



# Modelo murino de enfisema induzido por instilação de elastase e exposição a fumaça de cigarro

Rubia Rodrigues<sup>1</sup>, Clarice Rosa Olivo<sup>1</sup>, Juliana Dias Lourenço<sup>1</sup>, Alyne Riane<sup>1</sup>, Daniela Aparecida de Brito Cervilha<sup>1</sup>, Juliana Tiyaki Ito<sup>1</sup>, Milton de Arruda Martins<sup>1</sup>, Fernanda Degobbi Tenório Quirino dos Santos Lopes<sup>1</sup>

1. Departamento de Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

**Recebido:** 30 junho 2016.

**Aprovado:** 31 outubro 2016.

Trabalho realizado no Departamento de Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

## RESUMO

**Objetivo:** Descrever um modelo murino de enfisema induzido por exposição a fumaça de cigarro (FC) e instilação de elastase pancreática porcina (EPP). **Métodos:** Trinta e oito camundongos C57BL/6 foram aleatoriamente divididos em quatro grupos: controle (uma instilação intranasal de solução salina a 0,9%); EPP (duas instilações intranasais de EPP); FC (exposição a FC durante 60 dias) e FC + EPP (duas instilações intranasais de EPP + exposição a FC durante 60 dias). No fim do protocolo experimental, todos os animais foram anestesiados e traqueostomizados para o cálculo de parâmetros de mecânica respiratória. Em seguida, todos os animais foram sacrificados e seus pulmões foram removidos para a medição da interceptação linear média (Lm) e a determinação do número de células imunorreativas a antígeno macrofágico (MAC)-2, metaloproteinase da matriz (MMP)-12 e glicoproteína glicosilada de 91 kDa (gp91 $\alpha$ ) no parênquima pulmonar distal e na região peribrônquica. **Resultados:** Embora não tenha havido diferenças entre os quatro grupos quanto aos parâmetros de mecânica respiratória avaliados, houve aumento da Lm no grupo FC + EPP. O número de células positivas para MAC-2 na região peribrônquica e no parênquima pulmonar distal foi maior no grupo FC + EPP do que nos outros grupos, assim como o foi o número de células positivas para MMP-12 e gp91 $\alpha$ , porém somente no parênquima pulmonar distal. **Conclusões:** Nosso modelo de enfisema induzido por instilação de EPP e exposição a FC resulta em um grau significativo de destruição parenquimatosa em um período de tempo menor que o empregado em outros modelos de enfisema induzido por FC, o que reforça a importância do desequilíbrio entre proteases e antiproteases e entre oxidantes e antioxidantes na patogênese do enfisema.

**Descritores:** Tabaco; Modelos animais; Enfisema; Fenômenos fisiológicos respiratórios; Lesão pulmonar.

## INTRODUÇÃO

Modelos animais de enfisema têm sido amplamente usados para que se compreenda melhor a patogênese da doença. Isso ocorre em virtude do fato de que estudos com seres humanos concentram-se exclusivamente na análise morfológica e molecular de fragmentos de tecido pulmonar de pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos ou são estudos *in vitro* realizados em um único momento.

Os modelos de enfisema induzido por fumaça de cigarro (FC) ou elastase são os mais usados modelos murinos da doença, e ambos são capazes de produzir alterações patológicas semelhantes ao enfisema em seres humanos. No entanto, como nenhum dos dois modelos é capaz de simular minuciosamente a doença em seres humanos, é importante compreender as vantagens e desvantagens de cada um.<sup>(1)</sup> Embora os modelos de enfisema induzido por FC aparentemente sejam os que

representam melhor a patogênese do enfisema em seres humanos, uma grande limitação desses modelos é que, independentemente de quanto tempo os animais sejam expostos a FC, o aumento alveolar resultante é leve em comparação com o resultante de modelos animais de enfisema induzido por elastase.<sup>(1-3)</sup> Dependendo da dose, a instilação intratraqueal ou intranasal de elastase pode resultar em enfisema grave em pouco tempo,<sup>(1,4-7)</sup> além de resultar em aumento significativo do tamanho dos alvéolos, da quantidade de fibras de colágeno e da quantidade de fibras elásticas, o que sugere um processo de remodelação do parênquima pulmonar.<sup>(4,6)</sup> No entanto, a principal desvantagem dos modelos de enfisema induzido por elastase é que eles não desencadeiam todos os eventos fisiológicos desencadeados pelos modelos de enfisema induzido por FC; portanto, sua relevância para abordagens terapêuticas é limitada.<sup>(1)</sup>

Modelos animais de enfisema induzido por FC e elastase têm sido usados não só para elucidar as alterações

## Endereço para correspondência:

Fernanda Lopes. Departamento de Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo, 455, Sala 1210, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brasil.

