



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# Papel do resveratrol na Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica - potencial alternativa terapêutica?

**Hélder Sérgio Pinto de Oliveira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutora Mafalda Fonseca

Covilhã, fevereiro de 2017

# Dedicatória

Aos meus pais, pelos valores morais que me transmitiram e pelo apoio incondicional em todas as decisões da minha vida.

# Agradecimentos

À Universidade da Beira Interior, e particularmente à Faculdade de Ciências da Saúde, pela forma familiar como me acolheram e pelos ensinamentos não só científicos, mas também éticos, que guardo desta enriquecedora jornada de 6 anos como vosso aluno.

À minha orientadora, Professora Doutora Mafalda Fonseca pela pronta disponibilidade, dedicação e pertinentes sugestões que tanto contribuíram para a realização da presente dissertação.

Ao Professor Doutor Miguel Castelo Branco pelo exemplo de dedicação incansável para com os alunos e ensino médico que fazem dele uma inspiração e um verdadeiro exemplo a seguir.

À minha família, por serem os meus pilares, pelo apoio incondicional e suporte a todos os níveis durante todo o meu processo formativo. Sem vocês, não seria possível.

À minha companheira Ana Codorniz pela força constante que me transmitiu, pela paciência e pelo incentivo que me deu ao longo dos anos.

Por fim, a todos os meus amigos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta dissertação. Aos antigos que se mostraram sempre presentes apesar das distâncias e àqueles que tive a felicidade de encontrar na minha estadia na Covilhã.

A todos, o meu muito obrigado!

# Resumo e Palavras Chave

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC) é uma doença progressiva e inexorável que afeta mais de 250 milhões de pessoas. Com uma incidência cada mais elevada, acompanhando o crescente consumo global de tabaco, é atualmente a terceira causa de morte a nível mundial, tendo um importante impacto socioeconómico. A sua gestão terapêutica é complexa e principalmente paliativa, não existindo presentemente nenhum fármaco capaz de alterar a história natural da doença. A fisiopatologia da DPOC consiste numa perpetuação da inflamação pulmonar aliada a uma forte componente oxidativa, que resulta da própria inflamação e do fumo do tabaco, seu principal fator de risco.

O resveratrol é um polifenol natural existente nas uvas e classicamente associado ao vinho tinto. Muitos são os benefícios para a saúde que lhe têm sido atribuídos, nomeadamente no tratamento de doenças cardiovasculares, diabetes, inflamação, condições neurodegenerativas e doenças ligadas ao envelhecimento. As suas comprovadas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes fazem deste composto uma potencial alternativa terapêutica em doentes com DPOC.

No presente trabalho, apresentam-se as características da DPOC que a tornam uma patologia peculiar, de difícil tratamento e ao mesmo tempo ideal para uma aplicação potencialmente bem-sucedida do resveratrol. É também desenvolvida uma revisão sistemática sobre os artigos disponíveis em que este fármaco foi testado no contexto desta patologia.

Os resultados obtidos são extremamente promissores, tendo sido observada uma redução substancial da inflamação tanto em culturas de linhas celulares humanas como em pulmões de modelos animais. As capacidades antioxidantes do resveratrol foram verificadas nos modelos da DPOC, observando-se uma dualidade de ação através da neutralização direta das espécies reativas e por modulação da expressão genética dos genes antioxidantes através do promotor Nrf2. O problema da baixa biodisponibilidade é também abordado, tendo sido desenvolvidas formulações aerossolizadas que mantêm uma boa performance farmacológica, o que indica a viabilidade da aplicação desta via. Estas características apontam para que o resveratrol seja uma potencial alternativa aos fármacos atualmente utilizados devendo ser considerada de forma séria.

**Palavras-chave:** Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica, Resveratrol, antioxidante, anti-inflamatório

# Abstract and Keywords

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a progressive disease that affects more than 250 million people. Its incidence is increasing with the overall raising of tobacco consumption. It is currently the third leading cause of death in the world with a significant socioeconomic impact. The actual therapeutic management of COPD is complex and mainly palliative. Currently there is no drug capable of changing the natural progression of the disease. Its pathophysiology consists of a chronic pulmonary inflammation with a strong oxidative component resulting from the inflammation itself and from tobacco smoke which it is the main risk factor.

Resveratrol is a natural polyphenol that can be found in grapes and it's usually associated to the red wine. This compound has been related with some health benefits in the treatment of different disorders like cardiovascular diseases, diabetes, inflammation, neurodegenerative conditions and even in aging diseases. Its anti-inflammatory and antioxidant properties make this compound a potential alternative therapy in patients with COPD.

In the present work COPD's characteristics are presented along with its unique pathophysiology, difficult treatment and its potential for resveratrol application. Thus, a review was performed on the available papers where this drug was described with this pathology.

The results achieved so far are extremely promising showing a substantial inflammation reduction in inflammatory lung cells observed both in human cell cultures as well in animal models in vivo. The antioxidant capacities of resveratrol were verified in the models of COPD. In fact a dual action was observed, one through the direct neutralization of the reactive oxygen species and a second by modeling the genetic expression of the antioxidant genes through the Nrf2 promoter. The problem of low bioavailability of this compound is also addressed. Therefore aerosol formations have been developed as a promising route for medical administration which maintains a good pharmacological performance indicating by itself the viability of this method. Resveratrol's unique characteristics should force us to consider it a serious, potential alternative to the drugs currently being used.

**Keywords:** Resveratrol, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Anti-oxidant, Anti-inflammatory

# Índice

Dedicatória .....	ii
Agradecimentos .....	iii
Resumo e Palavras Chave .....	iv
Abstract and Keywords .....	v
Índice .....	vi
Índice de Figuras .....	viii
Lista de Tabelas .....	ix
Lista de Acrónimos .....	x
<b>Capítulo 1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1.    Objetivos .....	2
<b>Capítulo 2. Metodologia</b> .....	<b>3</b>
<b>Capítulo 3. Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica</b> .....	<b>4</b>
3.1.    Definição .....	4
3.2.    Causas e Fatores de Risco .....	5
3.3.    Diagnóstico .....	7
3.4.    Fisiopatologia.....	8
3.4.1.    Componente Celular Inflamatório .....	10
3.4.2.    Mediadores e Marcadores da Inflamação .....	13
3.4.3.    Componente Oxidativa .....	15
3.5.    Tratamento .....	18
3.5.1.    Resistência a corticosteróides.....	20
<b>Capítulo 4. O Resveratrol e suas aplicações na DPOC</b> .....	<b>22</b>
4.1.    Resveratrol.....	22
4.2.    A ação anti-inflamatória do resveratrol .....	23
4.3.    A ação antioxidante do resveratrol.....	30
4.4.    A Farmacocinética e toxicidade do resveratrol .....	32
4.5.    Vias de administração - Oral e inalável.....	34

4.6. Administração conjunta com corticosteróides .....	35
<b>Capítulo 5. Discussão e Conclusões .....</b>	<b>37</b>
5.1. Perspetivas futuras.....	41
<b>Bibliografia .....</b>	<b>43</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>48</b>
I- QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DOS SINTOMAS EM DOENTES COM DPOC .....	48
II- Teste de avaliação da DPOC- CAT teste .....	49
III- Classificação da gravidade de acordo com avaliação espirométrica .....	50
IV- Avaliação combinada da DPOC com base em sintomas, classificação espirométrica e risco futuro de exacerbações .....	50

# Índice de Figuras

Figura 1 Interações dos diversos componentes celulares na patogénese da DPOC.....	10
Figura 2 Papel central dos macrófagos alveolares nos pacientes com DPOC.....	12
Figura 3 Mecanismo de ação e resistência aos corticosteróides.....	20
Figura 4 Resveratrol reduz inflamação através da inibição ERK 1/2 via cAMP-PKA-MKP1 .....	26
Figura 5 Vias moleculares do resveratrol .....	39

# Lista de Tabelas

Tabela 1 Indicadores a considerar para o diagnóstico da DPOC .....	7
Tabela 2 Avaliação combinada DPOC.....	8
Tabela 3 Tratamento farmacológico de manutenção .....	19
Tabela 4 Efeito do resveratrol nos diferentes intervenientes da inflamação.....	29
Tabela 5 Efeitos do resveratrol nos intervenientes do componente oxidante da DPOC.....	32

# Lista de Acrónimos

AP-1	<i>Ativator protein 1</i>
AMPK	<i>Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase</i>
CAT	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease Assessment Test</i>
cAMP	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CCL2/ MCP-1	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand 2 / Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CXCL1	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1</i>
DALYs	<i>Disability Adjusted Life Year</i>
DGS	Direção Geral de Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
EGFR	Recetor do fator de crescimento epidérmico
ERK 1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
ICS	Corticosteróides inaláveis
IL	Interleucina
IFN	Interferão
IV	Intravenoso
iNOS	Sintetase de Oxido Nitrito Induzível
Kg	Quilogramas
FEV1	Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo
FVC	Capacidade Vital Forçada
FEV1 /FVC	Índice de <i>Tiffeneau-Pinelli</i> - Razão entre FEV1 e FVC
FoxO3	<i>Forkhead Box O3</i>
GOLD	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
HAT	Histona Acetiltransferase
HDAC2	Histona Desacetilase 2
HO-1	Heme Oxigenase-1
LABA	Agonistas Adrenérgicos $\beta_2$ de Longa Duração
LAMA	Agonistas Anticolinérgicos Longa Duração
LTA	Acido lipoteicoico
LPS	Lipopolissacarídeo
NAD	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NF-kB	Fator Nuclear kappa B

<b>Nrf2</b>	<i>Nuclear Factor Erythroid 2 [NF-E2]-Related Factor 2</i>
<b>MAPK</b>	Proteína-Cinases Ativadas por Mitógenos
<b>miR-34</b>	<i>microRNA precursor family</i>
<b>MKP-1</b>	<i>Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1</i>
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>MMP</b>	Metaloproteinase da Matrix
<b>mMRC</b>	Escala do Medical Research Council modificada
<b>MyD88</b>	<i>Myeloid Differentiation Factor 88</i>
<b>MyD88s</b>	<i>Myeloid Differentiation Factor 88 short</i>
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PARP-1</b>	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>
<b>PKA</b>	Proteína Cinase A
<b>PPAR-<math>\alpha</math></b>	Recetor Proliferador Ativado de Peroxissomas alfa
<b>ROS</b>	Espécies Reativas de Oxigénio
<b>SABA</b>	Agonistas Adrenérgicos $\beta_2$ de Curta Duração
<b>SAMA</b>	Agonistas Anticolinérgicos Curta Duração
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering RNA</i>
<b>SIRT1</b>	Sirtuina 1
<b>SOD3</b>	Superóxido Dismutase 3
<b>TLR</b>	<i>Toll-Like Receptor</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de Crescimento Tumoral Beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral alfa
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

# Capítulo 1. Introdução

A DPOC é uma patologia progressiva e irreversível que se caracteriza pela redução persistente do fluxo aéreo (1). Apresenta elevados índices de morbimortalidade em todo o mundo e afeta atualmente mais de 210 milhões de pessoas sendo já a terceira maior causa de morte a nível mundial (2). Constitui um importante problema de saúde pública, causando uma redução significativa da qualidade de vida, com aumento da procura de cuidados de saúde e do risco de morte prematura (3). A iniciativa *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*, GOLD, estima que até 2030 a DPOC se torne a sétima causa de perda de DALYs<sup>1</sup> (*Disability Adjusted Life Year*) a nível mundial. A elevada mortalidade, a incapacidade gradual para trabalho e os custos associados à gestão da doença traduzem-se num enorme peso económico, tanto para os estados como para as famílias (4).

A patogénese da DPOC assenta numa resposta imunológica crónica aos gases e partículas tóxicas inaladas, sendo o fumo do tabaco o principal, mas não único, fator de risco (3-5). A abordagem terapêutica tradicional da DPOC foca-se na melhoria sintomática, estando direcionada para a resolução da obstrução do fluxo aéreo, não tendo em consideração os processos fisiopatológicos de base (6). Daqui resulta que a terapêutica farmacológica disponível seja em grande parte paliativa, não alterando o curso natural da doença. A única intervenção que presentemente diminui o declínio da função pulmonar é a cessação tabágica mas, mesmo quando conseguida, é invariavelmente aplicada após o aparecimento de lesões irreversíveis (5,6).

As alterações morfológicas típicas desta doença resultam de uma resposta inflamatória mantida, com envolvimento macrofágico predominante e uma forte componente de stress oxidativo. Esta inflamação crónica parece ser responsável por alterações estruturais no parênquima pulmonar e vias aéreas, defeitos da função mucociliar e por um estado de inflamação sistémica persistente, encontrada em alguns pacientes (6,7). Este achado levou a que se considerasse empiricamente que anti-inflamatórios potentes, como os corticosteróides, fossem acrescentar valor na terapêutica farmacológica. Infelizmente, tal hipótese não se comprovou na prática pois, numa maioria significativa dos casos, a inflamação é resistente aos esteróides (6,8,9).

---

<sup>1</sup> DALYs- consistem na soma dos anos perdidos devido a mortalidade e anos vividos com incapacidade

A resistência da inflamação aos corticosteróides teve tanto de intrigante como de impulsionador para a investigação fundamental da fisiopatologia da DPOC. Esta situação levou à necessidade de procura de uma alternativa terapêutica no tratamento desta patologia. Nesse sentido, foram procurados novos fármacos com o objetivo de quebrar aquilo a que Agusti (6) chama “o círculo vicioso da DPOC”, ou seja, o aspeto multidimensional da fisiopatologia da DPOC que a torna resistente às abordagens tradicionais.

Dentro das várias novas abordagens exploradas, um dos compostos que se revelou mais promissor foi o resveratrol. Este polifenol de origem vegetal tem já uma longa história de relatos científicos que comprovam benefícios nos mais variados aspetos da saúde humana. Desde que foi pela primeira vez avançado, em 1979 por St. Leger e colaboradores (10), como um dos principais responsáveis pelo chamado “Paradoxo Francês”, uma multiplicidade de publicações científicas vieram comprovar o seu valor biológico. O leque de ação desta molécula estende-se nas mais diversas condições patológicas e sistemas orgânicos, através das suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antivirais, anticancerígenas e geroprotetoras (10-15).

É neste cenário, considerando a importância epidemiológica da DPOC, a sua complexa fisiopatologia com componentes inflamatórios e oxidantes, e a ineficácia relativa da terapêutica atual com corticosteróides, que surge a necessidade de procurar uma alternativa terapêutica eficaz e segura. O resveratrol com as suas conhecidas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias apresenta-se como um bom candidato como alternativa terapêutica pois pode, teoricamente, atuar em vários componentes da doença em simultâneo. Considera-se assim importante uma revisão bibliográfica, de modo a reunir e sistematizar o conhecimento sobre o potencial benefício e aplicabilidade do resveratrol no tratamento da DPOC.

## **1.1. Objetivos**

A presente dissertação consiste numa revisão sistemática da literatura disponível sobre o uso do composto resveratrol em modelos da DPOC. Como objetivo principal pretende-se explorar e compilar as vias de ação do resveratrol, solidificar os conhecimentos fundamentais sobre a sua atuação procurando legitimar com dados científicos a sua pretensão a constituir uma alternativa terapêutica séria na futura gestão da doença. Tenciona-se, também, revelar o estado da arte no que respeita à aplicabilidade do resveratrol no uso efetivo no tratamento da DPOC em humanos. Por fim, pretende-se alertar para a necessidade de explorar diferentes alternativas terapêuticas para uma patologia que atualmente se apresenta de difícil gestão e sem tratamento eficaz.

## Capítulo 2. Metodologia

Para o desenvolvimento do tema proposto foi realizada uma pesquisa sistemática entre outubro de 2015 e dezembro de 2016 utilizando, pela sua credibilidade e impacto na comunidade científica médica, a base de dados *PubMed*. As pesquisas foram realizadas usando terminologia na língua inglesa. A escolha dos descritores em inglês foi efetuada através da ferramenta online DeCS (Descritores em Ciências da Saúde), para o acrônimo português “DPOC” (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) e também para a palavra “Resveratrol”. Optou-se pelo uso nos motores de busca referidos dos termos: “*Pulmonary Disease, Chronic Obstructive*” e “Resveratrol”, que não apresentou nenhum outro descritor.

A pesquisa na base de dados *PubMed* foi realizada em modo “pesquisa avançada” usando a seguinte fórmula “*(Pulmonary Disease, Chronic Obstructive) AND resveratrol*”, sem restrição de data de publicação. Resultou num total de 40 artigos que foram ordenados por relevância. Os artigos que compõem a bibliografia foram publicados entre os anos 2004 e 2016, sendo a maioria referentes aos últimos 5 anos.

De modo a aprofundar estudos considerados relevantes, mas não cobertos pela metodologia escolhida, assim como desenvolver o capítulo da “Introdução” e complementar a informação relativa ao composto resveratrol, foram pesquisados artigos originais citados pelos autores dos artigos revistos e consultado o site da *World Health Organization, WHO*.

Por último, informações sobre a DPOC, nomeadamente os processos fisiopatológicos e moleculares necessários à compreensão do modo de ação do composto resveratrol, foram desenvolvidas recorrendo a publicações de instituições de referência como a iniciativa GOLD, assim como a pesquisa de artigos de revisão atualizados e artigos considerados relevantes citados pelos artigos anteriormente referidos.

# Capítulo 3. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

## 3.1. Definição

A DPOC é dos principais problemas de saúde no mundo; afetando mais de 250 milhões de pessoas é já a terceira causa de morte a nível mundial. Pela escassez de dados epidemiológicos a nível mundial, pensa-se que esta patologia seja subdiagnosticada; no entanto, é certo que houve um aumento da sua incidência ao longo dos últimos anos, acompanhando o aumento do consumo mundial de tabaco (4). A prevalência estimada encontra-se entre os 4-20% da população adulta, 6-7% em não fumadores e até 14% em fumadores (3). Esta aumenta acentuadamente com a idade, havendo relatos que indicam que é duas a três vezes maior na população acima dos 60 anos de idade (15).

