



Revisión

Modelos animales de enfermedad pulmonar obstructiva crónica



Sandra Pérez-Rial, Álvaro Girón-Martínez y Germán Peces-Barba*

Laboratorio de Neumología, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz-CIBERES-UAM, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 20 de marzo de 2014

Aceptado el 25 de junio de 2014

On-line el 5 de septiembre de 2014

Palabras clave:

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

Modelo animal

Tabaco

Enfisema

Transgénico

Exacerbación

Autoinmune

Ensayos terapéuticos

RESUMEN

El desarrollo de modelos animales de una enfermedad ha sido siempre bien acogido por la comunidad científica porque permite realizar una aproximación a la investigación de determinados aspectos de la misma.

Los modelos animales de la EPOC no pueden llegar a reproducir la heterogeneidad de esta enfermedad y generalmente solo llegan a representar los estadios más leves de la misma. Además, la obstrucción al flujo aéreo, variable que determina el diagnóstico en un paciente, no siempre se tiene en cuenta en los modelos. Por este motivo, los modelos se han centrado en el desarrollo de enfisema, fácilmente detectable por morfometría pulmonar, sin prestar atención a otros componentes de la enfermedad, como la lesión de las vías aéreas o las alteraciones vasculares asociadas.

La exposición continua y prolongada al humo de tabaco se considera el principal factor de riesgo de esta enfermedad, lo que justifica que sea el modelo de exposición al humo de tabaco el más ampliamente utilizado. Sobre esta base de modelo podemos encontrar algunas variantes relacionadas con el tiempo de exposición, la asociación de otros inductores o inhibidores, las exacerbaciones o el uso de animales transgénicos que facilitan la identificación de las vías patogénicas. Es posible, por tanto, reproducir algunas variantes o heterogeneidades de esta enfermedad y diseñar uno u otro modelo que sea capaz de responder a una u otra pregunta de investigación, dirigida bien a una identificación patogénica y/o bien a una respuesta terapéutica.

© 2014 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Animal Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease

ABSTRACT

Animal models of disease have always been welcomed by the scientific community because they provide an approach to the investigation of certain aspects of the disease in question.

Animal models of COPD cannot reproduce the heterogeneity of the disease and usually only manage to represent the disease in its milder stages. Moreover, airflow obstruction, the variable that determines patient diagnosis, not always taken into account in the models. For this reason, models have focused on the development of emphysema, easily detectable by lung morphometry, and have disregarded other components of the disease, such as airway injury or associated vascular changes.

Continuous, long-term exposure to cigarette smoke is considered the main risk factor for this disease, justifying the fact that the cigarette smoke exposure model is the most widely used. Some variations on this basic model, related to exposure time, the association of other inducers or inhibitors, exacerbations or the use of transgenic animals to facilitate the identification of pathogenic pathways have been developed. Some variations or heterogeneity of this disease, then, can be reproduced and models can be designed for resolving researchers' questions on disease identification or treatment responses.

© 2014 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Keywords:

Chronic obstructive pulmonary disease

Animal model

Smoking

Emphysema

Transgenic animals

Exacerbation

Autoimmune

Therapeutic assays

Introducción

El elevado impacto de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) a nivel mundial obliga a disponer de todas las

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: gpeces@fjd.es (G. Peces-Barba).

herramientas posibles para abordar todos los aspectos de la enfermedad. Los problemas del infradiagnóstico, del paciente frágil exacerbador o las incógnitas existentes acerca del desarrollo de una u otra forma clínica de la enfermedad o de la historia natural de la misma, en la que se mezclan casos de muy poca progresión con casos de progresión acelerada, pueden ser abordables bajo el desarrollo de modelos animales. Del mismo modo, todo nuevo ensayo terapéutico generalmente comienza con una aproximación realizada previamente en un modelo animal.

El tabaquismo es la principal causa de esta enfermedad, pero su capacidad para generar una respuesta inflamatoria permanente depende de la susceptibilidad del paciente. Por eso, los modelos animales de la EPOC desarrollados por exposición al humo del tabaco son los principalmente elegidos para estudiar los mecanismos patogénicos de la enfermedad y de la susceptibilidad a su desarrollo y progresión. El uso de animales transgénicos que tienen limitada o potenciada alguna vía metabólica ayuda en estos casos a comprender las vías patogénicas existentes en uno u otro caso. Igualmente, dentro del estudio de esta enfermedad, las nuevas aproximaciones a la clasificación de la EPOC que proponen tanto la estrategia GOLD¹ como la GESEPOC² dan mayor importancia a la existencia de las exacerbaciones por la trascendencia que tienen sobre la intensidad de los síntomas, la progresión de la obstrucción y la mortalidad. Por este motivo, el estudio de las exacerbaciones en los modelos de la EPOC ha cobrado mayor interés y pueden contribuir a mejorar el conocimiento acerca de los mecanismos que subyacen en la condición del paciente exacerbador.

Los resultados encontrados con el uso de modelos animales de cualquier enfermedad deben siempre considerarse bajo la limitación de tener que extrapolar una conclusión sobre lo potencialmente existente en un paciente, pero son imprescindibles como soporte de la investigación clínica si se plantean como modelos preclínicos, término cada vez más utilizado, y que engloba el concepto de traslación a la clínica y que debe prevalecer en todo diseño experimental.