Tel.: 55 11 3061-7180. Fax: 55 11 3094-2621. E-mail: fernanda@experimental.fm.usp.br

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Instituto dos Laboratórios de Investigação Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIMs-HC/FMUSP).

estruturais do tecido pulmonar, mas também para esclarecer os mecanismos de desenvolvimento do enfisema. Embora a hipótese do desequilíbrio entre proteases e antiproteases ainda seja a mais amplamente aceita para explicar a destruição parenquimatosa característica do enfisema,<sup>(8-11)</sup> o estresse oxidativo também deve ser levado em conta, já que a carga de oxidantes é maior em fumantes em resposta a compostos presentes na FC.<sup>(12,13)</sup> Na tentativa de reduzir o tempo de exposição à fumaça necessário para induzir enfisema e simular da melhor maneira possível as características patológicas do enfisema em seres humanos, elaboramos um modelo experimental de enfisema induzido por instilação de elastase pancreática porcina (EPP) e exposição a FC durante apenas 2 meses.

## MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na cidade de São Paulo (SP). Foram usados no estudo camundongos C57BL/6 machos de seis a oito semanas de idade e 20-25 g de peso. Todos os animais receberam tratamento humanitário em conformidade com o Guia de Tratamento e Uso de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health* dos EUA (Publicação n. 85-23 do NIH, revisada em 1996).

Para a indução do enfisema, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (i.m., 5 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente) e então submetidos a instilação intranasal de 50 µl de EPP tipo I (E1250; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), cuja dose foi menor (isto é, 0,33 UI) que a usada em outros modelos de enfisema induzido por EPP, já que nosso objetivo era induzir enfisema por meio de instilação de EPP e exposição a FC.<sup>(14)</sup> Os animais receberam um total de duas doses de EPP (uma dose no dia 0 e uma dose no dia 30). Os animais de controle receberam 50 µl de solução salina a 0,9% (veículo).

Para os animais expostos a FC, o protocolo começou no dia 1. Os animais foram expostos a FC em uma câmara de inalação de 28 l com duas entradas (uma para o ar e outra para a fumaça), uma saída e uma ventoinha para misturar melhor o ar e a fumaça dentro da câmara. Uma das entradas foi ajustada para fornecer fluxo de ar sintético a 2 l/min e a outra para fornecer fluxo de ar sintético proveniente de um sistema Venturi conectado a um cigarro aceso, aspirando a FC para dentro da câmara. Era possível alterar o fluxo de modo a aumentar ou diminuir a quantidade de fumaça na câmara. Após várias medições da concentração de CO na câmara, o fluxo foi ajustado para 1,5 l/min, o que resultou em uma concentração de CO de 250-350 ppm. Os níveis de carboxi-hemoglobina foram mantidos em  $10 \pm 1,3\%$  em todos os camundongos expostos a FC. Os animais foram expostos à fumaça proveniente de  $12 \pm 1$  cigarros comerciais com filtro (cada um contendo 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de CO), com concentração total de material particulado =  $411,4 \pm 30 \mu\text{g}/\text{m}^3$  por dia. A duração da

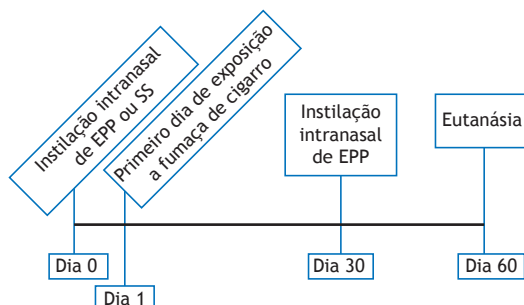
exposição foi de 60 min por dia (isto é, dois períodos de exposição de 30 min) 5 dias por semana durante 2 meses. Os camundongos de controle foram expostos ao ar ambiente.<sup>(15)</sup>

Trinta e oito camundongos C57BL/6 foram aleatoriamente divididos em quatro grupos (Figura 1):