O impacto da DPOC a nível mundial contribuiu para que fosse criada a iniciativa GOLD. Esta entidade, lançada em 1997, é constituída por vários Institutos Nacionais de Saúde em colaboração com a WHO. Tem como objetivo consciencializar os profissionais de saúde e a sociedade para a doença, contribuindo através de uma estratégia baseada na evidência para a prevenção, diagnóstico e tratamento. Este organismo define nas suas publicações periódicas (1,4) a DPOC como:

*“uma doença comum, prevenível e controlável, caracterizada pela limitação persistente do fluxo aéreo que é, usualmente, progressiva e associada a uma resposta inflamatória aumentada, nas vias aéreas e pulmão, a partículas e gases inalados. As exacerbações e as comorbilidades contribuem para a severidade global nos pacientes”.*

Esta definição simples engloba em apenas um parágrafo, a epidemiologia, a patogenia dependente de fatores de risco modificáveis, a clínica, o prognóstico, as bases fisiopatológicas e o impacto das comorbilidades e exacerbações na qualidade de vida dos doentes. Todas estas vertentes são de grande importância para a compreensão da patologia e serão exploradas nas secções seguintes.

É importante referir que embora os termos “enfisema” e “bronquite crónica” sejam muitas vezes usados para descrever a DPOC, o seu uso deve ser evitado quando se pretende definir esta patologia, pois o diagnóstico não depende da presença destes dois achados (1,4). É verdade que a limitação crónica do fluxo aéreo que caracteriza a DPOC é causada por uma

mistura de patologia das pequenas vias aéreas arrastada no tempo (bronquite obstrutiva) e lesões no parênquima pulmonar (enfisema) e que dependendo das características do paciente cada um destes componentes tem preponderância sobre o outro. No entanto, enfisema é uma definição da patologia clínica, que se refere à destruição das superfícies alveolares e é apenas uma das muitas anomalias estruturais encontradas na DPOC. Por sua vez, bronquite crônica é uma definição clínica, que se traduz na presença de tosse e produção de expectoração por, pelo menos, três meses em cada um dos dois anos anteriores. É uma condição que pode apresentar-se de forma independente e nem sempre está associada à limitação do fluxo aéreo, indispensável para o diagnóstico da DPOC (4).

### 3.2. Causas e Fatores de Risco

A DPOC é uma patologia complexa e multifatorial com manifestações locais e sistêmicas. Os fatores ambientais interagem com determinantes genéticos individuais que em conjunto contribuem para o desenvolvimento e progressão da patologia (6).

O **fumo do tabaco** é o principal fator de risco e o melhor documentado. Estudos epidemiológicos mostram que, entre os fumadores, são os consumidores de cigarro os que desenvolvem sintomatologia mais grave e que têm maior mortalidade (4). Outras formas de consumo de tabaco como o cachimbo, charuto, *shishas* e marijuana têm também riscos comprovados. Curiosamente, os diversos padrões inalatórios, associados às diversas formas de consumo, produzem diferentes tipos e localizações de lesões pulmonares (7). A relação entre o fumo do tabaco e o desenvolvimento da DPOC foi estabelecida laboratorialmente. Está demonstrado que o fumo induz lesões pulmonares típicas da doença em cobaias animais, sendo um dos métodos utilizados quando se pretende reproduzir e estudar a doença em laboratório (16). O extrato de fumo de tabaco é, por sua vez, usado em modelos *in vitro* de linhas celulares pulmonares para simular as condições pulmonares típicas da DPOC (17,18).

Existem outras **partículas inaláveis** relacionadas com o desenvolvimento da doença, nomeadamente a poluição doméstica resultante da queima de biomassa em fogueiras abertas ou fornos pouco eficazes. Este tipo de poluição é um fator de risco considerável nos países em desenvolvimento que dependem maioritariamente deste tipo de energia para a cozinha ou aquecimento e afeta principalmente mulheres e crianças. Estima-se que em todo o mundo cerca de 3 mil milhões de pessoas usem a biomassa e o carvão como fonte de energia e se encontrem desta forma em risco de desenvolver a doença (3,4). Outros tipos de inaláveis, como poeiras orgânicas e inorgânicas ou químicos resultantes da exposição ocupacional, assim como a poluição atmosférica, têm também um importante papel no desenvolvimento da DPOC o que ajuda a explicar a sua considerável prevalência em não fumadores. No entanto, a sua contribuição relativa para o desenvolvimento da doença é de difícil medição (4).

Pensa-se que a **genética individual** tem um contributo notável no desenvolvimento da patologia. A condição melhor documentada é a deficiência em alfa-1 antitripsina. Esta doença genética é grave e leva invariavelmente ao desenvolvimento de enfisema. A alfa-1 antitripsina atua no pulmão como inibidor da elastase, uma serina protease endógena; a sua ausência ou diminuição da sua concentração local estão associadas à perda da complacência pulmonar e deterioração da função respiratória (4,15). No entanto, esta condição genética tem uma prevalência baixa na população e a sua apresentação não é a da DPOC típica, como tal, não explica a maioria dos casos. Estudos familiares em doentes sem deficiência de alfa-1 antitripsina mostram um risco acrescido de desenvolver DPOC em irmãos de indivíduos afetados, contudo, a identificação de genes específicos que possam explicar estes dados tem-se revelado difícil. Estes dados apontam para uma possível contribuição multigénica e não tanto de genes individuais (4).

A **idade** avançada é também um importante fator de risco. Autores como Ito, *et.al.* defendem a hipótese que a DPOC, pelas suas particularidades fisiopatológicas, mais que uma doença da velhice é uma “doença de envelhecimento acelerado” (15). Estudos epidemiológicos confirmam que a prevalência aumenta com a idade e é consideravelmente superior em idades avançadas, embora exista um número considerável de casos que se desenvolvem antes dos 40 anos. Depreende-se destes dados que o aumento da esperança média de vida tem contribuído para um aumento da prevalência desta doença no mundo (4).

O **género** era antigamente apontado como fator de risco. Estudos epidemiológicos indicavam uma clara prevalência entre homens fumadores. Atualmente, os dados que mostram a evolução da doença em países industrializados apontam para que estas diferenças se devam mais aos padrões sociais de consumo de tabaco do que à predisposição de género. Os homens eram tradicionalmente maiores consumidores de tabaco; hoje em dia a prevalência da doença entre géneros acompanha a tendência de igualdade no consumo de tabaco (3,4). Por seu lado, nos países em vias de desenvolvimento o aparecimento desta patologia em mulheres está principalmente relacionado com a utilização de biomassa para cozinhar. Curiosamente, existem dados que levam a crer que as mulheres se mostram predispostas a desenvolver DPOC mais precocemente e de forma mais grave independentemente do tipo de exposição sendo, no entanto, necessários mais estudos para comprovar a relação (3).

O **nível socioeconómico** é um claro determinante para o desenvolvimento da DPOC. Existem fortes evidências que o risco de desenvolver esta patologia é inversamente proporcional ao extrato socioeconómico. Não é, contudo, claro se este padrão se deve a poluentes domésticos, ocupacionais, má nutrição, maior risco de infeções ou outros relacionados com as condições de vida dos indivíduos (4).

As **infecções** virais, e principalmente bacterianas, são responsáveis pela maioria das exacerbações, pelo agravamento da sintomatologia e lesões histológicas da DPOC (5,19,20). Pensa-se que os fatores que afetam o crescimento pulmonar durante gestação e infância, inclusive as infecções congénitas ou pulmonares na infância, aumentam o risco individual para desenvolver DPOC (1). Contudo, desconhece-se ainda em que medida e de que forma as infecções precoces contribuem para o desenvolvimento desta patologia numa fase mais tardia da vida (4).

### 3.3. Diagnóstico

A norma da Direção Geral de Saúde (DGS) “Diagnóstico e Tratamento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica” segue as indicações da iniciativa GOLD para o diagnóstico da DPOC. Este deve ser considerado se existir um determinado grau de suspeição e confirmado analiticamente através dos dados obtidos por espirometria. Assim, deve-se considerar para estudo espirométrico qualquer paciente que sofra de sintomas crónicos e progressivos como: dispneia, tosse ou expetoração e história de exposição a fatores de risco para a doença (Tabela 1).

*Tabela 1 Indicadores a considerar para o diagnóstico da DPOC. Adaptado de GOLD, Pocket Guid to COPD Diagnosis 2015*

Considerar DPOC e fazer espirometria, se algum dos seguintes indicadores estiverem presentes num indivíduo com mais de 40 anos.	
<b>Dispneia</b>	Progressiva Piora com o exercício Persistente
<b>Tosse Crónica</b>	Pode ser intermitente ou improdutiva
<b>Produção de expetoração crónica</b>	Qualquer padrão de produção de expetoração pode indicar DPOC
<b>História de exposição a fatores de risco</b>	Fumo de tabaco Fumo de biomassa doméstico para cozinha ou aquecimento Poeiras ou químicos ocupacionais
<b>História familiar da DPOC</b>	

No contexto clínico referido anteriormente existe indicação para realização de espirometria. A objetivação de obstrução ao fluxo aéreo, caracterizado por relação FEV1/FVC inferior a 70% após broncodilatação, confirma o diagnóstico da DPOC (1,21).

Apesar de para o diagnóstico se usar um dado objetivo e mensurável, associado a sintomas tipo, é necessário ter presente que a DPOC é uma doença complexa. Diferentes fatores contribuem para a sintomatologia, cuja gravidade é variável entre indivíduos, mesmo naqueles com dados espirométricos equivalentes. Estas ambiguidades dificultam a gestão terapêutica da doença. Para adequar, de forma mais aproximada possível, a terapêutica existente às necessidades dos pacientes, é necessário usar ferramentas para determinar e estratificar a gravidade da patologia. Para isto, após instituído o diagnóstico, e periodicamente durante o acompanhamento, é necessário realizar uma avaliação combinada usando 3 parâmetros: sintomatologia, valores do FEV1 (Volume expirado forçado no 1 segundo) e frequência das exacerbações (Tabela 2). Esta avaliação permite classificar a gravidade da doença, o seu impacto no estado de saúde e o risco futuro de exacerbações.

Tabela 2 Avaliação combinada DPOC. Adaptado de GOLD, Pocket Guid to COPD Diagnosis 2015

Parâmetros	Avaliação	Risco elevado
Sintomas	mMRC <sup>2</sup>	>10
	CAT <sup>2</sup>	>2
Gravidade da obstrução	Espirometria <sup>2</sup>	Valor de FEV1 após broncodilatador < 50%
Frequência das exacerbações no ultimo ano	História clínica	2 exacerbações 1 internamento

Está preconizado que se deve aceder à sintomatologia através da aplicação dos questionários mMRC (Escala do *Medical Research Council* modificada) e CAT (*COPD Assessment Test*) e posteriormente usar, ou o valor FEV1 da espirometria, ou da frequência das exacerbações, para avaliar o risco de novas exacerbações. Aplicando estes critérios procede-se à estratificação por grupos de gravidade de doença (A, B, C, D) usando o esquema disponibilizado para consulta no anexo IV. Esta classificação reflete melhor as variações individuais dos doentes com DPOC e o seu conhecimento vai servir de base para a escolha da terapêutica a instituir.

### 3.4. Fisiopatologia

A patogénese da DPOC inicia-se com uma resposta inflamatória inata e adaptativa à inalação de partículas ou gases que é posteriormente perpetuada. Este estado inflamatório induz um processo de reparação e remodelação tecidual, provoca hipertrofia das glândulas

<sup>2</sup> Consultar anexo

mucosas, aumenta a produção de muco e causa metaplasia mucosa e escamosa. Tudo somado resulta numa diminuição do calibre das vias aéreas periféricas e na destruição enfisematosa do parênquima pulmonar (5,7). A redução do fluxo expiratório que define a DPOC resulta principalmente da diminuição do lúmen dos brônquios e bronquíolos inferiores a 2mm de diâmetro. Isto acontece por um misto de fibrose peribronquiolar, espessamento das paredes das vias aéreas periféricas e oclusão por exsudato mucoso. A destruição da matriz de suporte pulmonar vai provocar o aumento da complacência associada ao enfisema e à redução da elastância, que é a força que impulsiona a retração pulmonar na expiração, por perda de elastina (5). No conjunto tudo isto irá contribuir para o aprisionamento do ar na expiração, provocando dispneia que agrava com o esforço físico, sintoma cardinal da DPOC. O aspeto hiperinsuflado do tórax em “forma de barril” e a necessidade de utilização dos músculos acessórios da respiração, que se encontra em fases avançadas da doença, são os sinais semiológicos que resultam deste processo.

Nos pulmões de todos os fumadores é possível encontrar histologicamente um baixo grau de infiltrado inflamatório peribronquiolar e alveolar periférico. Este infiltrado é caracterizado pelo elevado número de neutrófilos e de macrófagos, mas também de linfócitos T e B. Verifica-se, contudo, que este achado é relativamente inócuo na maioria dos fumadores. Por sua vez, numa minoria significativa de indivíduos suscetíveis ao desenvolvimento da DPOC este processo inflamatório encontra-se amplificado e persiste mesmo após a cessação tabágica (5). Presume-se que a localização da inflamação reflita os locais de deposição dos irritantes inaláveis. As diferentes características dos inalantes, como o fumo de tabaco ou fumo resultante da queima da madeira, traduzem-se na existência de diferentes fenótipos clínicos. Em alguns pacientes predomina o componente bronquiolar, noutros o enfisematoso ou o misto. De fato, nos países em desenvolvimento onde predomina a poluição dentro de casa, com a queima de biomassa para as lides domésticas, encontra-se uma maior prevalência da componente bronquiolar da patologia. Por seu lado, nos países desenvolvidos onde o agente etiológico é principalmente o consumo de tabaco, existe uma maior prevalência de uma componente mista, com afeção dos bronquíolos e enfisema. O padrão de inalação parece também contribuir para estas diferenças na localização predominante da inflamação. Enquanto o fumo doméstico se inala durante o ciclo respiratório normal, o fumo do cigarro envolve uma inalação mais profunda com retenção de ar. Esta particularidade é ainda mais acentuada em fumadores de cannabis que apresentam uma componente enfisematosa predominante devido à profundidade e ao tempo de retenção do fumo nos pulmões (7).

Existe uma importante componente sistémica da doença com manifestações orgânicas como caquexia, anomalias cardíacas, do sistema nervoso central e problemas osteo e músculo-esqueléticos, ou com o agravamento de comorbilidade já presentes (6,22). Especialmente pronunciados são os problemas músculo-esqueléticos, onde se verifica redução da força e

resistência muscular por alteração no metabolismo energético das fibras musculares (22). Pensa-se que os efeitos sistêmicos se devem à passagem de mediadores inflamatórios dos locais de lesão pulmonar para a corrente sanguínea. De fato, é possível verificar em análises sanguíneas o aumento de citocinas, quimiocinas e proteínas de fase aguda em circulação. Não foi possível encontrar, no entanto, uma correlação forte entre os níveis de mediadores inflamatórios encontrados em circulação e os efeitos sistêmicos que os indivíduos manifestam. Contudo, existem estudos que associam elevadas concentrações de mediadores inflamatórios no sangue a um risco 2 a 4 vezes aumentado de doenças cardiovasculares, diabetes, cancro pulmonar e pneumonia. Verificou-se, também, que pacientes com uma inflamação sistêmica persistente têm exacerbações mais frequentes e uma taxa de mortalidade superior (7).

### 3.4.1. Componente Celular Inflamatório

A resposta inflamatória anormal às partículas e gases inalados em doentes com DPOC envolve tanto o sistema imune inato como o adaptativo. Participam no processo tanto células da imunidade inata como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, mastócitos, linfócitos “*natural killer*” e células dendríticas; como células da imunidade adaptativa nomeadamente linfócitos B e T CD4/CD8; mas também células estruturais como células epiteliais, endoteliais e fibroblastos (5,7). Esta miríade celular atua em conjunto, comunicando reciprocamente através de quimiocinas que ajudam a orquestrar todo o processo (Figura 1). As bases moleculares que determinam a amplificação da inflamação na minoria dos indivíduos que desenvolve DPOC não são ainda completamente compreendidas. Pensa-se que podem ser determinadas, pelo menos em parte, por mecanismos genéticos e epigenéticos. A manutenção da inflamação também não está completamente elucidada, mas fatores autoimunes, células T memória e a colonização bacteriana persistente parecem desempenhar um papel central (7).

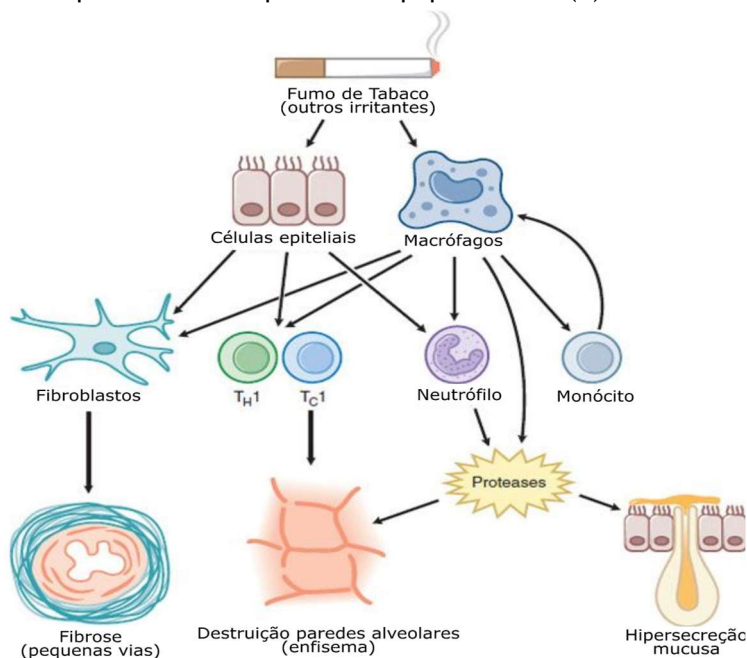


Figura 1- Interações dos diversos componentes celulares na patogênese da DPOC. Adaptado Brunton, 2015 (38)

As **células epiteliais** pulmonares estão longe de ter um papel passivo no desenvolvimento da patologia. Respondem ao fumo e a outros irritantes produzindo mediadores inflamatórios como Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, Fator estimulante de colônias de macrófagos (GM-CSF) e IL-8, que ajudam a recrutar leucócitos e contribuem para o início do processo inflamatório (23). Por sua vez, em resposta a citocinas desses mesmos leucócitos podem produzir Fator de Crescimento Tumoral Beta (TGF- $\beta$ ), que nas vias aéreas terminais induz fibrose. Outra molécula com um papel importante é a Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), que é expressa de forma constitutiva no epitélio e tem funções importantes na manutenção da integridade alveolar. Esta molécula encontra-se suprimida nos fumadores e doentes com DPOC, o que contribui para o desenvolvimento de enfisema (24). A secreção de defensinas está também afetada nos fumadores, o que parece contribuir para o aumento da suscetibilidade a infeções que causam exacerbações e ajudam a perpetuar o processo inflamatório. O fumo aumenta os Recetores de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), o que resulta numa metaplasia escamosa e aumenta o risco de carcinoma. Este mesmo aumento de EGFR contribui para a hiperplasia das células caliciais que respondem à inflamação neutrofílica com secreção aumentada de muco (7). As células claras, progenitoras celulares nas vias aéreas periféricas, são também afetadas pelo fumo do tabaco entrando em senescência, o que dificulta a regeneração dos tecidos, contribui para o desenvolvimento do enfisema e para a manutenção da inflamação (15).

