

# **Papel Protector de Estrógenos y Fitoestrógenos sobre el Efecto del Envejecimiento en Neumocitos Tipo II**

## **Cytoprotective Effects of Estrogens and Phytoestrogens on Aging in Rat Type II Pneumocytes**

Sofía Campillo, Mario Calvo y Marina Higuera

Tutores:

Elena Vara y Lisa Rancan

Universidad Complutense de Madrid

### *Resumen*

Las afecciones respiratorias crónicas son un problema importante para la salud y el desarrollo de los humanos. Tanto la fisiología pulmonar como la fisiopatología están influenciadas por varios factores hormonales, incluyendo los niveles de estrógenos. La prevalencia de las patologías pulmonares aumenta en las mujeres tras la menopausia, con una peor evolución clínica y un aumento de la morbilidad y la mortalidad. La suplementación dietética de fitoestrógenos parece ser beneficiosa en enfermedades respiratorias crónicas, inflamatorias y neoplásicas. Sin embargo, sus efectos sobre la síntesis de lípidos del surfactante y el aumento local del grado de estrés oxidativo, siguen sin ser conocidos. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del envejecimiento y la suplementación con estrógenos o fitoestrógenos sobre la síntesis de surfactante y el grado de estrés oxidativo en neumocitos tipo II. Para ello, se utilizaron 104 ratas Wistar (40 machos y 64 hembras). Las hembras fueron asignadas aleatoriamente a 2 grupos: intacto (A) y ovariectomizado (B). El grupo B se dividió en 3 grupos: tratamiento con estrógenos, tratamiento con fitoestrógenos o sin tratamiento. Las ratas fueron sacrificadas a los 14, 18, 22 y 24 meses y los neumocitos se aislaron y cultivaron para la determinación de fosfatidil colina (PC), guanosil monofosfato cíclico (GMPC), peróxido de lípidos (LPO), monóxido de carbono (CO) y óxido nítrico (NO). El envejecimiento se asoció con un aumento significativo de los niveles de CO, NO, GMPC y LPO y un menor contenido de PC. El tratamiento con estrógenos o fitoestrógenos redujo significativamente los marcadores de estrés oxidativo y restauró la síntesis de PC en animales castrados. En conclusión, tanto el reemplazo hormonal como la suplementación dietética con fitoestrógenos podrían proteger al pulmón de los efectos deletéreos del envejecimiento y/o la privación de estrógenos.

*Palabras clave: estrógeno fitoestrógeno, fosfatidilcolina, estrés oxidativo, envejecimiento.*

### *Abstract*

Chronic respiratory conditions are a major problem for human health and development. Both pulmonary physiology and pathophysiology are influenced by several hormonal factors, including estrogen levels. The prevalence of pulmonary pathologies increases in postmenopausal women, with a worse clinical course and an increase in morbidity and mortality. Dietary supplementation of phytoestrogens appears to be beneficial in chronic respiratory, inflammatory and neoplastic diseases. However, its effects on surfactant lipid synthesis and local increase in the degree of oxidative stress remains unknown. The objective of this study was to investigate the effect of aging and estrogen or phytoestrogen supplementation on surfactant synthesis and the degree of oxidative stress in type II pneumocytes. For this purpose, 104 Wistar rats (40 males and 64 females) were used. Females were randomly assigned to 2 groups: intact (A) and ovariectomized (B). Group B was divided into 3 groups: treatment with estrogens, treatment with phytoestrogens or without treatment. Rats were sacrificed at 14, 18, 22 and 24 months and pneumocytes were isolated and cultured for determination of phosphatidyl choline (PC), cyclic guanosyl monophosphate (cGMP), lipid peroxide (LPO), carbon monoxide (CO) and nitric oxide (NO). Aging was associated with a significant increase in CO, NO, cGMP and LPO levels and a lower PC content. Treatment with estrogens or phytoestrogens significantly reduced markers of oxidative stress and restored PC synthesis in castrated animals. In conclusion, both hormone replacement and dietary supplementation with soy could protect the lung from the deleterious effects of aging and / or estrogen deprivation.

