



# Os Inibidores da FAAH Melhoram a Função das Bexigas Inflamadas, Modulando os Níveis de Anandamide e Palmitoil Etanolamida

## *FAAH Inhibitor Improves Function of Inflamed Bladders by Modulation of Anandamide and Palmitoylethanolamide*

Ana Charrua<sup>1,2,3,4</sup>, Rita Matos<sup>4</sup>, Tim Marczylo<sup>5</sup>, Istvan Nagy<sup>6</sup>, Francisco Cruz<sup>1,2,3,7</sup>

### Resumo

**Introdução:** O objectivo foi estudar o efeito do bloqueio da hidrolase da amida dos ácidos gordos na bexiga hiperativa e dos níveis de amidas de ácidos gordos durante a cistite.

**Material e Métodos:** A cistite foi induzida em fêmeas de ratas Wistar usando lipopolissacarídeo a 5 mg/mL. O grupo controlo foi instilado com solução salina. Ambos os grupos receberam intravenosamente (veia caudal), durante cistometria: URB 937 (URB; antagonista da hidrolase da amida dos ácidos gordos - FAAH) em doses de 0,007, 0,07, 0,7 e 7 mg/kg (cumulativamente, com 10 minutos de intervalo). Usando a dose máxima efetiva de URB (0,7 mg/kg, ver em baixo) os animais receberam intravenosamente 10 µM MJ15 (antagonista do recetor CB1) ou 0,3 mg SR144528 /kg (SR; antagonista do recetor CB2). Em doses de 7 mg/kg, os animais receberam 1,4 µg SB366791/kg (SB; antagonista do TRPV1).

Grupos de animais controlo e com cistite (sem receberem ou depois de receberem 0,7 e 7 mg/kg URB) foram eutanasiados e as bexigas foram colhidas para determinação dos níveis de anandamida (AEA) e palmitoil etanolamida (PEA) por espectrometria de massa.

**Resultados:** A frequência dos animais controlo não se alterou com o tratamento de URB. Na cistite, houve um aumento da frequência urinária. URB nas doses de 0,007 mg/kg e 0,07 mg/kg fez diminuir a frequência urinária dos animais com cistite. Na dose de 0,7 mg/kg, o URB reverteu a hiperatividade vesical induzida pela cistite. Na dose de 7 mg/kg, URB não reverteu nem

### Abstract

**Introduction:** We aim to study the effect of fatty acid amide hydrolase (FAAH) blockade on bladder hyperactivity and on fatty acid amides levels during cystitis.

**Material and Methods:** Cystitis was induced in female Wistar rats using 5 mg/mL lipopolysaccharide (LPS). Control group were intravesical instilled with saline. LPS and control groups received intravenously (caudal vein) during cystometry: URB 937 (URB; FAAH antagonist) in doses of 0.007, 0.07, 0.7 and 7 mg/kg (cumulative, with 10 minutes interval). Using the maximal effective dose of URB (0.7 mg/kg, see below) animals received 10 µM MJ15 (CB1 receptor antagonist) or 0.3 mg SR144528 /kg (SR; CB2 receptor antagonist). At dose of 7 mg/kg, animals receive 1.4 µg SB366791/kg (SB; TRPV1 antagonist).

Control and inflamed (without and with 0.7 and 7 mg/kg URB) group were euthanized and the bladder was harvested for the determination of anandamide (AEA) and palmitoylethanolamide (PEA) by mass spectrometry.

**Results:** Frequency of control was not changed by URB treatment at any dose. LPS increase bladder frequency. 0.007 mg and 0.07 mg URB decrease bladder frequency of LPS-inflamed rats. 0.7 URB reversed LPS-induced bladder hyperactivity. At 7 mg, URB was unable to reverse or reduce LPS-induced bladder hyperactivity.

The administration of CB1, CB2 and TRPV1 antagonists did not change the frequency of voiding contractions of naïve animals. CB1 antagonist reversed the effect of 0.7 URB while TRPV1 antagonist reduced the effect of 7 URB.

AEA levels increase during inflammation. Treating LPS-inflamed animals with 0.7 mg URB brought AEA levels to control levels. Treating LPS-inflamed animals with 7 mg URB did not change AEA levels, compared to LPS-inflamed animals.

PEA levels decrease during inflammation. Treating LPS-inflamed animals with 0.7 mg URB brought AEA levels to control levels. Treating LPS-inflamed animals with 7 mg URB, decreased PEA levels to values similar to the ones observed in LPS-inflamed animals.

**Conclusion:** During cystitis, the FAAH inhibitor raises the le-

<sup>1</sup>i3S - Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>2</sup>IBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>3</sup>Departamento de Doenças Renais, Urológicas e Infeciosas, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>4</sup>Departamento de Biologia Experimental, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>5</sup>Public Health England, Chilton, United Kingdom

<sup>6</sup>Department of Surgery & Cancer, Faculty of Medicine, Imperial College of London, London, United Kingdom

<sup>7</sup>Departamento de Urologia, Hospital S. João, Porto, Portugal



reduziu a hiperatividade vesical induzida pela cistite.

