocanabinóide e o SNE sugerem a modulação das vias canabinóides para o tratamento de condições associadas à motilidade gastrintestinal como refluxo gástrico, doença inflamatória intestinal e íleo paralítico (ABALO et. al., 2012; HORNBY; PROUTY, 2004). Hons et.al. 2013, através de estudos imunohistoquímicos e eletrofisiológicos em neurônios do PM, demonstrou a expressão de CB₁ nas varicosidades

sinápticas em neurônios colinérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos do SNE. Ensaios funcionais em tecido isolado (ROTH et. al., 1978; PERTWEE et. al., 1996), estudos eletrofisiológicos (LÓPEZ-REDONDO et. al., 1997; HONS et. al. 2013), imunohistoquímicos (COUTTS et. al., 2002; HONS et. al., 2013) e farmacológicos (DARMANI et. al., 2003; HORNBY; PROUTY, 2004) atribuem à ativação de receptores CB1 pré-sinápticos a inibição da liberação dos neurotransmissores excitatórios, como a acetilcolina, em eferências vagais, da serotonina a partir de ECC e da ACh, da SP e do VIP em neurônios motores do PM respectivamente. Tal inibição tanto em direção ascendente (oral) quanto descendente (aboral) acarreta em última instância um efeito antipropulsivo, diminuição da peristalse intestinal (IZZO; COUTS, 2005; PERTWEE, 2001), diminuição do esvaziamento e aumento de relaxamento receptivo gástrico decorrentes da diminuição das pressões intragástrica e aumento da sensibilidade e desconforto relacionados às alterações funcionais do TGI (HORNBY; PROUTY, 2004). Esse efeito compromete a coordenação do reflexo peristáltico intestinal (GRIDER et. al., 2009).

Agonistas cannabinoides inibem a liberação de acetilcolina e a contração muscular induzida por corrente elétrica (PERTWEE, 2001). Em nível molecular a ativação de receptores CB1 através do acoplamento à proteína G_{i/o} (PERTWEE, 2001) promove uma redução da amplitude dos potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos (HONS et al., 2013) e lentos (FAN, 1995) e uma hiperpolarização neuronal através da diminuição da entrada de cálcio e aumento das condutâncias de potássio (KREITZER; REGHR, 2001). Dessa forma o bloqueio dos canais de potássio promove uma despolarização e aumento da excitabilidade das células musculares lisas intestinais.

Da coordenação entre esvaziamento gástrico e transito GI teremos um funcionamento adequado do TGI ou disfunções intestinais relacionadas à motilidade gastrintestinal. A utilização de fármacos com ação sobre a neurotransmissão, psicotrópicos, antidepressivos, analgésicos opióides, entre outros, têm entre seus efeitos colaterais mais proeminentes alterações do transito gastrintestinal. Esses fármacos agem diretamente na regulação do transito GI pelo SNE liberando ou bloqueando a atividade dos neurotransmissores inibitórios ou excitatórios no TGI e indiretamente ao modular a expressão de receptores locais através de alças de feedback entre o SNC e o SNE (ANNERINO, 2012).

No presente estudo foi abordada a constipação induzida por antipsicóticos em especial pela clozapina, devido à elevada prevalência deste efeito colateral associado ao uso dessa classe medicamentosa, o que acarreta piora na qualidade de vida nesse grupo de pacientes e aumento

de gastos com o manejo clínico dessa condição além do risco potencial associado à sua ocorrência.

1.2. Antipsicóticos e Inibição do TGI

A utilização de antipsicóticos (AP) para o tratamento da esquizofrenia data do início da década de 1950 (DELAY, 1952). O controle dos sintomas e a prevenção de crises promovidas pelos AP proporcionou a mudança do paradigma manicomial no tratamento da esquizofrenia para seu manejo em serviços de base comunitária (MULLER; KENNEDY, 2006).

Os AP dividem-se em de primeira geração ou típicos, e de segunda geração ou atípicos. Essa classificação baseia-se na propensão dos diferentes AP em causar efeitos colaterais específicos e/ou modular a atividade de receptores específicos no SNC (BARONDES et. al., 1997; MULLER; KENNEDY, 2006).

São fármacos antipsicóticos de primeira geração (APG), a clorpromazina, a levopromazina, a flufenazina, a piperazina, o haloperidol, a tioridazina, o clorprotixeno, o flupentixol, a pipamperona, e a pimozida. Os antipsicóticos de segunda geração (ASG) consistem na clozapina, risperidona, amissulpirida, olanzapina, quetiapina, ziprazidona e o aripiprazol (em ordem cronológica do desenvolvimento).

Os APG são potentes bloqueadores de receptores dopaminérgicos D2 (DRD2) centrais e tem seu uso na clínica limitado pela ocorrência de reações adversas do tipo extrapiramidais como discinesia tardia, acatisia, bradicinesia ou síndrome neuroléptica maligna e piora dos sintomas negativos da esquizofrenia devido ao bloqueio dopaminérgico em neurônios mesocorticais e do nigroestriatum, respectivamente (ABI-DARGHAM, 2004; JAFFARI et. al., 2012; JUST, 2015).

Os ASG possuem maior afinidade por receptores 5-HT_{2a} em relação aos receptores DRD2 caracterizada por uma constante de Melzert igual ou superior a 1,12 (JUST, 2015). Os antipsicóticos atípicos apresentam maior seletividade para bloquear os receptores dopaminérgicos D2 mesolímbicos responsáveis pelos sintomas positivos da esquizofrenia, (alucinações e delírios). Tal seletividade característica dos ASG evita a depleção dopaminérgica em outras áreas do SNC como a nigroestriatal responsável pela indução de reações extrapiramidais. Sua constante de dissociação (K_d) para receptores DRD2 é inferior ao K_d para

a dopamina, o que lhes confere propriedades estabilizadoras do humor no tratamento do transtorno bipolar (JUST, 2015). O bloqueio de hétero ou de autorreceptores serotoninérgicos 5-HT_{2a} e 5-HT_{1a}, respectivamente promove o aumento da atividade dopaminérgica nas vias mesocorticais e melhora dos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia. O aumento da atividade dopaminérgica na via nigroestriatal reduz o risco de ocorrência da síndrome neuroléptica maligna (JUST, 2015). A eficácia dos ASG no tratamento dos transtornos psicóticos também parece estar relacionada ao bloqueio de receptores histaminérgicos H₁, adrenérgicos α 1 e colinérgicos muscarínicos M₁ (RAChM₁) centrais. (JAFFARI et. al., 2012). No entanto, devido ao seu amplo espectro de ações em diferentes vias de neurotransmissão, os ASG apresentam um grande leque de efeitos colaterais nos mais diversos sistemas orgânicos. Enfocaremos nesta pesquisa suas ações sobre a função motora GI (PHILPOTT et. al., 2014).

Usuários de AP apresentam risco de desenvolver constipação duas vezes maior que não usuários, de maneira tempo dependente (HAYES; GIBLER, 1995; POTTER, 1989; TALLEY, 2003). Staniland e Taylor (2000), relatam taxas de incidência de 25% comparadas a 1,5% com uso de placebo. Palmer et. al. (2008), descreveram 102 casos de efeitos adversos gastrointestinais dos quais 28 foram fatais. A mortalidade associada à disfunção GI pode ser maior que aquela relacionada à agranulocitose a depender da gravidade, detecção e tratamento precoce (DE HERT et. al., 2011b; HIBBARD et. al., 2009; LEVIN, 2002; REGE, 2008). Estima-se a incidência de constipação relacionada ao uso de antipsicóticos em 1 de cada 3 pacientes e um custo anual de U\$ 40000 com o tratamento desse efeito colateral em hospital universitário psiquiátrico (DE HERT et. al., 2011a).

A constipação é um efeito colateral descrito dos ASG e está relacionado com sua afinidade por receptores colinérgicos muscarínicos. Em casos severos pode progredir para íleo paralítico, isquemia mesentérica e óbitos devido à sepse e a perfuração intestinal (NIELSEN; MEYER, 2012). A associação entre APG e agentes anticolinérgicos, para tratar efeitos colaterais extrapiramidais, aumentam o risco de morbidade e a incidência de efeitos sobre o TGI neste grupo específico de pacientes (PEYRIÈRE et. al., 2009).

1.3 Clozapina

A clozapina (Figura 5) é um antipsicótico atípico, classificado como um dibenzodiazepílico e apresenta menos efeitos colaterais extrapiramidais quando comparado a outros AP. É utilizada no manejo de condições psiquiátricas como esquizofrenia ou transtornos psicóticos resistentes ao tratamento (ERT), mania grave com delírios e alucinações refratária ao tratamento com estabilizadores do humor, retardo mental com sintomas psicóticos, transtorno de personalidade borderline, tendências suicidas em pacientes psicóticos, entre outras condições. (MELTZER et. al., 1989; MELTZER, 2012). A ERT é caracterizada pela ausência de resposta a dois diferentes AP utilizados em doses plenas por aproximadamente 6 a 8 semanas.

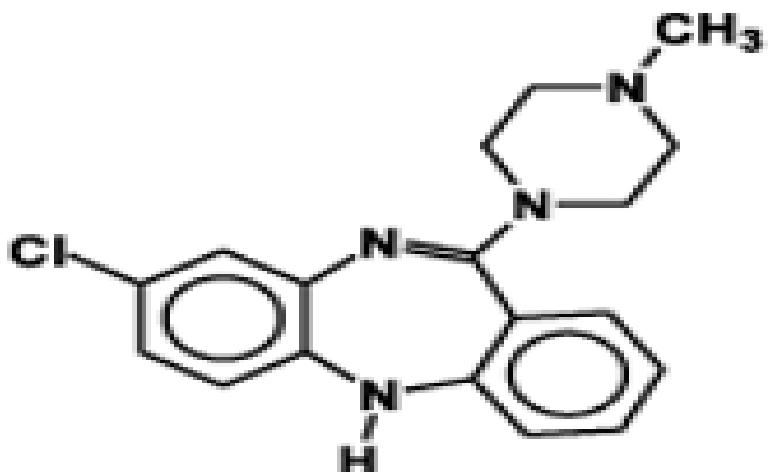


Figura 5 – Fórmula estrutural molecular da clozapina.

A clozapina reduz a taxa de mortalidade na esquizofrenia severa diminuindo a incidência de suicídios nestes pacientes, no entanto aumenta a mortalidade por doenças cardiovesselares (KECK et. al., 2000; BROWN et. al., 2010; MURRAY, 2013). O sucesso do tratamento com a clozapina depende da tolerabilidade ao seu uso crônico, o qual na maioria das vezes é comprometido pela ocorrência de efeitos adversos comuns como sedação, constipação, tontura, fadiga ou hipotensão postural (STANNILAND; TAYLOR, 2000)

A clozapina apresenta afinidade moderada baixa para receptores D1 (JANN, 1991), baixa afinidade para receptores D2 e D3 (comparado a outros AP), no entanto tem alta afinidade para receptores D4 (ASHBY; WANG, 1996). A clozapina também possui alta afinidade para receptores serotoninérgicos 5-HT1C e 5-HT2A e 5-HT2C e moderada afinidade para receptores 5-HT3 (ASHBY; WANG, 1996), adrenérgicos α 1 e α 2, colinérgicos muscarínicos M1 e M4 e histaminérgicos H1 (BALDESSARINI; FRANENBURG, 1991; KAHN et. al., 1993; SANYAL; VAN TOL, 1997; BOLDEN et. al., 1992).

De acordo com Asenjo et. al. (2010),

O amplo perfil farmacodinâmico da clozapina favorece seu uso em casos de esquizofrenia resistentes aos demais antipsicóticos com menor incidência de efeitos extrapiramidais. No entanto também limita seu uso prolongado devido a ocorrência de efeitos adversos potencialmente fatais com taxas de abandono acima de 17% em pacientes tratados com clozapina devido a efeitos adversos.

Em contraste aos AP com alta afinidade pelos receptores D2, a clozapina apresenta baixa propensão a induzir sintomas extrapiramidais (DIVAC et. al., 2014). Contudo a clozapina está associada a uma ampla gama de efeitos adversos em múltiplos sistemas e potencialmente fatais (FITZSIMONS et. al., 2005), dentre os quais podemos citar: Agranulocitose, neutropenia, eosinofilia (ROGE et.al., 2012; COHEN et. al., 2012; VERBELEN; LEWIS, 2015), cardiomiopatia, pericardite, prolongamento de QT, morte súbita (KECK et. al., 2000; BROWN et. al., 2010; LEUNG et. al., 2012; MURRAY, 2013); convulsões e síndrome neuroléptica maligna (MURRI et. al., 2015; WILLIAMS; PARK, 2015), síndrome metabólica, diabetes, dislipidemia e ganho de peso (CASEY, 2005; LU et. al., 2015; McEVOY et. al., 2005; NEWCOMER, 2005), hematêmese, constipação, esofagite, isquemia intestinal, redução do esvaziamento gástrico, íleo paralítico, pseudo obstrução intestinal, peritonite e perfuração intestinal (McKINNON et. al., 2009).

A agranulocitose, desenvolvida em 0,8% dos pacientes tratados com clozapina, torna essa droga reservada apenas para casos resistentes a outras medicações (VERBELEN; LEWIS, 2015). Trata-se de uma condição hematológica na qual o número de neutrófilos fica reduzido para menos de 500 céls/mm³ deixando o paciente suscetível a infecções fatais em 2 a 4% dos

casos (COHEN et. al., 2012). É uma condição que não se relaciona com a dose utilizada e poucos fatores de risco foram identificados. 80% dos casos de agranulocitose ocorrem nos primeiros 18 meses de uso e seu risco reduz em 10 vezes após o primeiro ano de uso (VERBELEN; LEWIS, 2015). Dessa forma sua prevenção e detecção precoce exige contagem de células sanguíneas periodicamente durante o tratamento com a clozapina.