Os **macrófagos alveolares** desempenham um papel central na fisiopatologia da doença. Este tipo celular tem uma função crucial na imunidade inata e adquirida do sistema respiratório, tanto na defesa contra agentes patogénicos como na remoção de partículas inaladas (8). Têm uma distribuição ubíqua no pulmão, estando localizados tanto no interstício como na fina camada líquida da superfície bronco-alveolar constituindo, juntamente com os sistema barreira, os primeiros mecanismos de defesa imune (5). Nos doentes com DPOC estão marcadamente aumentados no parênquima, no lavado bronco-alveolar e expetoração. São encontrados em grandes quantidades em locais de destruição enfisematosa e a sua concentração no parênquima relaciona-se com a severidade do enfisema. O fumo de tabaco e outros irritantes inaláveis parecem ter a capacidade de ativar os recetores celulares dos macrófagos, que respondem libertando uma multiplicidade de quimiocinas como TNF- $\alpha$ , CXCL1, IL8, CCL2/ MCP-1, leucotrieno B<sub>4</sub>, GM-CSF e espécies reativas de oxigénio (ROS), que por sua vez atraem neutrófilos, monócitos e linfócitos ao pulmão, iniciando assim o processo inflamatório (7,25). Secretam também enzimas elastolíticas, incluindo metaloproteínases da matriz (MMPs) 2, 9 e 12; catepsinas K, L e S; e elastase neutrofílica (Figura 2). Os macrófagos de pacientes com DPOC secretam mais proteínas inflamatórias e têm maior atividade elastolítica que os fumadores sem doença. Estas propriedades diferenciadoras dos macrófagos de pacientes com DPOC mantêm-se mesmo após três dias de cultura celular, o que permite utiliza-los como modelo aproximado da DPOC em estudos *in vitro* (7).

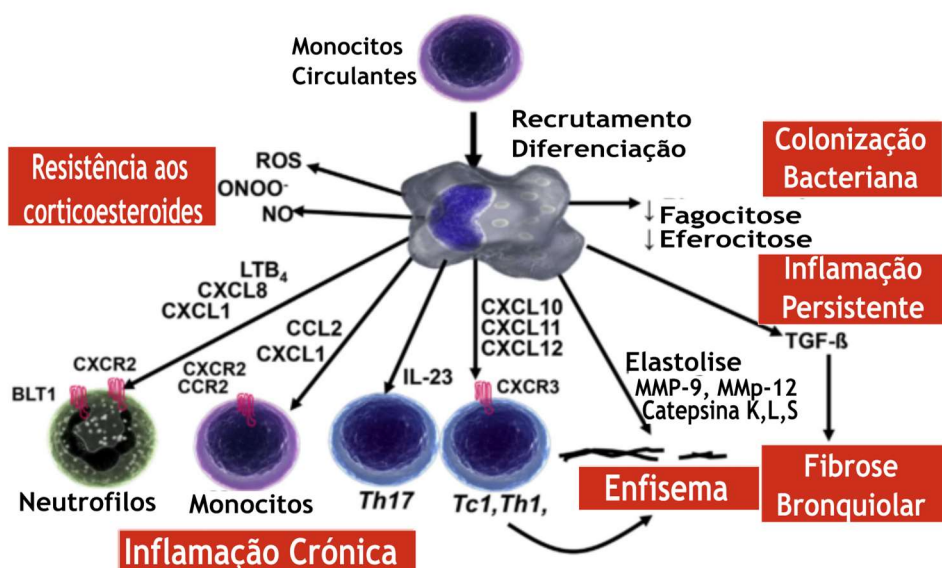


Figura 2- Papel central dos macrófagos alveolares nos pacientes com DPOC. Adaptado de Barnes, 2016

A maior concentração de macrófagos nos pulmões de doentes com DPOC comparativamente a fumadores sem doença, deve-se ao aumento do recrutamento de monócitos, da proliferação e sobrevivência dos macrófagos além da diminuição da eliminação mucociliar (8). Está também demonstrado que os macrófagos destes pacientes possuem uma diminuída capacidade fagocítica bacteriana, assim como diminuída capacidade de captar células apoptóticas (Figura 2). Estes fatores em conjunto facilitam a colonização bacteriana crônica das vias aéreas baixas, e contribuem para a incapacidade em resolver a inflamação (7).

Os **neutrófilos** são encontrados em grande número em análises da expetoração e lavados bronco-alveolares estando correlacionados com a severidade da doença. São células altamente móveis e conseguem penetrar facilmente nos tecidos. Não são típicos da DPOC, mas são marcadores da presença de inflamação (26). O seu recrutamento para os pulmões resulta da libertação dos mediadores inflamatórios, já mencionados, por parte dos macrófagos e células endoteliais. Estas células estimulam também o aumento da produção de neutrófilos na medula óssea através da libertação de GM-CSF para a circulação sanguínea. Os neutrófilos secretam uma série de serina proteases, como a elastase neutrofílica, catepsina G, proteinase-3, MMP-8 e MMP-9, todas elas contribuindo para a destruição da estrutura alveolar. Como já foi referido algumas das moléculas libertadas pelos neutrófilos na superfície pulmonar estimulam a produção de muco pelas glândulas submucosas e pelas células caliciais, contribuindo assim para a fisiopatologia da doença (7).

Os **eosinófilos** são tipicamente associados à asma e o seu papel na DPOC não é tão claro. Cerca de 10 a 15% dos doentes com DPOC apresentam quantidades aumentadas de eosinófilos nas vias aéreas (7,27). Estes pacientes manifestam características típicas de asma o que pode indicar uma sobreposição de doenças. Esta condição está descrita e é identificada pelo acrónimo inglês ACOS (*asthma-COPD overlap syndrome*). Curiosamente, níveis elevados de eosinófilos no lavado bronco-alveolar estão relacionados com uma melhor resposta a broncodilatadores (27) e a terapia com corticosteróides inaláveis (ICS) (7). Está postulado que os seus níveis elevados no sangue podem servir de marcador para uma melhor resposta terapêutica com o uso de ICS e corticosteróides orais. No entanto, este fator não é ainda considerado em nenhum guia de tratamento (20).

Os **linfócitos** são leucócitos característicos da imunidade adquirida. A presença de linfócitos T em número elevado nos tecidos pulmonares é típica da DPOC. Está diretamente relacionada com a cronicidade da inflamação e tem um papel importante no desenvolvimento de enfisema. O aumento de linfócitos T CD8 é mais acentuado que T CD4 e existe uma correlação positiva entre a quantidade de linfócitos T, o nível de destruição alveolar e a severidade da obstrução (5). De fato, uma das únicas diferenças significativas no infiltrado inflamatório entre os fumadores assintomáticos e os doentes com DPOC é o aumento da concentração local de linfócitos T, principalmente T CD8 (5,9). Estes linfócitos libertam, entre outras moléculas, Interferão Gama (IFN- $\gamma$ ) e TNF- $\alpha$  que ajudam a manter a inflamação e estimulam a libertação de MMP-12. Estudos em ratos *knock-out* para o tipo celular CD8, mostram que estes se tornam incapazes de desenvolver enfisema, mesmo após exposição prolongada ao fumo de cigarro, contrariamente a ratos com o sistema imune íntegro. Estes dados apontam para o papel fundamental dos linfócitos T CD8 na patologia da DPOC (9). É possível que exista uma componente autoimune na DPOC, provocada por alterações nas estruturas pulmonares pelo fumo do tabaco, que formam estruturas antigénicas. Por exemplo, o stress oxidativo pode contribuir para a formação de proteínas carboniladas que podem apresentar propriedades antigénicas. Anticorpos anti-endotélio e outros autoanticorpos foram já isolados nos doentes com DPOC, mas não se sabe o significado desse achado (7). Sejam quais forem as causas desencadeantes, sabe-se que a concentração de linfócitos B se encontra aumentada nos pulmões de pacientes com DPOC, particularmente naqueles com doença severa (5,7).

### 3.4.2. Mediadores e Marcadores da Inflamação

Muitos são os mediadores inflamatórios produzidos por células estruturais e do sistema imunitário que interagem de forma complexa na génese e progressão da DPOC. Muitos destes, longe de se restringirem a uma ação parácrina, entram na corrente sanguínea e produzem efeitos sistémicos, potenciando comorbilidades. Existem vários tipos de mediadores inflamatórios, nomeadamente, prostaglandinas, citocinas, quimiocinas e espécies reativas de

oxigênio. A complexidade da interação bioquímica dos mediadores inflamatórios é de tal ordem que considerando apenas as quimiocinas, estão descritas mais de 50 tipos e mais de 20 diferentes recetores, tendo estes diferentes afinidades para várias quimiocinas diferentes (7). Estas interações são complexas e a sua exploração ultrapassa os objetivos desta dissertação. No entanto, é importante referir aqueles mediadores que são implicados diretamente na fisiopatologia da DPOC e têm servido de marcadores inflamatórios nos estudos de eficácia do resveratrol.

As citocinas **TNF- $\alpha$**  e **IL-1** desempenham um papel importante, tanto local como sistemicamente. Existe um aumento da sua concentração na expetoração dos doentes com DPOC e nota-se um aumento ainda maior durante as exacerbações. São libertadas principalmente por macrófagos ativados em resposta a estímulos, como infeções e stress oxidativo (28). Em baixas concentrações estas duas citocinas ativam os leucócitos e estimulam as células epiteliais a expressar moléculas de adesão. Em concentrações moderadas, estimulam o hipotálamo a aumentar a temperatura corporal, o fígado a produzir proteínas de fase aguda e a medula óssea a produzir e libertar mais leucócitos. Em elevadas concentrações podem induzir o choque séptico (5). O TNF- $\alpha$  é também um potente ativador do NF- $\kappa$ B, o que amplifica ainda mais a resposta inflamatória (7).

O Fator Nuclear kappa B (**NF- $\kappa$ B**) é um fator de transcrição nuclear pró-inflamatório que se encontra constitutivamente presente no citoplasma tanto dos leucócitos, como das células epiteliais do pulmão. Em resposta a vários estímulos como citocinas, stress oxidativo, radiação, antigénios bacterianos e virais, este fator migra para o núcleo e promove a expressão de vários genes de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-8, Ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e Sintetase de Oxido Nitrito Induzível (iNOS) (29-31). O aumento da sua concentração nas células imunitárias pulmonares está correlacionado com o grau de inflamação e enfisema pulmonar, o que faz deste fator nuclear um marcador de inflamação e um potencial alvo terapêutico (32).

A IL-8 ou CXCL8 é uma importante citocina que se encontra invariavelmente aumentada na expetoração de doentes com DPOC e está relacionada com a severidade da doença (31). É produzida em resposta a vários estímulos presentes na DPOC como fumo de tabaco e hipóxia (8). As exacerbações bacterianas são, também, um estímulo particularmente importante para a sua produção (33). Ela é secretada principalmente por macrófagos, mas também células epiteliais, sendo que a sua principal função é a de quimiotaxia de leucócitos, particularmente neutrófilos, recrutando-os para os tecidos onde esta é produzida (Figura 2). Conjuntamente com TNF- $\alpha$ , estas citocinas são imprescindíveis para estimular uma reação inflamatória em pulmões de cobaias (26). Em doentes hospitalizados com exacerbações da DPOC, níveis sorológicos de IL-8 aumentados são associados a aumento de fraqueza muscular (22).

Curiosamente os corticosteróides falham em baixar a sua concentração nos pulmões de doentes com DPOC (11,19).

O **GM-CSF** é um fator de sobrevivência celular que prolonga o tempo de residência das células inflamatórias no local da inflamação, contribuindo para que esta se prolongue no tempo (11). A presença deste fator encontra-se aumentada nas vias aéreas de pacientes com DPOC estável e durante as exacerbações. Antigénios bacterianos contribuem para o aumento da sua secreção (33). É possível que o fumo do tabaco tenha um efeito estimulante na produção e libertação de neutrófilos pela medula óssea, possivelmente pela entrada em circulação sanguínea deste fator produzido pelos macrófagos pulmonares (7). À semelhança do IL-8, os corticosteróides também falham em reduzir os seus níveis em doentes com DPOC (33).

A **MMP-9** é uma enzima serino protease, com enorme importância no desenvolvimento de enfisema na DPOC. Contribui para a inflamação e destruição tecidual, portanto, para a progressão da doença (33). É produzida por macrófagos, neutrófilos e células epiteliais em resposta a vários mediadores de inflamação como TNF- $\alpha$  e IL-8. Encontra-se aumentada nas vias aéreas de pacientes com DPOC estável e particularmente nas exacerbações (26). Atua degradando a matriz extracelular, sendo que os produtos daqui resultantes podem ser reconhecidos por linfócitos T, facilitando a ativação da resposta imunitária adaptativa e perpetuação da inflamação (9). É considerado um marcador de inflamação pulmonar e é a principal enzima elastolítica libertada por macrófagos (31), está correlacionado com o número de neutrófilos presentes no local da inflamação e é considerado fator de prognóstico de fibrose pulmonar (32). Está demonstrado que a sua concentração aumenta consideravelmente nas exacerbações por bactérias. Verificou-se que os níveis desta enzima mostram uma insensibilidade parcial à utilização de corticosteróides (33).

### 3.4.3. Componente Oxidativa

A DPOC apresenta uma forte componente oxidativa que resulta do fato dos seus fatores etiológicos serem agentes com um elevado poder oxidante e da produção de ROS endógena pelas células inflamatórias no estado de inflamação crónica (6). Sabe-se que o fumo do tabaco contém inúmeros oxidantes, radicais livres e químicos capazes de causar stress oxidativo através da geração de espécies reativas (13). Nos doentes com DPOC o excesso de ROS leva ao esgotamento dos antioxidantes endógenos. Sem a proteção dos antioxidantes, os ROS provocam alterações enzimáticas, proteicas e lipídicas a nível intracelular, lesam o DNA, e estimulam a libertação de citocinas inflamatórias como a IL-8 e o TNF- $\alpha$  que induzem o processo inflamatório. Por sua vez, estas citocinas estimulam a produção de ROS por parte dos neutrófilos e macrófagos criando um círculo vicioso que aumenta ainda mais o stress oxidativo no pulmão (28).

Nos doentes com DPOC existe um claro desequilíbrio entre o balanço oxidante/antioxidante. O excesso de oxidantes estimula a inflamação através da ativação de NF- $\kappa$ B, que parece ser a molécula de ligação entre o stress oxidativo e a inflamação (34). Por outro lado, moléculas com a sua estrutura alterada pela oxidação podem gerar autoanticorpos estimulando a imunidade adquirida com agravamento e perpetuação da inflamação. Aliado a estes efeitos, o stress oxidativo provoca compromisso das moléculas antiproteases, como a  $\alpha$ 1-antitripsina, o que permite uma ação desregulada da elastase e contribui para a formação de enfisema. Os danos causados no Ácido Desoxirribonucleico (DNA) levam por sua vez ao aumento da autofagia, apoptose e senescência celular, o que agrava as lesões teciduais (35,36). O agentes oxidantes têm a capacidade de oxidar ácido araquidónico levando ao formação de mediadores prostanoídes, chamados isoprostanos, que provocam broncoconstricção e exsudato plasmático (7). Verifica-se também o aumento de produção de óxido nítrico, através da atividade da iNOS que aumenta a imunoreatividade dos macrófagos alveolares (31). Como se pode observar, todos estes aspetos contribuem para o desenvolvimento das alterações sintomatológicas e fisiopatológicas observadas na DPOC.

No pulmão existem antioxidantes intracelulares e extracelulares. Os antioxidantes intracelulares estão presentes de forma constitutiva em baixos níveis que não variam em resposta ao stress oxidativo. Por seu lado os antioxidantes extracelulares, que representam a maior fatia do poder antioxidante pulmonar, respondem ao stress oxidativo aumentando significativamente a sua produção intracelular e secreção para o meio externo. Estes antioxidantes extracelulares incluem principalmente o glutatião que se encontra marcadamente hiper-regulado em resposta ao fumo do tabaco e ao stress oxidativo; em menores proporções existem outros antioxidantes obtidos pela dieta como a vitamina C e ou outros, como ácido úrico, lactoferrina e Superóxido Dismutase 3 (SOD3) (7). A maioria destes antioxidantes são regulados pelo fator de transcrição Fator Relacionado com o Fator Eritroide 2 (Nrf2) que normalmente se encontra ativo em resposta ao stress oxidativo. Nos doentes com DPOC a ação do Nrf2 encontra-se deprimida apesar dos altos valores de oxidantes nos pulmões destes pacientes (18).

O **Nrf2** é um fator de transcrição sensível a alterações no equilíbrio oxido-redutor, a sua função é induzir a produção de moléculas antioxidantes endógenas. Atua através da ativação de genes antioxidantes de fase II, onde se inclui glutatião peroxidase, glutatião-S-transferase, e genes de resposta a stress como a Heme Oxigenase-1 (HO-1). Estas moléculas conferem proteção celular contra o stress oxidativo (15). Encontra-se constitutivamente no citosol celular ligado a recetores de actina, na presença de oxidantes a sua conformação é alterada, o que lhe permite libertar-se, migrar para o núcleo e agir como promotor dos genes

antioxidantes. Em modelos animais em que este promotor foi inibido verificaram-se lesões compatíveis com enfisema (18). Os aldeídos presentes no fumo de tabaco parecem provocar modificações pós-transcricional, como acetilação da molécula do Nrf2 e seu ligando do citosol. Além disso o fumo de tabaco diminui os níveis de Histona Desacetilase 2 (HDAC2) fazendo com que o Nrf2 e ligando se mantenham hiperacetilados, o que o impede a sua libertação e migração para o núcleo (15). Efetivamente nos fumadores e doentes com DPOC a localização do Nrf2 nos tecidos pulmonares é principalmente o citosol, apesar do ambiente oxidante, o que indica que a sua atividade está suprimida (7).