1. controle (n = 9), formado por camundongos que receberam uma instilação intranasal de solução salina a 0,9% no dia 0 e foram sacrificados no dia 60
2. EPP (n = 9), formado por camundongos que receberam duas instilações intranasais de EPP (uma no dia 0 e uma no dia 30) e foram sacrificados no dia 60
3. FC (n = 10), formado por camundongos expostos a FC duas vezes por dia 5 dias por semana durante 60 dias e sacrificados no dia 60
4. FC + EPP (n = 10), formado por camundongos que receberam duas instilações intranasais de EPP (uma no dia 0 e uma no dia 30), foram submetidos ao supracitado protocolo de exposição a FC a partir do dia 1 e foram sacrificados no dia 60

No fim do protocolo experimental, todos os animais foram anestesiados profundamente com uma injeção intraperitoneal de tiopental (70 mg/kg), traqueostomizados e então conectados a um ventilador para animais de pequeno porte (flexiVent™; SCIREQ, Montreal, QC, Canadá) cujos parâmetros foram volume corrente = 10 ml/kg e FR = 120 ciclos/min. Todos os animais receberam uma injeção intraperitoneal de brometo de pancurônio (0,2 mg/kg) para evitar o aumento do trabalho respiratório.<sup>(15)</sup> A impedância de entrada do sistema respiratório foi medida pela técnica de oscilações forçadas, com aplicação de uma perturbação de 16 s (com frequências de 0,25-9,125 Hz) e a válvula de expiração fechada.<sup>(16)</sup> Foi gerada pressão, e a impedância foi calculada em função das diferentes frequências. Para calcular parâmetros de mecânica respiratória, como resistência das vias aéreas, resistência tecidual e elastância tecidual, usamos um modelo de fase constante descrito anteriormente.<sup>(17)</sup>

Após o cálculo dos parâmetros supracitados, foi realizada uma incisão de 2 cm no abdome e os animais foram sacrificados por exsanguinação da aorta abdominal. Em seguida, a parede torácica anterior foi aberta e os pulmões foram removidos em bloco e fixados em formaldeído a 4% com pressão constante de 20



**Figura 1.** Cronologia do protocolo experimental. EPP: elastase pancreática porcina; e SS: solução salina.

cmH<sub>2</sub>O durante 24 h. Foi então realizada a histologia convencional. Em suma, espécimes do lobo inferior e superior foram incluídos em parafina e cortados em seções de 5 µm que foram coradas com hematoxilina e eosina para medir a intercepção linear média (Lm), que é um indicador do diâmetro alveolar médio.<sup>(18)</sup>

O tecido pulmonar foi imunomarcado com os seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal de rato antimacrófago (MAC)-2 de camundongo (1:50.000; CEDARLANE®, Burlington, ON, Canadá); antimetaloalbumina da matriz (MMP)-12 de camundongo policlonal de cabra (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA) e antiglicoproteína glicosilada de 91 kDa de camundongo policlonal de cabra (gp91*phox*; 1:300; Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Foi usado o método da biotina-estreptavidina-peroxidase. Os anticorpos secundários foram os kits ABC VECTASTAIN® anticeelho, anticabra e antirrato (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA), que também foram usados sem um anticorpo primário, servindo de controle negativo.<sup>(19)</sup>

Para a histomorfometria, um retículo ocular de 100 pontos de área conhecida foi colocado na ocular do microscópio.<sup>(20)</sup> Para cada animal, 20 campos não sobrepostos de parênquima pulmonar foram selecionados aleatoriamente e examinados por meio de microscopia de luz (aumento: 200×). A Lm foi medida por meio da contagem do número de vezes que as linhas do retículo interceptaram as paredes alveolares e foi calculada por meio da seguinte equação:

$$Lm = Ltotal/NI$$

na qual *Ltotal* é a soma de todos os segmentos do retículo, calculada por meio da medição de cada segmento com uma régua (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemanha) ao microscópio, e *NI* é a média do número de vezes que as linhas interceptaram as paredes alveolares. Todos os valores de Lm foram expressos em micrômetros (µm).