A eosinofilia associada ao uso da clozapina pode se manifestar de forma transiente e benigna em 0,2 a 61% dos pacientes nas 4 primeiras semanas de tratamento ou pode estar associada à lesão em órgão específico como miocardite, pancreatite, hepatite, nefrite ou efusões pleurais. A eosinofilia pode ainda ser fator preditor de evolução para neutropenia. Sua fisiopatologia parece estar relacionada a reação de hipersensibilidade mediada por IgE (ANEJA et. al., 2015).

O aumento dos fatores de risco para doenças cardíacas com o uso da clozapina (CASEY, 2005) relaciona-se a modificações no metabolismo energético (aumento do colesterol total e triglicérides) secundárias a alterações nos níveis séricos de adipocitocinas (aumento de leptina e diminuição da adiponectina) e da diminuição da grelina plasmática total. (LU et. al., 2015).

O efeito do ganho de peso induzido pela clozapina pode ser observado após tratamento a curto e longo prazo (WHITNEY et. al., 2015). O mecanismo pelo qual a clozapina induz o ganho de peso e o desenvolvimento de síndrome metabólica ainda não é conhecido (REYNOLDS; KIRK, 2010; WHITNEY et. al., 2015), contudo envolve a participação de receptores adrenérgicos, histaminérgicos e serotoninérgicos (ROERIG et. al., 2011)

O mecanismo de ação atípico da clozapina confere a essa droga entre outros efeitos adversos um aumento no risco para ocorrência de convulsões tônico-clônicas da ordem de 5% a cada ano de uso. A ocorrência de convulsões relaciona-se à dose total diária de clozapina (a partir de 600 mg/d), aos níveis séricos em torno de 1300 ng/ml e ao aumento rápido na dose administrada. A clozapina é metabolizada pelas enzimas do citocromo P450 CYP1A2. A variação do perfil farmacocinético interindividual influencia na ocorrência de efeitos adversos. Indivíduos metabolizadores lentos da clozapina são mais propensos a desenvolver quadros convulsivos. O ácido valpróico é a droga antiepileptica (DAE) de escolha para o manejo das convulsões induzidas pela clozapina, no entanto existem diversos relatos do uso com sucesso de outras DAE. Ainda não há um consenso sobre o mecanismo etiológico das convulsões induzidas pela clozapina e mais estudos são necessários (WILLIAMS; PARK, 2015).

A síndrome neuroléptica maligna (SNM) trata-se de um efeito adverso raro e potencialmente fatal dos antipsicóticos sobre o sistema nervoso central. Apresenta-se tipicamente com rigidez, tremores, febre, hiperatividade simpática, alterações do estado mental, leucocitose e elevação dos níveis séricos de creatinofosfoquinase (CPK). Os ASG foram considerados inicialmente isentos do risco de desenvolvimento da SNM, no entanto, conforme seu uso se difundiu, surgiram relatos de caso de SNM relacionados ao seu uso na clínica. A clozapina está relacionada com a ocorrência de quadros semelhantes, porém com apresentações atípicas nas quais os sinais típicos acima relacionados podem estar ausentes ou atenuados (MURRI et. al., 2015)

O antagonismo serotoninérgico diretamente a nível de gânglios intramurais no SNE e o bloqueio colinérgico sobre as eferências vagais colinérgicas, oriundas do DMV, induzido pela clozapina reduz a atividade dos neurônios pós-ganglionares serotoninérgicos e colinérgicos e consequentemente a função motora GI (BOLDEN, 1991).

A constipação tem sido relatada em 25 a 60% dos pacientes tratados com clozapina (POTTER et. al., 1989; CENTORRINO et. al., 1994; LIEBERMAN et al., 1994; HAYES; GIBLER, 1995; YOUNG et. al., 1998; MELTZER et. al., 2003; DE HERT et. al., 2011a; 2011b; FLANAGAN et. al., 2011) e em casos severos pode ser fatal. Contudo o mecanismo farmacodinâmico envolvido na sua gênese ainda é pouco compreendido (REGE et. al., 2008; DE HERT et. al., 2011b).

Baptista et. al., 2015 descreve a constipação relacionada à uma síndrome de hipomotilidade GI generalizada a qual quando complicada pode acarretar íleo paralítico, isquemia intestinal e morte secundária à sepse e perfuração intestinal (BAPTISTA et. al., 2015). Uma série histórica entre 1996 e 2007 acompanhou 26720 pacientes e detectou 123 casos de íleo paralítico e detectou um risco aumentado para tal desfecho associado ao uso da clozapina (NIELSEN; MEYER, 2012). A mortalidade associada à constipação induzida pela clozapina pode chegar a 27,5% nos casos de severa constipação, uma incidência superior àquela relacionada ao tratamento com outros AP e à agranulocitose (PEYRIÈRE et. al., 2009; DE HERT et. al., 2011a; DE HERT et. al., 2011b; COHEN et. al., 2012; NIELSEN; MEYER, 2012; BAPTISTA et. al., 2015). Baptista et. al. 2015, demonstrou através de testes diagnósticos de transito colônico em pacientes esquizofrênicos em tratamento com clozapina apresentavam maior prevalência de hipomotilidade GI em relação àqueles tratados com outros AP (BAPTISTA et. al., 2015).

O entendimento sobre a fisiopatologia dos efeitos adversos da clozapina sobre o TGI e os mecanismos farmacodinâmicos e farmacocinéticos da clozapina envolvidos na sua gênese orientam o manejo e a minimização de suas complicações gastrintestinais. Orientações dietéticas sobre maior ingestão de fibras e líquidos e de combate ao sedentarismo são medidas seguras e efetivas na prevenção e manejo da constipação leve. O uso de laxativos como o hidróxido de magnésio e a lactulona são indicados no tratamento agudo dos sintomas causados pela dismotilidade no TGI. Em casos mais severos de constipação o uso de agentes estimulantes catárticos como o bisacodil, a senna ou enemas podem ser usados por curto período de tempo (YOUNG et. al., 1997; 1998). O uso do betanecol, um agente inibidor da colinesterase, está associado a melhora da função intestinal e redução nas doses de laxativos/catárticos no manejo da constipação severa no entanto seu uso é limitado pela ocorrência de efeitos colinérgicos importantes e potencialmente fatais (POTTER; STEWART, 2013). Em casos potencialmente fatais de complicações GI a rápida descontinuação do tratamento e reintrodução gradual da clozapina, após resolução do quadro, ou sua associação com outros agentes antipsicóticos, a fim de diminuir a dose necessária, pode ser a única alternativa o que pode levar a piora do estado funcional e cognitivo dos pacientes (POTTER; STEWART, 2013). Novos agentes estão sendo desenvolvidos para o tratamento da constipação crônica e refratária ao uso de laxativos.

Os agonistas de receptores da guanilato ciclase como o Linaclotide estimulam a secreção luminal e aumento reflexo da peristalse intestinal (CHEY et. al., 2012; RAO et. al., 2012). Agonistas seletivos 5-HT4, como o Tegaserod e a Prucaloprida aceleram o transito colônico e diminuem o desconforto relacionado à constipação (CAMILLERİ et. al., 2010). Mais recentemente a Lubiprostone, um ácido graxo bicíclico derivado prostanóide vem sendo indicado no tratamento da constipação associada à síndrome do intestino irritável e ao uso crônico de opióides com bons resultados, agindo através do aumento da secreção intestinal de íons cloreto e aumento da peristalse intestinal (WILSON; SCHEY, 2015).

O uso de medicações para tratar os efeitos colaterais da clozapina leva à polifarmácia e torna esse grupo de pacientes polimedicados e de difícil manejo na clínica. De todas as drogas usadas para tratar efeitos colaterais relacionados ao uso da clozapina 38 % são para o tratamento da constipação (McKEAN; VELLA-BRINCAT, 2011)

1.4. Justificativa

Apesar da gama de efeitos colaterais associados ao seu uso, a clozapina é ainda hoje, entre os ASG, a medicação dotada de grande eficácia e poder resolutivo no tratamento da esquizofrenia e transtornos esquizoafetivos refratários e não refratários (KHAN et. al., 1993; SZOTA et. al., 2013) .

Em torno de 30% dos pacientes com esquizofrenia vão preencher o critério para ERT, dos quais 50-60% responderão ao tratamento com clozapina com tempo de resposta variável de 6 meses a 1 ano (LALLY; McCABE, 2015). A ERT representa hoje importante paradigma no manejo da esquizofrenia, implica pior prognóstico, pobre qualidade de vida, aumento na utilização de serviços de saúde, polimedicação e maior grau de dependência de terceiros (NAKAJIMA et. al. 2015), o que justifica a utilização da clozapina ainda nos dias de hoje.

Apesar de sua fundamental importância no manejo de casos severos de transtornos psicóticos, em 2008 a clozapina era responsável por 8% do mercado dos AP nos EUA, enquanto estimava-se uma prevalência de 40% de pacientes deste mercado tinham indicação para sua utilização (MELTZER, 2012). Esses números demonstram a pouca utilização ou uma utilização de maneira tardia da clozapina em casos nos quais ela teoricamente seria a última ou a única opção terapêutica. Ainda hoje a clozapina é uma droga subutilizada e um dos maiores motivos para tal seriam os seus efeitos colaterais potencialmente fatais, apesar de raros e a falta de segurança dos prescritores em monitorizar sua ocorrência e seu manejo adequado (TUNGARAZA; FAROOQ, 2015). Todo esforço deve ser feito no sentido de favorecer sua utilização precoce e continuidade terapêutica (WILLIAMS; PARK, 2015).

Diante do exposto, no presente estudo buscou-se abordar a constipação associada ao uso da clozapina do ponto de vista farmacodinâmico. E dessa forma contribuir para a elucidação do mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal, sugerir uma abordagem farmacológica mais segura e eficaz para tratar e/ou prevenir a constipação relacionada ao uso da clozapina na clínica.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar através da utilização de ferramentas farmacológicas possíveis mecanismos de ação da clozapina sobre o trânsito GI em camundongos.

2.2. Específicos

- Avaliar o envolvimento das vias neurotransmissoras excitatórias (colinérgica, serotoninérgica e TRPA1) e inibitórias (dopaminérgica, opioide, de canais de potássio sensíveis ao ATP, do óxido nítrico e endocanabinóide) da motilidade GI com a atividade da clozapina sobre o transito intestinal em camundongos,
- Avaliar a atividade da clozapina e da via endocanabinóide sobre a excreção de pelotas fecais em camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS

3.1. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 25-30g, provenientes do Biotério Central da UFC. Estes foram mantidos em caixas de polipropileno, à temperatura de $24\pm2^{\circ}\text{C}$, recebendo ração padrão e água à vontade. Os animais foram mantidos em jejum de ração por 12 h, antes da realização dos experimentos.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o número de protocolo – NS 57/2014.

3.2 Aparelhos

Aparelhos	Origem
Balança para animais (modelo MF-6)	Filizola, Brasil
Balança analítica (mod. AX-200)	Shimadzu, Japão
Estufa (mod. NV1.2)	Nevoni, Brasil
Pipetas automáticas	Jencons Scientific Inc., USA

3.3 Drogas e Reagentes

Droga e Reagente	Origem
Cloridrato de 5-Hidroxitriptamina (5-HT)	Sigma, USA
Alil isotiocianato, 1,013 g/ml (AITC)	Sigma, USA
AM251	Sigma, USA
Bromidrato de Neostigmina	Sigma, USA
Carvão ativado	Vetec
Clozapina (Leponex®)	Novartis
Dimetilssulfóxido (DMSO)	Sigma, USA

Domperidona (Domperix®)	Eurofarma
Glibenclamida	Sigma, USA
Goma arábica	Vetec
N-nitro-L-arginina-metilester (L-NAME)	Sigma, USA
Naloxona 1 mg/ml (Narcan®)	Sigma, USA
Tiopental sódico	Cristália

Quanto às diluições foi utilizada água destilada para diluir o cloridrato de 5-hidroxitriptamina, o bromidrato de neostigmina, a clozapina, a domperidona, o L-NAME e o tiopental sódico, enquanto o AM251 e a glibenclamida foram diluídos em DMSO.

4. MÉTODOS

4.1. Avaliação do trânsito gastrintestinal

A avaliação do transito intestinal foi feita através do teste de propulsão do carvão ativado (CASPASSO et. al., 1976) conforme descrito a seguir.

4.1.1. Efeito da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.

Camundongos divididos em grupos (n=8), foram tratados, por via oral, com veículo (água destilada, 10ml/kg) ou clozapina 2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg. Após 45 min foi administrado, por via oral, 0,2 ml do marcador (10% de carvão ativado em 5% de goma arábica). Após 20 min, da administração do marcador, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após sobredose de tiopental sódico (150 mg/Kg, i.p.), o estômago e intestino retirados (piloro até a válvula íleo cecal) e determinada a distância percorrida pelo marcador. O trânsito gastrintestinal foi expresso em porcentagem em relação ao comprimento total do intestino e aquele percorrido pelo marcador.

Transito gastrintestinal (%) = Distância percorrida pelo marcador/Comprimento do intestino delgado x 100.

A escolha das doses da clozapina (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg) foi inicialmente baseada pelo estudo de Li et al (2000). A dose de clozapina utilizada nos experimentos subsequentes (10 mg/kg) foi a menor dose com efeito inibitório significativo sobre o transito intestinal em camundongos conforme descrito adiante.