AS HDACs são potentes desacetilases envolvidas na regulação de muitos fatores de transcrição, recetores celulares e histonas. Existem várias classes de HDACs, das quais destacamos a HDAC2 que tem propriedades anti-inflamatórias e tem um papel importante na componente oxidativa da DPOC (9). Entre outras funções, a HDAC2 tem a capacidade de desacetilar os locais de promoção de genes inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1, etc., com isto inibe a sua transcrição e limita a inflamação. Outra função importante é a de promoção da atividade fagocítica dos macrófagos alveolares, o que aumenta a capacidade de defesa contra infeções. Portanto, a redução desta enzima permite o arrastar temporal de um processo inflamatório já estabelecido, diminui a capacidade de defesa contra microrganismos, além de permitir a senescência celular (7). Todos estes aspetos contribuem para o desenvolvimento da DPOC. O stress oxidativo provoca alterações estruturais na molécula o que leva a sua inativação e marcação para degradação pelos proteossomas intracelulares (27). Está demonstrado que o fumo de tabaco diminui a atividade desta enzima através deste mecanismo (9). Uma particularidade importante desta molécula é que tem como função manter o Nrf2 desacetilado e conseqüentemente capaz de migrar para o núcleo celular, de modo a promover a transcrição de moléculas antioxidantes (7). Assim, quando há um desequilíbrio no balanço oxidante/antioxidante no interior da célula, a HDAC2 é inibida e com ela a capacidade de a célula produzir antioxidantes mediados pela Nrf2, criando um efeito bola de neve com o escalar do stress oxidativo.

O stress oxidativo está intimamente ligado ao envelhecimento celular. Provoca danos no DNA e conseqüente ativação de mecanismos de reparação. Estes atuam inibindo o ciclo celular, provocando senescência ou apoptose. O envelhecimento de células diferenciadas e células progenitoras limita a capacidade de regeneração dos tecidos e seu conseqüente envelhecimento (37). Nos fumadores e doentes com DPOC está demonstrado um aumento na senescência e o encurtamento dos telómeros das células leucócitos e células pulmonares (15).

Um importante regulador da estabilidade celular e senescência é **Sirtuina 1** (SIRT1). A SIRT1 é uma desacetilase NAD<sup>+</sup> dependente da família das HDACs que desempenha um papel importante numa variedade de processos biológicos, como a diferenciação celular, a morte,

envelhecimento/senescência, metabolismo, inflamação e resistência a stress. Atua principalmente pela desacetilação de moléculas como o NF- $\kappa$ B, p53, MMP-9 e *Forkhead Box O3* (FoxO3). O FoxO3 é um importante fator de transcrição ligado à reparação de lesões de DNA e produção de antioxidantes que necessita de estar desacetilado para exercer a sua ação (15). Está demonstrado que a expressão tanto do SIRT1 como o FoxO3 estão diminuídos em resposta ao stress oxidativo provocado pelo tabaco (35). A diminuição da atividade SIRT1 deve-se provavelmente à depleção de NAD<sup>+</sup> causada pelo stress oxidativo. Esta coenzima é rapidamente gasta pela *Poly [ADP-ribose] polymerase 1* (PARP-1), uma enzima de reparação de DNA nuclear que forma polímeros de NAD<sup>+</sup> diminuindo rapidamente as suas reservas locais (36). A inibição da SIRT1 vai permitir que as moléculas referidas se mantenham acetiladas, o que vai promover a autofagia, senescência celular, enfisema e a inflamação (32).

### 3.5. Tratamento

A DPOC é uma doença complexa, com um componente inflamatório e um componente oxidante que estão intimamente relacionados. Cada um destes componentes contribui para a manutenção do outro, constituindo um autêntico “círculo vicioso da DPOC”. Já Agusti em 2005 referia este conceito, propondo que para o tratamento ser eficaz se deveria atuar simultaneamente nas várias componentes da doença, de modo a quebrar o círculo. No entanto, atualmente a terapêutica mantém-se centrada no alívio sintomático e na melhora funcional, mantendo-se inexistente uma abordagem global eficaz contra a progressão doença.

As normas portuguesas para orientação terapêutica da DPOC, recomendadas pela DGS, seguem as indicações da iniciativa GOLD. O primeiro grau de intervenção tem como objetivo a redução do risco de progressão da doença e exacerbações e aplica-se a todos os doentes, independentemente da gravidade da patologia. Consiste em medidas de mudança do estilo de vida com a cessação tabágica mandatória, o exercício físico e a vacinação recomendada. O segundo grau de intervenção é aplicado em doentes sintomáticos estáveis e de evolução lenta e consiste no tratamento farmacológico prolongado. Para o âmbito desta dissertação iremos focar-nos principalmente neste nível, não explorando as medidas de redução do risco ou a terapêutica aplicada durante as exacerbações, que constitui o terceiro grau de intervenção.

As terapêuticas recomendadas em doentes sintomáticos têm por base a avaliação combinada de sintomas, exacerbações e grau de obstrução, o que permite a estratificação de gravidade GOLD, referida na secção do “Diagnóstico”. Esta estratificação é feita em 4 níveis de gravidade - A, B, C e D. Os fármacos recomendados por grau de gravidade são apresentados na Tabela 3. A presença de sintomas não controlados de forma adequada ou a existência de exacerbações frequentes com o tratamento farmacológico referido, deve modular a escolha de

terapêuticas alternativas ou uma nova avaliação combinada para reavaliar a mudança de grupo de risco.

*Tabela 3 Tratamento farmacológico de manutenção. SABA- Agonistas Adrenérgicos  $\beta_2$  de Curta Duração; SAMA- Agonistas Anticolinérgicos Curta Duração; LABA- Agonistas Adrenérgicos  $\beta_2$  de longa ação; LAMA- Agonistas Anticolinérgicos Longa Duração; ICS- Corticosteróides Inalável*

Nível	Primeira escolha	Segunda escolha	Escolha alternativa
A	SABA (SOS)	LABA ou LAMA	Teofilina
	ou SAMA (SOS)	ou SABA e SAMA	
B	LABA	LAMA ou LABA	SABA e/ou SAMA Teofilina
	ou LAMA		
C	ICS + LABA	LAMA e LABA	SABA e/ou SAMA Teofilina
	ou LAMA		
D	ICS + LABA	ICS + LABA e LAMA	Carbocisteína
	e/ou LAMA	Ou LAMA e LABA	SABA e/ou SAMA Teofilina

A terapia farmacológica é usada para reduzir os sintomas, frequência e severidade das exacerbações, assim como melhorar o estado geral de saúde e tolerância ao exercício (1). Como se pode verificar, o uso de broncodilatadores ocupa uma posição central na abordagem farmacológica da DPOC, o que não deixa de ser um contrassenso tendo em conta que o diagnóstico da DPOC é definido pela irreversibilidade da obstrução do fluxo respiratório nas provas de função respiratória após broncodilatação. Contudo, e embora os ganhos espirométricos sejam negligenciáveis, está comprovado que esta abordagem providencia uma melhoria subjetiva dos sintomas, reduz exacerbações e hospitalizações relacionadas com a doença (4).

O uso de corticosteróides é apenas recomendado em doentes com um grau de doença C ou D. Nestes, o seu uso parece melhorar os sintomas, a função pulmonar e a qualidade de vida, assim como reduzir a frequência das exacerbações. No entanto, o seu efeito na inflamação pulmonar e sistémica é controverso, tendo-se verificado uma resistência de um grande número de pacientes com DPOC aos efeitos anti-inflamatórios destes fármacos. Os seus efeitos secundários não são desprezáveis, estando associados a uma elevada prevalência de candidíase oral, rouquidão e aumento do risco de pneumonia. Os corticosteróides orais devem apenas ser usados nas exacerbações pois o seu uso prolongado está associado a miopatia esteróide, com

fraqueza e diminuição da função muscular que agrava a tendência para estes efeitos também presentes na DPOC. Em doentes com DPOC severa podem mesmo provocar falência respiratória (4).

Como já foi referido, não existem fármacos disponíveis, até à data, capazes de alterar a história natural da doença e reverter o declínio da função pulmonar a longo termo. Esta conjuntura reflete a necessidade imperiosa de encontrar alternativas terapêuticas eficazes para um tratamento efetivo da patologia e não apenas da melhoria dos sintomas.

### 3.5.1. Resistência a corticosteróides

Devido à natureza inflamatória da DPOC seria de esperar obter-se uma excelente resposta terapêutica com uso de anti-inflamatórios potentes, como os corticosteróides, que tão bons resultados alcançam noutras patologias inflamatórias do pulmão, como a asma (33). No entanto, o uso de corticosteróides tem sido desapontante, com poucos ganhos efetivos. Verificou-se que existe um grande número de pacientes com DPOC com resistência total ao tratamento com corticosteróides (9). Em doentes resistentes, os corticóides falham em induzir a redução de neutrófilos e linfócitos CD8 na expetoração e não conseguem suprimir os níveis de IL-6, IL-8, GM-CSF e MMP-9 (9).

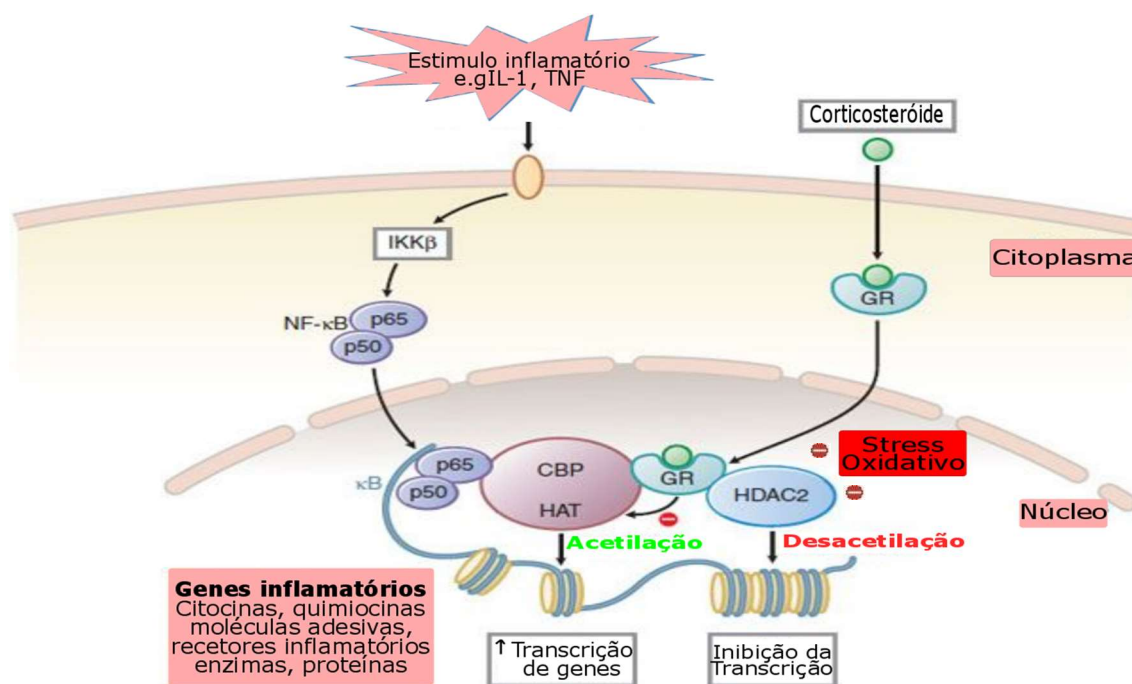


Figura 3- Mecanismo de ação e resistência aos corticosteróides. Os recetores corticosteróides em articulação com as HDAC2 diminuem a atividade de NF-κB promovendo assim a diminuição da inflamação. O stress oxidativo altera a conformação das HDAC2 e diminui os GR impedindo a ação dos corticosteróides sobre o NF-κB e promovendo a manutenção da inflamação. Adaptado de Brunton, 2015 (38)

Os corticóides atuam através dos recetores de glucocorticóides (GR), localizados no citosol das células. Quando ativos, suprimem a ação do importante fator nuclear pró-inflamatório NF- $\kappa$ B. Esta ação dos GR não é direta, depende da desacetilase HDAC2, enzima responsável pela desacetilação dos complexos ativos de NF- $\kappa$ B (Figura 3), que por sua vez se encontram ativos devido à acetilação resultante de estímulos inflamatórios e oxidantes. (27). Contudo, como já foi referido a ação da HDAC2 é inibida pelo stress oxidativo e desta forma torna os corticóides incapazes de inibir o NF- $\kappa$ B e conseqüentemente de exercer os seus efeitos anti-inflamatórios (Figura 3). Outro processo envolvido na resistência aos corticosteróides são as modificações pós-transcricionais dos GR provocadas pelo stress oxidativo que levam à sua degradação pelas chaperonas, diminuindo a sua concentração intercelular (9).

O componente oxidativo da doença parece ser o principal responsável pela resistência da DPOC aos corticosteróides, limitando a ação destes fármacos no componente inflamatório. Este fato levanta a questão da necessidade de encontrar novas abordagens terapêuticas que atuem no stress oxidativo, o que faz do resveratrol um potencial candidato.

## Capítulo 4. O Resveratrol e suas aplicações na DPOC

A fisiopatologia da DPOC assenta na interação e perpetuação retroalimentada de duas grandes componentes, a inflamatória e a oxidativa. A hipótese do uso de resveratrol no tratamento da DPOC é baseada na verificação de propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes em vários órgãos e sistemas, incluindo o sistema respiratório. Os estudos revistos na presente dissertação exploram os efeitos do resveratrol na DPOC, contribuindo para a aproximação a uma possível aplicação prática. O primeiro relato de um estudo testando os efeitos deste composto especificamente na DPOC data de 2003. Nesse estudo, pretendeu-se testar *in vitro* se as propriedades anti-inflamatórias deste composto se mantinham em macrófagos de doentes com DPOC (25). A partir desta data, observa-se um esforço para compreender quais os mecanismos moleculares da ação do resveratrol, tanto na componente inflamatória como oxidante, tanto *in vitro* como *in vivo*. A via de administração mostrou ser um aspeto importante, pois a biodisponibilidade do composto quando ingerido oralmente é muito baixa (39) o que obriga a explorar vias alternativas, tal como a via inalatória, através de partículas aerossolizadas, já desenvolvidas por Trotta e colaboradores em 2015, e testadas em animais em 2016 (28,30). Presentemente existe um ensaio clínico, em fase de recrutamento, que pretende avaliar os efeitos do resveratrol na forma de suplemento alimentar, em vários parâmetros associados com a DPOC (40). O interesse neste composto como terapia na DPOC é relativamente recente, mas muito promissor e atual. Nas secções seguintes serão revistos os resultados dos estudos disponíveis, tendo em consideração qual a componente da doença, inflamatória/oxidante, que foi abordada. O efeito do resveratrol em cada um dos intervenientes inflamatórios e oxidantes testados será mostrado nas tabelas resumo Tabela 4 e Tabela 5, respetivamente.

### 4.1. Resveratrol

O resveratrol ou trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno, é um polifenol encontrado naturalmente em várias plantas. Na sociedade ocidental é tradicionalmente associado ao vinho. Está presente em grandes quantidades na videira e pode ser encontrado nas folhas e caules mas principalmente na pele e grainhas dos bagos de uvas (18). Este composto atua como uma fitoalexina, cuja função natural é proteger as células vegetais de lesões de várias ordens como infeções fúngicas e radiações UV (41). Foi pela primeira vez isolado na raiz de um tipo de heléboro branco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes), planta utilizada como analgésico e como medicamento para doenças pulmonares na medicina tradicional chinesa (16). No entanto, foi apenas em meados da década de 1970 que o resveratrol despertou verdadeiramente a atenção

da comunidade científica, após ter sido avançado como um dos principais responsáveis pelo chamado “Paradoxo Francês<sup>3</sup>”, ou seja, pelos benefícios cardiovasculares associados ao consumo regular de vinho tinto (11). Desde essa data que lhe têm sido atribuídas várias propriedades farmacológicas, como anti-aterosclerótico, cardioprotetor, antineoplásico, anti-envelhecimento, mas são principalmente as suas propriedades como anti-inflamatório e antioxidante que têm um potencial interesse na DPOC (19,42).

#### 4.2. A ação anti-inflamatória do resveratrol

Os primeiros estudos revistos que abordam a componente anti-inflamatória do resveratrol na DPOC focaram-se na medição do seu efeito em duas importantes citocinas a IL-8 e a GM-CSF. Estas duas citocinas são importantes na patogénese da DPOC e foi verificado que os corticosteróides muitas vezes falham em reduzir os seus níveis em doentes com DPOC (9). Estas características fazem destas citocinas interessantes marcadores do desenvolvimento da doença e da eficácia terapêutica dos compostos testados. Foi com isto em mente que em 2003, Culpitt e colaboradores, exploraram os efeitos do resveratrol na libertação destas duas citocinas em macrófagos de doentes com DPOC. Os macrófagos foram isolados de lavados bronco-alveolares de doentes com DPOC, como grupo de estudo, e fumadores sem doença, que serviram de grupo controlo. Posteriormente estes macrófagos foram cultivados *in vitro* na presença e na ausência de resveratrol. Os resultados foram bastantes promissores: verificou-se com o uso de resveratrol uma redução na libertação de IL-8 de 94% em fumadores e 88% em doentes com DPOC, comparativamente ao grupo controlo. A mesma tendência verificou-se ao analisar o GM-CSF, com uma redução de 79% e 76% em fumadores e doentes com DPOC, respetivamente. Estas reduções significativas nos dois marcadores em estudo são dose dependentes, sendo que a redução máxima obtida em ambas as citocinas foi observada numa concentração de 100  $\mu$ M de resveratrol (25).