A administração dos antagonistas dos recetores CB1, CB2 e TRPV1 não alterou a frequência urinária dos animais controlo. O antagonista do recetor CB1 reverteu o efeito induzido por 0,7 mg URB/kg enquanto o antagonista do TRPV1 reduziu o efeito induzido por 7 mg URB/kg.

Os níveis de AEA na bexiga aumentaram com a cistite. A administração de 0,7 mg URB/kg aos animais com cistite baixou níveis de AEA para níveis semelhantes aos dos animais controlo. A administração de 7 mg URB/kg em animais com cistite não alterou os níveis de AEA, comparando com os animais com cistite. Os níveis de PEA diminuíram com a cistite. A administração de 0,7 mg URB/kg aos animais com cistite elevou os níveis de PEA para valores semelhantes aos dos animais controlo. A administração de 7 mg URB/kg em animais com cistite baixou níveis de PEA para níveis semelhantes aos dos animais com cistite.

**Conclusão:** Na cistite, o inibidor da FAAH aumentou os níveis de PEA e reverteu a frequência urinária, por um mecanismo que envolve o recetor CB1. Quando usado em doses muito elevadas, o antagonista da FAAH aumenta os níveis de AEA e aumenta da frequência urinária por um mecanismo dependente do TRPV1. Assim sendo, a escolha da dose do inibidor da FAAH a ser usado na clínica deverá considerar os efeitos putativos sobre os níveis de endocanabinóide no sistema.

**Palavras-chave:** Ácidos Araquidónicos; Ácidos Palmíticos; Anti-Inflamatórios; Bexiga Urinária; Dor; Endocanabinóides.

## Introdução

Os mecanismos de dor visceral associados a disfunção da bexiga são ainda pouco conhecidos. No entanto, é sabido que o processo envolve a sensibilização de neurónios aferentes primários nociceptivos, nomeadamente neurónios que expressam TRPV1.<sup>1</sup> Na cistite, o TRPV1 é ativado por moléculas endógenas como a anandamida (AEA, do inglês *arachidonoyl ethanolamine*). Esta molécula, em condições fisiológicas atua sobre recetor canabinóide 1 (CB1) e recetor canabinóides 2 (CB2) promovendo o relaxamento do detrusor.<sup>2</sup> No entanto, na cistite, atua sobre o TRPV1, contribuindo para o desenvolvimento da hiperalgesia e hiperreflexia vesical.<sup>3</sup> Pensa-se que a ação da AEA nestes recetores esteja intimamente ligada com os seus níveis na bexiga. Ou seja, quando em níveis mais baixos, atua sobre os recetores canabinóides e em níveis mais altos atua sobre o TRPV1.<sup>4</sup> Esta hipótese é corroborada pela observação feita anteriormente pelo nosso grupo de trabalho, em que se verificou que rata-

*zanas fêmeas com cistite apresentam níveis de anandamida muito mais elevados do que ratas controlo.<sup>3</sup> A ação da anandamida sobre os recetores canabinóides é potenciada pela amida de ácido gordo palmitoil etanolamida (PEA, do inglês *palmitoylethanolamide*), através de um efeito *entourage*.<sup>5</sup> De facto, num modelo animal de cistite verificou-se que a administração exógena de PEA exógena atenuou o comportamento doloroso vesical, através do recetor CB1.<sup>6</sup> Os níveis de AEA e de PEA são controlados enzimaticamente, quer pela enzima que as produzem, a N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipase D (NAPE-PLD, do inglês *N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D*),<sup>7</sup> quer pelas enzimas que as preferencialmente degradam, a hidrolase da amida de ácidos gordos (FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*) e a amidase ácida hidrolase de N-acil etanolamina (NAAA, do inglês *N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase*), respetivamente.<sup>8,9</sup>*

**Keywords:** *Anti-Inflammatory Agents; Arachidonic Acids; Endocannabinoids; Palmitic Acids; Pain; Urinary Bladder.*

zanas fêmeas com cistite apresentam níveis de anandamida muito mais elevados do que ratas controlo.<sup>3</sup> A ação da anandamida sobre os recetores canabinóides é potenciada pela amida de ácido gordo palmitoil etanolamida (PEA, do inglês *palmitoylethanolamide*), através de um efeito *entourage*.<sup>5</sup> De facto, num modelo animal de cistite verificou-se que a administração exógena de PEA exógena atenuou o comportamento doloroso vesical, através do recetor CB1.<sup>6</sup> Os níveis de AEA e de PEA são controlados enzimaticamente, quer pela enzima que as produzem, a N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipase D (NAPE-PLD, do inglês *N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D*),<sup>7</sup> quer pelas enzimas que as preferencialmente degradam, a hidrolase da amida de ácidos gordos (FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*) e a amidase ácida hidrolase de N-acil etanolamina (NAAA, do inglês *N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase*), respetivamente.<sup>8,9</sup>