4.1.2. Avaliação do efeito dos receptores colinérgicos sobre a inibição do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

Camundongos divididos em grupos (n=8) foram tratados com veículo (água destilada, 10ml/kg), clozapina (10 mg/kg p.o.) ou um anticolinesterásico, a neostigmina (1 mg/kg, i.p.), 45 minutos antes da administração do marcador. Após 20 min, da administração do marcador, os animais foram sacrificados e o trânsito GI determinado de acordo com o descrito no item 4.1.1.

Para avaliação da participação dos receptores colinérgicos no mecanismo de ação da clozapina, grupos de animais foram pré-tratados com neostigmina (1 mg/kg, i.p.). 15 minutos antes da administração da clozapina (10mg/kg, v.o.).

4.1.3. Investigaçāo da participação da serotonina (5-HT) sobre a inibição do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

Camundongos divididos em grupos (n=8) foram tratados com veículo (água destilada, 10ml/kg), clozapina (10mg/kg v.o.) ou 5-HT (10mg/kg v.o), 45min antes da administração do marcador. Após 20 min, da administração do marcador, os animais foram sacrificados e o trânsito GI determinado de acordo com o descrito no item 4.1.1.

Para avaliação da participação dos receptores 5-HT no mecanismo de ação da clozapina, grupos de animais foram tratados com 5-HT (10mg/kg, v.o.) 30 min. antes da administração da clozapina (10mg/kg v.o.).

4.1.4. Avaliação da participação dos receptores TRPA1 sobre a inibição do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

Camundongos divididos em grupos (n=8) foram tratados com veículo (água destilada, 10ml/kg), clozapina (CLZ, 10 mg/kg, v.o.) ou alil isotiocianato (AITC, 10mg/kg, v.o.), um agonista do receptor de potencial transiente ankirina 1 (TRPA1), 45 min antes da administração do marcador. 20 min após a administração do marcador, os animais foram sacrificados e o trânsito GI determinado de acordo com o descrito no item 4.1.1.

Para avaliação da participação dos receptores TRPA1 no mecanismo de ação da clozapina, grupos de animais foram pré-tratados com AITC (10mg/kg, v.o.) antes do tratamento com CLZ (10 mg/kg v.o.).

4.1.5. Avaliação do efeito dos receptores dopaminérgicos sobre a inibição do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

Camundongos divididos em grupos (n=8), foram tratados com veículo (água destilada, 10ml/kg), clozapina (10 mg/kg v.o.) ou domperidona (20mg/kg, v.o.), um antagonista periférico dos receptores dopaminérgicos D2 e D3, 45 min antes da administração do marcador. Após 20 min, da administração do marcador, os animais foram sacrificados e o trânsito GI determinado de acordo com o descrito no item 4.1.1.

Para avaliação da participação dos receptores dopaminérgicos no mecanismo de ação da clozapina grupos de animais foram pré-tratados com domperidona (20mg/kg, v.o.), um antagonista dos receptores periféricos de dopamina D2 e D3, 30 minutos antes do tratamento com clozapina (10mg/kg, v.o.).

4.1.6. Avaliação da atividade da óxido nítrico sintase (NOS) sobre o retardo do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

Camundongos divididos em grupos (n=8) foram tratados com veículo (água destilada, 10ml/kg) ou clozapina (10 mg/kg p.o.). 45 min antes da administração do marcador ou com o inibidor da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME (80 mg/kg, i.p.), um falso substrato da

enzima NOS, 30 minutos antes da administração do marcador. Os animais foram sacrificados e o trânsito GI determinado de acordo com o descrito no item 4.1.1.

Para avaliação da participação da NOS no mecanismo de ação da clozapina grupos de animais foram pré-tratados com L-NAME (80 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração de clozapina (10 mg/kg, v.o.).

4.1.7. Avaliação do efeito dos receptores opióides sobre a inibição do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

Camundongos divididos em grupos (n=8) foram tratados com veículo (água destilada, 10ml/kg), clozapina (10 mg/kg v.o.) 45 min. ou com o antagonista opióide, a naloxona (2 mg/kg s.c.) 30 min. antes da administração do marcador. Após 20 min. da administração do marcador, os animais foram sacrificados e o trânsito GI determinado de acordo com o descrito no item 4.1.1.

Para avaliação da participação dos receptores opióides no mecanismo de ação da clozapina grupos de animais foram pré-tratados com o antagonista opióide, naloxona (2 mg/kg, s.c.), 15 min antes do tratamento com clozapina (10 mg/kg, v.o.).

4.1.8. Avaliação da participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP sobre o retardamento do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

Camundongos divididos em grupos (n=8) foram tratados com veículo (água destilada, 10ml/kg) ou clozapina (10 mg/kg v.o.) 45 min. antes ou com o bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP, a glibenclamida (5mg/kg i.p.) 30 min. antes da administração do marcador. Após 20 min. da administração do marcador, os animais foram sacrificados e o trânsito GI determinado de acordo com o descrito no item 4.1.1.

Para avaliação da participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP no mecanismo de ação da clozapina grupos de animais foram pré-tratados com glibenclamida (10 mg/kg, v.o.) 15 min. antes do tratamento com clozapina (10 mg/kg, v.o.).

4.1.9. Avaliação do efeito dos receptores canabinóides CB1 sobre o retardo do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

Camundongos divididos em grupos (n=8) foram tratados com veículo (água destilada, 10ml/kg), clozapina (10 mg/kg v.o.) ou com o antagonista dos receptores canabinóides CB1, o AM251 (1mg/kg, i.p.), 45 min antes da administração do marcador do trânsito gastrintestinal. Após 20 min, da administração do marcador, os animais foram sacrificados e o trânsito GI determinado de acordo com o descrito no item 4.1.1.

Para avaliação da participação dos receptores CB1 no mecanismo de ação da clozapina grupos de animais foram pré-tratados com AM251 (1mg/kg, i.p.) 15 min antes do tratamento com clozapina (10 mg/kg, v.o.).

4.2. Avaliação da excreção de pelotas fecais

4.2.1. Efeito da clozapina e do AM251 sobre a excreção de pelotas fecais em camundongos

A excreção de pelotas fecais foi avaliada em camundongos alimentados que foram tratados com veículo (controle), clozapina (10 mg/kg, v.o.), AM251 (1 mg/kg, i.p.) ou clozapina e AM251 em combinação. As doses administradas nesse experimento foram escolhidas baseadas nas quais a inibição do transito gastrintestinal induzida pela clozapina foi quase totalmente revertida após pré-tratamento com AM251. Após os tratamentos, animais divididos em grupos (n=8) foram colocados em gaiolas experimentais limpas e as fezes expelidas cumulativamente durante 3 horas foram registradas e tiveram seu peso seco e úmido determinados em miligramas (mg). Para minimizar a evaporação e a coprofagia, as pelotas fecais excretadas foram coletadas em intervalos de 1 hora, pesadas (peso úmido em mg) e após desidratação em estufa (50°C, 6h) pesadas novamente (peso seco em mg). A excreção fecal cumulativa em 3 horas foi registrada ao final do período experimental. Como marcador da função secretória foi determinado o conteúdo fluido das fezes e sua percentagem foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Conteúdo fluido fecal (em\%)} = 100 \times (\text{peso úmido} - \text{peso seco}) / \text{peso úmido}$$

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para analisar a significância das diferenças entre os grupos foi utilizada a ANOVA, seguida da aplicação do pós-teste de Student Newman Keuls, sendo considerado significativo um $p < 0,05$.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação do trânsito gastrintestinal

6.1.1. Efeito da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos

De acordo como os resultados descritos na **tabela 1** e na **figura 6** a clozapina, administrada na dose de 10 e 20 mg/Kg v.o., foi capaz de reduzir significativamente ($p<0,05$) o transito gastrintestinal para $27,41 \pm 2,09$ e $21,87 \pm 1,57\%$, respectivamente, correspondendo a uma redução de 50,92 e 60,8% quando comparados ao veículo ($55,85 \pm 1,26\%$).

Tabela 1 – Efeito da clozapina sobre o transito gastrintestinal em camundongos.

Grupos	Dose (mg/Kg v.o.)	% de trânsito gastrintestinal
Veículo	-	$55,85 \pm 1,96$
Clozapina	2,5	$53,03 \pm 2,85$
	5	$48,32 \pm 2,52$
	10	$27,41 \pm 2,09^*$
	20	$21,87 \pm 1,57^*$

Os valores estão expressos como média \pm E.P.M do percentual de trânsito GI. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (2,5; 5; 10 e 20 mg/kg, v.o.) foram administradas 45 min antes da administração do marcador. O transito GI foi determinado 20 min. após a administração do marcador. * $P < 0,05$ vs. veículo (ANOVA seguida do Teste Student Newman Keuls).

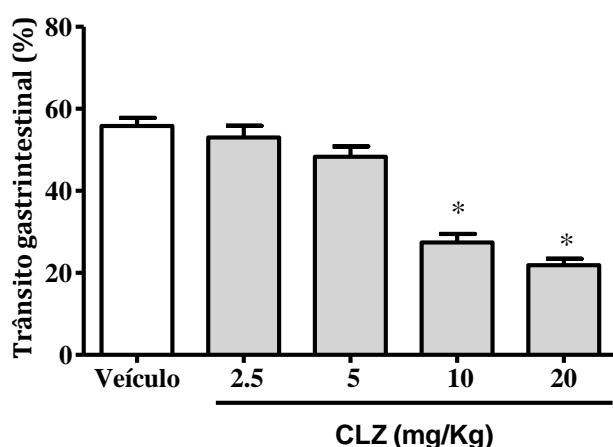


Figura 6 – Efeito da clozapina sobre o transito intestinal em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M do percentual de trânsito GI. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (2,5; 5; 10 e 20 mg/kg, v.o.) foram administradas 45 min antes da administração do marcador. O transito GI foi determinado 20 min. após a administração do marcador. * $P < 0,05$ vs. veículo (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

6.1.2. Avaliação do efeito dos receptores colinérgicos sobre a inibição do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

A avaliação da participação dos receptores colinérgicos no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal está demonstrada na **tabela 2** e na **figura 7**.

O tratamento com neostigmina, um anticolinesterásico, na dose de 1 mg/Kg, i.p, aumentou significativamente ($P<0,05$) a velocidade do transito gastrintestinal para $69,49 \pm 2,476\%$ o que correspondeu a um aumento de 26,9% em relação ao veículo ($54,75 \pm 3,741\%$). O pré-tratamento com neostigmina ($40,96 \pm 2,105\%$) foi capaz de inibir significativamente ($P<0,05$) a redução do transito gastrintestinal induzida pela clozapina ($28,06 \pm 3,145\%$).

6.1.3. Investigação da participação da serotonina (5-HT) na inibição do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

A participação da serotonina no mecanismo de ação da clozapina sobre trânsito gastrintestinal está demonstrada na **tabela 3** e na **figura 8**.

O pré-tratamento com serotonina ($50,40 \pm 2,28\%$) foi capaz de inibir significativamente ($P<0,05$) a redução do transito gastrintestinal induzida pela clozapina ($27,41 \pm 2,09\%$).

6.1.4. Avaliação da participação dos receptores TRPA1 na inibição do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

A participação dos receptores TRPA1 na redução do transito gastrintestinal induzida pela clozapina está demonstrada na **tabela 4** e na **figura 9**.

O pré-tratamento com alilisotiocianato ($37,56 \pm 2,847\%$) foi capaz de inibir significativamente ($P<0,05$) a redução do transito gastrintestinal induzida pela clozapina ($27,41 \pm 2,091\%$).

Tabela 2 - Avaliação do efeito dos receptores colinérgicos sobre a inibição do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/Kg), via	% de trânsito gastrintestinal
Veículo	-	54,75 ± 3,741
Clozapina	10, v.o.	28,00 ± 3,145 ^a
Neostigmina	1, i.p.	69,49 ± 2,476 ^a
Neostigmina + Clozapina	1, i.p.; 10, v.o.	40,96 ± 2,105 ^{ab}

Os valores estão expressos como média ± EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (10 mg/Kg, v.o.) e neostigmina (1 mg/Kg, i.p.) foram administradas 45 min. antes do marcador. Pré-tratamento com neostigmina (1 mg/Kg, i.p.) 15 min. antes da administração da clozapina (CLZ, 10 mg/Kg, v.o.). ^a P < 0,05 vs. veículo, ^b P < 0,05 vs. clozapina (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

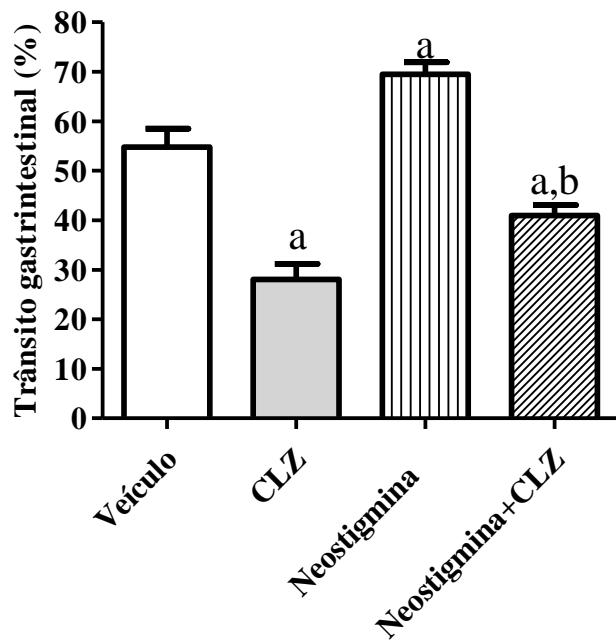


Figura 7 – Avaliação do efeito dos receptores colinérgicos sobre a inibição do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos. Os valores estão expressos como média ± EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/Kg, v.o.) e neostigmina (1 mg/Kg, i.p.) foram administradas 45 min. antes do marcador. Pré-tratamento com neostigmina (1 mg/Kg, i.p.) 15 min. antes da administração da CLZ (10 mg/Kg, v.o.). ^a P < 0,05 vs. veículo, ^b P < 0,05 vs. clozapina (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