*Keywords: estrogen, phytoestrogen, phosphatidylcholine, oxidative stress, aging.*

## Introducción

Las afecciones respiratorias crónicas son un problema importante para la salud y el desarrollo de los humanos. Tanto la fisiología pulmonar como la fisiopatología están influenciadas por varios factores hormonales. En consecuencia, se ha demostrado que los estrógenos juegan un papel central en muchos aspectos de la fisiología pulmonar tanto normal como alterada (Townsend, Miller y Prakash, 2012). Además, son cruciales para el desarrollo y la función normales del pulmón durante la infancia temprana (Seaborn, Simard, Provost, Piedboeuf y Tremblay, 2010). Por ejemplo, estudios previos sugieren que bajos niveles de estrógenos pueden tener un impacto adverso en el desarrollo y la función pulmonar por disminución de la producción de surfactante y NO (McCurnin et al., 2009). Sin embargo, el efecto de los estrógenos en el sistema respiratorio, particularmente en neumocitos tipo II, no ha sido estudiado.

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del envejecimiento y la suplementación con estrógenos o fitoestrógenos sobre la síntesis de surfactante y el grado de estrés oxidativo en neumocitos tipo II.

## Material y métodos

Se utilizaron 40 ratas Wistar macho y 64 hembras. Las hembras fueron asignadas aleatoriamente a 2 grupos: intacto (A) y ovariectomizado (B). El grupo B se dividió en 3 grupos: tratados con estrógenos (estradiol 125 µg/semana), tratados con extracto de soja (Phytosoya® Akropharma SA, Madrid, España, 312 mg/kg/día), o sin tratamiento. Como grupo control se utilizaron 8 machos y 8 hembras de 2 meses de edad. Tras 14, 18, 22 o 24 meses, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y sus pulmones fueron recolectados para el aislamiento de neumocitos tipo II y posterior determinación de síntesis de PC (incorporación de D-[U-14C] glucosa a la PC), niveles de GMPc y LPO (ELISA), y liberación de CO (ratio de carboxihemoglobina, tras adición de hemoglobina) y NO (reacción de Griess).

Los resultados se expresaron como la media ± SEM. Para analizar posibles diferencias entre grupos se realizó un ANOVA, seguido por una t de Student para identificar la fuente de las diferencias. Se consideró significativo un nivel de confianza del 95%.

## Resultados

El envejecimiento se asoció con un aumento significativo en la producción de CO por los neumocitos de tipo II. El nivel de CO en las ratas machos y hembras castradas fue significativamente mayor comparado con los observados en

hembras no castradas. El tratamiento con estrógenos o fitoestrógenos disminuyó significativamente estos efectos.

Los niveles de LPO aumentaron exponencialmente de 2 a 14 meses en los tres grupos. De 14 a 24 meses, las concentraciones de LPO mostraron un ligero aumento que fue cuantitativamente menor en animales no castrados. El tratamiento con estrógenos y fitoestrógenos disminuyó significativamente las concentraciones de LPO en los neumocitos de tipo II de animales castrados. Sin embargo, los niveles de LPO se mantuvieron elevados en comparación con los controles de 2 meses.

La liberación de NO por los neumocitos de tipo II a los 2 meses fue significativamente mayor en animales machos cuando se comparó con ambos grupos de ratas hembra. Sin embargo, de 14 a 24 meses, los valores de NO fueron comparables en los grupos de machos y hembras castradas, mostrando un fuerte aumento que no se observó en hembras no castradas. El tratamiento con estradiol o fitoestrógenos, redujo significativamente los valores de NO en ratas castradas.

El envejecimiento también indujo un aumento progresivo de la concentración de GMPc en los tres grupos. Los niveles de GMPc en ratas macho y hembras castradas, fueron comparables, pero fueron más altos que en hembras no castradas. El tratamiento con estrógenos o fitoestrógenos disminuyó significativamente los niveles de GMPc en ratas hembra castradas.