A FAAH, que na bexiga se expressa com mais intensidade nas camadas superiores do urotélio,<sup>10,11</sup> degrada a AEA



em ácido araquidônico e etanolamida.<sup>8</sup> Murganhos cujo gene para a FAAH foi deletado apresentam níveis elevados de endocanabinóide no sistema nervoso central, bem como uma redução no comportamento doloroso,<sup>12</sup> indicando que a inibição da FAAH é uma boa ferramenta para a manutenção de níveis elevados de amidas de ácidos gordos e consequentemente manipular processos dolorosos em situações patológicas. A manipulação da FAAH terá também aplicabilidade no tratamento da hiperatividade vesical, uma vez que em ratas com cistite, a inibição da FAAH atenua o comportamento doloroso e aumenta o intervalo entre contrações.<sup>10,11</sup> Assim sendo, o uso de inibidores da FAAH para se aumentar os níveis de amidas de ácidos gordos de forma a obter um efeito analgésico tem sido observada como uma terapêutica promissora para o tratamento da dor vesical crônica. Isto deve-se em parte ao fato da inibição da FAAH, e consequente manipulação de amidas de ácidos gordos endógenas, não promoverem os efeitos secundários despoletados pela ativação dos recetores CB1 presentes no sistema nervoso central, que se verifica aquando da administração de fármacos canabinóides exógenos.

Assim, com o presente trabalho pretendeu-se estudar os efeitos de um antagonista da FAAH na hiperatividade de ratas com cistite e verificar os níveis de AEA e PEA na bexiga, durante a cistite, antes e após a inibição da FAAH.

## Material e Métodos

### INDUÇÃO DA CISTITE

Induziu-se cistite instilando 0,5 mL de uma solução de lipopolissacarídeo (LPS), a 5 mg/mL, durante uma hora, em fêmeas Wistar com 175-200 g, adquiridas na Charles River (Espanha). Animais cuja bexiga foi instilada com soro fisiológico, seguindo o mesmo protocolo, foram usados como controlo.

### CISTOMETRIA

Os animais (n = 6 animais/experiência; 48 animais no total) foram anestesiados com uretano, vinte e quatro horas após a administração da solução salina (animais controlo) ou após a indução de cistite com LPS (animais LPS). Após a colocação do animal sobre uma placa de aquecimento, foi introduzida uma sonda rectal para monitorizar a temperatura corporal. A bexiga foi exposta através de uma incisão no abdómen, e uma agulha foi inserida na cúpula na bexiga para infusão de solução salina a 6 mL/h. A agulha estava ainda ligada a um transdutor de pressão que permite gravação de um cistometrograma. Depois de um período de estabilização de 30 minutos, a frequência urinária foi monitorizada e gravada por 10 minutos.

**EXPERIÊNCIA 1** - Após a estabilização do animal, o inibidor da FAAH URB937 (URB) foi administrado intravenosamente em ambos os grupos (controlo e LPS), em concentrações crescentes de 0,007, 0,07, 0,7, 3,5 e 7 mg/kg, de forma cumulativa.

**EXPERIÊNCIA 2** - Após a estabilização do animal foi administrado um dos conjuntos de fármacos:

- 0,7 mg URB /kg + 10  $\mu$ M MJ15 (antagonista CB1)
- 0,7 mg URB /kg + 0,3 mg SR144528/kg (SR, antagonista CB2)
- 7 mg/kg URB + 1,4  $\mu$ g SB366791/kg (SB, antagonista TRPV1).
- A cistite foi sempre confirmada histologicamente (resultados não apresentados).

### QUANTIFICAÇÃO DE AMIDAS DE ÁCIDOS GORDOS

Para a quantificação de amidas de ácidos gordos usaram-se animais controlo, LPS e LPS tratados quer com 0,7 mg URB/kg quer com 7 mg/kg URB. Para tal, após a administração de todos os fármacos, as bexigas dos animais foram colhidas, pesadas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Todas as bexigas foram homogeneizadas usando azoto líquido e um almofariz. O homogeneizado foi colocado num volume conhecido de metanol e procedeu-se à quantificação dos lípidos por espectrometria de massa.

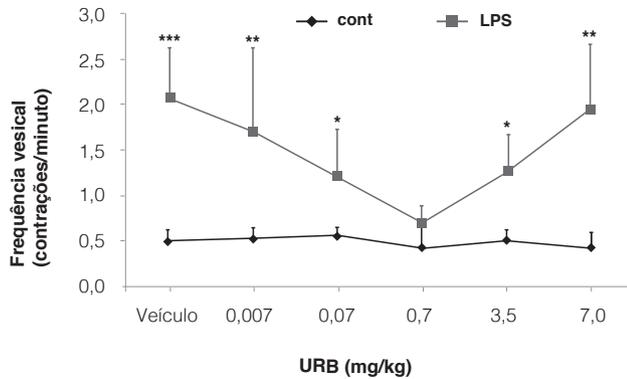
### MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os dados apresentam-se sob a forma de média +/- desvio padrão. Para comparações múltiplas, usou-se o teste ANOVA seguido do teste de Comparações Múltiplas de *Student-Newman-Keuls* para amostras com desvios padrões semelhantes e o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA *non-parametric*) seguida do teste de Comparações Múltiplas de Dunn para amostras com desvios padrões diferentes. Considerou-se a existência de diferenças significativas entre grupos quando o valor de P foi inferior a 5 centésimas.