Tabela 3 - Investigação da participação da serotonina (5-HT) na inibição do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/Kg v.o.)	% de trânsito gastrintestinal
Veículo	-	61,01±2,39
Clozapina	10	27,41± 2,09 ^a
5-HT	10	76,56±2,35 ^a
5-HT + Clozapina	10; 10	50,40±2,28 ^{ab}

Os valores estão expressos como média ± EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/kg, v.o.) e serotonina (5-HT, 10 mg/kg v.o.) foram administradas 45min antes da administração do marcador. Pré-tratamento com 5-HT (10 mg/kg v.o.) 30 min. antes da CLZ, 10 mg/kg, v.o. ^a P < 0,05 vs. veículo, ^b P < 0,05 vs. clozapina. (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

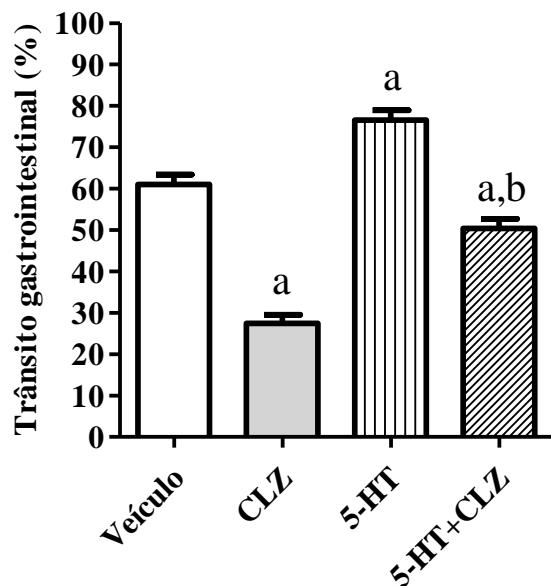


Figura 8 - Investigação da participação da serotonina (5-HT) na inibição do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos. Os valores estão expressos como média ± EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/kg, v.o.) e serotonina (5-HT, 10 mg/kg v.o.) foram administradas 45min antes da administração do marcador. Pré-tratamento com 5-HT (10 mg/kg v.o.) 30 min. antes da CLZ (10 mg/kg, v.o.). ^a P < 0,05 vs. veículo, ^b P < 0,05 vs. clozapina. (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

Tabela 4 – Investigação da participação dos receptores TRPA1 na redução do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/Kg v.o.)	% de trânsito gastrintestinal
Veículo		61,01±2,396
Clozapina	10	27,41± 2,091 ^a
AITC	10	71,07±2,645 ^a
AITC + Clozapina	10; 10	37,56±2,847 ^{ab}

Os valores estão expressos como média ± EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/kg, v.o.) e alilisotiocianato (AITC) foram administradas 45min antes da administração do marcador (carvão ativado). AITC (10 mg/kg v.o.) foi administrado 30 min antes do tratamento com CLZ (10 mg/kg, v.o.). ^a P < 0,05 vs. veículo, ^b P < 0,05 vs. CLZ 10 mg/kg v.o. (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

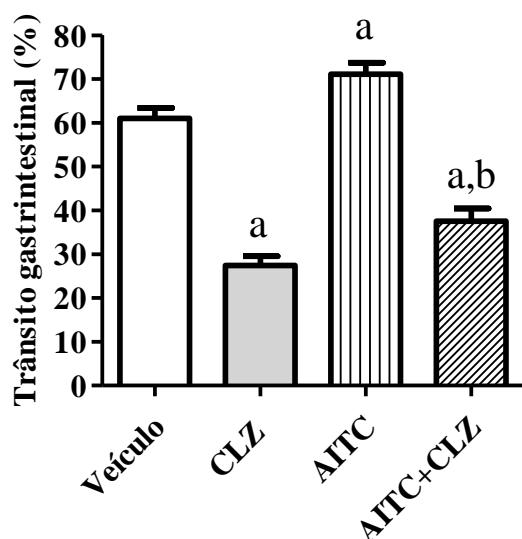


Figura 9 - Investigação da participação dos receptores TRPA1 na redução do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos. Os valores estão expressos como média ± EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/kg, v.o.) e alilisotiocianato (AITC) foram administradas 45min antes da administração do marcador (carvão ativado). AITC (10 mg/kg v.o.) foi administrado 30 min antes do tratamento com CLZ (10 mg/kg, v.o.). ^a P < 0,05 vs veículo, ^b P < 0,05 vs CLZ 10 mg/kg v.o. (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

6.1.5. Avaliação do efeito dos receptores dopaminérgicos sobre a inibição do transito gastrintestinal induzida por clozapina em camundongos.

A investigação da participação dos receptores dopaminérgicos no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal está demonstrada na **tabela 5** e na **figura 10**.

O pré-tratamento com domperidona, 20 mg/kg ($27,1 \pm 2,64$), foi incapaz de bloquear a redução do transito gastrintestinal induzida pela clozapina ($24,78 \pm 1,95 \%$).

6.1.6. Avaliação da atividade da óxido nítrico sintase sobre a inibição do transito gastrintestinal induzida por clozapina em camundongos.

A avaliação da participação do óxido nítrico no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal está demonstrada na **tabela 6** e na **figura 11**.

O pré-tratamento com L-NAME, 80mg/kg i.p ($30,84 \pm 5,29 \%$), foi incapaz de bloquear a redução do transito gastrintestinal induzida pela clozapina ($31,81 \pm 4,27 \%$).

6.1.7. Avaliação do efeito dos receptores opióides sobre a inibição do transito gastrintestinal induzida por clozapina em camundongos.

A investigação sobre a participação dos receptores opióides no mecanismo de ação da clozapina sobre o trânsito gastrintestinal está demonstrada na **tabela 7** e na **figura 12**.

O pré tratamento com a naloxona, 2 mg/kg s.c. ($34,58 \pm 2,96 \%$), foi incapaz de bloquear a redução do transito gastrintestinal induzida pela clozapina ($31,68 \pm 2,77$).

Tabela 5 – Avaliação do efeito dos receptores dopaminérgicos sobre a inibição do transito gastrintestinal induzida por clozapina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/Kg v.o.)	% de trânsito gastrintestinal
Veículo	-	54,75 ± 3,74
Clozapina	10	24,78 ± 1,95*
Domperidona	20	50,28 ± 4,12
Domperidona + Clozapina	20; 10	27,1 ± 2,64*

Os valores estão expressos como média ± EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/kg, v.o.) e domperidona (20 mg/kg, v.o.) foram administradas 45 minutos antes da administração do marcador (carvão ativado). Pré-tratamento com domperidona (20 mg/Kg, v.o.) 30 min. antes da administração da CLZ (10 mg/kg, v.o.). * P < 0,05 vs. veículo (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

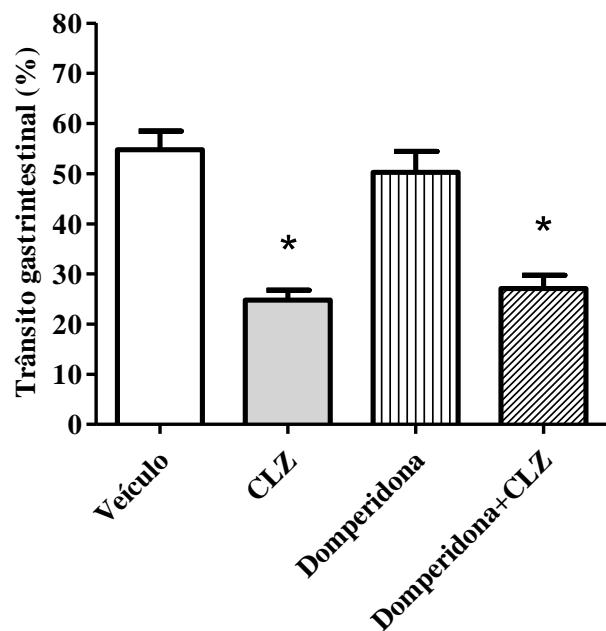


Figura 10 - Avaliação do efeito dos receptores dopaminérgicos sobre a inibição do transito gastrintestinal induzida por clozapina em camundongos. Os valores estão expressos como média ± EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/kg, v.o.) e domperidona (20 mg/kg, v.o.) foram administradas 45 minutos antes da administração do marcador (carvão ativado). Pré-tratamento com domperidona (20 mg/Kg, v.o.) 30 min. antes da administração da CLZ (10 mg/kg, v.o.). * P <0,05 vs. veículo (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

Tabela 6 – Avaliação da atividade da óxido nítrico sintase sobre a inibição do transito gastrintestinal induzida por clozapina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/Kg), via	% de trânsito gastrintestinal
--------	-------------------	-------------------------------

Veículo	-	56,76 ± 2,30
Clozapina	10; v.o.	31,81 ± 4,27*
L-NAME	80; i.p.	66,22 ± 4,38
L-NAME + Clozapina	80, i.p.; 10, v.o.	30,84 ± 5,29*

Os valores estão expressos como média ± EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/Kg, v.o.) e L-NAME (80 mg/kg i.p) foram administrados 45 minutos, 30 minutos antes da administração do marcador (carvão ativado). Pré-tratamento com L-NAME (80 mg/Kg, i.p.) 15 min. antes da administração da CLZ (10 mg/Kg, v.o.). * P < 0,05 vs. veículo (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

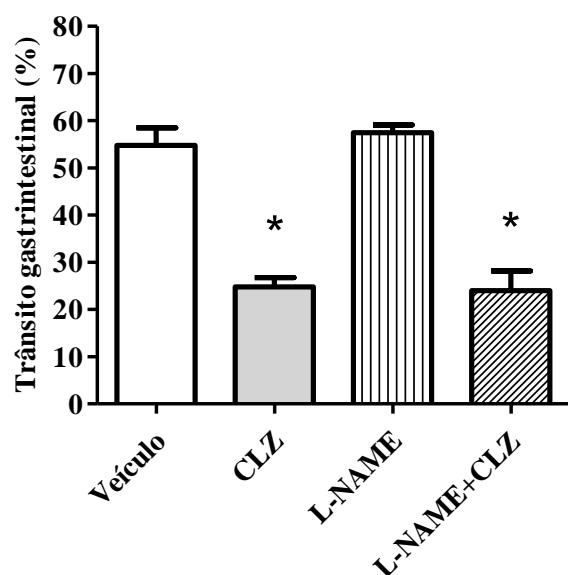


Figura 11 - Avaliação da atividade da óxido nítrico sintase sobre a inibição do transito gastrintestinal induzida por clozapina em camundongos. Os valores estão expressos como média ± EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/Kg, v.o.) e L-NAME (80 mg/kg i.p) foram administrados 45 minutos, 30 minutos antes da administração do marcador (carvão ativado). Pré-tratamento com L-NAME (80 mg/Kg, i.p.) 15 min. antes da administração da CLZ (10 mg/Kg, v.o.). * P < 0,05 vs. veículo (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

Tabela 7 – Avaliação do efeito dos receptores opioides sobre a inibição do transito gastrintestinal induzida por clozapina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/Kg), via	% de trânsito gastrintestinal
Veículo	-	64,00 ± 3,84

Clozapina	10, v.o.	$31,68 \pm 2,77^*$
Naloxona	2, s.c.	$61,01 \pm 2,86$
Naloxona + Clozapina	2, s.c.; 10, v.o.	$34,58 \pm 2,96^*$

Os valores estão expressos como média \pm EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/Kg, v.o.) foram administradas 45min ou naloxona (2 mg/kg s.c.) 30 minutos antes da administração do marcador (carvão ativado). Pré-tratamento com naloxona (2 mg/kg s.c.) 15 min. antes da administração da CLZ (10 mg/Kg, v.o.). * $P < 0,05$ vs. veículo (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

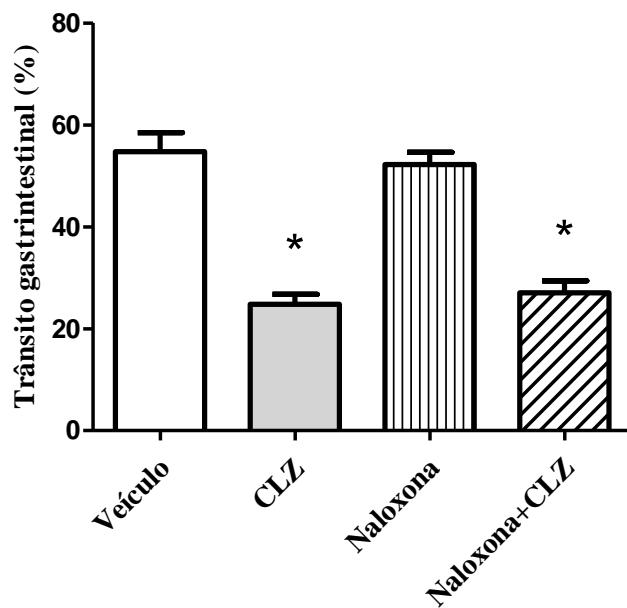


Figura 12 – Avaliação do efeito dos receptores opioides sobre a inibição do transito gastrintestinal induzida por clozapina em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/Kg, v.o.) foram administradas 45min ou naloxona (2 mg/kg s.c.) 30 minutos antes da administração do marcador (carvão ativado). Pré-tratamento com naloxona (2 mg/kg s.c.) 15 min. antes da administração da CLZ (10 mg/Kg, v.o.). * $P < 0,05$ vs. veículo (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

6.1.8. Avaliação da participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP sobre o retardamento do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

A investigação da participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP no mecanismo de ação da clozapina sobre o trânsito gastrintestinal está demonstrada na **tabela 8** e na **figura 13**.