Modelos de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica por exposición al humo de tabaco

Los modelos de la EPOC por exposición al humo de tabaco son los que mejor reflejan los mecanismos inflamatorios y patogénicos de la enfermedad y, por tanto, los que potencialmente mejor se prestan a los ensayos de nuevas terapias. La exposición al humo de tabaco se ha aplicado en numerosas especies animales, como perros, cobayas, conejos, ratas y ratones. De ellas, las cobayas y los ratones han demostrado ser las especies más susceptibles para el desarrollo de la enfermedad por exposiciones prolongadas³. Existen 2 procedimientos generales de administración de humo de tabaco: el denominado «nose only», donde la

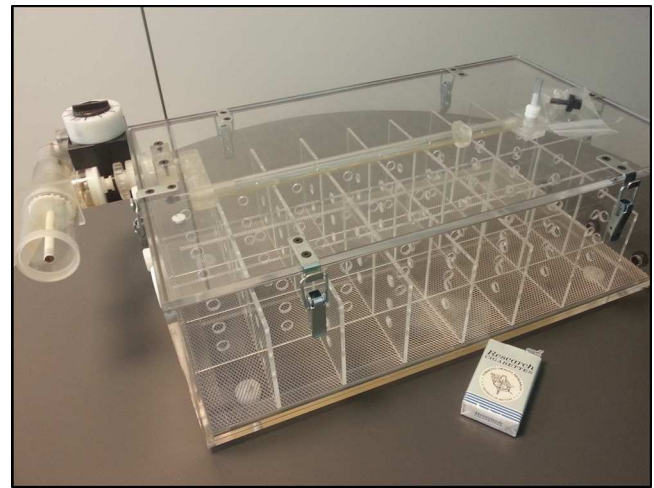


Figura 1. Sistema de exposición al humo de tabaco «whole body».

combustión del cigarrillo es conducida directamente a la nariz del animal, y el «whole body» (fig. 1), donde el animal es expuesto íntegramente en una cámara sometida a una concentración controlada de humo para asegurar unos niveles estables, no tóxicos, de carboxihemoglobina^{4,5}. Conceptualmente diferentes, ambos métodos se han utilizado indistintamente y se han mostrado similares en cuanto a los hallazgos referentes a la presencia de poblaciones celulares inflamatorias, niveles de citoquinas, cambios en el remodelado pulmonar y respuestas terapéuticas⁶.

Aproximadamente el 90% de los pacientes que sufren la EPOC es por haber fumado un promedio de al menos 10 paquetes/año y desarrollan una enfermedad que puede presentarse bajo diferentes formas clínicas con diferentes niveles de progresión y gravedad de las mismas⁷. El modelo animal de la EPOC, sea de cobaya o murino, suele establecerse durante un periodo de exposición de 6 meses⁸, aunque a partir del segundo mes ya se detectan importantes cambios inflamatorios y morfométricos (fig. 2)⁹. Nunca suelen alcanzar las fases equivalentes a la EPOC grave de un paciente, pero son capaces de desarrollar muchas de las características propias de esta enfermedad, como inflamación crónica con afluencia de neutrófilos y macrófagos, presencia de linfocitos T CD4 y CD8, hipersecreción de moco, cambios en la función pulmonar, enfisema y remodelado vascular y de las vías aéreas¹⁰.

El modelo murino de exposición al humo de tabaco es el más utilizado debido a su bajo coste y fácil manejo, al buen conocimiento de su genoma, a la disponibilidad de muchas variantes transgénicas, a la disponibilidad de una variada oferta de anticuerpos específicos para su uso en el laboratorio y a la disponibilidad de una

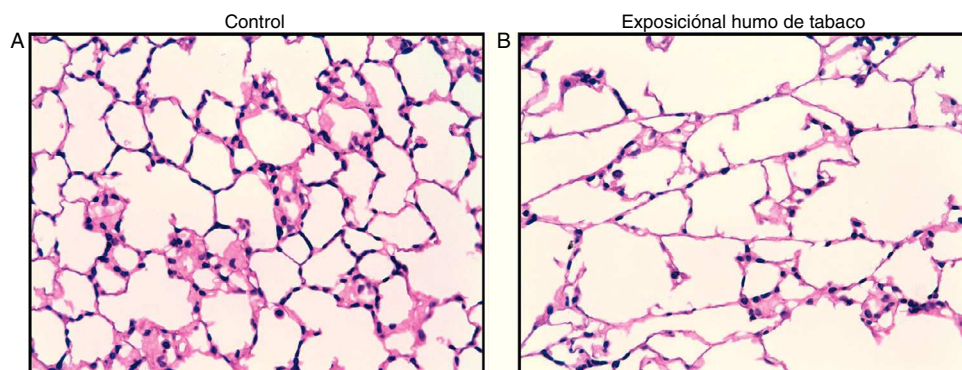


Figura 2. Imágenes representativas de cortes histológicos (H&E) del pulmón de ratones expuestos al aire ambiental (A) y de ratones expuestos durante 6 meses al humo del tabaco (B), mostrando enfisema.

Tabla 1
Ejemplos de modelos de la EPOC por exposición al humo de tabaco

Modelo animal	Metodología	Aportación	Referencia
Ratón Serpina B1 KO	Exposición crónica	No se asocia con enfisema severo	83
Ratón NZWLac/J, AJ, SJL, C57BL/6 y AKR	Exposición crónica	El grado de susceptibilidad a desarrollar daño pulmonar varía entre distintas cepas	12
Ratón NZWLac/J y AKR	Exposición crónica	Egr-1 (marcador pro-inflamatorio) altamente incrementado en la cepa susceptible AKR, mientras que en la cepa NZWLac/J el incremento fue mínimo	84
Ratón C57BL/6 (CD8 ^{-/-})	Exposición crónica	Los linfocitos T CD8 ⁺ son imprescindibles para el desarrollo de enfisema	85
Ratón C57BL/6	Exposición aguda	Aumento de marcadores de daño sobre el ADN por estrés oxidativo (8-ohdg y 4-HNE)	86
Ratón ICR (Nrf2 ^{-/-})	Exposición crónica	Más susceptibles a desarrollar enfisema, con incremento de la expresión de enzimas antioxidantes	78
Cobaya	Exposición crónica	Aumento del remodelado vascular y de la presión pulmonar arterial	87
Ratón C57BL/6 y «pallid»	Exposición crónica	Los niveles de α 1-antitripsina determinan el perfil enfisematoso	88
Cobaya	Exposición crónica	Papel de las MMP en el desarrollo de enfisema y remodelado de las vías aéreas	89
Ratón C57BL/6	Exposición aguda (directa e indirecta)	La intensidad de la respuesta inflamatoria depende de la composición del humo de tabaco	90
Ratón C57BL/6 (sGC α 1 ^{-/-})	Exposición aguda y crónica	Reducción de la expresión de sGC contribuyendo a la limitación al flujo aéreo	91
Ratón	Exposición subcrónica	Efecto antiinflamatorio de los ligandos de PPAR- γ	92
Ratón	Exposición crónica	La neutralización de CXCL13 bloquea parcialmente la respuesta inflamatoria y la destrucción de la pared alveolar	93
Ratón	Exposición crónica	El bloqueo de linfocitos T puede ser eficaz como terapia para la EPOC	94
Ratón C57BL/6 y BALB/cj	Exposición crónica	El humo de tabaco desencadena una respuesta dependiente de antígeno en la que participan linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺	95
Ratón C57BL/6 y 129S2/SvHsd	Exposición aguda	Implicación de los monocitos proinflamatorios en la susceptibilidad a desarrollar daño pulmonar	5