A histomorfometria também foi usada para determinar o número de células imunorreativas a MAC-2, MMP-12 e gp91*phox* no parênquima pulmonar distal e na região peribrônquica por meio de uma técnica de contagem de pontos com o retículo supracitado na ocular do microscópio (aumento: 400×). Para cada animal, foram selecionados aleatoriamente 15 campos de parênquima pulmonar e 5 vias aéreas. Os resultados foram expressos em células/µm<sup>2</sup>.<sup>(21-24)</sup>

A análise estatística foi realizada com o programa SigmaStat, versão 11 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EUA). Os quatro grupos de camundongos foram comparados por meio de ANOVA de uma via. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

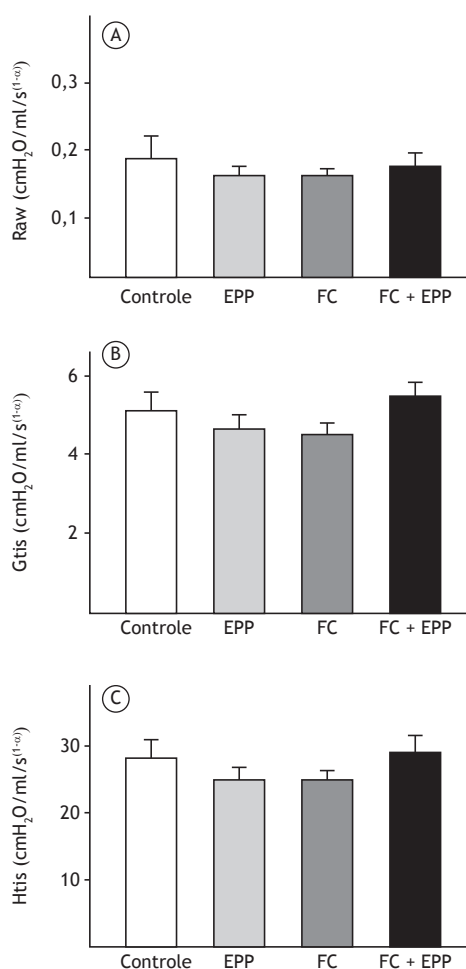
No dia 60 do protocolo experimental, não foram observadas diferenças significativas entre os quatro grupos de camundongos no tocante aos parâmetros de mecânica respiratória (isto é, resistência das vias aéreas, resistência tecidual e elastância tecidual; Figura 2). A Lm foi maior no grupo FC + EPP do que

nos outros grupos ( $p < 0,05$ ; Figura 3); o aumento da Lm é um atributo marcante do enfisema pulmonar.

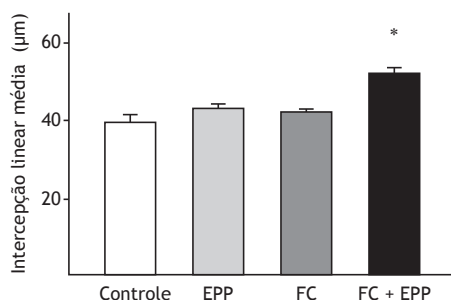
A Figura 4 mostra o número de células positivas para MAC-2 na região peribrônquica e no parênquima pulmonar distal. Houve um aumento do número de macrófagos na região peribrônquica ( $p < 0,05$ ) e no parênquima pulmonar distal ( $p < 0,005$ ) no grupo FC + EPP.

Não houve diferenças significativas entre os quatro grupos quanto ao número de células positivas para MMP-12 na região peribrônquica (Figura 5A). No entanto, no parênquima pulmonar distal, o número de células positivas para MMP-12 foi maior no grupo FC + EPP que no grupo controle ( $p = 0,007$ ; Figura 5B).

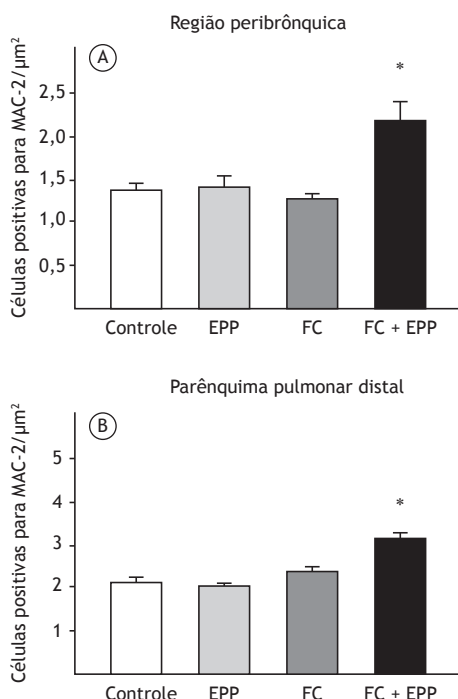
O número de células positivas para gp91*phox* na região peribrônquica foi maior no grupo FC do que nos grupos controle e EPP ( $p = 0,001$ ; Figura 6A). No parênquima pulmonar distal, o número de células



**Figura 2.** Parâmetros de mecânica respiratória nos quatro grupos experimentais, expressos em forma de média ± ep. Em A, resistência das vias aéreas (Raw); em B, resistência tecidual (Gtis); em C, elastância tecidual (Htis). Não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto aos parâmetros avaliados. EPP: elastase pancreática porcina; e FC: fumaça de cigarro.