## Resultados

### ANIMAIS COM CISTITE NÃO RESPONDEM DE FORMA DOSE DEPENDENTE A ADMINISTRAÇÃO DO ANTAGONISTA DA FAAH

Os animais controlo, antes e após o tratamento com doses cumulativas de URB, apresentaram valores de frequência urinária semelhante ( $p > 0,05$ ) como se pode observar na Fig. 1. Os animais LPS urinaram  $2,07 \pm 0,57$  vezes por minuto ( $p < 0,001$ , comparado com qualquer controlo; Fig. 1). A administração intravenosa, sucessiva, de 0,007 mg de URB e 0,07 mg de URB fez diminuir o número de micções/minuto dos animais com cistite para  $1,70 \pm 0,91$  ( $p < 0,01$ , comparado com qualquer controlo; Fig. 1) e para  $1,20 \pm 0,53$  ( $p < 0,05$ , com-

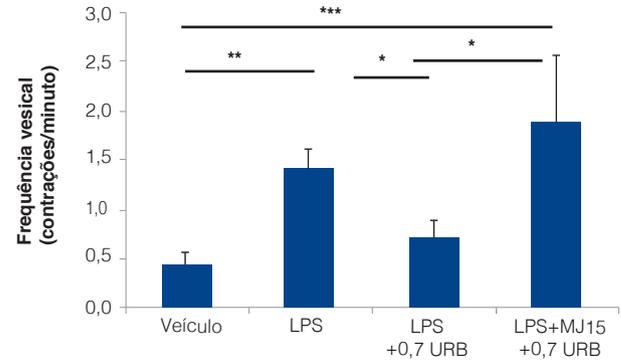


**Figura 1:** Frequência vesical de animais controle (a preto, ◆ cont) e LPS (a cinzento, ■ LPS) antes e após a administração de URB, em doses cumulativas de 0,007, 0,07, 0,7, 3,5 e 7 mg URB/kg. (\*\*\*) corresponde a  $p < 0,001$ ; \*\* corresponde a  $p < 0,01$ ; \* corresponde a  $p < 0,05$ )

parado com qualquer controlo; Fig. 1), respetivamente. A administração intravenosa de 0,7 mg de URB reduziu o número de micções por minuto para  $0,70 \pm 0,20$  ( $p > 0,05$ , comparado com qualquer controlo; Fig. 1), revertendo a hiperatividade vesical causada pela cistite. A administração de 3,5 mg de URB e de 7 mg de URB promoveram um novo aumento, significativo, do número de micções/minuto para  $1,27 \pm 0,41$  ( $p < 0,05$ , comparado com qualquer controlo; Fig. 1) e  $1,97 \pm 0,72$  ( $p < 0,01$ , comparado com qualquer controlo; Fig. 1).

#### A REVERSÃO DA HIPERATIVIDADE DA BEXIGA PELO INIBIDOR DA FAAH ENVOLVE O RECETOR CANABINÓIDES 1

Os animais controle apresentaram  $0,45 \pm 0,12$  contrações por minuto (Fig. 2). O grupo de animais com cistite apresentou uma média de  $1,40 \pm 0,20$  contrações por minuto ( $p < 0,01$  comparado com o grupo controle; Fig. 2). O tratamento de animais com cistite com 0,7 mg de URB fez diminuir o número de contrações por minuto para  $0,70 \pm 0,20$  ( $p < 0,05$  comparado com



**Figura 2:** Frequência vesical de animais controle (veículo), animais com cistite (LPS), animais com cistite tratados com 0,7 mg URB/kg (LPS+0,7 URB) e de animais com cistite tratados com 0,7 mg URB/kg e com o antagonista CB1 MJ15 (\*\*\*) corresponde a  $p < 0,001$ ; \*\* corresponde a  $p < 0,01$ ; \* corresponde a  $p < 0,05$ ).

LPS; Fig. 2). O tratamento de animais com cistite com 0,7 mg de URB e com o antagonista do recetor CB1 induziu  $1,87 \pm 0,72$  contrações por minuto ( $p < 0,001$  comparado com controlo,  $p < 0,05$  comparado com LPS+0,7 URB; Fig. 2).

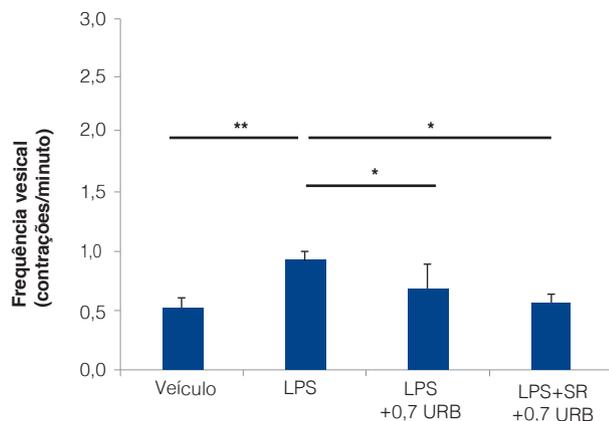
Os animais controle apresentaram  $0,52 \pm 0,08$  contrações por minuto (Fig. 3). O grupo de animais com cistite apresentou uma média de  $0,92 \pm 0,08$  contrações por minuto ( $p < 0,01$  comparado com o grupo controle; Fig. 3). O tratamento de animais com cistite com 0,7 mg de URB fez diminuir o número de contrações por minuto para  $0,70 \pm 0,20$  ( $p < 0,05$  comparado com LPS; Fig. 3). O tratamento de animais com cistite com 0,7 mg de URB e com o antagonista do recetor CB2 induziu  $0,57 \pm 0,05$  contrações por minuto ( $p < 0,05$  comparado com LPS; Fig. 3).