amplia gama de cepas que ofrecen diferentes susceptibilidades en su respuesta al humo de tabaco. La susceptibilidad para desarrollar la EPOC dependiente de cepa está bien identificada en el modelo murino^{11–14}, y si la exposición de ratones al humo de tabaco se realiza durante al menos 3 a 6 meses, se puede generar el patrón morfométrico pulmonar de la EPOC con presencia de células inflamatorias típicas, mediadores de inflamación y cambios funcionales propios de la enfermedad¹⁵.

Los cobayas también presentan algunas ventajas a la hora de generar modelos de la EPOC, ya que son animales muy susceptibles para desarrollar la enfermedad tras pocos meses de exposición¹⁶. En 1990, Wright y Churg¹⁷ publicaron uno de los primeros estudios con cobayas expuestas al humo de tabaco. En este caso, tras 12 meses de exposición las cobayas habían desarrollado enfisema y presentaban alteraciones de la función pulmonar de forma muy similar a lo que ocurre en fumadores con la EPOC. La principal limitación en el uso de esta especie proviene de la limitada disponibilidad de anticuerpos específicos. Las ratas, especie de roedores próxima a ratones y cobayas, son más resistentes para desarrollar alteraciones por exposición al humo de tabaco, por lo que su uso como modelo de la EPOC es menos frecuente¹⁸. La **tabla 1** resume algunos hallazgos relevantes descritos en este modelo.

Los modelos de la EPOC por exposición crónica al humo de tabaco siguen teniendo la limitación de que se muestran incapaces de reproducir algunas de las características de esta enfermedad compleja y heterogénea. Formas clínicas conocidas, como la del exacerbador, de progresión acelerada o con colonización bacteriana, por ejemplo, no han podido ser desarrolladas hasta la fecha, aunque existen algunas aproximaciones mediante la combinación de agentes que intentan dar respuesta a este planteamiento. La exposición a gases tóxicos e irritantes como el dióxido de nitrógeno, el ozono o el dióxido de azufre produce una lesión pulmonar más intensa que la del humo de tabaco^{19–22}.

Modelos de exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

La presencia de exacerbaciones es una característica de la EPOC que si se presenta de manera repetida condiciona una peor evolución de los pacientes por asociarse a una mayor progresión de la enfermedad, peor calidad de vida y mayor mortalidad. La

posibilidad de disponer de modelos animales de exacerbación abre la opción de estudiar mecanismos patogénicos asociados y detectar posibles marcadores biológicos asociados.

La mayoría de las exacerbaciones infecciosas de la EPOC son de origen viral (75%), seguidas de las de origen bacteriano (25%). Disponemos de datos de modelos *in vivo* acerca del efecto de la infección viral sobre ratones previamente expuestos al humo de tabaco, de forma tanto aguda como crónica. El pulmón responde con mayor intensidad de inflamación si la infección viral afecta a un animal previamente expuesto al humo de tabaco. Además, se acelera la progresión del enfisema y el nivel de afectación de las vías aéreas^{23,24}.

La bacteria más comúnmente aislada en las exacerbaciones de la EPOC es el *Haemophilus influenzae* no tipificable (HiNT). Por ello tiene especial interés el resultado obtenido en modelos de esta infección sobre ratones sanos²⁵ o previamente expuestos al humo de tabaco. Tras 8 semanas de exposición a tabaco en ratones de la cepa C57BL/6, la infección con HiNT produce una respuesta inflamatoria más intensa y un daño pulmonar mayor que en animales previamente sanos^{26,27}.

Los lipopolisacáridos bacterianos se han utilizado solos en administración crónica²⁸ o en combinación con periodos cortos de exposición al humo de tabaco²⁹ para desarrollar modelos de enfisema, pero administrados de manera aguda a dosis mayores pueden producir una respuesta inflamatoria que se acompaña de fiebre, hipersecreción mucosa y broncoconstricción, que reproduce síntomas de una exacerbación³⁰ detectables por tomografía computarizada³¹.

Modelos de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica grave por combinación de agentes de inducción

En los estadios más graves de la EPOC se produce una clara ruptura del «programa de mantenimiento» de la estructura del pulmón que puede llevar irremediadamente a la aparición de enfisema e hipertensión pulmonar. Existen varios modelos de patología de la EPOC frágil (muy grave), como la combinación de la exposición al humo de cigarrillo y el inhibidor de VEGF³². La exposición al humo de tabaco causa una disminución significativa de la expresión de VEGF y su receptor VEGFR2 en modelos animales de enfisema. Además, el tratamiento con el bloqueante del receptor de VEGF,

Tabla 2
Cepas de ratones mutantes naturales que desarrollan enfisema

Ratón	Mutación	Fenotipo pulmonar	Referencia
Blotchy (<i>Blo</i>)	Traducción anormal del gen de Menkes en el cromosoma X	Agrandamiento de los espacios aéreos	35,36
Tight skin (<i>Tsk+/-</i>)	Duplicación de fibrilina-1	Desorganización de las fibras elásticas	37,38
Beige (<i>Bg</i>)	Delección en <i>Lyst</i>	Desarrollo anormal del espacio aéreo, con desarrollo de enfisema panlobular	39
Pallid (<i>Pa</i>)	Sintaxina-3	Normal al nacer, pero con anormal alveolización neonatal	40,41
Osteopetrotic (<i>Op</i>)	Deficiencia del factor estimulante de la colonia de macrófagos	Desarrollan enfisema leve y tardío	42
		Reducido número de macrófagos alveolares y enfisema	

SU5416, induce la apoptosis de las células alveolares, la retracción de los vasos capilares y el ensanchamiento del espacio alveolar³³. Por ello, el enfisema aparece como un estado de deficiencia de VEGF que compromete la supervivencia de las células endoteliales y, por lo tanto, el programa de mantenimiento del pulmón. Otra aproximación puede obtenerse mediante la combinación de la exposición al humo de tabaco y la inducción de hipoxia. Este modelo puede conducir a la hipertensión pulmonar, condición presente solo en la EPOC grave evolucionada³⁴.