Em 2004, uma outra equipa do mesmo instituto, liderada desta feita por Donnelly, prossegue o estudo tentando compreender por quais mecanismos o resveratrol atua. Embora este estudo tenha levantado mais questões que dado respostas, deixa indicações bastante interessantes ao rejeitar algumas vias de atuação hipotéticas. Foram testadas vias e recetores descritos na literatura como alvo da ação do resveratrol. Entre eles: o recetor de estrogénios, a via Recetor Proliferador Ativado de Peroxissomas alfa (PPAR- $\alpha$ ) e a via dos glucocorticóides. Este trabalho foi realizado numa linha de células epiteliais de fumadores e numa linha celular de adenocarcinoma pulmonar, a A549. Estas linhas celulares foram transformadas biotecnologicamente de modo a evidenciar com marcadores biológicos as vias moleculares em estudo. A produção de citocinas foi estimulada através da adição ao meio do promotor inflamatório IL-1. Observou-se a reprodução dos resultados do estudo anterior, com redução

---

<sup>3</sup> Observação de uma relativa baixa taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares na população francesa apesar da sua dieta rica em gordura saturada

dose dependente da produção de GM-CSF e IL-8 nas células tratadas com resveratrol, relativamente ao controlo. Foi possível observar que esta ação não é mediada pelos recetores de estrogénio, nem dos glucocorticóides, ou pela via dos PPAR- $\alpha$  pois a redução dos parâmetros inflamatórios manteve-se, mesmo após adição de antagonistas e inibidores destas vias ao meio de cultura. Foi observado um balanço mantido entre as HDAC -HAT (histona acetiltransferase) o que sugere não ser este o mecanismo de atuação do resveratrol. Mesmo não sendo possível identificar a via pela qual o resveratrol atua, este mostrou reduzir a concentração dos mediadores de transcrição NF- $\kappa$ B, AP-1 e “*cAMP response element-binding protein*” (CREB) e dos genes iNOS e COX-2. As conclusões deste estudo realçam que o resveratrol apresenta propriedades anti-inflamatórias seletivas e que atua por uma via diferente dos glucocorticóides (11). Esta verificação de um potencial anti-inflamatório que atua por uma via independente da dos corticosteróides indica que o resveratrol poderá ser uma alternativa terapêutica para as doenças inflamatórias resistentes a este grupo farmacológico, incluindo a DPOC.

No âmbito da comparação de eficácia terapêutica entre o resveratrol e os corticosteróides, surge um interessante estudo realizado em 2011 por Knobloch e a sua equipa. Neste trabalho procurou-se testar os efeitos anti-inflamatórios do resveratrol em comparação com dexametasona na produção de um painel alargado de citocinas e marcadores inflamatórios de macrófagos isolados de indivíduos com DPOC. Neste modelo *in vitro*, a inflamação foi estimulada com lipopolissacarídeos (LPS), uma molécula antigénica bacteriana, capaz de induzir exacerbações na DPOC. Verificou-se uma redução dose dependente de IL-8 e GM-CSF com os dois fármacos. No entanto, esta redução mostrou-se mais marcada com o uso de resveratrol, que apresentou a capacidade de redução dos níveis de ambos os marcadores para a concentração basal, prévia à exposição com LPS (33). Observou-se concomitantemente a redução dos níveis de IL-6 para os dois fármacos testados e redução de MCP-1 consideravelmente mais acentuada com resveratrol de que com dexametasona. Em relação ao MMP-9 os corticosteróides apresentam um efeito moderado, contrariamente ao resveratrol que reduz quase totalmente os níveis desta metaloproteínases, até aos seus valores basais. Com a exceção do IL-6 todos os outros marcadores inflamatórios utilizados são parcialmente resistentes aos corticosteróides, mesmo na ausência de stress oxidativo. Isto verifica-se mais acentuadamente com MCP-1 e MMP-9 (33). A incapacidade dos corticosteróides reduzirem os níveis das metaloproteínases pode explicar a sua incapacidade de atrasar a evolução histológica da patologia (4). Uma outra observação interessante deste estudo foi que nos macrófagos isolados de fumadores, o LPS ativa principalmente a produção de IL-8 e MMP-9. Como o LPS é uma molécula antigénica bacteriana, estes dados estão de acordo com as observações de aumento nas lesões histológicas e da perda de função provocada pelas exacerbações causadas por infeção com estes microrganismos (4).

Como já foi discutido em capítulos anteriores, os macrófagos parecem desempenhar um papel central na fisiopatologia da DPOC, no entanto, outros componentes celulares como os linfócitos são relevantes na evolução da patologia. Os linfócitos indicam o envolvimento da imunidade adquirida e da cronicidade do processo inflamatório. A sua presença é detetada no local das lesões estruturais em cortes histológicos (10). Em 2016, Liu e colaboradores propuseram-se testar os efeitos do resveratrol na libertação de marcadores inflamatórios em linfócitos isolados de doentes com DPOC. Os resultados deste trabalho replicaram os dados descritos em macrófagos. As vias sinalizadoras dos componentes inflamatórios NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  e MMP-9 encontram-se significativamente aumentadas nos linfócitos de doentes com DPOC, comparativamente aos controlos. Quando adicionado resveratrol às culturas de linfócitos, a produção de NF- $\kappa$ B diminui, de forma dose dependente, sendo que o TNF- $\alpha$  apresenta uma redução equivalente. O MMP-9 apresenta também uma redução dose dependente, mas não correlacionada com os outros marcadores de inflamação (34). Estes dados estão de acordo com o conhecimento biológico prévio, pois a ativação do NF- $\kappa$ B vai estimular a produção de TNF- $\alpha$ , entre outros efetores pró-inflamatórios, mas não intervém na produção de MMP-9. O efeito do resveratrol é mais pronunciado no TNF- $\alpha$  do que no MMP-9, o que pode indicar um efeito anti-inflamatório mais acentuado do que o efeito anti-remodelador pulmonar.

As células epiteliais são responsáveis por parte dos sintomas da DPOC ao libertarem mediadores inflamatórios após lesão que, por sua vez, estimulam a produção de muco e ativam a resposta inflamatória com o recrutamento de leucócitos. Como já foi referido, as infeções bacterianas contribuem para as exacerbações e para a progressão da doença. Em 2016 Andrews e colaboradores, partindo do conhecimento da imunologia entre a ação dos antigénios bacterianos do *Haemophilus influenzae* e os recetores celulares toll-like (TLRs), abriram caminho para a compreensão de uma das vias de atuação do resveratrol. Os antigénios desta bactéria ligam-se e ativam os TLR, o que vai provocar o recrutamento de MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), isto leva à ativação de NF- $\kappa$ B e das Proteína-Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPK) o que desencadeia a resposta inflamatória (Figura 4). Esta reação é contrabalançada por um produto de *splicing* alternativo MyD88s que se liga ao mesmo recetor, mas sem capacidade de ativar os efetores a jusante. Estes autores verificaram que na presença de resveratrol existe aumento significativo de MyD88s, que está inversamente relacionado com a libertação de IL-1, IL-6, CCL-2 e GM-CSF nas células do epitélio bronquial em cultura e em modelos animais na presença de infeção com *H. influenzae*. Curiosamente, quando a produção de MyD88s é bloqueada com RNA interferência curtos (siRNA), o resveratrol perde a capacidade de reduzir de forma significativa o IL-6 e GM-CSF. Estes dados sugerem que uma das vias principais da ação anti-inflamatória do resveratrol em resposta a infeção bacterianas se processa através da regulação da expressão MyD88s. Este estudo revela que, nestas condições, o resveratrol atua através da via cAMP-PKA-MKP-1 (43). Tal como mostra a Figura 4, o resveratrol parece atuar como inibidor direto da fosfodiesterase, provocando a acumulação de Monofosfato de Adenosina Cíclico (cAMP), o que conjuntamente com a Proteína

Cinase A (PKA) aumenta a expressão da *Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1* (MKP-1). A MKP-1 provoca a desfosforilação e consequente inativação das *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1/2), que por sua vez parece inibir a expressão de MyD88s. Desta feita, a inibição da ERK1/2, através desta via, permite ao resveratrol aumentar os níveis de MyD88s e suprimir a inflamação provocada por *H. influenzae* (43).

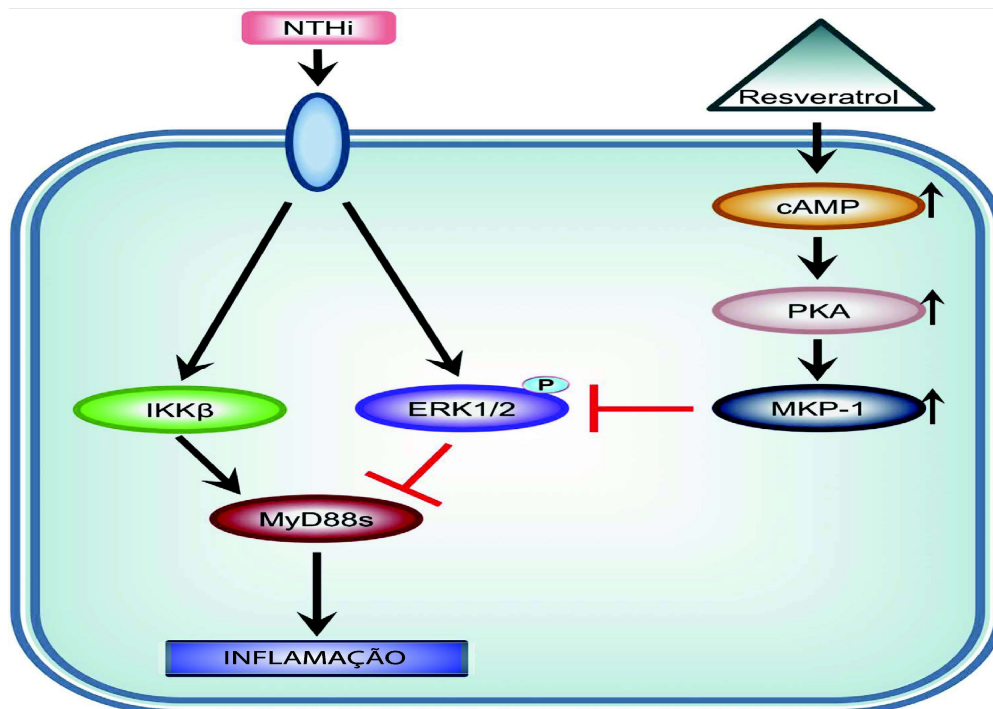


Figura 4- Resveratrol reduz inflamação através da inibição ERK 1/2 via cAMP-PKA-MKP1. Adaptado de Andrews 2016 (43)

Outro tipo celular que merece atenção são as células dendríticas. Estas células são responsáveis pela ligação entre a imunidade inata e a imunidade adquirida. São apresentadoras de antígenos por excelência, modeladoras da ativação de linfócitos T e potentes secretoras de interferão. Pensa-se terem um papel importante na patogênese da DPOC através da manutenção do estado inflamatório crônico, conseguida por meio da ativação inadequada da resposta imunitária adquirida. Uma forma das células regularem a sua apoptose, proliferação e transição epitélio-mesenquimal é através de microRNAs que funcionam como inibidores da transcrição genética. A família miR-35 encontra-se entre os microRNA com a expressão mais deprimida em pulmões de ratos expostos a tabaco. Wang e colaboradores hipotizam que a diminuição do precursor da família dos microRNA miR-34, está relacionada com as alterações de comportamento celular encontradas nas células dendríticas, que estas alterações contribuem para a DPOC e que o uso de resveratrol contribui para atenuar estes efeitos. Os referidos autores verificaram que os fumadores e doentes com DPOC possuem uma diminuição na concentração de miR-34, um aumento nas moléculas co-estimuladoras de linfócitos T, CD80 e CD86 e elevação da produção de IFN. Os interferões são moléculas que estão associadas ao combate a infeções virais, crescimento tumoral, inflamação e angiogénese. Como tal, podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da DPOC e suas exacerbações. Na cultura de isolados de células dendríticas de fumadores e pacientes com DPOC, estes

investigadores verificaram que na presença de resveratrol no meio de cultura, existe um aumento marcado na expressão de miR-34 e uma inibição considerável tanto na quantidade de CD80 e CD86, como na secreção de INF- $\alpha$ . Os autores concluíram que o resveratrol inibe a disfunção das células dendríticas em doentes com DPOC, efeito este parcialmente modulado através da promoção de miR-34 (42).

As células do musculo liso brônquico desempenham também um importante papel na resposta imunitária inata dos pulmões, através da produção de mediadores inflamatórios quando lesadas. O artigo de 2014 de Knobloch, descreve um estudo efetuado neste tipo de células cultivadas *in vitro*. A sua resposta inflamatória foi estimulada pela exposição a um constituinte da parede celular de bactérias gram positivas, o LPS, tendo sido adicionado resveratrol ou dexametasona ao meio de cultura, com o objetivo de testar as alterações que estes fármacos teriam na produção de citocinas. Observou-se que o resveratrol diminui a libertação de MCP-1 e IL-6 em maior grau que a dexametasona e de GM-CSF em proporções semelhantes. Foi também constatado que o bloqueio da ação da SIRT1 inibia os efeitos do resveratrol nas citocinas estudadas, inversamente, o bloqueio da ação das HDAC classe I/II<sup>4</sup> não surtiam efeito. Em relação à dexametasona verificou-se o inverso, o bloqueio das HDAC classe I/II inibia a sua ação, mas o bloqueio das sirtuínas não provocava alterações na sua função (19). Com estes dados reforça-se a noção que a ação anti-inflamatória do resveratrol atua por vias diferentes à dos corticosteróides. Tornou-se também evidente que a via da SIRT é de grande importância na ação do resveratrol, pois inibindo-a, reduz-se significativamente a sua ação.

Os estudos *in vivo* das propriedades farmacológicas dos compostos são essenciais para perceber a sua aplicabilidade, eficácia e toxicidade. Birrell e a sua equipa em 2005 propôs-se a explorar os efeitos anti-inflamatórios do resveratrol em comparação com corticosteróides, em situações inflamatórias pulmonares de cobaias. Este trabalho foi desenvolvido em modelos de roedores e a inflamação pulmonar estimulada por instilação de LPS nas vias respiratórias. Após verificação da indução de inflamação pulmonar, foi aplicada a terapêutica por meio da administração intratraqueal de resveratrol e corticosteróides micronizados. Verificou-se, após terapêutica com resveratrol uma redução dose dependente da neutrofilia nos tecidos e lavados bronco-alveolares, semelhante à obtida com corticosteróides, não se observando, contrariamente a este último fármaco, uma redução de eosinófilos. Medições dos níveis de NF- $\kappa$ B, neste modelo, demonstram que o resveratrol não afeta a sua expressão. Também não se observou redução da expressão do gene iNOS ligado à atividade do fator nuclear NF- $\kappa$ B nem da COX1 ou COX2. Embora o resveratrol não tenha demonstrado diminuição dos genes mediadores inflamatórios estudados, as proteínas inflamatórias consideradas (TNF- $\alpha$ , IL-1, MPO e CXCL1) apresentaram uma redução dose dependente. Este trabalho conclui que o resveratrol apresenta

---

<sup>4</sup> Ligadas a ação dos corticosteróides

atividade anti-inflamatória *in vivo*, embora neste modelo tenha sido obtida de forma independente da inibição de NF- $\kappa$ B (41).

Um outro estudo testando os efeitos terapêuticos do resveratrol em modelos roedores da DPOC, foi desenvolvido por J. Chen e a sua equipa, em 2016. Neste estudo, a patologia pulmonar foi provocada através do uso combinado de LPS e concentrado de fumo de tabaco, aproximando-se de forma mais fidedigna da etiologia da DPOC em humanos. Neste estudo foi verificado uma redução histológica da inflamação pulmonar, da fibrose, da deposição de colagénio e a produção de muco em ratos tratados com resveratrol oralmente. Na análise de lavados broncoalveolares destes mesmos ratos, verificou-se uma diminuição significativa de células inflamatórias, especialmente neutrófilos e macrófagos. A produção das citocinas IL-6, IL-17, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  encontra-se suprimida assim como o marcador de autofagia Beclin1. Estes autores finalizam o estudo afirmando que estas evidencias apoiam que a administração oral de resveratrol pode ser adequada ao tratamento da DPOC em humanos.

Y. Chen e colaboradores em 2016 adotaram uma abordagem diferente na tentativa de encontrar uma terapêutica que altere a evolução natural da doença que merece ser referida pela sua originalidade. Estes investigadores exploraram o potencial do uso de células estaminais transformadas biotecnologicamente com genes de interesse, neste caso concreto o gene do VEGF, um importante fator de crescimento que promove a angiogénese e vasculogénese. Esta escolha foi baseada na observação feita em estudos prévios onde verificaram que doentes com DPOC apresentam paredes alveolares mais finas e menos vascularizadas que controlos sem doença, e que isto se correlacionava com baixas concentrações de VEGF. A referida equipa de investigadores propôs-se testar os efeitos do uso de resveratrol na produção de VEGF em células estaminais do mesênquima pulmonar de ratos. Foi avaliado o efeito do co-tratamento com células estaminais e resveratrol, comparativamente ao uso de células estaminais isoladamente, no desenvolvimento da doença em modelos vivos. Foi observado que na presença de resveratrol existe um aumento na produção de VEGF e que uso de células estaminais pré-tratadas com resveratrol se traduz numa melhoria da função pulmonar e mais efeitos terapêuticos nos ratinhos, comparativamente com o uso de células estaminais isoladas. As conclusões deste estudo foram que as células estaminais do mesênquima tratadas com resveratrol exibem efeitos benéficos na redução da produção de citocinas inflamatórias, na renovação de células endoteliais disfuncionais e na reativação de vias de sinalização regeneradoras de tecidos (24).

Por último, é importante referir um estudo desenvolvido por Qi e colaboradores, em 2014. numa vertente importante, mas pouco explorada da DPOC, que são os seus efeitos sistémicos. Presume-se que a inflamação pulmonar que provoca a DPOC possa complicar ao estender-se sistemicamente. A diminuição dos níveis de AMP cíclico, causado pelo estado inflamatório sistémico, provoca a disfunção do metabolismo energético muscular e conduz,

entre outros efeitos, à fraqueza muscular e caquexia. Neste estudo *in vivo*, usando ratos de laboratório nos quais foi induzida DPOC, observou-se que na presença de resveratrol há uma diminuição da deposição de colagénio nos músculos esqueléticos, as lesões mitocondriais provocadas pelo fumo do tabaco são atenuadas, os níveis de cAMP aumentam para próximo do valor do grupo controlo, há um aumento na expressão da SIRT1 muscular, e uma diminuição do marcador de inflamação TNF- $\alpha$  tanto sistémico e muscular. Embora não se tenha observado um ganho de peso significativo nos ratos tratados com resveratrol, observou-se um menor número de lesões pulmonares e a melhoria dos marcadores inflamatórios e da disfunção muscular. Estes dados parecem indicar que o resveratrol é uma terapêutica potencial para o tratamento da fraqueza muscular em modelos de ratos com DPOC (22).