A glibenclamida, um bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP, na dose de 5mg/kg i.p. aumentou o transito gastrintestinal ($86,94 \pm 6,01 \%$) quando comparado ao veículo ($56,76 \pm 3,34 \%$). O pré-tratamento com glibenclamida ($43,60 \pm 4,40 \%$), foi capaz de inibir significativamente ($P<0,05$) a redução do trânsito gastrintestinal induzida pela clozapina ($28,63 \pm 3,44 \%$).

6.1.9. Avaliação do efeito dos receptores canabinóides CB1 sobre o retardamento do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

A investigação sobre a participação dos receptores canabinóides CB1 no mecanismo de ação da clozapina sobre o trânsito gastrintestinal está demonstrada na **tabela 9** e na **figura 14**.

O AM251, agonista inverso dos receptores canabinóides CB1, na dose de 1 mg/Kg, i.p., não alterou o trânsito gastrintestinal ($61,23 \pm 7,24 \%$) quando comparado ao veículo ($61,41 \pm 1,73 \%$). O pré-tratamento com AM251 ($56,58 \pm 5,55 \%$) foi capaz de inibir significativamente ($P<0,05$) a redução do trânsito gastrintestinal induzida pela clozapina ($25,45 \pm 1,316\%$).

Tabela 8 – Avaliação da participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP sobre o retardamento do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/Kg), via	% de trânsito gastrintestinal
---------------	--------------------------	--------------------------------------

Veículo	-	56,76 ± 3,34
Clozapina	10, v.o.	28,63 ± 3,44 ^a
Glibenclamida	5, i.p.	86,94 ± 6,01 ^{ab}
Glibenclamida + Clozapina	5, i.p.; 10, v.o.	43,60 ± 4,40 ^{ab}

Os valores estão expressos como média ± EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/Kg, v.o.) foram administradas 45 minutos antes ou glibenclamida (5 mg/kg i.p.) 30 min. antes do marcador (carvão ativado). Pré-tratamento com glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) 15 min. antes da administração da CLZ (10 mg/Kg, v.o.). ^a P < 0,05 vs veículo; ^b P < 0,05 vs clozapina (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

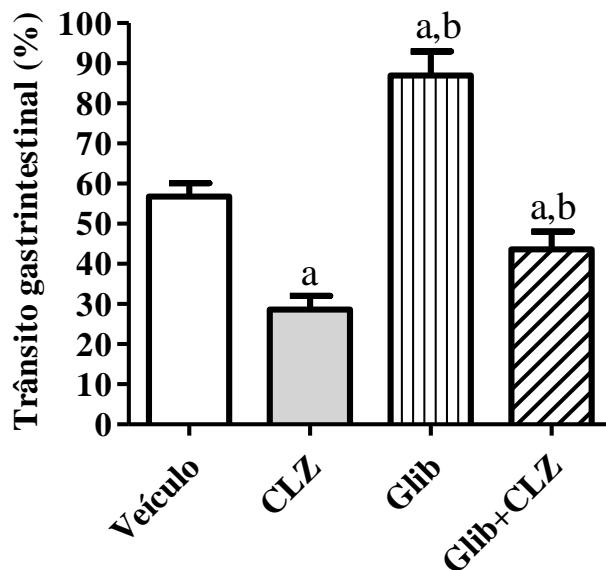


Figura 13 - Avaliação da participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP sobre o retardo do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos. Os valores estão expressos como média ± EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/Kg, v.o.) foram administradas 45 minutos antes ou glibenclamida (5 mg/kg i.p.) 30 min. antes do marcador (carvão ativado). Pré-tratamento com glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) 15 min. antes da administração da CLZ (10 mg/Kg, v.o.). ^a P < 0,05 vs. veículo; ^b P < 0,05 vs. clozapina (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

Tabela 9 – Avaliação do efeito dos receptores canabinóides CB1 sobre o retardo do transito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/Kg), via	% de trânsito gastrintestinal
--------	-------------------	-------------------------------

Veículo	-	61,41 ± 1,55
Clozapina	10, v.o.	25,45 ± 1,31 ^a
AM251	1, i.p.	61,23 ± 7,24
AM251 + Clozapina	1, i.p.; 10, v.o.	56,58 ± 5,55 ^b

Os valores estão expressos como média ± EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/Kg, v.o.) ou AM251 (1 mg/kg i.p.) foram administradas 45 minutos antes do marcador (carvão ativado). Pré-tratamento com AM251 (1 mg/Kg, i.p.) 15 min. antes da administração da CLZ (10 mg/Kg, v.o.). ^a P<0,05 vs veículo; ^b P<0,05 vs clozapina (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

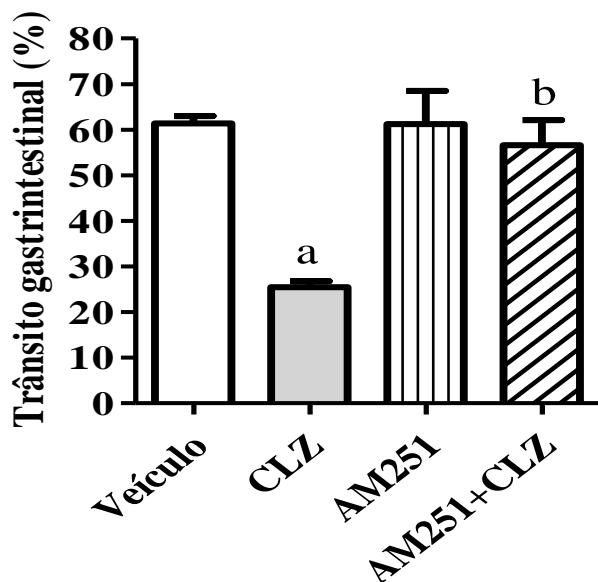


Figura 14 – Avaliação do efeito dos receptores canabinóides CB1 sobre o retardamento do trânsito gastrintestinal induzido por clozapina em camundongos. Os valores estão expressos como média ± EPM do percentual de trânsito gastrintestinal. Veículo (água destilada, 10mL/kg, v.o.), clozapina (CLZ, 10 mg/Kg, v.o.) ou AM251 (1 mg/kg i.p.) foram administradas 45 minutos antes do marcador (carvão ativado). Pré-tratamento com AM251 (1 mg/Kg, i.p.) 15 min. antes da administração da CLZ (10 mg/Kg, v.o.). ^a P < 0,05 vs. veículo; ^b P < 0,05 vs. clozapina 10mg/Kg v.o. (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

6.2. Avaliação da excreção de pelotas fecais em camundongos.

6.2.1. Avaliação do efeito da clozapina e do AM251 sobre a excreção de pelotas fecais em camundongos.

A avaliação do efeito da clozapina e do AM251 sobre a excreção de pelotas fecais em camundongos está demonstrada na **tabela 10**.

A clozapina (10mg/kg, v.o.) reduziu significativamente a o peso úmido e o peso seco das pelotas fecais quando comparado ao veículo. O AM251 (1mg/kg, i.p.) não alterou o peso úmido nem o peso seco das pelotas fecais em comparação ao veículo, assim como o pré-tratamento com AM251 (1mg/kg, i.p.) não foi capaz de bloquear a redução do peso úmido e do peso seco das pelotas fecais induzida pela clozapina. Nem o tratamento com clozapina nem com AM251 alterou de forma significativa o conteúdo de fluido fecal.

Tabela 10 – Efeitos da clozapina e AM251 sobre 3h de excreção cumulativa de pelotas fecais em camundongos.

Tratamento	Excreção de pelotas fecais (mg) /3h		Conteúdo fluido fecal (%)
	Peso úmido	Peso seco	
Veículo	249.6±23.63	115.1±10.85	53.9
CLZ (10mg/kg, p.o.)	24.7±12.65*	12.8±6.74*	48.1
AM251 (1 mg/kg, i.p.)	268.8±44.44	111.6±18.63	58.4
CLZ (10mg/kg, p.o.) +	46.1±20.40*	18.2±8.15*	60.5
AM251 (1 mg/kg, i.p.)			

Valores expressos em média ± EPM da excreção de pelotas fecais (mg) e do conteúdo fluido fecal em porcentagem (%). Veículo ou clozapina foram administrados 45 min. antes do marcador e AM251 foi administrado 15min. antes da CLZ. * P < 0.05 vs. veículo (ANOVA seguida do Teste de Student Newman Keuls).

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

No presente estudo buscou-se avaliar do ponto de vista farmacodinâmico o efeito da clozapina sobre a função motora intestinal. Para tal finalidade foram abordados o trânsito intestinal e a excreção de pelotas fecais em camundongos. Inicialmente constatou-se o efeito inibitório significativo da clozapina nas doses de 10 e 20 mg/kg sobre os parâmetros avaliados. Subsequentemente avaliou-se a capacidade de bloqueio do efeito inibitório da clozapina através da ativação de mediadores excitatórios da motilidade GI ou do bloqueio de mediadores inibitórios da função motora GI.

A neostigmina foi capaz de inibir parcialmente, mas significativamente, o efeito da clozapina sobre o transito gastrintestinal. Tal resultado sugere a participação da via colinérgica no mecanismo de ação da clozapina sobre a motilidade gastrintestinal. Ao inibir a degradação da ACh no SNE e nas varicosidades colinérgicas do TGI, a neostigmina aumentou a concentração de acetilcolina revertendo o antagonismo colinérgico competitivo exercido pela clozapina nos receptores colinérgicos envolvidos na iniciação e manutenção da peristalse intestinal. A diminuição da atividade colinérgica no SNE induzida pela clozapina se deve principalmente ao antagonismo de receptores muscarínicos M₂ e M₃ periféricos (OLSSON; HOLMGREN, 2001 e JAFFARI et. al., 2012). A clozapina atuaria em última instância bloqueando diretamente receptores colinérgicos muscarínicos nas varicosidades sinápticas do músculo liso intestinal reduzindo de forma direta a motilidade do TGI ou indiretamente inibindo a liberação de ACh seja em interneurônios excitatórios no SNE, neurônios aferentes intrínsecos primários ou aferentes extrínsecos. O bloqueio central das eferências parassimpáticas seria outro mecanismo possível de ação da clozapina sobre a neurotransmissão colinérgica capaz de justificar a inibição da motilidade gastrintestinal.

O bloqueio colinérgico e consequente inibição da peristalse gastrintestinal também é reforçado indiretamente pelo antagonismo exercido pela clozapina sobre os receptores serotoninérgicos 5-HT₃ das vias aferentes sensoriais do SNE, dos receptores 5-HT₃ e 5-HT₄ presentes nos neurônios motores colinérgicos e receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ presentes no músculo liso gastrintestinal (OLSSON; HOLMGREN, 2001; SIKANDER et. al., 2009). O bloqueio das vias inibitórias descendentes serotoninérgicas através do bloqueio de receptores 5-HT₇ contribui para a perda da coordenação da serotonina sobre a função motora intestinal (OLSSON; HOLMGREN, 2001).

O bloqueio de receptores serotoninérgicos pela clozapina mostrou-se como importante mecanismo de ação da mesma sobre a inibição do transito intestinal o qual foi inibido em torno de 83% após o pré-tratamento com serotonina.

Relatos de casos fatais por isquemia mesentérica, nos quais a queixa de constipação não era proporcional à gravidade do problema ou até inexistente (De HERT et. al., 2011b e BAPTISTA et. al., 2015), reforçam a extensão do bloqueio pela clozapina das vias sensoriais intestinais serotoninérgicas provavelmente pela ação da clozapina antagonizando receptores 5-HT3 presentes em neurônios entéricos aferentes extrínsecos e receptores 5-HT4 possivelmente expressos em mecanoceptores e em neurônios aferentes intrínsecos do SNE envolvidos na percepção do desconforto nas disfunções do TGI respectivamente (SIKANDER et. al., 2009; MAWE; HOFFMAN, 2013).

O bloqueio das aferências sensoriais intestinais serotoninérgicas justificaria a desproporção entre a constipação gastrintestinal induzida pelo tratamento com clozapina e a sintomatologia referida em decorrência da mesma (FLANAGAN; BALL, 2011). Visto ser uma avaliação subjetiva de difícil mensuração a nível pré-clínico esse dado não pode ser confirmado no presente estudo.

No presente estudo a clozapina teve seu efeito inibitório sobre a função motora gastrintestinal antagonizado tanto após o pré-tratamento com neostigmina intraperitoneal quanto com serotonina por via oral. Os resultados obtidos sugerem uma ação inibitória da clozapina sobre interneurônios serotoninérgicos no SNE, neurônios motores colinérgicos nas varicosidades sinápticas do músculo liso intestinal e sobre as terminações aferentes serotoninérgicas a nível de mucosa intestinal (OLSSON; HOLMGREN, 2001; SIKANDER et. al., 2009).

Dentre outros aspectos a clozapina apresenta uma maior afinidade com os receptores serotoninérgicos 5HT1 e 5-HT2 em relação aos receptores dopaminérgicos DRD2 quando aferida sua taxa de ocupação no SNC de cobaias (KAPUR et. al., 1999), tal aspecto poderia direcionar as atenções sobre sua ação nesses receptores a nível das camadas musculares intestinais.

