

Elucidación estructural y evaluación biológica del fitoestrógeno ferutinina aislado de *Ferula hermonis* (Umbeliferae)

TRINA COLMAN^{1*}, PAULO BOUTROS¹, ÁNGEL E. AMESTY¹, ALÍ BAHASAS³,
YAIRA MATHISON², MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO² Y ANITA ISRAEL^{2*}

Resumen

La *Ferula hermonis* Boiss (Umbeliferae) es una planta nativa de Siria y del Líbano. Muchos herbalistas del Medio Oriente, indican que esta planta tiene una fuerte actividad afrodisíaca y antiespasmódica. A partir de la raíz de esta planta se aisló y caracterizó un sesquiterpeno oxigenado, la ferutinina (1). La elucidación estructural se realizó mediante métodos espectroscópicos tales como IR, RMN-¹H, RMN-¹³C, COSY, HMBC, HMQC, NOESY, EIMS y CIMS. Se evaluó la posible actividad biológica del compuesto (1), mediante el estudio de las vías de señalización en el sistema nervioso central *in vitro*, demostrándose que el compuesto (1) incrementa la actividad de la óxido nítrico sintasa y la acumulación de inositol monofosfato en la eminencia media del cerebro de la rata (en un 49% cada uno), sin afectar dicha señalización en la glándula pituitaria. Estos hallazgos sugieren que la ferutinina activa la vía de los fosfoinosítidos y a la producción de óxido nítrico (NO), este último un conocido mensajero intracelular que juega un papel fundamental en la biología humana. Nuestros resultados contribuyen al soporte farmacológico del uso popular del extracto de *Ferula hermonis*, en la mejoría del desempeño sexual y como afrodisíaco.

Palabras clave: Fitoestrógenos, óxido nítrico, eminencia media, ferutinina.

Abstract

Ferula hermonis Boiss (Umbeliferae) is a plant native from Syria and Lebanon. Many herbalist from Middle East, indicate that this plant have aphrodisiac and antispasmodic effects. Two oxygenated sesquiterpene Ferutin (1) has been isolated from the roots of this plant. The structural elucidation was done by spectroscopic methods as: IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, COSY, HMBC, HMQC, NOESY, EIMS, and CIMS. After that the evaluation of the possible signaling pathways of compound 1, in nervous tissue *in vitro* was assessed and the results showed that these compounds are able to increase the nitric oxide synthase activity and inositol monophosphate accumulation (49%, each) in the median eminence of the rat brain, suggesting that isolated compound is associated to the activation of phosphoinositide breakdown and nitric oxide production (NO), the last a gaseous intracellular messenger which is known to play a broad role in human biology. Our results give pharmacological support to the folk use of *Ferula hermonis*.

Key words: Phytoestrogen, nitric oxide, median eminence, ferutin.

Introducción

El 17 β -estradiol (E2), un estrógeno endógeno, actúa sobre el sistema nervioso central ejerciendo sus efectos por mecanismos genómicos y no genómicos. Los efectos genómicos son mediados por los receptores estrogénicos ER α y ER β . La eminencia media

(EM) es una importante región del hipotálamo, esencial para el control neuroendocrino. La EM responde a los estrógenos mediante la liberación de óxido nítrico (NO), un mensajero gaseoso, implicado en la regulación del eje hipotálamo-pituitaria-gónadas (Moretto y col., 1993; Herbison y col., 1996; Prevot

¹ Laboratorio de Bioensayos y Productos Naturales. *Laboratorio de Modelado Molecular.

² Laboratorio de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas. VENEZUELA-1040

³ Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear.

Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida. VENEZUELA-5101

E-mail: trinaco@cantv.net

y col., 2000). Adicionalmente, se conoce que el NO liberado por el estradiol estimula la liberación de GnRH, lo que sugiere que el estradiol es capaz de ejercer una acción inmediata sobre la EM por la vía de la señalización no genómica.

Los fitoestrógenos son un grupo de compuestos, aislados de plantas, que no tienen la misma estructura química que los estrógenos naturales pero funcionalmente tienen las mismas actividades estrogénicas, aunque mil veces menor que el 17β -estradiol (E2), con afinidad por los mismos receptores nucleares (tipo ER α y ER β). Se asume que la actividad estrogénica y/o antiestrogénica de los fitoestrógenos son transmisibles a través de los receptores estrogénicos (ER).