Tabela 4 Efeito do resveratrol nos diferentes intervenientes da inflamação

	Efeito da presença de resveratrol	Referências
<b>Citocinas</b>		
IL-6	Redução em macrófagos <i>in vitro</i>	(19,29,30,33)
	Redução LBA <i>in vivo</i>	(16)
IL-8	Redução em macrófagos <i>in vitro</i>	(11,25,30,33)
	Redução LBA <i>in vivo</i>	(26)
IL-17	Redução <i>in vivo</i>	(16)
GM-CSF	Redução em macrófagos <i>in vitro</i>	(11,19,25,30,33)
MCP-1	Redução em macrófagos <i>in vitro</i>	(19,33)
PGE2	Redução tecido pulmonar <i>in vivo</i>	(41)
TGF- $\beta$		(16)
TNF- $\alpha$	Redução <i>in vitro</i>	(30)
	Redução linfócitos circulação	(34)
	Redução <i>in vivo</i>	(16,22,26,29)
<b>Metaloproteinases</b>		
MMP-9	Redução em macrófagos <i>in vitro</i>	(33)
	Redução linfócitos circulação	(34)
	Redução no LBA <i>in vivo</i>	(26)
<b>Genes/enzimas</b>		
iNOS	Redução <i>in vitro</i>	(11)
	Sem efeito <i>in vivo</i> tecido pulmonar	(41)
COX-2	Redução <i>in vitro</i>	(11)
	Sem efeito <i>in vivo</i> tecido pulmonar	(41)
AMP cíclico	Aumenta <i>in vivo</i>	(22)
VEGF	Aumenta <i>in vitro</i>	(24)
<b>Fatores transcrpcionais</b>		
NF- $\kappa$ B	Inibe parcialmente	(28,29,32,44)
	Sem efeito	(41)
	Inibe linfócitos circulação	(34)

### 4.3. A ação antioxidante do resveratrol

O reconhecimento da importância do papel da componente oxidante na fisiopatologia da DPOC foi um passo essencial para a compreensão de vários aspectos da doença, nomeadamente a resistência ao tratamento com corticosteróides. O primeiro estudo revisito que pretende esclarecer os mecanismos de ação antioxidante do resveratrol contra o stress oxidativo do fumo de tabaco data de 2008, sendo da autoria de Kode e colaboradores. O seu trabalho consistiu no estudo dos efeitos do resveratrol contra o stress oxidativo proveniente da adição de extrato de tabaco em cultura de células epiteliais de pulmão humano. Verificou-se que o resveratrol possui a capacidade de neutralizar diretamente os ROS e detém uma função indireta como promotora da expressão genética de glutatião por uma via dependente do fator de transcrição Nrf2. Fisiologicamente a expressão de glutatião é regulada através do Nrf2, que é um fator transcricional que é ativado em resposta a estímulos oxidativos. Após ativo, o Nrf2 é capaz de estimular genes que codificam enzimas, como a importante glutamato-cisteíno ligase, a enzima limitante da produção do glutatião. O resveratrol parece conferir proteção contra as modificações pós-transcricionais que o Nrf2 sofre devido ao stress oxidativo do fumo do tabaco, evitando assim a sua degradação. Isto permite que este fator de transcrição mantenha a sua capacidade de responder ao stress oxidativo com a estimulação da produção de antioxidantes (18).

Chen e colaboradores, no seu estudo com células estaminais já citado, além dos parâmetros inflamatórios, avaliaram a capacidade antioxidante do resveratrol nas células estaminais cultivadas na presença de extrato de fumo de tabaco. Para isto, foram determinadas as concentrações de algumas moléculas importantes na defesa antioxidante do organismo em culturas com e sem a adição de resveratrol. Foi verificado que o resveratrol tem capacidade de aumentar até 9 vezes a expressão de HO-1, até 4 vezes o Nrf2 e o SOD, concomitantemente verificou-se a diminuição da apoptose e necrose celular. Este estudo concluiu que a presença de resveratrol aumenta a viabilidade das células estaminais em ambientes oxidantes, provocado pelos componentes do fumo de tabaco (24).

O stress oxidante é capaz de induzir lesões no DNA. Uma das formas de proteção intracelular, quando a primeira linha de defesa antioxidante é insuficiente e há lesão de organelos, é aumentar a autofagia celular. Nos pulmões de doentes com DPOC este mecanismo está aumentado de forma aparentemente desregulada. A autofagia em excesso provoca morte celular, o que contribui para a disfunção dos tecidos, liberta mediadores inflamatórios e leva a lesões estruturais associadas à DPOC e à sua progressão. Hwang e colaboradores hipotizaram que o aumento da autofagia se deve à desregulação do eixo SIRT1-PARP-1 causada pelo stress oxidativo. Para o comprovar, estes autores recorreram a culturas celulares de epitélio brônquico, às quais adicionaram extrato de fumo de tabaco, para simular o ambiente oxidativo. Estes autores verificaram que na presença de resveratrol existe um ambiente protetivo contra a

diminuição de SIRT1 e que isto está correlacionado com a atenuação da autofagia provocada pelo fumo do tabaco (36). Um outro estudo, conduzido por Shi et. al., usando resveratrol e o seu dímero sintético Vam3, replicou os efeitos relatados pelo estudo de Hwag. Ou seja, comprovou a atenuação da autofagia provocada pelo concentrado de fumo de tabaco em células do epitélio brônquico. Estes autores avaliaram também a concentração de FoxO3, um dos principais fatores de transcrição alvo, que são desacetilados pelo SIRT1. Uma importante adição em relação ao estudo anterior foi que neste trabalho os autores utilizaram ratos *knocked down* para a SIRT1 e observaram que, nestes animais, não acontece a diminuição da autofagia na presença de resveratrol. Isto indica que o resveratrol utiliza obrigatoriamente esta via na regulação da autofagia, neste tipo celular. Em ratos não *knocked down* os parâmetros de autofagia avaliados encontram-se diminuídos, tal como seria de esperar. O tratamento com resveratrol e Vam3 restaurou os níveis de SIRT1 e FoxO3 nos tecidos e diminuiu a progressão histológica da doença nos pulmões dos ratos tratados (35). Este efeito protetor do resveratrol através da via da SIRT1 foi também verificado em outros estudos, como o realizado por Paschalaki em 2013 com células formadoras de colônias endoteliais, um tipo de células progenitoras multipotentes, capazes de regenerar populações endoteliais. O resveratrol mostrou diminuir os danos de DNA e a senescência nestas células através da via SIRT1 (37). Um outro estudo do mesmo ano realizado por Hu e colaboradores, desta feita na avaliação do impacto sistémico da DPOC através de danos oxidativos cardíacos e a remodelação cardíaca do ventrículo esquerdo, mostrou que usando resveratrol em ratos idosos expostos a fumo de tabaco e com lesões compatíveis com DPOC, os efeitos cardíacos da DPOC eram atenuados, através da via da SIRT1 e também do aumento da SOD (45).

As células epiteliais são a primeira linha de defesa contra agentes externos, a sua excessiva apoptose e inadequada reparação são característicos da fisiopatologia da DPOC. Zhang e colaboradores, em 2015, exploraram os efeitos antiapoptóticos do resveratrol em células epiteliais bronquiais expostas a fumo de tabaco. Está estabelecido em trabalhos prévios, alguns dos quais já referidos, que a presença de resveratrol aumenta a expressão de SIRT1 e que esta enzima é uma das principais contribuintes para os seus efeitos antiapoptóticos. Este autor, e a sua equipa, propuseram-se a determinar se a Proteína de Choque Regulada pelo Oxigénio (ORP150) está envolvida na via de ativação do SIRT1 pelo resveratrol. Verificou-se que a presença de resveratrol aumenta os níveis tanto de ORP150 como de SIRT1 e que existe uma marcada diminuição dos marcadores de apoptose nas linhas celulares estudadas. Após bloqueio do gene codificante de ORP150, e embora os níveis de SIRT1 não tenham sofrido alterações, os efeitos protetores do resveratrol foram largamente atenuados, o que se traduziu em um aumento da apoptose. Estes dados implicam que os efeitos protetores do resveratrol serão alcançados, pelo menos em parte, através de uma via que envolve o ORP150 em interação com a SIRT1 (23).

Outro interessante estudo *in vivo* foi desenvolvido por Liu e a sua equipa, em 2014, e teve como objetivo investigar os efeitos do resveratrol nas lesões oxidativas e inflamação pulmonar. Procederam, para isto, à exposição dos pulmões de ratos com concentrado de fumo de tabaco. No grupo de estudo procederam à administração de várias concentrações de resveratrol na hora anterior à exposição do fumo de tabaco; no grupo controlo fizeram a exposição ao fumo sem qualquer tratamento prévio. Analisando posteriormente amostras de lavado broncoalveolar e cortes histológicos dos pulmões, verificou-se que o pré-tratamento com resveratrol atenua as alterações histológicas do pulmão, a infiltração celular inflamatória e diminui de forma dose-dependente a secreção de citocinas no lavado broncoalveolar. A atividade de SOD, catalase, HO-1 e glutatião mostra-se significativamente reduzida pelo fumo do tabaco no grupo controlo, mas encontra-se consideravelmente aumentada na presença de resveratrol no grupo de estudo (29). Estes dados indicam que o resveratrol atenua o stress oxidativo provocado pelo concentrado de fumo de tabaco e as lesões histológicas a ele associadas.

Tabela 5 Efeitos do resveratrol nos intervenientes do componente oxidante da DPOC

	Efeito da presença de resveratrol	Referências
<b>Fatores transcricionais</b>		
Nfr2	Proteção alteração conformação	(18,24)
ROS	Redução	(18)
FoxO3	Aumento	(35)
<b>Antioxidante</b>		
Glutatião	Aumento	(18,29)
Superóxido dismutase	Aumento	(24,29,45)
catalase	Aumento	(29)
HO-1	Aumento	(24,29)
NO	Reduz	(11,30)
<b>Desacetilases</b>		
SIRT1	Evita depleção tecido pulmonar	(19,22,23,35-37)

#### 4.4. A Farmacocinética e toxicidade do resveratrol

A biodisponibilidade de um fármaco é de enorme importância quando se pondera a sua utilização terapêutica. O resveratrol é um produto existente naturalmente em alimentos como as uvas e é tradicionalmente associado ao vinho tinto. Desta forma, a via oral é a mais frequentemente explorada. Outras vias possíveis são a sua administração intravenosa (IV) (46), intraperitoneal (41), ou a via inalatória (28). Oralmente, verifica-se que o resveratrol apresenta uma absorção de cerca de 75% da dose administrada, o que parece ocorrer por difusão transepitelial. Esta absorção é considerada particularmente elevada tendo em conta a sua fraca solubilidade em meios aquosos (39).

Após uma administração, a concentração plasmática do composto na sua forma não conjugada é relativamente baixa em seres humanos, o que indica um rápido metabolismo (19). Este metabolismo é principalmente hepático, através da glucuronidação e sulfatação do composto. Não é claro se os metabolitos resultantes possuem interesse biológico por si, mas hipotiza-se que podem funcionar como uma reserva funcional podendo ser revertidos à forma livre de resveratrol através das glucuronidases e sulfatases celulares, respetivamente (39). O resveratrol circula no plasma ligado de forma não covalente a lipoproteínas, acumulando-se preferencialmente nos tecidos periféricos comparativamente ao plasma.

A sua excreção é feita maioritariamente pela urina podendo chegar aos 85% da dose administrada, contra o máximo 38% nas fezes (46). Observa-se também que a percentagem de excreção pelas fezes é maior quando administrado pela via oral, comparativamente à via parenteral. Estes dados sugerem não só uma absorção subtotal do composto pela via entérica, como também uma elevada distribuição periférica pelos tecidos quando a administração é parentérica. A deteção de resveratrol e seus metabolitos nas fezes, tanto após administração oral como parentérica, sugere a existência de uma circulação entero-hepática. O seu pico plasmático acontece 1 hora após a administração oral, com um segundo pico às 6 horas, este segundo pico não se verifica quando administrado IV. A sua meia vida plasmática é entre 3-11 horas independentemente da via de administração (46).

O resveratrol é detetado no plasma em quantidades 20 vezes menores comparativamente aos seus metabolitos. Contudo, verifica-se que a administração em multidoses diárias aumenta não só os níveis deste composto como a sua semivida plasmática. Este efeito multidoses é observado tanto na administração do composto purificado como no consumo do mesmo através da dieta, por exemplo pelo consumo de vinho tinto. Estes dados levam a crer que este tipo de posologia é a mais indicada para atingir doses terapêuticas no organismo, comparativamente à uni-dose diária (46).

A toxicidade do resveratrol parece ser baixa. Vários autores apresentam dados que indicam que este composto é bem tolerado em várias linhas celulares. Não se verificou toxicidade até 50  $\mu\text{mol/L}$  em macrófagos (28) ou em células formadoras de colónias endoteliais (37), nem em células dendríticas a uma concentração de 10 000  $\mu\text{mol/L}$  por 72 horas (42). Em cobaias, parece também ser bem tolerado mesmo em doses consideradas elevadas. É classificado por Cottart e colaboradores como “não tóxico e inócuo para a capacidade reprodutiva ou na embriogénese” (46). Em humanos foram testadas doses de até 5g/70kg em dose única, e 0,9 g/dia em doses fracionadas sendo apenas relatados efeitos secundários ligeiros, como cefaleias, eritema ou alterações ligeiras na função hepática, todos estes limitados no tempo (46).

#### 4.5. Vias de administração - Oral e inalável

O contexto histórico da descoberta deste composto e a sua forte associação com o consumo de vinho tinto despertou o interesse no estudo dos efeitos do resveratrol quando ingerido através do consumo moderado de vinho. Existem dois estudos de coorte que exploram o efeito do consumo de vinho na função pulmonar. Os autores referem que o resveratrol poderia ser um dos principais contribuintes para estes mesmo efeitos, mas admitem que a sua contribuição efetiva é impossível de isolar dos restantes compostos do vinho. Os resultados são contraditórios e necessitam de uma interpretação cuidadosa. No entanto, a posse destes dados tem importância na exploração da viabilidade de usar o consumo de vinho como uma potencial via dietética para obter os efeitos protetores do resveratrol.

Kamholz observou que o consumo moderado de vinho, até 250 mL diário, provoca um aumento do FEV1 e FVC em doentes com DPOC comparativamente com não consumidores. Esta associação é mais forte no consumo de vinho branco do que no vinho tinto. Como as concentrações de resveratrol são mais baixas no vinho branco, onde é praticamente inexistente, comparativamente ao tinto, estes efeitos serão devidos muito provavelmente a outros fatores, como as quantidades moderadas de álcool. De fato é verificado que consumidores moderados de bebidas alcoólicas, que não o vinho, apresentam menor mortalidade relacionada com a DPOC do que não consumidores (12). Por seu lado Siedlinski encontra uma melhora estatisticamente significativa do FEV1 e da obstrução das vias aéreas, dois sinais típicos da DPOC, apenas nos consumidores de vinho branco. Nos consumidores regulares de vinho tinto foi verificado uma melhora da FVC, sem efeito nos outros parâmetros medidos (47). Embora existam muitos fatores confusionais, impossíveis de serem controlados nestes dois estudos, os seus resultados apontam para a virtual ineficácia do resveratrol quando ingerido como complemento alimentar através do consumo de vinho, o que se deve provavelmente, entre outros fatores, à baixa biodisponibilidade oral e a um consumo de quantidades flutuantes e não controladas de resveratrol, não suficientes para atingir o seu limiar terapêutico.

Não existem presentemente dados sobre os efeitos pulmonares da administração oral controlada e regular de resveratrol em seres humanos. Contudo, encontra-se neste momento a decorrer um ensaio clínico, em fase de recrutamento, que prevê a medição de vários parâmetros vitais e inflamatórios em doentes com DPOC suplementados com 150 mg de resveratrol oral durante 4 semanas (40). Espera-se que os resultados deste ensaio clínico permitam esclarecer se esta via é adequada para reproduzir, em doentes com DPOC, os efeitos do resveratrol observados *in vitro* e em estudos animais *in vivo*.

A via inalável é a via preferencialmente utilizada para a administração de fármacos em doenças inflamatórias crônicas pulmonares, como a asma e a DPOC. O leque de fármacos administrados para a DPOC usando esta via é extenso, desde corticosteróides, beta agonistas, anticolinérgicos, teofilina e inibidores da PDE-4. A possibilidade da administração de resveratrol em forma de aerossol é legítima e segue um raciocínio lógico, tendo em Trotta e colaboradores os pioneiros na sua exploração. No seu artigo de 2015, esta equipa explora o potencial inalatório do resveratrol em forma de pó liofilizado e a sua atividade como anti-inflamatório e antioxidante. Os dados obtidos neste trabalho demonstram que o resveratrol liofilizado tem o tamanho e a estabilidade necessária para a administração pulmonar em forma de spray, apresentando uma eficiente performance como aerossol. As concentrações deste composto resultantes da deposição em vários locais da árvore respiratória artificial variaram entre 1,25  $\mu\text{M}$  a 160  $\mu\text{M}$ , tendo sido as mesmas testadas para a sua citotoxicidade em linhas celulares pulmonares. A toxicidade variou entre as diferentes linhas testadas, mas manteve-se abaixo dos 5% na grande maioria. Os seus efeitos anti-inflamatórios revelaram-se positivos em doses de 5  $\mu\text{M}$  através da redução na produção de marcadores de inflamação. Os efeitos antioxidantes foram apenas medidos através da sequestração direta de ROS tendo sido verificados a uma concentração de 100  $\mu\text{M}$ . O stress nitrosante também apresentou uma redução com a diminuição da produção de NO. É concluído que o resveratrol não é tóxico, possui as características físico-químicas apropriadas para ser usado como aerossol e tem boas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, podendo ser de elevado valor terapêutico na DPOC (30).