O bloqueio dopaminérgico nos neurônios da *substantia nigra* (SN) e do núcleo do trato solitário (NTS) induz uma redução da liberação de acetilcolina (ACh) pelos neurônios do núcleo motor dorsal do vago (DMV) e um aumento reflexo na atividade dopaminérgica periférica (ZHENG et. al., 2014). A hiperatividade dopaminérgica periférica e a redução da atividade parassimpática central contribuem para a redução da função motora gástrica (ZHENG et. al., 2014). No entanto essa hiperatividade dopaminérgica não parece ocorrer em nível

intestinal tendo em vista que no presente estudo o bloqueio dos receptores D2 periféricos pela domperidona não alterou o retardo no transito gastrintestinal induzido pela clozapina.

A incapacidade da domperidona em antagonizar o efeito inibitório da clozapina sobre a motilidade gastrintestinal sugere não se aplicar ao transito intestinal a hipótese proposta por Annerinno sobre a hiperexpressão de receptores dopaminérgicos periféricos inibindo o esvaziamento gástrico (ANNERINNO et. al., 2012). As vias dopaminérgicas periféricas não parecem estar envolvidas no mecanismo de inibição do trânsito intestinal induzido pela clozapina, o que pode refletir a pouca afinidade da clozapina pelos receptores dopaminérgicos em relação aos receptores serotoninérgicos centrais e periféricos (KAPUR et.al., 1999).

No presente estudo o pré-tratamento com AITC, um agonista TRPA1, administrado por gavagem antagonizou parcialmente a inibição do trânsito gastrintestinal induzida pela clozapina em 37%. Esse achado sugere a participação dos receptores TRPA1 no mecanismo de ação da clozapina sobre a função motora gastrintestinal. Outros estudos sugerem a utilização de agonistas TRPA1 no tratamento da constipação intestinal (KOJIMA et. al., 2009 e 2014). Neste sentido a administração de AITC parece acessar diretamente, quando administrado v.o., células da mucosa gastrintestinal como as células enterocromafins e enteroendócrinas e estimular a liberação e fatores estimulantes da contração muscular GI como a serotonina (5-HT) e a acetilcolina (ACh) respectivamente (CAPASSO et. al., 2012). Estudos eletrofisiológicos demonstram efeitos contraditórios *in vitro*, nos quais a incubação com AITC e a estimulação dos receptores TRPA1 parece inibir contrações no músculo liso isolado do cólon proximal de cobaias, no entanto não alterou o padrão contrátil gástrico ou do intestino proximal (POOLE et. al., 2011). Outro estudo mostrou a capacidade do AITC de contrair o músculo liso isolado do cólon distal de camundongos e inibir o padrão contrátil do íleo (CAPASSO et. al., 2012). Em cultura de células o AITC mostrou-se capaz de induzir uma maior sensibilização de neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal à despolarização através do aumento do influxo de íons cálcio (MORI et. al., 2011). Receptores TRPA1 também são ativados por moléculas do sistema endocanabinóide como o canabidiol e o canabicromeno (KANEKO; SZALLASI, 2013) o que também poderia justificar os resultados obtidos no presente estudo. O bloqueio de receptores TRPA1 também justificaria a ausência de queixas álgicas relacionadas a constipação em casos graves induzidos pela clozapina (De HERT et. al., 2011b e BAPTISTA et. al., 2015).

A ausência de resposta antagônica sobre a inibição do transito gastrintestinal induzida pela clozapina após o pré-tratamento com o antagonista opióide, naloxona ou com o inibidor

da produção de óxido nítrico, L-NAME mostrou ausência de participação direta dessas vias no mecanismo de ação da clozapina sobre a motilidade gastrintestinal.

Estudos eletrofisiológicos, de *patch-clamp* e de análises moleculares (LEE et. al., 2015; KOH et. al., 1998 e 2012), demonstram a presença de canais de potássio dependentes de ATP nas células musculares lisas de todo o TGI e que participam na manutenção potencial de repouso de membrana, na frequência e amplitude dos potenciais de ondas lentas e na regulação da excitabilidade e atividade espontânea do músculo liso gastrintestinal e consequentemente na motilidade intestinal.

A glibenclamida, um bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP aumentou o transito intestinal enquanto o pré-tratamento com glibenclamida foi capaz de prevenir a inibição do trânsito intestinal induzida pela clozapina. Sugere-se, dessa forma, uma participação dos canais de KATP contribuindo através do aumento da condutância do potássio para uma hiperpolarização das células musculares lisas intestinais para a redução do transito intestinal induzido pela clozapina. Na camada muscular do estomago os canais de potássio KATP estão presentes, mas não estão ativos constitucionalmente (LEE et. al., 2015) e não foram avaliados quanto a sua participação no mecanismo do esvaziamento gástrico. Canais de potássio dependentes de voltagem (K_V), canais de potássio dependentes de cálcio (SK) e os canais retificadores de potássio (K_{IR}) não foram avaliados quanto sua participação no mecanismo de ação da clozapina sobre a motilidade GI.

Tal resultado pode ser explicado se considerarmos que Estudos eletrofisiológicos anteriores demonstraram a presença de canais de potássio sensíveis ao ATP no músculo liso de todo o trato gastrintestinal e sua importante contribuição na manutenção do potencial de repouso da membrana celular do músculo liso gastrintestinal e consequentemente na coordenação da motilidade do TGI (KOH et. al., 1998; LEE et. al., 2015).

A utilização do antagonista CB1, AM251, previu totalmente a inibição do trânsito intestinal induzida pela clozapina. Pode-se sugerir a partir dos resultados obtidos uma importante participação do sistema endocanabinóide no mecanismo de ação da clozapina sobre o transito gastrintestinal. Entretanto devido à baixa afinidade da clozapina pelos receptores CB1, conclui-se que a mesma deve estar modulando o tônus canabinóide intestinal indiretamente via receptores serotoninérgicos (SUNDRAM et. al., 2005).

Tendo em vista a ação modulatória de agonistas canabinóides sobre receptores 5-HT₃ no gânglio nodoso de cobaias (FAN, 1995; LÓPEZ-REDONDO et. al., 1997), pode-se supor

uma ação cruzada da clozapina sobre receptores canabinóides CB1, tal hipótese seria um possível desdobramento do presente estudo.

Um dos efeitos do aumento da atividade do sistema endocanabinóide (ECS) é o aumento da condutância do potássio e hiperpolarização neuronal (KREITZER; REGEHR, 2001) e consequente inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios nas juncções sinápticas e fendas varicosas musculares. A abertura de canais de K sensíveis ao ATP bloqueada pelo pré-tratamento com glibenclamida reforça a modulação de canais iônicos no SNE como possíveis vias de ação para futuros fármacos no tratamento/prevenção da constipação induzida pela clozapina (DE GIORGIO et. al., 2007). Para tanto, novas investigações seriam necessárias ao nível molecular.

Novos estudos eletrofisiológicos poderiam ajudar a correlacionar a clozapina com a condutância cátions a nível intestinal e a hiperpolarização de neurônios das vias excitatória ou a sensibilização de neurônios inibitórios periféricos gastrointestinais.

A inibição das vias excitatórias intrínsecas e extrínsecas do SNE pela clozapina se relaciona direta e indiretamente à atividade endocanabinóide sobre a motilidade gastrintestinal. De tal forma que o agonista inverso de CB1, o AM251 bloqueou de maneira significativa a inibição do trânsito gastrintestinal pela clozapina. Os resultados sugerem a hipótese de que o tônus canabinóide estaria aumentado após o tratamento com clozapina e de que receptores CB1 expressos em neurônios colinérgicos e serotoninérgicos do PM e em vias vagais colinérgicas inibem a liberação de acetilcolina, serotonina, substancia P e VIP por esses neurônios, produzindo efeito inibidor da peristalse gastrintestinal (ABALO et. al., 2012).

No entanto o mesmo não ocorreu em relação à inibição da excreção de pelotas fecais pela clozapina. Os dados obtidos sugerem que a nível colônico a atividade endocanabinóide não estaria diretamente implicada no mecanismo de ação da clozapina ou que os receptores CB1 estariam inacessíveis à ação do AM251 administrado intraperitonealmente ou ainda que o mecanismo de ação da clozapina sobre o sistema endocanabinóide colônico estivesse ocorrendo de maneira diversa e não prevenível pelo pré-tratamento com o AM251, visto que em outros estudos o AM251 não alterou a sensibilidade do músculo liso do colón de cobaias à despolarização evocada pelo impulso elétrico, diferente de outro agonista inverso já utilizado na clínica, mas que teve sua utilização suspensa devido a seus efeitos colaterais sobre o TGI, o Rimonabanto (STORR et. al., 2010) o qual não foi testado no presente estudo. Mais estudos serão necessários para abordar essa questão.

Estudos em microscopia confocal demonstram a formação de heterodímeros CB1 e DRD2 em neurônios do SNC (PERTWEE et. al., 2010). Receptores CB1/DRD2 respondem tanto a ligantes canabinóides como a agonistas dopaminérgicos e exercem ações excitatórias ou inibitórias dependendo do acoplamento a proteínas G e do microambiente em que se inserem (PERTWEE et. al., 2010). Estudos in vitro demonstram antagonismo endocanabinoide sobre receptores 5-HTR3 neuronais (XIONG et. al., 2008). Questões sobre a localização, distribuição e mecanismos de internalização dos receptores serotoninérgicos, canabinóides e canais de cátions em diferentes porções do TGI e neurônios do SNE precisam ser investigadas e respondidas.

No presente estudo, a clozapina na dose de 10 e 20 mg/kg reduziu significativamente o transito intestinal em camundongos de maneira aguda em minutos. Um estudo da administração subaguda ou crônica da clozapina in vivo e seus efeitos sobre o TGI poderia contribuir na elucidação do mecanismo de ação da clozapina quando do seu uso prolongado. Em revisão sistemática a dose de clozapina em humanos relacionada a ocorrência de casos graves de constipação variou de 300 a 900 mg/dia em dias a anos (HIBBARD et. al., 2009). No entanto a dose total não parece apresentar correlação com o tempo de uso necessário para o aparecimento do sintoma, o que pode estar mais relacionado outros fatores, como a variações individuais quanto a metabolização da droga e à velocidade de titulação da dose. Metabolizadores rápidos respondem com menores doses enquanto os mais lentos necessitam de maiores doses para obter o mesmo efeito terapêutico, aumentando o risco de ocorrência de efeitos adversos (DETTLING et. al., 2000).

Dentre as hipóteses levantadas pela pesquisa, aquela que unificaria os resultados experimentais obtidos seria uma atividade da clozapina e de seus metabólitos sobre a neurotransmissão serotoninérgica (HEISER et. al., 2004) e consequente bloqueio secundário de receptores colinérgicos e de canais de cátion TRPA1, promovendo indiretamente a importância da atividade inibitória canabinóide e das condutâncias de potássio sobre a motilidade GI. A convergência desses eventos acarretaria a hipomotilidade gastrintestinal induzida pela clozapina.

Extensas lacunas ainda persistem para uma completa compreensão das vias serotoninérgicas e canabinóides, e sua relação com o SNE e a motilidade gastrintestinal, no entanto o presente estudo ressalta sua importância na regulação da função motora intestinal e a necessidade de aprofundarmos os estudos dessas vias sobre a motilidade do trato gastrintestinal. Novos estudos em músculo liso gastrintestinal isolado, de microscopia confocal e de docking

molecular serão necessários afim de melhor caracterizar a anatomia farmacológica dos receptores canabinóides a nível de SNE e sua relação com o mecanismo de ação da clozapina.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Os efeitos da clozapina sobre o transito gastrintestinal e sobre a expulsão de pelotas fecais são característicos de sua ação sobre a motilidade gastrintestinal.

A constipação decorrente é consistente com as observações clínicas em pacientes esquizofrênicos tratados com clozapina. A constipação induzida pela clozapina parece ser multifatorial envolvendo a modulação de vários neurotransmissores tanto em nível central quanto periférico.

Primariamente destaca-se a atividade antagônica da clozapina sobre os receptores serotoninérgicos intestinais e secundariamente o bloqueio de canais TRPA1, ativação de canais de potássio ATP dependentes e o antagonismo colinérgico. Desse mecanismo farmacodinâmico decorreria de forma resultante um aumento da importância da via inibitória endocanabinóide sobre o SNE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALO R.; VERA G.; LOPEZ-PEREZ A.E.; MARTINEZ-VILLALUENGA M.; MARTIN-FONTELES M.I. **The Gastrointestinal Pharmacology of Cannabinoids: Focus on Motility.** Pharmacology 2012; 90:1-10.

ABI-DARGHAM A. **Do we still believe in the dopamine hypothesis?** New data bring new evidence. Int J Neuropsychopharmacol. 2004; 7 (1):1-5.

ANEJA J.; SHARMA N.; MAHAJAN S.; CHAKRABARTI S.; GROVER S. **Eosinophilia Induced by Clozapine:** A Report of Two Cases and Review of the Literature. J Family Med Prim Care. 2015; 4(1): 127-129.

ANNERINNO D.M.; ARSHAD S.; TAYLOR G.M.; ADLER C.H.; BEACH T.G.; GREENE J.G. **Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss.** Acta Neuropathol. 2012; 124(5): 665-680.

ASENJO L. C.; KOMOSSA K.; RUMMEL-KLUGE C.; HUNGER H.; SCHIMD F.; SCHAWRZ S.; LEUCHT S. **Clozapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia.** Cochrane Database Syst Rev. 2010; 10(11):CD006633.