#### A HIPERATIVIDADE DA BEXIGA INDUZIDA POR DOSE ELEVADA DO INIBIDOR DA FAAH ENVOLVE O TRPV1

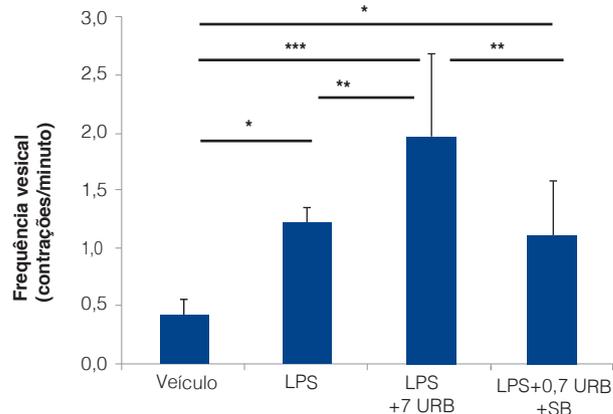
Os animais controle (veículo) apresentaram  $0,40 \pm 0,20$  contra-

**Tabela 1:** Valores dos níveis de anandamida e de palmitoil etanolamida na bexiga.

	Anandamida (nmol/g peso seco da bexiga)	Palmitoil etanolamida (nmol/g peso seco da bexiga)
Controlo	$179 \pm 76$	$160 \pm 54$
LPS	$743 \pm 227$ ( $p < 0,05$ comparado ao controlo)	$4 \pm 1$ ( $p < 0,01$ comparado ao controlo)
LPS + 0,7 mg URB/kg	$190 \pm 55$ ( $p > 0,05$ comparado ao controlo)	$249 \pm 75$ ( $p > 0,05$ comparado ao controlo)
LPS + 7 mg URB/kg	$1010 \pm 470$ ( $p < 0,05$ comparado ao controlo)	$5 \pm 2$ ( $p < 0,05$ comparado ao controlo)



**Figura 3:** Frequência vesical de animais controlo (veículo), animais com cistite (LPS), animais com cistite tratados com 0,7 mg URB/kg (LPS+0,7 URB) e de animais com cistite tratados com 0,7 mg URB/kg e com o antagonista CB2 SR (\*\* corresponde a  $p < 0,01$ ; \* corresponde a  $p < 0,05$ ).



**Figura 4:** Frequência vesical de animais controlo (veículo), animais com cistite (LPS), animais com cistite tratados com 7 mg URB/kg (LPS+0,7 URB) e de animais com cistite tratados com 7 mg URB/kg e com o antagonista TRPV1 SB (\*\*\*) corresponde a  $p < 0,001$ ; \*\* corresponde a  $p < 0,01$ ; \* corresponde a  $p < 0,05$ ).

ções por minuto (Fig. 4). O grupo de animais com cistite apresentou uma média de  $1,20 \pm 0,20$  contrações por minuto ( $p < 0,05$  comparado com o grupo controlo; Fig. 4). O tratamento de animais com cistite com 7 mg de URB fez aumentar o número de contrações por minuto para  $2,00 \pm 0,70$  ( $p < 0,01$  comparado com LPS,  $p < 0,001$  comparado com veículo; Fig. 4). O tratamento de animais com cistite com 7 mg de URB e com o antagonista do TRPV1 induziu  $1,10 \pm 0,05$  contrações por minuto ( $p < 0,05$  comparado com controlo,  $p < 0,01$  comparado com LPS + 7 URB; Fig. 4).

#### OS NÍVEIS DE AMIDAS DE ÁCIDOS GORDOS DEPENDEM DO GRAU DE INIBIÇÃO DA FAAH DURANTE A CISTITE

Os níveis de anandamida e de palmitoil etanolamida variam de maneira inversa durante a cistite (Tabela 1). A inibição da FAAH com 0,7 mg de URB/kg durante a cistite faz retomar os níveis destas amidas de ácidos gordos para valores semelhantes aos observados nos animais controlo (Tabela 1). A inibição da FAAH com 7 mg de URB/kg durante a cistite mantém os níveis de anandamida e de palmitoil etanolamida semelhantes aos observados durante a cistite (Tabela 1).