#### 4.6. Administração conjunta com corticosteróides

Até este ponto foi descrito a ação anti-inflamatória e antioxidante do resveratrol, ou derivados, de forma isolada. No entanto, a sua associação terapêutica com os corticosteróides poderá ter um valor sinérgico. Como já foi exposto, as características fisiopatológicas da DPOC e a existência de um ambiente oxidante na superfície pulmonar leva a uma inibição da via molecular de atuação dos glucocorticóides. Contudo, as propriedades antioxidantes do resveratrol têm efeitos protetores das moléculas responsáveis pelo efeito anti-inflamatório dos glucocorticóides que se encontram inibidas quando há resistência na DPOC. Desta forma, é legítimo pensar que o resveratrol possa ter um efeito sinérgico com os glucocorticóides.

Esta hipótese foi primariamente explorada por Sadarini e a sua equipa em um modelo de ratos. Estes autores usaram um protocolo de indução da DPOC através de instilações de concentrado de fumo de cigarro e LPS nos pulmões de ratos para obterem um modelo de DPOC com componente oxidativa. Numa fase precoce de inflamação pulmonar foram administradas, no grupo de estudo, diferentes proporções de resveratrol e corticosteróides. Os resultados foram muito promissores - verificou-se que o uso combinado destes compostos leva a uma redução do número de leucócitos e edema pulmonar; redução da atividade da MMP-9, TNF- $\alpha$  e IL-8 em lavado bronco-alveolar; diminuição da mieloperoxidase e da peroxidação de lípidos.

Histologicamente observou-se uma redução da destruição do parênquima pulmonar no grupo de estudo comparativamente aos controlos. Foi demonstrado com este trabalho a capacidade sinérgica que estes compostos, em conjunto, possuem ao diminuírem a inflamação e curiosamente também ao reduzirem o stress oxidativo em maior grau que usados isoladamente (26). Estes dados indicam que o uso de uma terapêutica combinada pode ser uma abordagem a ter em conta no tratamento do DPOC.

Num outro estudo de 2016, Trotta e seus colaboradores propuseram-se testar a viabilidade celular, a atividade anti-inflamatória e antioxidante de formulações aerossolizadas combinadas. Para isto, desenvolveram e testaram formulações aerossolizadas com diferentes combinações de resveratrol e de corticosteróide, tendo sido testada a performance da deposição de partículas num sistema respiratório artificial e sua atividade biológica em culturas de macrófagos alveolares. Verificou-se que as formulações combinadas se comportam de forma homogeneia, apresentando um padrão de deposição similar ao longo da via respiratória artificial. A viabilidade dos macrófagos não foi alterada com o uso de diferentes combinações de concentrações dos fármacos, manifestando uma boa tolerância às concentrações testadas. Observou-se também uma diminuição dos radicais livres dose-dependente de resveratrol, explicada pela capacidade deste composto sequestrar diretamente os radicais livres. Por seu lado, o corticosteróide utilizado não apresentou esta propriedade antioxidante isoladamente. Os níveis de NO mostram uma redução com a utilização destes compostos de forma isolada, sendo que esta é ainda mais pronunciada quando usados em conjunto. Em relação aos parâmetros anti-inflamatórios verificou-se que todas as formulações combinadas possuem capacidade de reduzir tanto o IL-6 como TNF- $\alpha$ , variando, no entanto, na sua eficácia. Um dado curioso mostra que a capacidade anti-inflamatória aumenta com a elevação da percentagem de resveratrol na formulação, sendo os valores de redução máxima dos marcadores inflamatórios foram atingidos com o uso de resveratrol isolado (28). Os autores afirmam desconhecer qual a razão do observado, mas provavelmente tal se deverá ao duplo efeito do resveratrol que o torna mais eficaz em populações celulares que têm já as vias moleculares de resistência aos corticosteroides expressas de forma predominante. Não descartam, contudo, a possibilidade de o uso de formulações combinadas poder ser benéfico na DPOC ou em outras condições pulmonares como a asma.

## Capítulo 5. Discussão e Conclusões

O resveratrol parece atuar de forma pleiotrópica através de diversas vias ainda não completamente compreendidas, mas que aparentam estar interligadas e ser interdependentes (Figura 5). Diversos estudos continuam a contribuir para desvendar os modos de atuação deste composto nos dois pilares fundamentais da fisiopatologia da DPOC, o componente inflamatório e o componente oxidante. Os dados resultantes dos artigos revistos mostram que, independentemente do modelo celular ou animal usado ou do método escolhido para simular a DPOC, o resveratrol apresenta um efeito anti-inflamatório elevado, igual ou superior aos corticosteróides (19,33,41). Em relação à componente antioxidante, está demonstrado que o resveratrol possui um duplo efeito, atua como antioxidante *per se* ao se ligar diretamente aos ROS e modula a transcrição genética de antioxidantes endógenos. Propriedades estas, que os corticosteróides falharam em demonstrar (18).

A ação anti-inflamatória do resveratrol é maioritariamente exercida por vias diferentes da dos corticosteróides e totalmente independente dos GR (11). Estudos realizados em linhas celulares humanas indicam que a redução de fatores de transcrição pró-inflamatórios, principalmente o NF- $\kappa$ B, é uma das principais formas pelas quais os efeitos anti-inflamatórios do resveratrol se fazem sentir (11,34). Curiosamente, quando Birrel e associados testaram um modelo vivo esta diminuição de NF- $\kappa$ B não foi verificada, apesar de se terem medido diminuições da mesma ordem nos mesmo marcadores inflamatórios testados nos estudos *in vitro* anteriores. Os autores explicam estes dados por uma possível variabilidade de resposta entre espécies, do rato para células humanas, mas a verdadeira razão destas diferenças no modelo testado continuam desconhecidas (41).

O NF- $\kappa$ B é o principal alvo de atuação dos corticosteróides e depende dos GR. A resistência verificada a estes fármacos observada nos doentes com DPOC parece ser devida a alterações conformacionais provocadas pelo stress oxidativo na molécula HDAC2, elemento essencial que atua em conjunto com o recetor corticosteróide ativado para exercer a modulação transcricional anti-inflamatória (Figura 5). Na totalidade dos estudos revistos observou-se que o resveratrol apresenta uma eficácia anti-inflamatória equivalente ou superior aos corticosteroides usados como comparação. É de referir que na quase totalidade dos estudos revistos em que se procedeu à comparação da eficácia destes dois fármacos, a inflamação foi estimulada apenas com antigénios ou citocinas inflamatórias sem adição de tabaco ou concentrados do mesmo, possivelmente para evitar o viés que o stress oxidativo que o tabaco iria provocar na eficiência dos corticosteróides ou porque era desconhecida a importância fisiopatológica na DPOC do stress oxidativo provocado pelo fumo. As únicas exceções

encontram-se nos artigos de Sadarini em 2015 e de Trotta em 2016, que utilizam extrato de fumo de tabaco para simular as condições pulmonares da DPOC em ratos e em linhas celulares humanas, respetivamente. Os resultados do primeiro artigo mostram que o resveratrol tem uma capacidade sensivelmente equivalente à do corticosteróide em reduzir os parâmetros inflamatórios avaliados. Já no segundo estudo o resveratrol usado de forma isolada tem capacidade em diminuir os marcadores de inflamação quase duas vezes superior à do corticosteróide. A própria autora do segundo estudo explica estes dados devido à resistência dos macrófagos de doentes com DPOC aos corticosteróides (28). Mesmo admitindo que o NF- $\kappa$ B seja um alvo para o resveratrol tão importante em humanos como se demonstrou *in vitro* nas suas linhas celulares, os dados obtidos parecem apontar para que os efeitos deste composto não se limitem a este promotor e que a sua interação a montante com o mesmo aconteça de uma forma diferente da dos corticosteróides.

Foram referidos nos artigos revistos duas potenciais moléculas alvo de ação do resveratrol independentes do promotor NF- $\kappa$ B. Estas moléculas são o miR-34 um microRNA envolvido na regulação genética da apoptose e o MyD88s um produto de *splicing* alternativo de um gene que produz uma proteína adaptadora dos TLR. O gene que codifica o miR-34 parece ser diretamente regulado pela proteína do ciclo celular p53 e esta envolvido na resposta de supressão tumoral e apoptose regulada por esta proteína (42). Os efeitos do resveratrol nesta molécula foram estudados em células dendríticas de doentes com DPOC onde foi detetado um aumento da sua concentração na presença de resveratrol e uma correlação inversa com a produção de interferão e das moléculas co-ativadoras de linfócitos T, CD80 e CD86. Desconhece-se qual o mecanismo onde o resveratrol intervém para aumentar o miR-34, no entanto, os seus efeitos diminuem a ativação da imunidade adquirida e ajudam a limitar a inflamação. O MyD88s é uma proteína que compete diretamente com a MyD88 na ligação aos TLR, o que limita a ativação do sinal pró-inflamatório desencadeado pela presença de antigénios bacterianos no meio pericelular, limitando assim a progressão da resposta inflamatória. Andrews e colaboradores desvendaram de forma compreensiva se não toda, pelo menos parte, da via de atuação do resveratrol no aumento de MyD88s em células epiteliais do pulmão. Os efeitos do resveratrol, neste caso, são indiretos, ao aumentar os níveis de cAMP vai desencadear uma cadeia de resposta que culmina com o aumento da MyD88 e diminuição da resposta inflamatória causada por *H.influenzae* (43). Estes dois mecanismos, que atuam em situações tão específicas, são exemplificadores do pleiotropismo da ação do resveratrol e demonstram as dificuldades na compreensão global dos mecanismos de ação do resveratrol.

Sabe-se atualmente que resveratrol atua como antioxidante de pelo menos duas formas distintas: neutralizando diretamente os ROS, ou seja, agindo como antioxidante *per se*, e promovendo a transcrição de genes antioxidantes endógenos (18). A sua ação de neutralização direta de ROS é demonstrada em diferentes artigos (18,28,30), verifica-se que é tanto maior

quanto maior a sua concentração local e parece resultar da interação dos radicais livres com os grupos hidroxilo do resveratrol (30). A capacidade de promover genes inflamatórios não se encontra ainda completamente compreendida, mas o papel do promotor Nrf2 como mediador da ação do resveratrol está já estabelecido. A presença de resveratrol facilita a libertação do Nrf2 da sua proteína de ligação citoplasmática, o que permite a sua migração para o núcleo e consequente promoção de genes antioxidantes endógenos. Esta capacidade do resveratrol de estimular a produção de antioxidantes endógenos é perdida quando se bloqueia a ação do Nrf2, o que comprava a importância deste promotor (18).

Uma das mais conhecidas ações do resveratrol a nível celular é no aumento da atividade da molécula SIRT1. Esta molécula NAD<sup>+</sup> dependente possui a capacidade de desacetilar histonas e outras proteínas, o que lhe confere capacidade de regulação epigenética e pós-transcricional. A aptidão do resveratrol em aumentar a atividade da SIRT1 está de tal forma estabelecida que o mesmo chegou a ser classificado e utilizado em estudos como “ativador da SIRT1” (32). No entanto, a forma como o resveratrol aumenta a atividade da SIRT1 ainda é pouco clara. Inicialmente pensava-se que seria por interação direta entre as duas moléculas, mas os dados apontam para que seja por um mecanismo indireto. Possivelmente o resveratrol ativa a SIRT1 aumentando os níveis de NAD<sup>+</sup> disponível através da sua ação ativadora sobre a AMPK (22), que aumenta o ratio NAD<sup>+</sup>/NAD fornecendo o substrato indispensável à ação da SIRT1 (48). Vários estudos revistos comprovam a capacidade do resveratrol aumentar a atividade da SIRT1 (10,19,22,23,26,35-37,45) sendo que este efeito parece ser responsável por parte da ampla gama de ação do resveratrol na redução da inflamação quer local, quer sistémica, pela modelação da sua capacidade antioxidante, na regulação genética ou capacidade antiapoptótica.

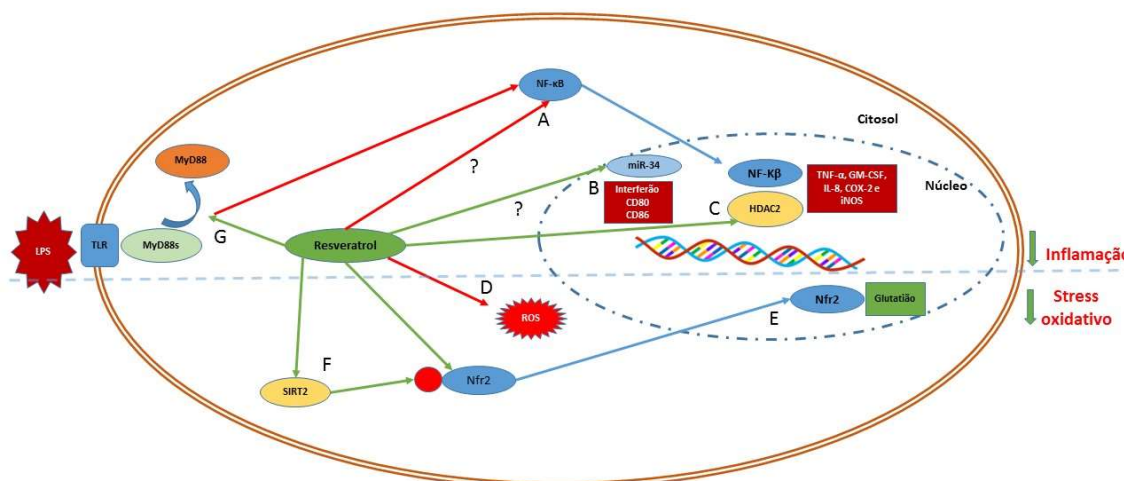


Figura 5 Vias moleculares do resveratrol. A- Inibição do promotor inflamatório NF-κB com consequente inibição de expressão marcadores inflamatórios. B- Aumento do miR-34 com consequente diminuição de expressão de moléculas pró-inflamatórias. C- Proteção da ação das HDAC com inibição inflamatória. D- Inativação direta dos ROS. E- Promoção da ação do Nrf2. F- Ativação da SIRT2 com proteção da ação do Nrf2. G- Aumento de MyD88s com deslocação da sinalizador pró-inflamatório. Linhas vermelhas- inibição; linhas verdes- promoção; linhas azuis- migração para núcleo

A possibilidade de combinar resveratrol com corticosteróides é muito tentadora devido à hipótese de estes dois fármacos poderem atuar de forma sinérgica. Como se pensa que a resistência aos corticosteróides nos doentes com DPOC é maioritariamente causada pelo stress oxidativo, a adição de um composto com propriedades antioxidantes, como o resveratrol, poderia, na teoria, desbloquear as vias de atuação dos corticosteróides permitindo-lhe exercer o seu potente efeito anti-inflamatório. Foram revistos dois estudos que utilizaram combinações de um corticosteróide com resveratrol e os resultados foram ligeiramente discrepantes (26,28). No estudo de Sadarani e colaboradores os fármacos foram administrados por via oral em ratos anteriormente à exposição com tabaco e LPS (26), no estudo de Trotta os fármacos foram testados em combinação na forma de aerossol em culturas de macrófagos isolados de doentes humanos com DPOC (28). Os resultados do primeiro estudo indicam que a combinação dos dois fármacos é sinérgica, com uma diminuição significativa dos marcadores de inflamação em relação aos fármacos isolados (26). Em relação ao segundo estudo, também se verifica uma diminuição dos marcadores inflamatórios, tanto com os fármacos combinados como com os fármacos isoladamente, sendo esta diminuição tanto maior quanto maior a concentração de resveratrol, não se verificou neste caso um efeito sinérgico (28). Estes resultados algo contraditórios poderão dever-se a várias razões, entre elas as diferenças de método, diferenças de resposta inter-espécie ou nos marcadores inflamatórios usados como referência. No entanto, alertam para a necessidade de continuar a explorar esta hipótese de forma cuidadosa de forma a esclarecer se existe, ou não, vantagens na utilização destes dois fármacos em conjunto.

Os protocolos de todos os estudos que envolveram a indução da DPOC em animais com aplicação de resveratrol, focaram-se na administração do composto imediatamente antes da exposição ao fumo do tabaco (22,26) ou LPS (16,26,41). Em todos os estudos referidos, sem exceção, foi verificada uma melhoria das lesões histológicas dos pulmões das cobaias. No entanto, a forma como foi desenhado o protocolo leva inevitavelmente a que os resultados sejam referentes a uma forte probabilidade de o resveratrol ter capacidades profiláticas na prevenção das lesões estruturais, não explorando uma possível capacidade de reversão das lesões já instituídas.

Os dados analisados de estudos retrospectivos (12,47) apontam para a provável ineficácia da obtenção de níveis terapêuticos de resveratrol através da dieta. O uso de concentrados poderá ser uma alternativa, no entanto, uma das grandes limitações frequentemente apontada para a aplicação oral do resveratrol é a da sua baixa biodisponibilidade, devida a um grande efeito de primeira passagem e rápido metabolismo hepático. Esta limitação parece ser minimizada se o composto for administrado de forma fracionada várias vezes ao dia (46). Outra forma de contornar esta questão é pelo desenvolvimento de derivados do resveratrol como o Vam3 (35) mais resistentes ao efeito de primeira passagem, ou pela aplicação local do composto

em forma de aerossol (28,30). Ambas as alternativas encontram-se em fase de desenvolvimento.

A concentração mínima eficaz local é um aspeto que necessita maior esclarecimento. Em estudos *in vitro* a atividade anti-inflamatória parece estar otimizada nos 100  $\mu\text{M}$  (25). A dose antioxidante é mais difícil de determinar devido à dualidade da ação do resveratrol, sendo que a sua capacidade neutralizadora é verificada de forma crescente até aos 2000  $\mu\text{M}$  (30) e possivelmente em níveis superiores, pois depende apenas da cinética das interações. Isto leva-nos a pensar que o efeito antioxidante será apenas limitado pela toxicidade celular ou efeitos secundários associados à aplicação de resveratrol. Embora o composto esteja atualmente definido como não tóxico, os limites de segurança ainda não estão completamente definidos. Testes de toxicidade celular e em cobaias mostram que o resveratrol é bem tolerado, mesmo a altas concentrações (28,37,42). Em humanos os dados que existem apenas dizem respeito a aplicações sistémicas e os efeitos secundários conhecidos são leves e pouco frequentes (46).