La síntesis “de novo” de PC disminuyó progresivamente a medida que aumentaba la edad en los machos y hembras castradas. Ambos tratamientos (estrógenos y fitoestrógenos) restauraron parcialmente la síntesis de PC en animales castrados.

## Discusión

Utilizando un modelo experimental de roedores, hemos demostrado una relación entre la edad y el estrés oxidativo en pulmón. Además, nuestros resultados mostraron un efecto protector de estradiol y fitoestrógenos, a través de la restauración de síntesis “de novo” de PC en neumocitos de tipo II. Tanto el estrés oxidativo como la señalización proinflamatoria están relacionados con el deterioro de la función pulmonar en las enfermedades agudas y crónicas (Holguin, 2013). Este daño podría estar mediado por la producción aumentada de GMPc intracelular debido a la generación endógena de CO y NO observada en este estudio, y apoyaría resultados previos de nuestro grupo, en donde se ha observado que la inhibición inducida por citoquinas de la síntesis de surfactante por los neumocitos de tipo II está parcialmente mediada por CO (Arias-Díaz, Villa, Hernández, Vara y Balibrea, 1997).

La terapia de reemplazo hormonal posmenopáusica se asocia con una mejor función pulmonar, reduciendo el riesgo de obstrucción del flujo aéreo en un 25% y la hiperreac-

tividad bronquial en mujeres posmenopáusicas (Gan, Man, Postma, Camp y Sin, 2006). Al igual que la terapia de reemplazo hormonal, la suplementación dietética de fitoestrógenos se ha correlacionado con un mejor pronóstico de varias afecciones respiratorias en mujeres posmenopáusicas (Hirayama *et al.*, 2010). De acuerdo con esto, en este trabajo hemos observado que el tratamiento con estrógenos o fitoestrógenos mejoró significativamente la producción de surfactante, lo que sugiere un efecto protector sobre la función pulmonar.

En conclusión, nuestros hallazgos sugieren que tanto el reemplazo hormonal como suplementos dietéticos de fitoestrógenos pueden proteger al pulmón frente a los efectos del envejecimiento y/o de la privación de estrógenos.

### Referencias

- Arias-Díaz J., Villa, N., Hernández, J., Vara, E., & Balibrea, J. L. (1997). Carbon monoxide contributes to the cytokine-induced inhibition of surfactant synthesis by human type II pneumocytes. *Archives of Surgery*, *132*, 1352-1361. <http://doi.org/10.1001/archsurg.1997.01430360098018>
- Gan, W. Q., Man, S. F. P., Postma, D. S., Camp, P., & Sin, D. D. (2006). Female smokers beyond the perimenopausal period are at increased risk of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Respiratory Research*, *7*, 52. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-7-52>
- Hirayama, F., Lee, A. H., Binns, C. W., Hiramatsu, N., Mori, M., & Nishimura, K. (2010). Dietary intake of isoflavones and polyunsaturated fatty acids associated with lung function, breathlessness and the prevalence of chronic obstructive pulmonary disease: Possible protective effect of traditional Japanese diet. *Molecular Nutrition & Food Research*, *54*, 909-917. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200900316>
- Holguin, F. (2013). Oxidative stress in airway diseases. *Annals of the American Thoracic Society*, *10*, S150-157. <http://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201305-116AW>
- McCurnin, D. C., Pierce, R. A., Willis, B. C., Chang, L. Y., Yoder, B. A., Yuhanna, I. S., ... Shaul, P. W. (2009). Postnatal estradiol up-regulates lung nitric oxide synthases and improves lung function in bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *179*(6), 492-500. <http://doi.org/10.1164/rccm.200805-794OC>
- Seaborn, T., Simard, M., Provost, P. R., Piedboeuf, B., Tremblay, Y. (2010). Sex hormone metabolism in lung development and maturation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *21*, 729-738. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2010.09.001>
- Townsend, E. A., Miller, M. V., & Prakash, Y. S. (2012). Sex differences and sex steroids in lung health and disease. *Endocrine Reviews*, *33*, 1-47. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0031>