## Discussão

Os valores da frequência urinária 24 horas após a indução de cistite aumentaram para cerca do triplo do valor observado nos animais controlo. Este aumento foi acompanhado por uma elevação dos níveis de AEA. Estes dados estão de acordo com dados publicados na literatura. Num trabalho anterior do nosso grupo, verificámos que 24 horas após a indução de cistite com 200 mg ciclofosfamida/kg fez aumentar significativamente

quer a frequência urinária, quer os níveis de AEA na bexiga.<sup>3</sup> Também Merriam e colaboradores verificaram que a instilação de 1 mM de acroleína (um metabolito da degradação da ciclofosfamida) na bexiga induziu um aumento dos níveis de AEA comparativamente ao controlo. O aumento dos níveis de AEA durante a inflamação poderá ter várias origens que incluem um aumento da sua produção e/ou uma diminuição da sua degradação pela FAAH. De fato, a FAAH, para além de na inflamação ver a sua expressão reduzida, poderá ter a sua atividade consideravelmente diminuída devido ao baixar do pH.<sup>13,14</sup> O aumento dos níveis de AEA conduz a uma mudança dos receptores dos quais este endocanabinóide é agonista. Em níveis mais elevados, passará a atuar sobre o recetor TRPV1, em vez do recetor CB1, ambos presentes na bexiga promovendo a um aumento da hiperatividade vesical,<sup>3</sup> também observada no presente trabalho. Também se verificou que 24 horas após a indução da cistite houve uma grande diminuição dos níveis de PEA, comparativamente ao controlo. É sabido que a administração exógena de PEA facilita a ação da AEA sobre o recetor canabinóide 1, promovendo uma atenuação da hiperreflexia induzida pela cistite.<sup>15</sup> Assim, a diminuição endógena de PEA verificada na bexiga inflamada poderá ser mais um fator a contribuir para o aumento da frequência urinária, mediada pela AEA, observada durante a inflamação.

Neste trabalho verificámos que a administração intravenosa de doses crescentes do antagonista da FAAH em animais com cistite resultou numa resposta bifásica de frequência urinária. Primeiro decorreu uma diminuição dos valores da frequência urinária que, aquando da administração da dose de 0,7 mg URB/kg chegam a atingir valores semelhantes aos



dos animais controlo. Os níveis de AEA e PEA nas bexigas dos animais com cistite que receberam 0,7 mg URB/Kg também se assemelham ao observado nas bexigas dos animais controlo. Tendo em conta os dados da literatura que referem que a níveis baixos a AEA atua sobre o recetor CB1,<sup>3</sup> este resultado sugere que a redução da concentração da AEA e aumento da PEA faça o primeiro agora sobre o recetor CB1, promovendo uma reversão da hiperreflexia induzida pela cistite (efeito *entourage*). Esta hipótese torna-se mais sólida com a observação feita no presente trabalho em que o bloqueio do recetor CB1 após a inibição da FAAH com 0,7 mg URB/kg volta a revelar a hiperatividade induzida pela cistite. Note-se que o nosso estudo mostrou que na bexiga é o recetor CB1 e não o recetor CB2 que é relevante para o efeito anti-nocetivo e normalizador da função vesical pelos endocanabinóides em concentrações normais.

A administração de doses do antagonista da FAAH acima dos 0,7 mg URB/kg resulta num aumento da frequência urinária dos animais com cistite. Quando administrado a 7 mg de URB/kg, verificou-se que os animais apresentaram uma frequência urinária semelhante ao dos animais com cistite sem a administração do fármaco. A administração desta dose de URB também induziu uma alteração nos níveis de AEA e PEA na bexiga para níveis semelhantes aos observados nos animais inflamados. Estes resultados sugerem que, nestas condições, a AEA (por se encontrar agora em doses elevadas) atue sobre o TRPV1 e (sem ter o efeito *entourage* da PEA que lhe poderia permitir uma ação sobre o recetor CB1) promovendo uma maior atividade vesical. De fato, quando os animais com cistite tratados com 7 mg de URB/kg receberam o antagonista de TRPV1, viram reduzida a sua frequência urinária para valores semelhantes aos dos animais com cistite, demonstrando o envolvimento do recetor neste processo.

A resposta bifásica causada pelos diferentes níveis de AEA foi já descrita noutros sistemas. Por exemplo, Fogaça e colaboradores descreveram um efeito bifásico da AEA quando esta molécula é injetada na substância cinzenta dorso-lateral num modelo de ansiedade em ratazanas.<sup>16</sup> Estes autores demonstraram que em doses baixas a AEA induz efeitos ansiolíticos através da ativação dos recetores CB1 e em doses elevadas, a AEA não reverte a ansiedade por atuar no TRPV1, facilitando a libertação de glutamato.<sup>16</sup>

A inibição da FAAH por qualquer das doses usadas do fármaco vem complementar a já baixa atividade da FAAH observada durante a inflamação.<sup>13,14</sup> Aquando da administração do antagonista na dose de 0,7 mg URB/kg, o bloqueio da FAAH produzirá um aumento da AEA, mesmo que momentâneo, que poderá interferir com a produção, transporte no