Modelos transgénicos de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

Antes de la llegada de la ingeniería genética dirigida ya existían algunas cepas mutantes de ratones C57BL/6 caracterizadas por desarrollar enfisema espontáneo (tabla 2). Se trata de los ratones «Blotchy», que tienen una traducción anormal del gen de Menkes en el cromosoma X³⁵, presentando deficiencias en las proteínas del tejido conectivo pulmonar, lo que afecta a la estructura y función del pulmón con el consiguiente desarrollo de enfisema³⁶; los «Tight Skin», que presentan una mutación en la fibrilina-1, uno de los principales componentes de las microfibrillas de la matriz extracelular del pulmón, lo que promueve el estrés oxidativo y la muerte celular, cascadas de lesiones fundamentales para el desarrollo de enfisema^{37,38}; los «Beige», cuyos pulmones parecen normales al nacer pero que por delección de *Lyst* no forman alvéolos con normalidad durante el desarrollo³⁹; los ratones «Pallid»⁴⁰, que presentan una mutación que afecta a la sintaxina-13 (una proteína de la membrana celular), que da lugar al desarrollo gradual y progresivo del enfisema⁴¹; y más recientemente los ratones «Osteopetrotic», que presentan una deficiencia del factor estimulante de la colonia de macrófagos (MCSF) y acaban desarrollando enfisema⁴².

Uno de los avances biotecnológicos más importantes de las últimas décadas ha sido el desarrollo de los animales transgénicos, a los que en las primeras fases del embrión se les introduce mediante inyección intranuclear un gen que no forma parte de su genoma y que secuenciará una determinada vía de interés^{13,15,43-45}. Una de las primeras aplicaciones de la tecnología transgénica a la EPOC fue la sobreexpresión constitutiva de la colagenasa-1 (MMP-1) humana

en ratones, que provoca enfisema⁴⁶ por destrucción del colágeno tipo III de la pared alveolar⁴⁷. La expresión constitutiva de transgenes tiene el inconveniente de no discernir el proceso del propio desarrollo pulmonar. Para solventarlo, se desarrolló la construcción de transgénicos de expresión inducible. Así, la sobreexpresión de IL-13⁴⁸, una citoquina producida por los linfocitos T-helper2 (Th2), o la sobreexpresión de IFN- γ ⁴⁹, producto destacado de los linfocitos T-helper1 (Th1), representan 2 ejemplos importantes de transgenes condicionales inducibles, que conducen a un enfisema en ratones adultos⁵⁰, dependiente de MMP-9 y MMP-12, en el caso de los transgénicos IL-13 («Dutch»). En estos ratones la IL-13 se sobreexpresa solo cuando los animales son expuestos a la tetraciclina, permitiendo así que los investigadores activen la sobreexpresión después del desarrollo completo del pulmón. La activación del TGF- β mediada por MMP-9 parece ser la responsable de la remodelación del colágeno en este modelo. Sin embargo, en los transgénicos IFN- γ («British») el componente inflamatorio parece ser más sutil, con apoptosis prominente pero sin ninguna patología de las vías respiratorias asociada. Estos son solo 2 ejemplos que demuestran la complejidad de las redes inflamatorias y cómo hallazgos inesperados en modelos animales han conducido a la búsqueda de nuevos mediadores potenciales en la enfermedad humana. Otros trabajos indican que la inducción del TNF- α en el pulmón adulto promueve la formación de tejido linfoide y enfisema, proporcionando un modelo en el que los efectos patógenos del TNF- α en el pulmón pueden ser investigados⁵¹, o cómo la sobreexpresión de protimosina- α (ProT- α) contribuye a la patogénesis del enfisema mediante el aumento de la acetilación de histonas y expresión de MMP-2,-9 dependiente de NF- κ B, sobre todo después de la exposición a tabaco⁵².

Un modelo alternativo al transgénico es el de «knock-out» (tabla 3), en el cual hay una inhibición en la expresión de un gen determinado, lo que permite conocer la función de las proteínas dependientes de este gen. Unas veces la inhibición génica protege contra el desarrollo de enfisema, como es el caso de la inhibición de la expresión de MMP-12, que protege del desarrollo de enfisema al tener deteriorado el sistema de reclutamiento de macrófagos al pulmón⁵³. Otro ejemplo sería el de la ausencia de la elastasa neutrofílica (NE), que parece proteger también del desarrollo de enfisema

Tabla 3
Ejemplos de modelos knock-out de ratones enfisematosos

Gen	Fenotipo pulmonar	Referencia
Elastasa macrófaga (MMP-12)	Protección completa frente al desarrollo de enfisema tras exposición al humo del tabaco	53
Elastasa neutrofílica (NE)	Protección frente al desarrollo de enfisema inducido por el consumo de tabaco	54
Elastina	Pocos y dilatados sacos aéreos distales y desarrollo de las vías aéreas detenido	57
Factor de crecimiento derivado de plaquetas-A (PDGF-A)	Ausencia de tropoelastina y fallo en la tabicación alveolar	55
Receptor factor crecimiento fibroblastos (FGFR-3 y -4)	Formación alveolar y tabicación anormales	56
Integrina alfa(v)beta6 (integrina α v β 6)	Desarrollo espontáneo de enfisema dependiente de MMP-12	58
Proteína D del surfactante pulmonar (SP-D)	Activación de macrófagos, producción de MMP y consecuente enfisema	59
Inhibidor de metaloproteasas (TIMP-3)	Agrandamiento de los espacios aéreos con el desarrollo progresivo de enfisema	60