ASHBY C.R. Jr.; WANG R.Y. **Pharmacological actions of atypical antipsychotic drug clozapine:** a review. Sinapse 1996; 24(4):349-394.

BALDASSANO S.; ZIZZO M.G.; SERIO R. et al. **Interaction between cannabinoid CB1 receptors and endogenous ATP in the control of spontaneous mechanical activity in mouse ileum.** Br. J. Pharmacol. 2009; 158: 243-51.

BALDESSARINI R.J.; FRANENBURG F.R. **Clozapine. A novel antipsychotic agent.** N Engl J Med. 1991; 324(11):746-754.

BARONDES S.H.; ALBERTS B.M., YOLKEN R.H. et. al. **Workshop on Schizophrenia,** Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94(5): 1612-1614.

BAPTISTA T.; CARRIZO E.; FERNANDEZ E.; CONNEL L.; SERVIGNA M.; PARRA A.; QUINTERO J.; PABÓN A.; SANDIA I.; UZCÁTEGUID E.; SERRANO A.; PIRELA N.; VILLARREAL L. **Colonic transit diagnostic test shows significant hypomotility in clozapine-treated patients in comparison with subjects treated with other antipsychotics.** Schizophrenia Research 2015; 166:207-211.

BLACKSHAW L.A.; BRIERLEY S.M.; HUGHES P.A.; HARRINGTON A.M. **The hot mustard receptor's role in gut motor function.** Gastroenterology 2011; 141: 423-427.

BOLDEN C.; CUSACK B.; RICHELSON E. **Antagonism by antimuscarinic and neuroleptic compounds at the five cloned human muscarinic cholinergic receptors expressed in Chinese hamster ovary cells.** J Pharmacol Exp Ther. 1992;260(2):576-580.

_____. **Clozapine is a potent and selective muscarinic antagonist at the five cloned human muscarinic acetylcholine receptors expressed in CHO-K1 cells.** Eur J Pharmacol. 1991; 192(1):205-206.

BROWN S.; KIM M.; MITCHELL C.; INSKIP H. **Twenty five year mortality of a community cohort with schizophrenia.** Br. J. Psychiatry 2010; 196: 116-121.

CAMILLERI M.; VAN OUTRYVE M.; BEYENS G.; KERSTENS R.; ROBINSON P.; VANDEPLASSCHE L; **Clinical trial:** the efficacy of open-label prucalopride treatment in patients with chronic constipation - follow-up of patients from the pivotal studies. Aliment Pharmacol Ther. 2010; 32:1113–1123.

CAPASSO R.; AVIELLO G.; ROMANO B.; BORRELLI F.; DE PETROCELLIS L.; DI MARZO V.; IZZO A.A. **Modulation of mouse gastrointestinal motility by allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables (Brassicaceae): evidence for TRPA1-independent effects.** Br J Pharmacol. 2012; 165(6):1966-1977.

CASPASSO F., DE RUGGIERO G., DI ROSA M., SORRENTINO L. **Pharmacological research on a deethylate metabolite of 4-amino-5-chloro-N-(2-diethylaminoethyl)-2-methoxybenzamide (metoclopramide).** Boll Chim Farm 1976; 115: 649-657

CASEY D.E. **Metabolic issues and cardiovascular disease in patients with psychiatric disorders.** Am. J. Med. 2005; 118(2):15S-22S.

CENTORRINO F.; BALDESSARINI R.J.; KANDO J.C.; FRANKENBURGF.R.; S.A. VOLPICELLI S.A.; FLOOD J.G. **Clozapine and metabolites:** concentrations in serum and clinical findings during treatment of chronically psychotic patients, J. Clin. Psychopharmacol. 1994; 14:119–125.

CHEY W.D.; DROSSMAN D.A.; JOHANSON J.F.; SCOTT C.; PANAS R.M.; UENO R. **Safety and patient outcomes with lubiprostone for up to 52 weeks in patients with irritable bowel syndrome with constipation.** Aliment Pharmacol Ther. 2012; 35(5):587-599.

COHEN D.; BOGERS J.P.; VAN DIJK D.; BAKKER B.; SCHULTE P.F. **Beyond white blood cell monitoring:** screening in the initial phase of clozapine therapy. J. Clin. Psychiatry. 2012; 73(10): 1307–1312.

COUTTS A.A.; IRVING A.J.; MACKIE K.; PERTWEE R.G.; ANAVI-GOFFER S.; **Localisation of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus.** J. Comp. Neurol. 2002; 448: 410–422.

CUNHA R.A.; RIBEIRO J.A. **ATP as a presynaptic modulator.** Life Sci. 2000; 68:119–37.

DARMANI N.A.; JANOVAN J.J.; KUMAR N.; CRIM J.L. **Behaviorally active doses of the CB1 receptor antagonist SR 141716A increase brain serotonin and dopamine levels and turnover.** Pharmacol. Biochem. Behav. 2003; 75: 777–787.

DE GIORGIO R.; BARBARA G.; FURNESS J.B.; TONINI M. **Novel therapeutic targets for enteric nervous system disorders.** Trends Pharmacol Sci. 2007; 28(9):473-481.

DE HERT M.; HUDYANA H.; DOCX L.; BERNAGIE C.; SWEERS K.; TACK J.; LEUCHT S.; PEUSKEN J. **Second-generation antipsychotics and constipation:** a review of the literature. Eur Psychiatry 2011a; 26(1):34-44.

- DE HERT M.; DOCX L.; BERNAGIE C.; PEUSKENS B.; SWEERS K.; LEUCHT S.; TACK J.; Van de STRAETE S.; WAMPERS M.; PEUSKENS J. **Prevalence and severity of antipsychotic related constipation in patients with schizophrenia: a retrospective descriptive study.** BMC Gastroenterol. 2011b; 11: 17.
- DELAY J.; DENIKER P.; HARL J.M. **Therapeutic use in psychiatry of phenothiazine of central elective action (4560 RP).** Ann Med Psychol. 1952; 110(21):112-117.
- DETTLING M.; SACHSE C.; BROCKMÖLLER J.; SCHELEY J.; OERLINHAUSEN B.M.; PICKERSGILL I.; ROLFS A.; SCHAUB R.; RAINER T.; SCHIMIDER J. **Long-term therapeutic drug monitoring of clozapine and metabolites in psychiatric in- and outpatients.** Psychopharmacology 2000; 152(1):80-86.
- DIVAC N.; PROSTRAN M.; JAKOVCEVSKI I.; CEROVAC N. **Second generation antipsychotics and extrapyramidal adverse effects.** Biomed Res Int. 2014; 6:563-570.
- DUARTE-ARAÚJO M.; NASCIMENTO C.; TIMOTEO M.A. et al. **Relative contribution of ecto-ATPase and ecto-ATPDase pathways to the biphasic effect of ATP on acetylcholine release from myenteric motoneurons.** Br. J. Pharmacol. 2009; 156: 519–533.
- FAN, P. **Cannabinoid agonists inhibit the activation of 5-HT3 receptors in rat nodose ganglion neurons.** J. Neurophysiol. 1995; 73:907 ± 910.
- FITZSIMONS J.; BERK M.; LAMBERT T.; BOURIN M.; DODD S. **A review of clozapine safety.** Expert Opin Drug Saf. 2005; 4(4):731-744.
- FLANAGAN R.J.; BALL R.Y. **Gastrointestinal hypomotility:** An under-recognised life-threatening adverse effect of clozapine. Forensic Science International 2011; 206:e31–e36.
- FURNESS J.B.; JONES C.; KULMIRA NURGALI K.; CLERC N. **Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine.** Progress in Neurobiology 2004; 72(2):143-164.
- GERSHON M.D.; TACK J. **The Serotonin Signaling System:** From Basic Understanding to drug development for functional GI disorders. Gastroenterology 2007; 132(1):397-414.
- GERSHON M.D. **5-hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract.** Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 2013; 20(1): 14-21.
- GIBBINS I. **Functional organization of autonomic neural pathways.** Organogenesis. 2013; 9:169 – 175.
- GIBBONS, S.J.; FARRUGIA G. **The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract.** J Physiol. 2004; 556:325–336.
- GRIDER J.R. **Neurotransmitters Mediating the Intestinal Peristaltic Reflex in the Mouse.** JPET. 2003; 307:460–467.

GRIDER J.R.; MAHAVADI S.; LI Y.; QIAO L.Y.; KUEMMERLE J.F.; MURTHY K.S.; MARTIN B.R. **Modulation of motor and sensory pathways of the peristaltic reflex by cannabinoids.** Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2009; 297: G539–G549.

GUYTON A.C.; HALL J.E. **Tratado de Fisiología Médica.** Elsevier Brasil, 2006; 1115 p

HAWKES N. D.; RHODES J.; EVANS B. K.; RODHES P.; HAWTHORNE A. B.; THOMAS G. A. O. **Naloxone treatment for irritable bowel syndrome:** a randomized controlled trial with an oral formulation. Aliment Pharmacol Ther. 2002; 16: 1649–1654.

HAYES B.; GIBLER B. **Clozapine-induced constipation.** Am J Psychiatry. 1995; 152:298.

HEISER P.; SCHULTE E.; HAUSMANN C.; BECKER R.; REMSCHIMDT H.; KRIEG J.C.; VEDDER H. **Effects of clozapine and its metabolites on the 5-HT 2 receptor system in cortical and hippocampal cells in vitro.** Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry 2004; 28(2):297-302.

HIBBARD K.R.; PROPST A.; FRANK D.E.; WYSE J. **Fatalities associated with clozapine-related constipation and bowel obstruction:** a literature review and two case reports. Psychosomatics. 2009; 50(4):416-419.

HONS I.M.; STORR M.A.; MACKIE K.; LUTZ B.; PITTMAN Q.J.; MAWE M.; SHARKEY K.A. **Plasticity of mouse enteric synapses mediated though endocannabinoid and purinergic signaling.** Neurogastroenterol Motil. 2013; 24(3): e113–e124.

HORNBY P.J.; PROUTY S.M. **Involvement of cannabinoid receptors in gut motility and visceral perception.** Br. J. Pharmacol. 2004; 141: 1335-1345.

IZZO A.A.; COUTS A.A., **Cannabinoids and the gastrointestinal tract.** Hand. Exp. Pharmacol. 2005; 168:573-598.

JAFFARI S.; FERNANDEZ-ENRIGHT F.; HUANG X. **Structural contributions of antipsychotic drugs to their therapeutic profiles and metabolic side effects.** Journal of neurochemistry 2012; 120: 371-384.

JANN, M. W. **Clozapine (Review).** Pharmacotherapy 1991; 11(3):179-195.

JUST M.J. **The influence of atypical antipsychotic drugs on sexual function.** Neuropsychiatric Disease and Treatment 2015;11 1655–1661.

KAHN R.S.; SIEVER L.; DAVIDSON M.; GREENWALD C.; MOORE C. **Haloperidol and clozapine treatment and their effect on M-chlorophenylpiperazine-mediated responses in schizophrenia:** implications for the mechanism of action of clozapine. Psychopharmacology 1993; 112:S90-S94.

KANEKO Y.; SZALLASI A. **Transient receptor potential (TRP) channels:** a clinical perspective. Br. J. Pharmacol. 2014; 171(10):2474-2507.

KAPUR S.; ZIPURSKY R.B.; REMINGTON G. **Clinical and Theoretical Implications of 5-HT2 and D2 Receptor Occupancy of Clozapine, Risperidone, and Olanzapine in**

Schizophrenia Am J Psychiatry 1999; 156:286-293.

KAPUR S. Psychosis as a state of aberrant salience: a framework linking biology, phenomenology, and pharmacology in schizophrenia. Am J Psychiatry 2003; 160(1):13-23.

KECK P.E. Jr.; STROWISKI S.M.; McELROY S.L. The efficacy of atypical antipsychotics in the treatment of depressive symptoms, hostility, and suicidality in patients with schizophrenia. J Clin Psychiatry 2000; 61(3):4-9.

KIM M.J.; SON H.J.; SONG S.H.; JUNG M.; KIM Y, et al. The TRPA1 Agonist, Methyl Syringate Suppresses Food Intake and Gastric Emptying. PloS one 2013; 8(8):e71603.

KOJIMA R.; DOIHARA H.; NOZAWA K.; KAWABATA-SHODA E.; YOKOYAMA T.; ITOU H. Characterization of two models of drug-induced constipation in mice and evaluation of mustard oil in these models. Pharmacology. 2009;84(4):227-233.

KOJIMA R.; NOZAWA K.; DOIHARA H.; KETO Y.; KAKU H.; YOKOYAMA T.; ITOU H. Effects of novel TRPA1 receptor agonist ASP7663 in models of drug-induced constipation and visceral pain. Eur J Pharmacol. 2014; 723:288-293.

KOH S.D.; BRADLEY K.K.; RAE M.G.; KEEF K.D.; HOROWITZ B.; SANDERS K.M. Basal activation of ATP-sensitive potassium channels in murine colonic smooth muscle cell. Biophys J. 1998; 75: 1793–1800.

KOH S.D.; WARD S.M.; SANDERS K.M. Ionic conductances regulating the excitability of colonic smooth muscles. Neurogastroenterol Motil. 2012; 24: 705–718.

KREITZER A.C.; REGEHR W.G. Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. Neuron. 2001; 29: 717–727.

KUEMMERLE J.F.; MURTHY K.S.; GRIDER J.R.; MARTIN D.C.; MAKHLOUF G.M.; Coexpression of 5-HT2A and 5-HT4 receptors coupled to distinct signaling pathways in human intestinal muscle cells. Gastroenterology. 1995; 109(6):1791-1800.