citoplasma, bem como com outras enzimas que possam metabolizar este lípido. O fato de na dose de 7 mg URB/kg termos de novo níveis elevados de AEA parece excluir as hipóteses que aumento dos níveis de AEA iniba a sua produção ou interfira com outras enzimas que a metabolizem, uma vez que também com administração desta dose elevada deveríamos verificar uma diminuição da AEA, sugerindo assim que as flutuações nos níveis de AEA observados neste trabalho possam estar intimamente ligados ao sistema de transporte da AEA no citoplasma. Para ser degradada pela FAAH, a AEA migra no citoplasma ligada a transportadores e/ou em vesículas.<sup>17,18</sup> Diferentes trabalhos demonstraram que este sistema de transporte poderá também representar um sistema de acumulação de AEA no citoplasma.<sup>19,20</sup> A acumulação de AEA na célula é influenciada pelo gradiente de concentração, é saturável, é inibida por moléculas com estruturas semelhantes e não requer nem sódio nem ATP para ocorrer.<sup>19</sup> Dado que a acumulação de AEA não é dependente da atividade da FAAH, a sua regulação dependerá mais dos níveis de AEA livre e de outros endocanabinóide, como é o caso da PEA.<sup>19</sup> Isto poderia explicar as alterações dos níveis de AEA e PEA observados aquando da administração de 0,7 mg URB/kg. O fato das AEA saturar os seus transportadores, poderia explicar as diferenças dos níveis, aparentemente contrários, de AEA e PEA observados após a administração de 7 mg URB/kg. No entanto, mais estudos serão necessários para confirmar estas hipóteses.

O controlo dos níveis de AEA pode ser influenciado por outros mecanismos para além dos já descritos. Em humanos, existe também outra enzima, a FAAH-2, que também está envolvida no metabolismo da AEA, tornando este processo ainda mais complexo.<sup>21</sup> A existência de polimorfismos da FAAH revela que a atividade desta enzima poderá ter variações entre diferentes indivíduos. Isto poderá revelar-se um problema a nível clínico já que a mesma dose de um inibidor da FAAH poderá ter efeitos muito díspares de pessoa para pessoa. Mais ainda, as observações feitas neste trabalho demonstram que o intervalo de concentrações de antagonista para o qual o mesmo mostra ser efetivo é reduzido. Esta observação poderá dificultar ainda mais a escolha da dose efetiva para a administração de antagonistas da FAAH. De fato, no único estudo clínico fase 2 publicado, Huggins e colaboradores demonstraram que o uso do inibidor irreversível da FAAH PF-04457845, em doses moderadas, modulou os níveis de endocanabinóide em doentes com osteoartrite no joelho, mas falhou em apresentar os efeitos analgésicos, anteriormente observados em modelos animais.<sup>22,23</sup> Apesar do fármaco PF-04457845 não ter apresentado efeitos adversos



que nos doentes com osteoartrite,<sup>22</sup> quer em pessoa saudável,<sup>24</sup> o mesmo não se verificou com o antagonista da FAAH BIA-10-2474 usado num estudo clínico fase 1. Este fármaco, quando usado em doses muito elevadas, induziu efeitos adversos em seis pessoas, resultando mesmo na morte de um homem. Contudo, este fármaco foi o único antagonista da FAAH, até ao momento, a reportar o desenvolvimento de efeitos adversos, não se sabendo ainda se estes foram causados pela dose usada ou por uma possível falta de especificidade da molécula.

Uma das limitações deste estudo foi ter efetuado as cistometrias em animais anestesiados, não permitindo observar efeitos adversos no comportamento dos animais aquando na administração dos antagonistas dos recetores canabinóides e do TRPV1. Outra limitação do presente estudo é o de não revelar o mecanismo que leva à variação dos níveis dos endocanabinóides aquando do aumento progressivo das doses do antagonista da FAAH. Poder-se-á num estudo futuro usar fármacos que controlem outras enzimas envolvidas no metabolismo dos endocanabinóides estudados para se perceber como estas variações acontecem.

## Conclusão

No seu conjunto, os resultados do presente trabalho mostram que os mecanismos que envolvem a metabolização da AEA são complexos e que a sua modulação poderá produzir efeitos antagónicos. Na cistite, o inibidor da FAAH aumentou os níveis da PEA e reverteu a frequência urinária, por um mecanismo que envolve o recetor CB1. Quando usado em doses muito elevadas, o antagonista da FAAH aumenta os níveis de AEA e aumenta da frequência urinária por um mecanismo dependente do TRPV1.

A escolha da dose do inibidor da FAAH a ser usado na clínica deverá considerar os efeitos putativos sobre os níveis de endocanabinóide no sistema de cada indivíduo, demonstrando que o bloqueio da FAAH poderá ser uma ferramenta pobre para o controlo dos níveis de AEA e seus efeitos no trato urinário inferior. ●

## Responsabilidades Éticas

Conflitos de Interesse: Ana Charrua, Rita Matos, Tim Marczylo, Istvan Nagy não têm conflito de interesses. Francisco Cruz é consultor/investigador/palestrante pela Astellas, Ipsen, Recordati e Allergan.

Fontes de Financiamento: Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

Protecção de Pessoas e Animais: Os autores declaram que os procedimentos seguidos estavam em conformidade com as guidelines definidas no *Guide for the care and use of laboratory animals* dos *National Institutes of Health*.

Confidencialidade dos Dados: Os autores declaram ter seguido os protocolos do seu centro de trabalho acerca da publicação dos dados de doentes.

## Ethical Disclosures

Conflicts of Interest: Ana Charrua, Rita Matos, Tim Marczylo, Istvan Nagy report no conflict of interest. Francisco Cruz is Astellas, Ipsen, Recordati e Allergan consultant / researcher / speaker.