inducido por el consumo de tabaco⁵⁴. En ambos casos se demuestra el papel directo de estas proteínas en el enfisema y se pone de relieve la interdependencia de las proteinasas y las células inflamatorias que median la destrucción pulmonar en respuesta al humo del cigarrillo. Otras veces la delección interfiere con la alveogénesis. Así, ratones que no expresan el factor de crecimiento derivado de plaquetas-A (PDGF-A) pierden miofibroblastos, y por lo tanto disminuyen los depósitos de elastina produciendo enfisema⁵⁵. Los dobles *knock-out* para los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos-3 y -4 (FGFR-3 y -4) muestran una formación alveolar y tabicación anormal⁵⁶. Y los ratones deficientes de elastina presentan pocos y dilatados sacos aéreos distales y el desarrollo de las vías aéreas detenido⁵⁷. Y en otras ocasiones la delección de determinados genes produce agrandamiento de los espacios alveolares, como aquellos ratones que no expresan la integrina alfa(v)beta6 (integrina $\alpha V\beta 6$), que no son capaces de activar el TGF- β en los espacios aéreos y desarrollan enfisema dependiente de MMP-12⁵⁸. O los ratones *knock-out* para la proteína D del surfactante pulmonar (SP-D), que presentan activación de macrófagos, producción de MMPs y agrandamiento de los espacios aéreos⁵⁹. O la deficiencia del inhibidor de metaloproteasas (TIMP-3), que parece combinar el agrandamiento de los espacios aéreos con el desarrollo progresivo de enfisema⁶⁰.

Para salvar la barrera trans-especie del modelo murino la tecnología también permite la eliminación selectiva de determinados genes murinos, seguido de la inserción («*knocking in*») de genes humanos bajo el control de promotores murinos. Existen los llamados ratones propensos al desarrollo de enfisema, a los que se les han eliminado los genes murinos de A1AT y han sido reemplazados por genes, ya sean normales o deficientes de A1AT humana⁶¹.

Modelos autoinmunes de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

La inflamación pulmonar existente en la EPOC grave incluye un gran número de linfocitos T Th1 activados, linfocitos B y linfocitos T CD8, que persisten durante años, incluso después de cesar el hábito de fumar, lo que sugiere un proceso de autopropagación que es una de las características de las enfermedades autoinmunes. Esta cadena de eventos sugiere que la respuesta inmune adaptativa en la EPOC, junto con su persistencia después de dejar de fumar, podría ser debida a una respuesta a autoantígenos. Tras un período inicial en el que esta posibilidad solo se planteaba como hipótesis^{62–64}, se han dado a conocer datos que podrían avanzar hacia la confirmación de esta hipótesis⁶⁵. Entre estos datos se encuentran el desarrollo de un primer modelo animal de enfisema autoinmunitario^{66–68}. Se ha correlacionado la presencia de autoanticuerpos antielastina⁶⁹ y de otros autoantígenos^{70,71} con el grado de enfisema y se ha descrito que la inducción de autoanticuerpos contra las proteínas de la matriz pulmonar aumentan la respuesta inflamatoria inducida por el humo de tabaco en ratones previamente inmunizados con una mezcla de proteínas de la matriz extracelular pulmonar⁷².

Modelos de ensayos terapéuticos en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

Los tratamientos actuales tienen una eficacia limitada en la inhibición de la inflamación crónica, no revierten la patología de la EPOC y no modifican los factores que inician y conducen a la progresión de la enfermedad a largo plazo. Por lo tanto, existe una clara necesidad de nuevas terapias que puedan prevenir la inducción y la progresión de la EPOC, y los diseños de modelos animales que reflejen con exactitud la fisiopatología de la enfermedad siguen siendo esenciales para el desarrollo de nuevas terapias. Muchos de los fármacos en desarrollo clínico de la EPOC han sido identificados a partir de

los trabajos realizados en modelos animales. Varios inhibidores de mediadores de inflamación están en desarrollo para el tratamiento de la EPOC. Pero hasta la fecha los inhibidores de LTB₄, TNF- α , IL-1, IL-8 y EGF no han dado los resultados esperados⁷³. Animales expuestos al humo de tabaco tratados con inhibidores sintéticos de la elastasa neutrofílica han puesto de manifiesto su potencial actividad antiinflamatoria⁷⁴. Del mismo modo, la potencial utilidad terapéutica de los inhibidores de quinasas (p38 MAPK y PI3K) en la EPOC ha sido apoyada por los datos generados en modelos animales de inflamación pulmonar inducida por la exposición al humo de tabaco⁷⁵. La enzima antioxidante Gpx-1 protege contra la inflamación pulmonar y el enfisema inducidos por el humo del cigarrillo en ratones⁷⁶, y el Gpx mimético también reduce la inflamación pulmonar cuando se administra tanto profiláctica como terapéuticamente^{76,77}. En otros estudios la delección del gen de respuesta antioxidante Nrf2 conduce a aumentos en la inflamación pulmonar y enfisema en los ratones expuestos al humo del cigarrillo⁷⁸, y un activador de Nrf2 se encuentra actualmente en ensayos clínicos de la EPOC⁷³.

El descubrimiento de nuevos fármacos que puedan reducir la tasa de destrucción pulmonar y la limitación al flujo aéreo, e incluso detener o revertir los procesos subyacentes, sigue siendo una deuda pendiente del tratamiento de esta enfermedad. En este sentido, existen algunos datos acerca de que el ácido retinoico aminora notablemente el enfisema inducido en ratas por la administración de elastasa⁷⁹, lo que ha suscitado un interés considerable en los retinoides⁸⁰ y otros factores de crecimiento como potenciales agentes terapéuticos⁸¹, aunque por ahora no existe confirmación acerca de su potencial aplicabilidad. Datos publicados por nuestro grupo muestran que el factor de crecimiento de hígado (LGF) presenta una actividad antifibrótica pulmonar y es capaz de mejorar la función pulmonar y de revertir, al menos parcialmente, el incremento de las proteínas de matriz producido tras la instilación con CdCl₂ en un modelo de fibrosis en ratas⁸².