El sesquiterpeno ferutinina (Figura 1), aislado de varias especies del género *Ferula*, muestra afinidad por los receptores estrogénicos (ER), pero no todas las acciones, al igual que las de E2, pueden ser explicadas por la llamada vía genómica. Estudios previos sobre la raíz de *Ferula hermonis*, han reportado el aislamiento de varios sesquiterpenos, la mayoría de ellos biológicamente activos (Ahmed, 1990). Se cree que los constituyentes activos son alcoholes tipo daucano esterificados con ácidos aromáticos, como el compuesto ferutinina (1) (González y Barrier, 1995). En efecto, la ferutinina es un potente fitoestrógeno, el cual tiene una actividad agonista sobre el receptor estrogénico (Ignatkov y col., 1990; Appendino y col.,

2002). Estudios *in vivo* recientes sobre la influencia de los componentes de *Ferula hermonis* sobre la conducta sexual de las ratas machos, han reportado que la ferutinina (1), estimula la conducta sexual después de la ingestión aguda (Zanoli y col., 2005).

En base a estas evidencias, evaluamos la posible participación del óxido nítrico y el recambio de los fosfoinosítidos, en la vía de señalización implicada en la acción neuroendocrina del sesquiterpeno aislado de la planta *Ferula hermonis*.

Materiales y métodos

Extracción y aislamiento

La raíz seca y pulverizada de *Ferula hermonis* (obtenida de fuente comercial) fue extraída con etanol, el extracto fue evaporado a presión reducida de manera de obtener un extracto etanólico FOO5. El extracto FOO5 fue sometido a sucesivas cromatografías en columna sobre sílica gel, usando como eluyente hexano/ EtOAc (gradiente de polaridad) para obtener el compuesto 1. La estructura de la ferutinina se estableció sobre la base de métodos espectroscópicos, tales como: IR, RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , COSY, HMBC, HMQC, NOESY, EIMS y CIMS (Figuras 1-3). Los espectros ID y 2D fueron tomados a 400/125MHz ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) en CHCl_3 . El desplazamiento químico (δ) viene expresado en ppm.

Ensayos biológicos

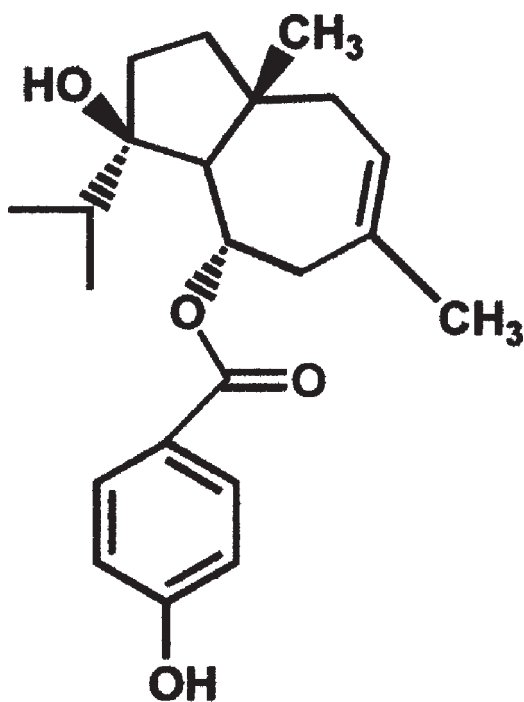
Actividad de la óxido nítrico sintasa (SON)