**Figura 3.** Intercepção linear média (Lm) nos quatro grupos experimentais, expressa em forma de média ± ep. O grupo FC + EPP apresentou um aumento dos valores de Lm em comparação com os outros grupos. EPP: elastase pancreática porcina; e FC: fumaça de cigarro. \* $p < 0,05$  vs. controle, EPP e FC.

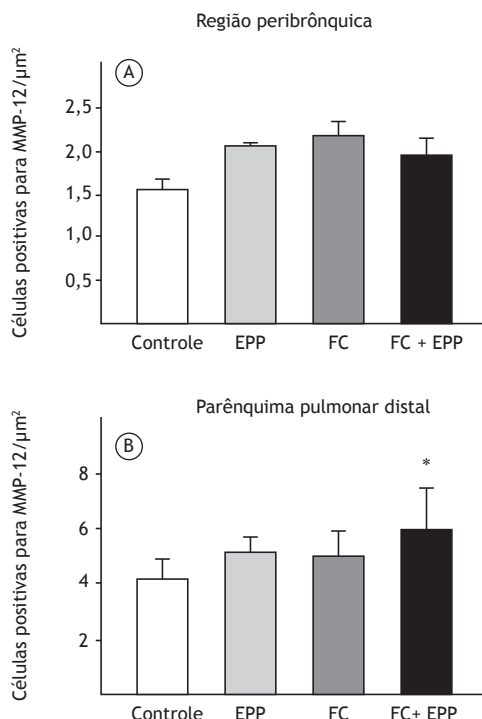


**Figura 4.** Número de células positivas para macrófagos (MAC)-2 nos quatro grupos experimentais, expresso em forma de média ± ep. Houve um aumento do número de células positivas para MAC-2 na região peribrônquica (em A; \* $p < 0,05$ ) e no parênquima pulmonar distal (em B; \* $p < 0,005$ ) no grupo FC + EPP em comparação com os outros grupos. EPP: elastase pancreática porcina; e FC: fumaça de cigarro.

positivas para *gp91phox* foi maior no grupo FC que no grupo controle ( $p = 0,03$ ), além de ter sido maior no grupo FC + EPP do que nos grupos controle e EPP ( $p < 0,003$ ; Figura 6B).

## DISCUSSÃO

No presente estudo, testamos um modelo experimental de enfisema induzido por exposição a FC em curto prazo e instilação de EPP. Após 2 meses, houve aumento da Lm, bem como infiltração de macrófagos na região peribrônquica e no parênquima pulmonar

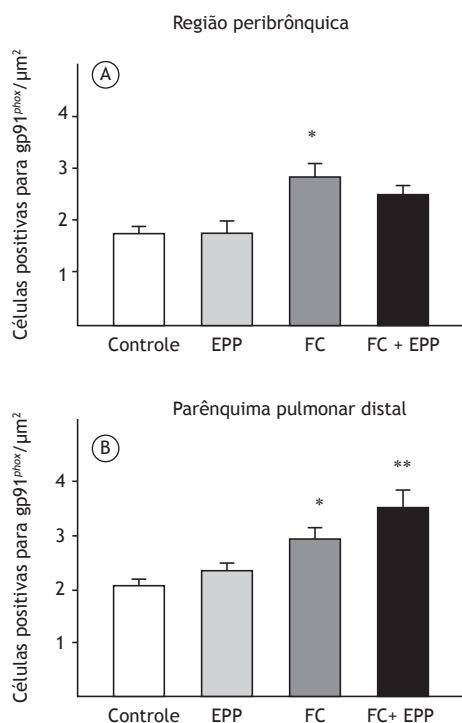


**Figura 5.** Número de células positivas para metaloproteinase da matriz (MMP)-12 nos quatro grupos experimentais, expresso em forma de média ± ep. Não houve diferenças entre os grupos experimentais quanto ao número de células positivas para MMP-12 na região peribrônquica (em A). O número de células positivas para MMP-12 no parênquima pulmonar distal foi maior no grupo FC + EPP do que no grupo controle (em B; \* $p = 0,007$ ). EPP: elastase pancreática porcina; e FC: fumaça de cigarro.

distal, além de um aumento do número de células positivas para MMP-12 e *gp91phox* no parênquima pulmonar distal.