En conclusión, el soporte de información que puede obtenerse a partir de los modelos animales de la EPOC sigue estando vigente y proporciona una buena herramienta para progresar en el conocimiento de los aspectos patogénicos de la enfermedad y de potenciales ensayos terapéuticos. La heterogeneidad que existe en la propia enfermedad también puede reflejarse en los modelos animales, que se desarrollan gracias al uso de diferentes combinaciones de agentes de inducción o de intensidades de los mismos. Por eso es importante elegir el modelo en función de la pregunta de investigación que cada caso requiera, sea de patogenia, de diagnóstico, de tratamiento o combinada.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Lopez-Giraldo A, Rodriguez-Roisin R, Agustí A. Chronic obstructive pulmonary disease: The golden decade. Implications for the diagnosis, prevention and treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Med Clin (Barc)*. 2014; pii: S0025-7753(14)00226-7. doi: 10.1016/j.medcli.2014.03.009.[Epub ahead of print].
- Miravittles M, Soler-Cataluna JJ, Calle M, Molina J, Almagro P, Quintano JA, et al. Spanish guideline for COPD (GesEPOC). *Arch Bronconeumol*. Update 2014;50 Suppl 1:1–16.
- Peces-Barba G, Heili S. Modelos animales de EPOC. *Arch Bronconeumol*. 2007;43:30–7.
- Perez-Rial S, Del Puerto-Nevedo L, Gonzalez-Mangado N, Peces-Barba G. Early detection of susceptibility to acute lung inflammation by molecular imaging in mice exposed to cigarette smoke. *Mol Imaging*. 2011;10:398–405.
- Perez-Rial S, del Puerto-Nevedo L, Terron-Exposito R, Giron-Martinez A, Gonzalez-Mangado N, Peces-Barba G. Role of recently migrated monocytes in cigarette smoke-induced lung inflammation in different strain of mice. *PLoS one*. 2013;8:e72975.