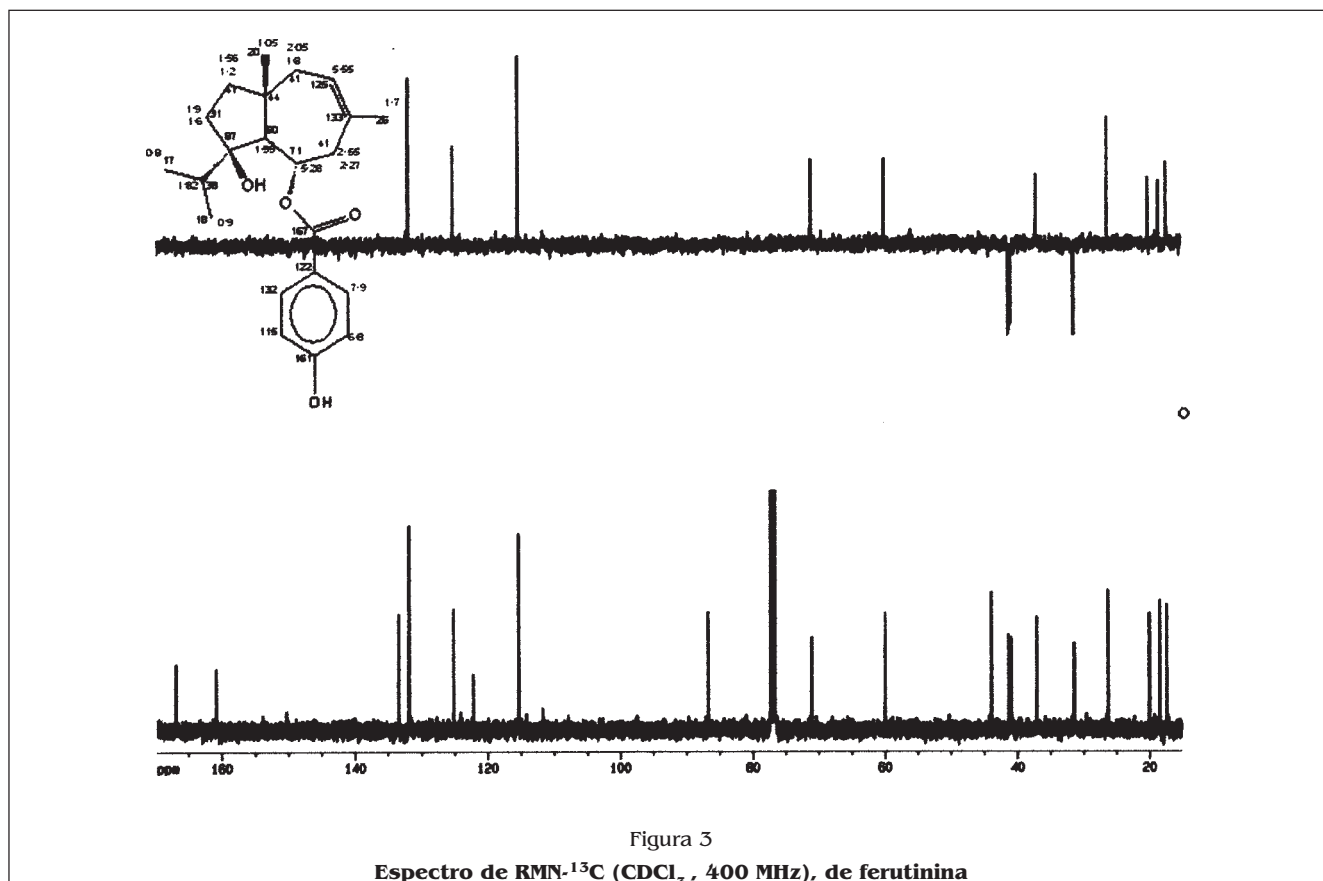
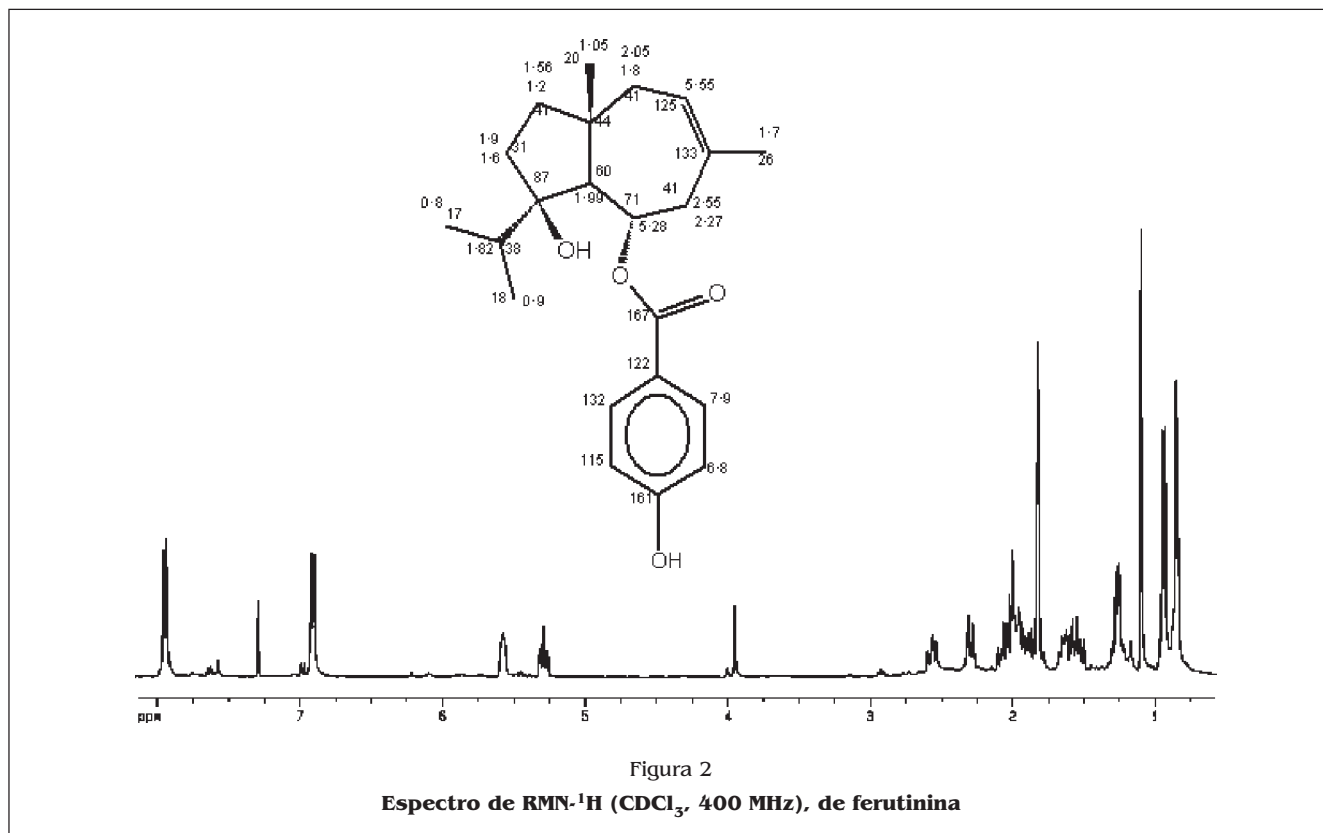
En los ensayos biológicos se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (200-250g). El procedimiento usado en estos experimentos fue aprobado por el Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. La actividad de la SON se determinó mediante la cuantificación de la conversión de arginina radiomarcada a citrulina, utilizando el método modificado por Mathison & Israel (1998).