O fato de que não se observaram alterações funcionais no presente estudo deve-se provavelmente ao fato de que houve menos aumento alveolar em nosso estudo do que em estudos com modelos de enfisema induzido por EPP e doses mais elevadas de elastase<sup>(25)</sup> ou em estudos com modelos de enfisema induzido por FC e períodos mais longos de exposição.<sup>(15)</sup> Além disso, alguns estudos mostraram que a avaliação da mecânica respiratória não reflete a presença de enfisema tão bem como a análise morfométrica.<sup>(21,26)</sup> Foronjy et al.<sup>(27)</sup> não observaram alterações da complacência pulmonar não obstante a presença de enfisema significativo, sem correlação entre o enfisema medido pela análise morfométrica e a complacência pulmonar. Os autores concluíram que essa falta de correlação ocorre porque os mecanismos envolvidos no enfisema anatômico podem ser distintos daqueles que causam a perda de retração elástica.<sup>(27)</sup>

O desequilíbrio entre a atividade das proteases e a das antiproteases no pulmão continua a ser o mecanismo mais amplamente aceito para a destruição do parênquima pulmonar no enfisema.<sup>(10,14,28-30)</sup> Além disso, estudos demonstraram que as MMPs,



**Figura 6.** Número de células positivas para glicoproteína glicosilada de 91 kDa (*gp91phox*) nos quatro grupos experimentais, expresso em forma de média  $\pm$  ep. O número de células positivas para *gp91phox* na região peribrônquica foi maior no grupo FC do que nos grupos controle e EPP (em A; \* $p = 0,001$ ). No parênquima pulmonar distal, o número de células positivas para *gp91phox* foi maior no grupo FC do que no grupo controle (em B; \* $p = 0,03$ ) e maior no grupo FC + EPP do que nos grupos controle e EPP (em B; \*\* $p < 0,003$ ). EPP: elastase pancreática porcina; e FC: fumaça de cigarro.

particularmente a MMP-12, desempenham um papel importante no ataque aos componentes proteicos da matriz extracelular do parênquima pulmonar.<sup>(31,32)</sup>

A MMP-12 é produzida principalmente por macrófagos alveolares<sup>(33)</sup> e é reconhecida como tendo um papel importante no enfisema. Em um estudo, camundongos com deficiência de MMP-12 foram expostos a FC 6 dias por semana durante 6 meses e não houve aumento do número de macrófagos nem destruição parenquimatosa.<sup>(34)</sup> Além disso, há relatos de aumento da expressão da MMP-12 nos macrófagos em fumantes e de maior atividade da MMP-12 no escarro de pacientes com DPOC do que no de fumantes sem limitação do fluxo aéreo.<sup>(35,36)</sup>

No presente estudo, houve um aumento de macrófagos na região peribrônquica e no parênquima pulmonar distal, bem como um aumento do número de células positivas para MMP-12 em comparação com o grupo controle, porém somente no parênquima pulmonar distal. Embora os níveis de MMP-12 tenham sido mais elevados nos grupos EPP e FC do que no grupo controle, a diferença não foi significativa. Esses achados são coerentes com as alterações estruturais observadas no parênquima pulmonar distal.

No presente estudo, a Lm foi maior no grupo FC + EPP do que nos outros grupos. Já se observou um aumento semelhante na Lm, embora somente após 6 meses de exposição a FC<sup>(15)</sup> ou com o uso do dobro da EPP usada no presente estudo.<sup>(25,37)</sup>

No presente estudo, o estresse oxidativo foi medido pela determinação do número de células positivas para *gp91phox*, que é a subunidade de ligação ao heme da NADPH oxidase geradora de superóxido.<sup>(38)</sup> A FC contém muitos oxidantes e espécies reativas de oxigênio que promovem uma carga ambiental de oxidantes, a qual é aumentada pela liberação adicional de oxidantes provenientes de células inflamatórias, culminando na destruição de tecido corporal.<sup>(39,40)</sup> Os macrófagos alveolares liberam mais espécies reativas de oxigênio em fumantes do que em não fumantes, e a capacidade antioxidante plasmática dos fumantes é reduzida.<sup>(39)</sup> No presente estudo, a exposição a FC resultou em um aumento das células positivas para *gp91phox* na região peribrônquica e no parênquima pulmonar distal. O número de células positivas para *gp91phox* na região peribrônquica foi maior no grupo FC do que nos grupos controle e EPP. Além disso, houve um aumento das células positivas para *gp91phox* no parênquima pulmonar distal nos grupos FC e FC + EPP. Esse aumento foi incrementado pelo uso tanto de exposição a FC como de instilação de EPP, e a presença de aumento alveolar sugere que os oxidantes desempenham um papel importante em nosso modelo murino de enfisema.