Conclui-se que o resveratrol é um composto com capacidades anti-inflamatórias e antioxidantes consideráveis, que atua de forma pleiotrópica por várias vias ainda não completamente compreendidas. As suas capacidades anti-inflamatórias estão demonstradas tanto *in vitro* como *in vivo* através da redução de vários marcadores inflamatórios. Quando comparado com corticosteróides, a capacidade de redução da inflamação é superior à dos corticosteróides, sem o inconveniente dos seus efeitos secundários. A sua toxicidade celular é baixa e os efeitos secundários conhecidos são ligeiros. As propriedades antioxidantes estão demonstradas através da medição da sua ação direta ao neutralizar espécies reativas, pela ligação destas à própria molécula do resveratrol, e de forma indireta pela capacidade de modulação da promoção da expressão de genes de antioxidantes. Estas capacidades antioxidantes apresentadas pelo resveratrol apresentam uma relação íntima e indissociável com a sua ação anti-inflamatória o que atribui a este composto uma vantagem em comparação com outros fármacos nas patologias que tenham uma forte componente oxidante, como é o caso da DPOC.

## 5.1. Perspetivas futuras

Existem ainda muitas questões que necessitam ser respondidas em relação ao uso de resveratrol na DPOC. Embora os resultados obtidos *in vitro* e nos ensaios em animais sejam altamente promissores existe ainda a necessidade de aprofundar os estudos sobre a eficácia e segurança deste composto. É necessário perceber se a dupla ação como anti-inflamatório e antioxidante é suficiente para quebrar o ciclo da patologia e alterar de fato a história natural da doença, o que é ainda impossível com os fármacos atualmente disponíveis. Outro aspeto que necessita ser explorado é a capacidade deste composto de reverter as lesões histológicas já

estabelecidas, o que não foi analisado pelo desenho dos estudos revistos. Estabelecer os limiares de toxicidade e estudar os efeitos secundários do composto em humanos são também aspetos importantes assim como o é dar continuidade aos trabalhos de Trotta e associados, com o composto aerossolizado que tão bons resultados têm demonstrado.

Por fim, e apesar de ainda existir um longo caminho a percorrer para se poder aplicar com segurança e de forma eficaz no tratamento da DPOC em humanos, o resveratrol possui as características necessárias para ser considerado com seriedade para uma possível alternativa terapêutica no tratamento desta patologia. Desta forma, deve-se continuar a investir na investigação do composto e suas propriedades biológicas de modo a que a sua aplicação farmacológica, a existir, seja feita no menor espaço de tempo possível.

## Bibliografia

1. GOLD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Pocket Guid to COPD Diagnosis, Manag Prev. 2015;5-10.
2. World Health Organization. The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012. [Internet] 2014 [consultado a 17 Oct 2016] Disponível em <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
3. World Health Organization. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach. Geneva, Switzerland. Chron Respir Dis. 2007;1-146.
4. Roisin RR. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Updated 2010 Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Glob Initiat Chronic Obstr Lung Dis Inc. 2016;1-94.
5. Hogg JC, Timens W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. Annu Rev Pathol. 2009;4:435-59.
6. Agusti AGN. COPD, a multicomponent disease: Implications for management. Respir Med. 2005;99(6):670-82.
7. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. J Allergy Clin Immunol. 2016;138(1):16-27.
8. Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. COPD. 2004;1(1):59-70.
9. Jiang Z, Zhu L. Update on molecular mechanisms of corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease. Pulm Pharmacol Ther. 2016;37:1-8.
10. Conte E, Fagone E, Fruciano M, Gili E, Iemmolo M, Vancheri C. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of resveratrol in the lung Histology and. 2015;523-9.

11. Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RHF, Ito K, et al. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(4):L774-83.
12. Kamholz S. Wine, Spirits and the Lung: Good, Bad or Indifferent? *Trans Am Clin Clim Assoc*. 2006;117:129-45.
13. Rahman I. Review: Antioxidant therapeutic advances in COPD. *Ther Adv Respir Dis*. 2008 Dec 1;2(6):351-74.
14. Al-Dissi AN, Weber LP. Resveratrol preserves cardiac function, but does not prevent endothelial dysfunction or pulmonary inflammation after environmental tobacco smoke exposure. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(7):1584-91.
15. Ito K, Colley T, Mercado N. Geroprotectors as a novel therapeutic strategy for COPD, an accelerating aging disease. Vol. 7, *International Journal of COPD*. 2012. p. 641-52.
16. Chen J, Yang X, Zhang W, Peng D, Xia Y, Lu Y, et al. Therapeutic Effects of Resveratrol in a Mouse Model of LPS and Cigarette Smoke-Induced COPD. *Inflammation*. 2016;
17. Martin JG, Tamaoka M. Rat models of asthma and chronic obstructive lung disease. *Pulm Pharmacol Ther*. 2006;19(6):377-85.
18. Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang S-R, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(3):L478-88.
19. Knobloch J, Wahl C, Feldmann M, Jungck D, Strauch J, Stoelben E, et al. Resveratrol attenuates the release of inflammatory cytokines from human bronchial smooth muscle cells exposed to lipoteichoic acid in chronic obstructive pulmonary disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014;114(2):202-9.
20. Vestbo J, Lange P. Prevention of COPD exacerbations: medications and other controversies. *ERJ Open Res*. 2015;1(1):00011-2015.

21. Direção-Geral de Saúde. Diagnóstico e Tratamento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica. Norma da Direção-Geral da Saúde. 2013;1(1):1-15.
22. Qi Y, Shang J, Ma L, Sun B, Hu X, Liu B, et al. Inhibition of AMPK expression in skeletal muscle by systemic inflammation in COPD rats. *Respir Res.* 2014;15:156.
23. Zhang L, Guo X, Xie W, Li Y, Ma M, Yuan T, et al. Resveratrol exerts an anti-apoptotic effect on human bronchial epithelial cells undergoing cigarette smoke exposure. *Mol Med Rep.* 2015;11(3):1752-8.
24. Chen Y Bin, Lan YW, Chen LG, Huang TT, Choo KB, Cheng WTK, et al. Mesenchymal stem cell-based HSP70 promoter-driven VEGFA induction by resveratrol alleviates elastase-induced emphysema in a mouse model. *Cell Stress Chaperones.* 2015;20(6):979-89.
25. Culpitt S V, Rogers DF, Fenwick PS, Shah P, Matos C De, Russell REK, et al. Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. 2003;942-6.
26. Sadarani BN, Majumdar AS. Resveratrol potentiates the effect of dexamethasone in rat model of acute lung inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2015;28(1):773-9.
27. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(3):636-45.
28. Trotta V, Lee WH, Loo CY, Young PM, Traini D, Scalia S. Co-spray dried resveratrol and budesonide inhalation formulation for reducing inflammation and oxidative stress in rat alveolar macrophages. *Eur J Pharm Sci.* 2016;86:20-8.
29. Liu H, Ren J, Chen H, Huang Y, Li H, Zhang Z, et al. Resveratrol Protects against Cigarette Smoke-Induced Oxidative Damage and Pulmonary Inflammation. *J Biochem Mol Toxicol.* 2014 Oct;28(10):465-71.
30. Trotta V, Lee WH, Loo CY, Haghi M, Young PM, Scalia S, et al. In vitro biological activity of resveratrol using a novel inhalable resveratrol spray-dried formulation. *Int J Pharm.* 2015;491(1-2):190-7.

31. Barnes PJ. COPD: Is there light at the end of the tunnel? *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(3):263-72.
32. Chun P. Role of sirtuins in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Pharm Res*. 2015;38(1):1-10.
33. Knobloch J, Hag H, Jungck D, Urban K, Koch A. Resveratrol Impairs the Release of Steroid-resistant Cytokines from Bacterial Endotoxin-Exposed Alveolar Macrophages in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011;109(2):138-43.
34. Liu X, Bao H, Zeng X, Wei J. Effects of resveratrol and genistein on nuclear factor- $\kappa$ B, tumor necrosis factor- $\alpha$  and matrix metalloproteinase-9 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Mol Med Rep*. 2016;1-7.
35. Shi J, Yin N, Xuan L, Yao C, Meng A, Hou Q. Vam3, a derivative of resveratrol, attenuates cigarette smoke-induced autophagy. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33(7):888-96.
36. Hwang J woong, Chung S, Sundar IK, Yao H, Arunachalam G, McBurney MW, et al. Cigarette smoke-induced autophagy is regulated by SIRT1-PARP-1-dependent mechanism: Implication in pathogenesis of COPD. *Arch Biochem Biophys*. 2010;500(2):203-9.
37. Paschalaki KE, Starke RD, Hu Y, Mercado N, Margariti A, Gorgoulis VG, et al. Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients due to increased dna damage and senescence. *Stem Cells*. 2013;31(12):2813-26.
38. Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman and Gilman Manual of Pharmacology and Therapeutics. 2005. 1984 p.
39. Walle T. Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1215(1):9-15.
40. Center MUM. Resveratrol In Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Patients (CARMENS-trial) (CARMENS). *ClinicalTrials.gov*. 2016 [cited 2016 Nov 10].

41. Birrell M a, McCluskie K, Wong S, Donnelly LE, Barnes PJ, Belvisi MG. Resveratrol, an extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory mediators through an NF-kB-independent mechanism. *FASEB J.* 2005;19(2):840-1.
42. Wang X, Zhang C, Huang G, Han D, Guo Y, Meng X, et al. Resveratrol inhibits dysfunction of dendritic cells from chronic obstructive pulmonary disease patients through promoting miR-34. 2015;8(5):5145-52.
43. Andrews CS, Matsuyama S, Lee B-C, Li J-D. Resveratrol suppresses NTHi-induced inflammation via up-regulation of the negative regulator MyD88 short. *Sci Rep.* 2016;6(April):34445.
44. Saluja B, Thakkar JN, Li H, Desai UR, Sakagami M. Novel low molecular weight lignins as potential anti-emphysema agents: In vitro triple inhibitory activity against elastase, oxidation and inflammation. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013;26(2):296-304.
45. Hu YX, Cui H, Fan L, Pan XJ, Wu JH, Shi SZ, et al. Resveratrol attenuates left ventricular remodeling in old rats with COPD induced by cigarette smoke exposure and LPS instillation. 2013;1054(July):1044-54.
46. Cottart CH, Nivet-Antoine V, Laguillier-Morizot C, Beaudeau JL. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54(1):7-16.
47. Siedlinski M, Boer JMA, Smit HA, Postma DS, Boezen HM. Dietary factors and lung function in the general population: Wine and resveratrol intake. *Eur Respir J.* 2012;39(2):385-91.
48. Thiel G, Rössler OG. Resveratrol regulates gene transcription via activation of stimulus-responsive transcription factors. *Pharmacol Res.* 2017;117:166-76.

## Anexos

### I- QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DOS SINTOMAS EM DOENTES COM DPOC

Questionário para avaliação do grau de dispneia, adaptado da versão modificada do *Medical Research Council Dyspnoea Questionnaire (mMRC)*

Assinale com uma cruz (X), o quadrado  correspondente à afirmação que melhor descreve a sua sensação de falta de ar.

#### GRAU 0

Sem problemas de falta de ar exceto em caso de exercício intenso.

*“Só sinto falta de ar em caso de exercício físico intenso”.*

#### GRAU 1

Falta de fôlego em caso de pressa ou ao percorrer um piso ligeiramente inclinado.

*“Fico com falta de ar ao apressar-me ou ao percorrer um piso ligeiramente inclinado”.*

#### GRAU 2

Andar mais devagar que as pessoas da minha idade devido a falta de fôlego, ou necessidade de parar para respirar quando anda no seu passo normal.

*“Eu ando mais devagar que as restantes pessoas devido à falta de ar, ou tenho de parar para respirar quando ando no meu passo normal”.*

#### GRAU 3

Paragens para respirar de 100 em 100 metros ou após andar alguns minutos seguidos.

*“Eu paro para respirar depois de andar 100 metros ou passados alguns minutos”.*

#### GRAU 4

Demasiado cansado/a ou sem fôlego para sair de casa, vestir ou despir.

*“Estou sem fôlego para sair de casa”.*

## II- Teste de avaliação da DPOC- CAT teste

O seu nome:

Data de hoje:



### Como está a sua DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica)? Faça o Teste de Avaliação da DPOC (COPD Assessment Test™ – CAT)

Este questionário irá ajudá-lo a si e ao seu profissional de saúde a medir o impacto que a DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica) está a ter no seu bem estar e no seu quotidiano. As suas respostas e a pontuação do teste podem ser utilizadas por si e pelo seu profissional de saúde para ajudar a melhorar a gestão da sua DPOC e a obter o máximo benefício do tratamento.

Para cada um dos pontos a seguir, assinale com um (X) o quadrado que melhor o descreve presentemente. Certifique-se que selecciona apenas uma resposta para cada pergunta.

Por exemplo: Estou muito feliz (0)  (1) (2) (3) (4) (5) Estou muito triste

PONTUAÇÃO

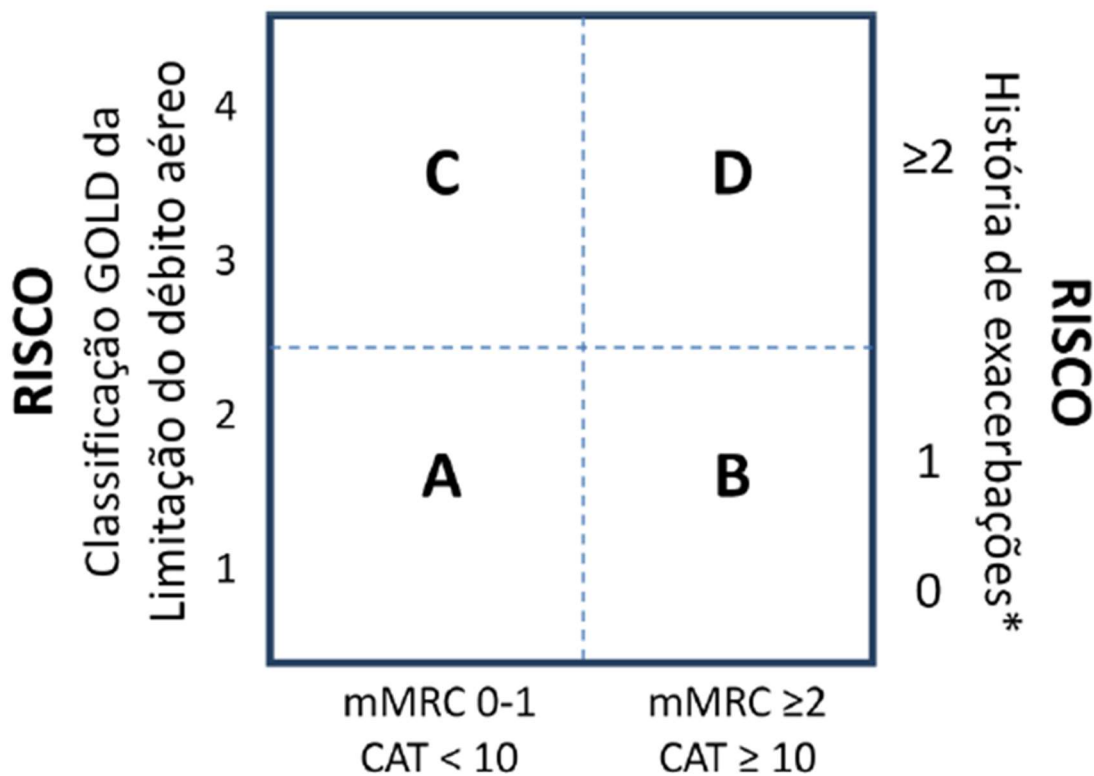
Nunca tenho tosse	(0) (1) (2) (3) (4) (5)	Estou sempre a tossir	
Não tenho nenhuma expectoração (catarro) no peito	(0) (1) (2) (3) (4) (5)	O meu peito está cheio de expectoração (catarro)	
Não sinto nenhum aperto no peito	(0) (1) (2) (3) (4) (5)	Sinto um grande aperto no peito	
Não sinto falta de ar ao subir uma ladeira ou um lance de escadas	(0) (1) (2) (3) (4) (5)	Quando subo uma ladeira ou um lance de escadas sinto bastante falta de ar	
Não sinto nenhuma limitação nas minhas actividades em casa	(0) (1) (2) (3) (4) (5)	Sinto-me muito limitado nas minhas actividades em casa	
Sinto-me confiante para sair de casa, apesar da minha doença pulmonar	(0) (1) (2) (3) (4) (5)	Não me sinto nada confiante para sair de casa, por causa da minha doença pulmonar	
Durmo profundamente	(0) (1) (2) (3) (4) (5)	Não durmo profundamente devido à minha doença pulmonar	
Tenho muita energia	(0) (1) (2) (3) (4) (5)	Não tenho nenhuma energia	
			<b>PONTUAÇÃO TOTAL</b>

O Teste de Avaliação da DPOC (COPD Assessment Test) e o logótipo CAT é uma marca comercial do grupo de empresas GlaxoSmithKline.  
© 2009 GlaxoSmithKline. Todos os direitos reservados.

### III- Classificação da gravidade de acordo com avaliação espirométrica

Pós broncodilatação	Pós broncodilatação
FEV1 / FVC < 0.7	GOLD 1 - Ligeiro FEV1 ≥ 80%
	GOLD 2 - Moderado FEV1 < 80% e ≥ 50%
	GOLD 3 - Grave FEV1 < 50% e ≥ 30%
	GOLD 4 - Muito Grave FEV1 < 30%

### IV- Avaliação combinada da DPOC com base em sintomas, classificação espirométrica e risco futuro de exacerbações



**Estratificação dos grupos de gravidade**

Doente	Característica	Classificação espirométrica	Exacerbações por ano	mMRC	CAT
A	Baixo Risco Poucos Sintomas	GOLD 1-2	≤1	0-1	<10
B	Baixo Risco Mais Sintomas	GOLD 1-2	≤1	≥2	≥10
C	Alto Risco Poucos Sintomas	GOLD 3-4	≥2	0-1	>10
D	Alto Risco Mais Sintomas	GOLD 3-4 >	≥2	≥2	≥10