6. Leberl M, Kratzer A, Taraseviciene-Stewart L. Tobacco smoke induced COPD/emphysema in the animal model-are we all on the same page? *Front Physiol.* 2013;4:91.
7. Miravittles M, Soler-Cataluna JJ, Calle M, Molina J, Almagro P, Antonio Quintano J, et al. Spanish Guideline for COPD (GesEPOC). *Arch Bronconeumol* 50 Suppl. Update 2014;1:1-16.
8. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;295:L1-15.
9. van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, et al. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:751-8.
10. Vlahos R, Bozinovski S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD. *Clin Sci (Lond).* 126:253-65.
11. March TH, Barr EB, Finch GL, Hahn FF, Hobbs CH, Menache MG, et al. Cigarette smoke exposure produces more evidence of emphysema in B6C3F1 mice than in F344 rats. *Toxicol Sci.* 1999;51:289-99.
12. Guerassimov A, Hoshino Y, Takubo Y, Turcotte A, Yamamoto M, Ghezzi H, et al. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:974-80.
13. Brusselle GG, Bracke KR, Maes T, D'Hulst AI, Moerlooze KB, Joos GF, et al. Murine models of COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* 2006;19:155-65.
14. Bartalesi B, Cavarra E, Fineschi S, Lucattelli M, Lunghi B, Martorana PA, et al. Different lung responses to cigarette smoke in two strains of mice sensitive to oxidants. *Eur Respir J.* 2005;25:15-22.
15. Shapiro SD. Animal models for chronic obstructive pulmonary disease: age of klotho and marlboro mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;22:4-7.
16. Wright JL, Churg A. A model of tobacco smoke-induced airflow obstruction in the guinea pig. *Chest.* 2002;121:1885-915.
17. Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142:1422-8.
18. Stevenson CS, Docx C, Webster R, Battram C, Hynx D, Giddings J, et al. Comprehensive gene expression profiling of rat lung reveals distinct acute and chronic responses to cigarette smoke inhalation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;293:L1183-93.
19. Farone A, Huang S, Paulauskis J, Kobzik L. Airway neutrophilia and chemokine mRNA expression in sulfur dioxide-induced bronchitis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12:345-50.
20. Shore S, Kobzik L, Long NC, Skornik W, Van Staden CJ, Boulet L, et al. Increased airway responsiveness to inhaled methacholine in a rat model of chronic bronchitis. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 1995;151:1931-8.
21. Chitano P, Hosselet JJ, Mapp CE, Fabbri LM. Effect of oxidant air pollutants on the respiratory system: insights from experimental animal research. *Eur Respir J.* 1995;8:1357-71.
22. Wegmann M, Renz H, Herz U. Long-term NO2 exposure induces pulmonary inflammation and progressive development of airflow obstruction in C57BL/6 mice: a mouse model for chronic obstructive pulmonary disease? *Pathobiology.* 2002;70:284-6.
23. Gualano RC, Hansen MJ, Vlahos R, Jones JE, Park-Jones RA, Deliyannis G, et al. Cigarette smoke worsens lung inflammation and impairs resolution of influenza infection in mice. *Respir Res.* 2008;9:53.
24. Kang MJ, Lee CG, Lee JY, Dela Cruz CS, Chen ZJ, Enelow R, et al. Cigarette smoke selectively enhances viral PAMP- and virus-induced pulmonary innate immune and remodeling responses in mice. *J Clin Invest.* 2008;118:2771-84.
25. Morey P, Viadas C, Euba B, Hood DW, Barberan M, Gil C, et al. Relative contributions of lipooligosaccharide inner and outer core modifications to nontypeable *Haemophilus influenzae* pathogenesis. *Infect Immun.* 2014;81:4100-11.
26. Gaschler GJ, Skrtic M, Zavitz CC, Lindahl M, Onnervik PO, Murphy TF, et al. Bacteria challenge in smoke-exposed mice exacerbates inflammation and skews the inflammatory profile. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:666-75.
27. Gaschler GJ, Zavitz CC, Bauer CM, Stampfli MR. Mechanisms of clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* from cigarette smoke-exposed mouse lungs. *Eur Respir J.* 36:1131-42.
28. Stolk J, Rudolphus A, Davies P, Osinga D, Dijkman JH, Agarwal L, et al. Induction of emphysema and bronchial mucus cell hyperplasia by intratracheal instillation of lipopolysaccharide in the hamster. *J Pathol.* 1992;167:349-56.
29. Nie YC, Wu H, Li PB, Luo YL, Zhang CC, Shen JG, et al. Characteristic comparison of three rat models induced by cigarette smoke or combined with LPS: to establish a suitable model for study of airway mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther.* 2012;25:349-56.
30. Spond J, Billah MM, Chapman RW, Egan RW, Hey JA, House A, et al. The role of neutrophils in LPS-induced changes in pulmonary function in conscious rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 2004;17:133-40.
31. Kobayashi S, Fujinawa R, Ota F, Angata T, Ueno M, Maeno T, et al. A single dose of lipopolysaccharide into mice with emphysema mimics human chronic obstructive pulmonary disease exacerbation as assessed by micro-computed tomography. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;49:971-7.
32. Edirisinghe I, Yang SR, Yao H, Rajendrasozhan S, Caito S, Adenuga D, et al. VEGFR-2 inhibition augments cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammatory responses leading to endothelial dysfunction. *FASEB J.* 2008;22:2297-310.
33. Kasahara Y, Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest.* 2000;106:1311-9.
34. Olea E, Ferrer E, Prieto-Lloret J, Gonzalez-Martin C, Vega-Agapito V, Gonzalez-Obeso E, et al. Effects of cigarette smoke and chronic hypoxia on airways remodeling and resistance. *Clinical significance Respir Physiol Neurobiol.* 2014;179:305-13.
35. Mercer JF, Grimes A, Ambrosini L, Lockhart P, Paynter JA, Dierick H, et al. Mutations in the murine homologue of the Menkes gene in dappled and blotchy mice. *Nat Genet.* 1994;6:374-8.
36. Fisk DE, Kuhn C. Emphysema-like changes in the lungs of the blotchy mouse. *Am Rev Respir Dis.* 1976;113:787-97.
37. Kieley CM, Raghunath M, Siracusa LD, Sherratt MJ, Peters R, Shuttleworth CA, et al. The Tight skin mouse: demonstration of mutant fibrillin-1 production and assembly into abnormal microfibrils. *J Cell Biol.* 1998;140:1159-66.
38. Podowski M, Calvi CL, Cheadle C, Tudor RM, Biswals S, Neptune ER. Complex integration of matrix, oxidative stress, and apoptosis in genetic emphysema. *Am J Pathol.* 2009;175:84-96.
39. Starcher B, Williams I. The beige mouse: role of neutrophil elastase in the development of pulmonary emphysema. *Exp Lung Res.* 1989;15:785-800.
40. Martorana PA, Brand T, Gardi C, van Even P, de Santi MM, Calzoni P, et al. The pallid mouse. A model of genetic alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lab Invest.* 1993;68:233-41.
41. Huang L, Kuo YM, Gitschier J. The pallid gene encodes a novel, syntaxin 13-interacting protein involved in platelet storage pool deficiency. *Nat Genet.* 1999;23:329-32.
42. Shibata Y, Zsengeller Z, Otake K, Palaniyar N, Trapnell BC. Alveolar macrophage deficiency in osteopetrotic mice deficient in macrophage colony-stimulating factor is spontaneously corrected with age and associated with matrix metalloproteinase expression and emphysema. *Blood.* 2001;98:2845-52.
43. Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease * 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax.* 2002;57:908-14.
44. Tudor RM, McGrath S, Neptune E. The pathobiological mechanisms of emphysema models: what do they have in common? *Pulm Pharmacol Ther.* 2003;16:67-78.
45. Vlahos R, Bozinovski S, Gualano RC, Ernst M, Anderson GP. Modelling COPD in mice. *Pulm Pharmacol Ther.* 2006;19:12-7.
46. D'Armiento J, Dalal SS, Okada Y, Berg RA, Chada K. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell.* 1992;71:955-61.
47. Shiomi T, Okada Y, Foronjy R, Schiltz J, Jaenish R, Krane S, et al. Emphysematous changes are caused by degradation of type III collagen in transgenic mice expressing MMP-1. *Exp Lung Res.* 2003;29:1-15.
48. Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese Jr RJ, et al. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest.* 2000;106:1081-93.
49. Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman Jr HA, et al. Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med.* 2000;192:1587-600.
50. Elias JA, Kang MJ, Crothers K, Homer R, Lee CG. State of the art. Mechanistic heterogeneity in chronic obstructive pulmonary disease: insights from transgenic mice. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3:494-8.
51. Vuilleminot BR, Rodriguez JF, Hoyle GV. Lymphoid tissue and emphysema in the lungs of transgenic mice inducibly expressing tumor necrosis factor-alpha. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;30:438-48.
52. Su BH, Tseng YL, Shieh GS, Chen YC, Shiang YC, Wu P, et al. Prothymosin alpha overexpression contributes to the development of pulmonary emphysema. *Nat Commun.* 2013;4:1906.
53. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science.* 1997;277:2002-4.
54. Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, Belaouaj A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol.* 2003;163:2329-35.
55. Bostrom H, Willetts K, Pekny M, Leveen P, Lindahl P, Hedstrand H, et al. PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell.* 1996;85:863-73.
56. Weinstein M, Xu X, Ohyama K, Deng CX. FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development.* 1998;125:3615-23.
57. Wendel DP, Taylor DG, Albertine KH, Keating MT, Li DY. Impaired distal airway development in mice lacking elastin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23:320-6.
58. Morris DG, Huang X, Kaminski N, Wang Y, Shapiro SD, Dolganov G, et al. Loss of integrin alpha(v)beta6-mediated TGF-beta activation causes Mmp12-dependent emphysema. *Nature.* 2003;422:169-73.
59. Wert SE, Yoshida M, LeVine AM, Ikegami M, Jones T, Ross GF, et al. Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:5972-7.
60. Leco KJ, Waterhouse P, Sanchez OH, Gowing KL, Poole AR, Wakeham A, et al. Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest.* 2001;108:817-29.
61. Curiel D, Brantly M, Curiel E, Stier L, Crystal RG. Alpha 1-antitrypsin deficiency caused by the alpha 1-antitrypsin Nullmattawa gene. An insertion mutation rendering the alpha 1-antitrypsin gene incapable of producing alpha 1-antitrypsin. *J Clin Invest.* 1989;83:1144-52.
62. Agusti A, MacNee W, Donaldson K, Cosio M. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax.* 2003;58:832-4.
63. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2009;360:2445-54.
64. Cosio BG, Agusti A. Autoimmunity in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Arch Bronconeumol.* 2005;41 Suppl 5:10-4.