Embora o estresse oxidativo tenha sido descrito como um mecanismo importante no desenvolvimento do enfisema,<sup>(41-43)</sup> demonstrou-se que a NADPH oxidase desempenha um papel importante na coibição da atividade das MMPs nos macrófagos; a atividade *in vitro* da MMP-12 é maior em macrófagos com deficiência de oxidantes do que em macrófagos com *gp91phox* nula e em macrófagos de tipo selvagem.<sup>(44)</sup> Além disso, demonstrou-se *in vivo* que camundongos com deficiência de *gp91phox* podem apresentar enfisema progressivo espontâneo semelhante ao observado em animais de tipo selvagem expostos a FC.<sup>(44)</sup> As diferenças entre nossos resultados e os do estudo supracitado<sup>(44)</sup> podem ser decorrentes de diferenças entre os protocolos experimentais empregados.

Nosso modelo de enfisema induzido por exposição a FC e instilação de EPP resulta em um grau significativo de destruição parenquimatosa em um período de tempo menor que o empregado em estudos anteriores, o que reforça a importância do desequilíbrio entre proteases e antiproteases e entre oxidantes e antioxidantes na patogênese do enfisema. Em virtude da diversidade de modelos experimentais na literatura, é importante escolher cuidadosamente o melhor modelo para cada propósito. Um modelo murino de enfisema induzido por exposição a FC e instilação de EPP pode ser útil para avaliar as alterações estruturais que ocorrem durante os processos de destruição e remodelação do parênquima pulmonar no enfisema.