Funding Sources: No subsidies or grants contributed to this work.

Protection of Human and Animal Subjects: The authors declare that the procedures followed were in accordance with the Guide for the care and use of laboratory animals” dos National Institutes of Health.

Confidentiality of Data: The authors declare that they have followed the protocols of their work center on the publication of patient data.

## Autor Correspondente/Corresponding Author

Francisco Cruz - cruzfjmr@med.up.pt  
Departamento de Urologia, Hopsital S. João, Al. Hernâni Monteiro, Porto, Portugal

Recebido/Received: 2017-03-27

Aceite/Accepted: 2017-10-31

## REFERÊNCIAS

- Charrua A, Cruz CD, Cruz F, Avelino A. Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 is essential for the generation of noxious bladder input and bladder overactivity in cystitis. *J Urol*. 2007;177:1537-41.
- Pertwee RG, Fernando SR. Evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in mouse urinary bladder. *Br J Pharmacol*. 1996;118:2053-8.
- Dinis P, Charrua A, Avelino A, Yaqoob M, Bevan S, Nagy I, et al. Anandamide-evoked activation of vanilloid receptor 1 contributes to the development of bladder hyperreflexia and nociceptive transmission to spinal dorsal horn neurons in cystitis. *J Neurosci*. 2004;24:11253-63.
- Hermann H, De Petrocellis L, Bisogno T, Schiano Moriello A, Lutz B, Di Marzo V. Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60:607-16.
- Ho WS, Barrett DA, Randall MD. 'Entourage' effects of N-palmitoylethanolamide and N-oleoylethanolamide on vasorelaxation to anandamide occur through TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol*. 2008;155:837-46.
- Pessina F, Capasso R, Borrelli F, Aveta T, Buono L, Valacchi G, et al. Protective effect of palmitoylethanolamide in a rat model of cystitis. *J Urol*. 2015;193:1401-8.
- Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I, Ueda N. Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J*. 2004;380(Pt 3):749-56.
- Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002;66:173-92.
- Taylor BK. N-acyl ethanolamine acid amidase (NAAA), a new path to unleash PPAR-mediated analgesia. *Pain*. 2013;154:326-7.
- Merriam FV, Wang ZY, Hillard CJ, Stuhr KL, Bjorling DE. Inhibition of fatty acid amide hydrolase suppresses referred hyperalgesia induced by bladder inflammation. *BJU Int*. 2011;108:1145-9.
- Strittmatter F, Gandaglia G, Benigni F, Bettiga A, Rigatti P, Montorsi F, et al. Expression of fatty acid amide hydrolase (FAAH) in human, mouse, and rat urinary bladder and effects of FAAH inhibition on bladder function in awake rats. *Eur Urol*. 2012;61:98-106.
- Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:9371-6.
- Maccarrone M, De Petrocellis L, Bari M, Fezza F, Salvati S, Di Marzo V, et al. Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. *Arch Biochem Biophys*. 2001;393:321-8.
- Holt S, Nilsson J, Omeir R, Tiger G, Fowler CJ. Effects of pH on the inhibition of fatty acid amidohydrolase by ibuprofen. *Br J Pharmacol*. 2001;133:513-20.
- Farquhar-Smith WP, Rice AS. Administration of endocannabinoids prevents a referred hyperalgesia associated with inflammation of the urinary



- bladder. *Anesthesiology*. 2001;94:507-13; discussion 6A.
16. Fogaca MV, Gomes FV, Moreira FA, Guimaraes FS, Aguiar DC. Effects of glutamate NMDA and TRPV1 receptor antagonists on the biphasic responses to anandamide injected into the dorsolateral periaqueductal grey of Wistar rats. *Psychopharmacology*. 2013;226:579-87.
  17. Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG. Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:6375-80.
  18. Fowler CJ. Transport of endocannabinoids across the plasma membrane and within the cell. *FEBS J*. 2013;280:1895-904.
  19. Hillard CJ, Jarrahian A. Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy. *Br J Pharmacol*. 2003;140:802-8.
  20. Maccarrone M, Dainese E, Oddi S. Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem Sci*. 2010;35:601-8.
  21. Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J Biol Chem*. 2006;281:36569-78.
  22. Huggins JP, Smart TS, Langman S, Taylor L, Young T. An efficient randomized, placebo-controlled clinical trial with the irreversible fatty acid amide hydrolase-1 inhibitor PF-04457845, which modulates endocannabinoids but fails to induce effective analgesia in patients with pain due to osteoarthritis of the knee. *Pain*. 2012;153:1837-46.
  23. Ahn K, Smith SE, Liimatta MB, Beidler D, Sadagopan N, Dudley DT, et al. Mechanistic and pharmacological characterization of PF-04457845: a highly potent and selective fatty acid amide hydrolase inhibitor that reduces inflammatory and noninflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338:114-24.
  24. Li GL, Winter H, Arends R, Jay GW, Le V, Young T, et al. Assessment of the pharmacology and tolerability of PF-04457845, an irreversible inhibitor of fatty acid amide hydrolase-1, in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2012;73:706-16.