65. Kheradmand F, Shan M, Xu C, Corry DB. Autoimmunity in chronic obstructive pulmonary disease: clinical and experimental evidence. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;8:285–92.
66. Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, Moore M, Sullivan A, Nicolls MR, et al. An animal model of autoimmune emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:734–42.
67. Taraseviciene-Stewart L, Burns N, Kraskauskas D, Nicolls MR, Tuder RM, Voelkel NF. Mechanisms of autoimmune emphysema. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:486–7.
68. Taraseviciene-Stewart L, Douglas IS, Nana-Sinkam PS, Lee JD, Tuder RM, Nicolls MR, et al. Is alveolar destruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease an immune disease? *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:687–90.
69. Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med*. 2007;13:567–9.
70. Kuo YB, Chang CA, Wu YK, Hsieh MJ, Tsai CH, Chen KT, et al. Identification and clinical association of anti-cytokeratin 18 autoantibody in COPD. *Immunol Lett*. 2012;138:131–6.
71. Feghali-Bostwick CA, Gadgil AS, Otterbein LE, Pilewski JM, Stoner MW, Czirnadia E, et al. Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:156–63.
72. Brandsma CA, Timens W, Geerlings M, Jekel H, Postma DS, Hylkema MN, et al. Induction of autoantibodies against lung matrix proteins and smoke-induced inflammation in mice. *BMC Pulm Med*. 2014;10:64.
73. Barnes PJ. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12:543–59.
74. Stevens T, Ekholm K, Granse M, Lindahl M, Kozma V, Jungar C, et al. AZD9668: pharmacological characterization of a novel oral inhibitor of neutrophil elastase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;339:313–20.
75. Medicherla S, Fitzgerald MF, Spicer D, Woodman P, Ma JY, Kapoun AM, et al. p38alpha-selective mitogen-activated protein kinase inhibitor SD-282 reduces inflammation in a subchronic model of tobacco smoke-induced airway inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;324:921–9.
76. Duong C, Seow HJ, Bozinovski S, Crack PJ, Anderson GP, Vlahos R. Glutathione peroxidase-1 protects against cigarette smoke-induced lung inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;299:L425–33.
77. Vlahos R, Bozinovski S. Glutathione peroxidase-1 as a novel therapeutic target for COPD. *Redox Rep*. 2014;18:142–9.
78. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest*. 2004;114:1248–59.
79. Massaro GD, Massaro D. Retinoic acid treatment partially rescues failed septation in rats and in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;278:L955–60.
80. McGowan SE. Contributions of retinoids to the generation and repair of the pulmonary alveolus. *Chest*. 2002;121:206S–8S.
81. Muyal JP, Muyal V, Kotnala S, Kumar D, Bhardwaj H. Therapeutic potential of growth factors in pulmonary emphysematous condition. *Lung*. 2013;191:147–63.
82. Martinez-Galan L, del Puerto-Nevado L, Perez-Rial S, Diaz-Gil JJ, Gonzalez-Mangado N, Peces-Barba G. [Liver growth factor improves pulmonary fibrosis secondary to cadmium administration in rats]. *Arch Bronconeumol*. 2010;46:20–6.
83. Cremona TP, Tschanz SA, von Garnier C, Benarafa C. SerpinB1 deficiency is not associated with increased susceptibility to pulmonary emphysema in mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2013;305:L981–9.
84. Reynolds PR, Cosio MG, Hoidal JR. Cigarette smoke-induced Egr-1 upregulates proinflammatory cytokines in pulmonary epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006;35:314–9.
85. Maeno T, Houghton AM, Quintero PA, Grumelli S, Owen CA, Shapiro SD. CD8+ T Cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Journal of immunology*. 2007;178:8090–6.
86. Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2003;28:555–62.
87. Wright JL, Tai H, Churg A. Vasoactive mediators and pulmonary hypertension after cigarette smoke exposure in the guinea pig. *Journal of applied physiology*. 2006;100:672–8.
88. Takubo Y, Guerassimov A, Ghezzi H, Triantafillopoulos A, Bates JH, Hoidal JR, et al. Alpha1-antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice: parallels with human disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166:1596–603.
89. Churg A, Wang R, Wang X, Onnervik PO, Thim K, Wright JL. Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs. *Thorax*. 2007;62:706–13.
90. John G, Kohse K, Orasche J, Reda A, Schnelle-Kreis J, Zimmermann R, et al. The composition of cigarette smoke determines inflammatory cell recruitment to the lung in COPD mouse models. *Clinical science*. 2014;126:207–21.
91. Glynos C, Dupont LL, Vassilakopoulos T, Papapetropoulos A, Brouckaert P, Giannis A, et al. The role of soluble guanylyl cyclase in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;188:789–99.
92. Lea S, Plumb J, Metcalfe H, Spicer D, Woodman P, Fox JC, et al. The effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands on in vitro and in vivo models of COPD. *The European respiratory journal*. 2014;43:409–20.
93. Bracke KR, Verhamme FM, Seys LJ, Bantsimba-Malanda C, Cunoosamy DM, Herbst R, et al. Role of CXCL13 in cigarette smoke-induced lymphoid follicle formation and chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;188:343–55.
94. Podolin PL, Foley JP, Carpenter DC, Bolognese BJ, Logan GA, Long 3rd E, et al. T cell depletion protects against alveolar destruction due to chronic cigarette smoke exposure in mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2013;304:L312–23.
95. Eppert BL, Wortham BW, Flury JL, Borchers MT. Functional characterization of T cell populations in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of immunology*. 2013;190:1331–40.