## REFERÊNCIAS

- Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(1):L1-15. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90200.2008>
- Lopes FD, Toledo AC, Olivo CR, Prado CM, Leick EA, Medeiros MC, et al. A comparative study of extracellular matrix remodeling in two murine models of emphysema. *Histol Histopathol*. 2013;28(2):269-76.
- Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease \* 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax*. 2002;57(10):908-14. <https://doi.org/10.1136/thorax.57.10.908>
- Janoff A, White R, Carp H, Harel S, Dearing R, Lee D. Lung injury induced by leukocytin proteases. *Am J Pathol*. 1979;97(1):111-36.
- Lieberman J. Elastase, collagenase, emphysema, and alpha1-antitrypsin deficiency. *Chest*. 1976;70(1):62-7. <https://doi.org/10.1378/chest.70.1.62>
- Janoff A. Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132(2):417-33.
- Lesser M, Padilla ML, Cardozo C. Induction of emphysema in hamsters by intratracheal instillation of cathepsin B. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145(3):661-8. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/145.3.661>
- Churg A, Cosio M, Wright JL. Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(4):L612-31. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00390.2007>
- Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res*. 2001;2(1):10-9.
- Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003;22(4):672-88. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00040703>
- Shapiro SD. Proteinases in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Soc Trans*. 2002;30(2):98-102. <https://doi.org/10.1042/bst0300098>
- Rahman I. Pharmacological antioxidant strategies as therapeutic interventions for COPD. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(5):714-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2011.11.004>
- Vlahos R, Bozinovski S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD. *Clin Sci (Lond)*. 2014;126(4):253-65. <https://doi.org/10.1042/CS20130182>
- Ito S, Ingenito EP, Brewer KK, Black LD, Parameswaran H, Lutchen KR, et al. Mechanics, nonlinearity, and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodeling. *J Appl Physiol* (1985). 2005;98(2):503-11. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00590.2004>
- Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJ, Moriya HT, et al. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J*. 2012;39(2):254-64. <https://doi.org/10.1183/09031936.00003411>
- Gomes RF, Shen X, Ramchandani R, Tepper RS, Bates JH. Comparative respiratory system mechanics in rodents. *J Appl Physiol* (1985). 2000;89(3):908-16.
- Hantos Z, Daróczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol* (1985). 1992;72(1):168-78.
- Margraf LR, Tomashewski JF Jr., Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis*. 1991;143(2):391-400. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/143.2.391>
- Standiford TJ, Kunkel SL, Greenberger MJ, Laichalk LL, Strieter RM. Expression and regulation of chemokines in bacterial pneumonia. *J Leukoc Biol*. 1996;59(1):24-8. <https://doi.org/10.1159/000109191>
- Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest*. 1963;12:131-55.
- Anciaes AM, Olivo CR, Prado CM, Kagohara KH, Pinto Tda S, Moriya HT, et al. Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(10):1797-803.
- van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009;374(9700):1543-56. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61114-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61114-4)
- Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(2):153-9. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.029>
- Reis Gonçalves CT, Reis Gonçalves CG, de Almeida FM, Lopes FD, dos Santos Durão AC, dos Santos FA, et al. Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. *Crit Care*. 2012;16(5):R199. <https://doi.org/10.1186/cc11807>
- Robertoni FS, Olivo CR, Lourenço JD, Gonçalves NG, Velosa AP, Lin CJ, et al. Collagenase mRNA Overexpression and Decreased Extracellular Matrix Components Are Early Events in the Pathogenesis of Emphysema. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129590. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129590>
- 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(9):974-80. <https://doi.org/10.1164/rccm.200309-1270OC>
- Foronjy RF, Mercer BA, Maxfield MW, Powell CA, D'Armiento J, Okada Y. Structural emphysema does not correlate with lung compliance: lessons from the mouse smoking model. *Exp Lung Res*. 2005;31(6):547-62. <https://doi.org/10.1080/019021490951522>
- Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1986;133(1):149-69. <https://doi.org/10.1164/arrd.1986.133.1.149>
- Stockley RA. Proteases and antiproteases. *Novartis Found Symp*. 2001;234:189-99; discussion 199-204. <https://doi.org/10.1002/0470868678.ch12>
- Takubo Y, Guerassimov A, Ghezzi H, Triantafyllopoulos 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. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(12 Pt 1):1596-603. <https://doi.org/10.1164/rccm.2202001>
- Churg A, Zhou S, Wright JL. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Matrix metalloproteinases in COPD. *Eur Respir J*. 2012;39(1):197-209. <https://doi.org/10.1183/09031936.00121611>
- Shapiro SD. Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150(6 Pt 2):S160-4. [https://doi.org/10.1164/ajrccm/150.6.Pt\\_2.S160](https://doi.org/10.1164/ajrccm/150.6.Pt_2.S160)
- Shibley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(9):3942-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.3942>
- Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*. 1997;277(5334):2002-4. <https://doi.org/10.1126/science.277.5334.2002>
- Demedts IK, Morel-Montero A, Lebecque S, Pacheco Y, Cataldo D, Joos GF, et al. Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD. *Thorax*. 2006;61(3):196-201. <https://doi.org/10.1136/thx.2005.042432>
- Woodruff PG, Koth LL, Yang YH, Rodriguez MW, Favoreto S, Dolganov GM, et al. A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(11):1383-92. <https://doi.org/10.1164/rccm.200505-686OC>
- Lourenço JD, Neves LP, Olivo CR, Duran A, Almeida FM, Arantes PM, et al. A treatment with a protease inhibitor recombinant from the cattle tick (*Rhipicephalus Boophilus microplus*) ameliorates emphysema in mice. *PLoS One*. 2014;9(6):e98216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098216>
- Yu L, Quinn MT, Cross AR, Dinauer MC. Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(14):7993-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.7993>
- Domej W, Oettl K, Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD—implications and relevance for treatment. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:1207-24. <https://doi.org/10.2147/COPD.S51226>
- MacNee W. Oxidants and COPD. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(6):627-41. <https://doi.org/10.2174/156801005774912815>
- de Moura RS, Pires KM, Santos Ferreira T, Lopes AA, Nesi RT, Resende AC, et al. Addition of açai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(4):855-63. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.12.007>
- Valença SS, Castro P, Pimenta WA, Lanzetti M, Silva SV, Barja-Fidalgo C, et al. Light cigarette smoke-induced emphysema and NFkappaB activation in mouse lung. *Int J Exp Pathol*. 2006;87(5):373-81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2006.00492.x>
- Valença SS, Rueff-Barroso CR, Pimenta WA, Melo AC, Nesi RT, Silva MA, et al. L-NAME and L-arginine differentially ameliorate cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Pulm Pharmacol Ther*. 2011;24(5):587-94. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2011.05.006>
- Kassim SY, Fu X, Liles WC, Shapiro SD, Parks WC, Heinecke JW. NADPH oxidase restrains the matrix metalloproteinase activity of macrophages. *J Biol Chem*. 2005;280(34):30201-5. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503292200>