LEE J.Y.; KO E.; AHN K.D.; KIM S., RHEE P. The role of K conductances in regulating membrane excitability in human gastric corpus smooth muscle. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2015; 308: G625–G633.

LEUNG J.Y.; BARR A.M.; PROCYSHYN R.M.; HONER W.G.; PANG C.C. Cardiovascular side-effects of antipsychotic drugs: the role of the autonomic nervous system. Pharmacol. Ther. 2012; 135(2):113–122.

LEVIN T.; BARRETT J.; MENDELOWITZ A. Death from clozapine-induced constipation. Psychomatics 2002, 43(1):71-73.

LI Y.; MATSUDA H.; YAMAHARA J.; YOSHIKAWA M. Acceleration of gastrointestinal transit by momordin Ic in mice: possible involvement of 5-hydroxytryptamine, 5-HT(2) receptors and prostaglandins. Eur J Pharmacol. 2000 Mar 24;392(1-2):71-77.

LIEBERMAN J.A.; SAFFERMAN A.Z.; POLLACK S.; SZYMANSKI S.; JOHNS C.; HOWARD A.; KRONIG M.; BOOKSTEIN P.; KANE J.M. **Clinical effects of clozapine in chronic schizophrenia: response to treatment and predictors of outcome.** Am. J. Psychiatry 1994; 151 (12):1744–1752.

LÓPEZ-REDONDO F.; LEES G.M.; PERTWEE R.G.; **Effects of cannabinoid receptor ligands on electrophysiological properties of myenteric neurones of the guinea-pig ileum.** Br. J. Pharmacol. 1997; 122: 330–334.

LU M.L.; WANG T.N.; LIN T.N.; SHAO W.C.; CHANG S.H.; CHOU J.Y.; HO Y.F.; LIAO Y.T.; CHEN V.C.H. **Differential effects of olanzapine and clozapine on plasma level of adipocytokines and total gherlin.** Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 2015; 58: 47-50.

MARATHE C. S.; RAYNER C. K.; JONES K. L.; HOROWITZ M. **Effects of GLP-1 and Incretin-Based Therapies on Gastrointestinal Motor Function.** Exp Diabetes Res. 2011.

MAWE G.M.; HOFFMAN J.M. **Serotonin Signaling in the Gastrointestinal Tract:** Functions, dysfunctions, and therapeutic targets. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013; 10(8): 473–486.

McEVOY J.P.; MEYER J.M.; GOFF D.C.; NASRALLAH H.A.; DAVIS S.M.; SULLIVAN L.; MELTZER H.Y.; HSIAO J.; SCOTT S.T.; LIEBERMAN J.A. **Prevalence of the metabolic syndrome in patients with schizophrenia:** baseline results from the Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) schizophrenia trial and comparison with national estimates from NHANES III. Schizophr. Res. 2005; 80(1):19–32

McKEAN A.; VELLA-BRINCAT J. **Drug usage to alleviate the adverse effects of clozapine.** Australian Psychiatry. 2011; 19(2):175.

McKINNON N.D.; WATERS B.M.; KAUSTUBH G; JOSHI K.G. **Clozapine-induced Bowel Infarction:** A Case Report, Psychiatry 2009; 6(3):30–35.

MCLEAN P.G.; BORMAN R.A.; LEE K. **5-HT in the enteric nervous system:** gut function and neuropharmacology. Trends in Neurosciences. 2007; 30(1):9-13.

MELTZER H.Y. **Clozapine:** balancing safety with superior antipsychotic efficacy. Clinical Schizophrenia & Related Psychoses 2012; 6(3): 134–144.

MELTZER H.Y.; ALPHS L.; GREEN A.I.; ALTAMURA A.C.; ANAND R.; BERTOLDI A.; BURGEOIS M.; CHOUINARD G.; ISLAM M.Z.; KANE J.; KRISHNAN R.; LINDENMAYER J.P.; POTKIN S. **International Suicide Prevention Trial Study Group Clozapine treatment for suicidality in schizophrenia:** International Suicide Prevention Trial (InterSePT) Arch Gen Psychiatry. 2003; 60 (1):82–91.

MELTZER H.Y.; MATSUBARA S.; LEE J.C. **The ratios of serotonin and dopamine affinities differentiate atypical and typical antipsychotic drugs.** Psychopharmacol Bull. 1989; 25(3):390-392.

MORI N.; KAWABATA F.; MATSUMURA S.; HOSOKAWA H.; KOBAYASHI S.; INOUE K.; FUSHIKI T. **Intragastric administration of allyl isothiocyanate increases carbohydrate oxidation via TRPV1 but not TRPA1 in mice.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011; 300(6):R1494-R1505.

MULLER D.J.; KENNEDY J.L. **Genetics of antipsychotic treatment emergent weight gain in schizophrenia.** Pharmacogenomics. 2006; 7(6):863-887.

MURRAY T.T.; JONES M.E., PATEL D. et. al. **Risk of Mortality (Including Sudden Cardiac Death) and Major Cardiovascular Events in Atypical and Typical Antipsychotic Users: A Study with the General Practice Research Database.** Cardiovascular Psychiatry and Neurology. 2013; 247486.

MURRI M.B.; GUAGLIANONE A.; BUGLIANI M.; CALCAGNO P.; RESPINO M.; SERAFINI G.; INNAMORATI M.; POMPILI M.; AMORE M. **Second-Generation Antipsychotics and Neuroleptic Malignant Syndrome: Systematic Review and Case Report Analysis.** Drugs in R&D. 2015; 15(1): 45–62.

NAKAJIMA S.; TAKEUCHI H.; PLITTMAN E.; FERVAHA G.; GERRETSEN P.; CARAVAGGIO F.; CHUNG J.K.; IWATA J.; REMINGTON G.; GRAFF-GUERRERO A.; **Neuroimaging findings in treatment-resistant schizophrenia:** A systematic review: Lack of neuroimaging correlates of treatment-resistant schizophrenia, Schizophrenia Research 2015; 164 (1-3): 164-175.

NEWCOMER J.W. **Second-generation (atypical) antipsychotics and metabolic effects: a comprehensive literature review.** CNS Drugs 2005; 19(1):1–93.

NIELSEN J.; MEYER J.M. **Risk factors for ileus in patients with schizophrenia.** Schizophr Bull. 2012; 38:592–598.

OLSSON C.; HOLMGREN S. **The control of gut motility.** Comparative Biochemistry and Physiology Part A 2001; 128: 481-503.

PALMER S.E.; MCLEAN R.M.; ELLIS P.M.; HARRISON-WOOLRICH M. **Life – threatening clozapine - induced gastrointestinal hypomotility:** An analysis of 102 cases. J Clin Psychiatry 2008; 69(5):759-68.

PERTWEE R.G. **Cannabinoids and the gastrointestinal tract.** Gut 2001; 48: 859–867.

PERTWEE R.G.; FERNANDO S.R.; NASH J.E.; COUTTS A.A.; **Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in guinea-pig small intestine.** Br J Pharmacol 1996; 118:2199–2205.

PERTWEE R.G.; HOWLETT A.C.; ABOOD M.E.; ALEXANDER S.P.H.; DI MARZO V.; ELPHICK M.R.; GREASLEY P.J.; HANSEN H.S.; KUNOS G.; MACKIE K.; MECHOULAM R.; ROSS R.A. **Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB1**

and CB2. *Pharmacol. Rev.* 2010; 62:588–631.

PEYRIÈRE H.; ROUX C.; FERARD C.; DELEAU N.; KREFT-JAIS C.; HILLAIRE-BUYS D.; BOULENGER J.P.; BLAYAC J.P. **Antipsychotics-induced ischemic colitis and gastrointestinal necrosis:** a review of the French pharmacovigilance database. *Pharmacopidemiol Drug Saf.* 2009; 18(10):948-955.

PHILPOTT H.L.; NANDURKAR S.; LUBEL J.; GIBSON P.R. **Drug-induced gastrointestinal disorders.** *Frontline Gastroenterology* 2014; 5:49–57.

POOLE D.P.; PELAYO J.C.; CATTARUZZA F. et al. **Transient receptor potential ankyrin 1 is expressed by inhibitory motoneurons of the mouse intestine.** *Gastroenterology*. 2011; 141: 565–575.

POTTER W.Z.; GRANT N.K.; LIANG D.Z.; YAN W. **Clozapine in China:** A review and preview of US/PRC collaboration. *Psychopharmacol* 1989, 99:87-91.

POTTER C.E.; STEWART J.T. **Treatment of clozapine-induced constipation with bethanechol.** *J Clin Psychopharmacol.* 2013; 33(5):713-714.

RAO S.; LEMBO A.; SHIFF S.; LAVINS B.; CURRIE M.; JIA X. **A 12-week, randomized, controlled trial with a 4-week randomized withdrawal period to evaluate the efficacy and safety of linaclotide in irritable bowel syndrome with constipation.** *Am J Gastroenterol.* 2012; 107:1714–1724.

REGE S.; LAFFERTY T. **Life-Threatening Constipation Associated with Clozapine.** *Australia's Psychiatry* 2008; 16:216.

ROGE R.; MOLLER B.K.; ANDERSEN C.R.; CORREL C.U.; NIELSEN J. **Immunomodulatory effects of clozapine and their clinical implications:** what have we learned so far? *Schizophr. Res.* 2012; 140(1–3):204–213.

REYNOLDS G.P.; KIRK S.L. **Metabolic side effects of antipsychotic drug treatment—pharmacological mechanisms.** *Pharmacol. Ther.* 2010; 125(1):169–179.

ROERIG J.L.; STEFFEN K.J.; MITCHELL J.E. **Atypical antipsychotic induced weight gain:** insights into mechanisms of action. *CNS Drugs* 2011; 25(12):1035–1059.

ROTH S.H. **Stereospecific presynaptic inhibitory effect of delta9-tetrahydrocannabinol on cholinergic transmission in the myenteric plexus of the guinea pig.** *Can J Physiol. Pharmacol.* 1978; 56: 968–975.

SANYAL S.; VAN TOL H.H. **Review the role of dopamine D4 receptors in schizophrenia and antipsychotic action.** *J Psychiatr Res.* 1997; 31(2):219-232.

SIKANDER A.; RANA S.V.; PRASAD K.K. **Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome.** *Clinica Chimica Acta.* 2009; 403:47–55.

STANNILAND C.; TAYLOR D. **Tolerability of atypical antipsychotics.** *Drug safety* 2000; 22(3):195-214.

STORR M.A.; BASHSHATI M.; HIROTA C. et. al. **Differential effects of CB1 neutral antagonists and inverse agonists on gastrointestinal motility in mice.** Neurogastroenterol Motil. 2010; 22(7): 787–e223.

SZOTA A.; OGIODEK E.; ARASZKIEWCZ A. **Fever development in neuroleptic malignant syndrome during treatment with olanzapine and clozapine.** Pharmacological Reports 2013; 65: 279-287.

SUNDRAM S., COPOLOV D., DEAN B. **Clozapine decreases [3H] CP 55940 binding to the cannabinoid1 receptor in the rat nucleus accumbens.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2005;371(5):428-433.

TAKAHASHI T. **Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract.** J Gastroenterol. 2003; 38(5):421-430.

TALLEY N.J.; JONES M.; NUYTS G.; DUBOIS D. **Risk Factors of Chronic Constipation Based on a General Practical Sample.** Am J Gasteroenterol. 2003; 98:1107-1111.

TUNGARAZA E.T.; FAROOQ S. **Clozapine prescribing in the U.K: views and experience of consultant psychiatrists.** Therapeutic Advances in Psychopharmacology 2015; 5(2): 88-96.

VERBELEN M.; LEWIS C.M. **How close are we to a pharmacogenomic test for clozapine-induced agranulocytosis?** Pharmacogenomics 2015; 16(9): 915-917.

WHITNEY Z.; PROCYSHYN R.M.; FREDRIKSON D.H.; BARR A.M. **Treatment of clozapine-associated weight gain: a systematic review.** Eur. J. Clin. Pharmacol. 2015; 71:389–401.

WILLIAMS A.M.; PARK S.H. **Seizure Associated with Clozapine:** Incidence, Etiology and Management. CNS Drugs 2015 29:101–111.

WILSON N.; SCHEY, R. **Lubiprostone in constipation:** clinical evidence and place in therapy. Therapeutic Advances in Chronic Disease 2015; 6(2): 40–50.

XIONG W.; HOSOI M.; KOO B.N.; ZHANG L. **Anandamide inhibition of 5-HT3A receptors varies with receptor density and desensitization.** Mol Pharmacol. 2008; 73: 314–322.

YOUNG C.R.; LONGHURST J.G.; BOWERS M.B. et.al. **The expanding indications for clozapine.** Exp Clin Psychopharmacol. 1997; 5:216–234.

YOUNG C.R.; MALCOM B.; BOWERS Jr. M.B.; MANURE C.M. **Management of the Adverse Effects of Clozapine.** Schizophrenia Bulletin. 1998; 24(3):381-390.

ZHANG X.; GUO H., XU J.; LI Z.; LI L.; ZHANG X.; LI X.; FAN R.; ZHANG Y.; DUAN Z.; ZHU J. **Dopamine receptor D1 mediates the inhibition of dopamine on the distal colonic motility.** Translational Research. 2012; 159(5):407-414.

ZHENG L.F.; SONG J.; FAN R.F.; CHEN C.F.; REN Q.Z.; ZHANG X.L.; FENG X.Y.; ZHANG Y.; LI L.S.; ZHU J.X. **The role of the vagal pathway and gastric dopamine in the gastroparesis of rats after a 6-hydroxydopamine microinjection in the substantia nigra.** *Acta Physiol.* 2014; 211:434.