Las ratas fueron decapitadas y la EM y la glándula pituitaria se obtuvieron mediante microdissección. Inmediatamente después de la extracción, el cerebro fue colocado sobre hielo y los tejidos extraídos mediante control estereomicroscópico.

Los tejidos fueron mantenidos en buffer Hepes 50 mM, pH 7,1 + EDTA 1mM. Posteriormente cada muestra fue preincubada por 30 minutos a 37°C en buffer Hepes 50mM, pH 7,1, conteniendo ditiotreitól 1mM, β -NADPH 0,5 mM; CaCl_2 1,25 mM y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de calmodulina, [^3H]-arginina 0,12 μM y arginina 0,3 μM , seguido de un período de incubación de 10 minutos.

Figura 1
Estructura de Ferutinina (1)





Para determinar la estimulación de la actividad de la SON, la ferutinina fue añadida al iniciar los 10 minutos de incubación. La reacción fue detenida agregando buffer Hepes 20 mM, pH 5,5; EDTA 4mM, frío y calentando durante 5 min a 90°C. Los tejidos fueron sonificados, centrifugados a 12.000 rpm durante cuatro minutos y el sobrenadante pasado a través de una columna de Dowex 50, forma Na⁺ (RBI), desde donde fue eluido con 2 ml de agua. La (³H)-citrulina formada fue cuantificada mediante espectroscopia de centelleo líquido. La actividad de la sintasa del óxido nítrico se expresó como pmol de citrulina formada/hora/mg de proteínas.

Acumulación de fosfoinosítidos, InsP₁

La hidrólisis de fosfoinosítidos (PI) se cuantificó como la acumulación de monofosfato de inositol en presencia de 10 mM de LiCl, en el tejido completo (Garrido & Israel, 2004). El tejido fue mantenido en buffer Krebs-Ringer (BKR) conteniendo: NaCl 125 mM, KCl 3.5 mM, KH₂PO₄ 1.25 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 0.75 mM, NaHCO₃ 25 mM y glucosa 10 mM. Para su marcaje, los tejidos fueron incubados durante dos horas a 37°C, en 2 ml de BKR conteniendo 0.5 mCi de *myo*-(2-³H)-inositol (actividad específica 18.8 Ci/mmol) gasificado continuamente con O₂ (95%): CO₂ (5%). Después del marcaje, los tejidos fueron lavados en BKR fresco gasificado y transferidos a BKR conteniendo LiCl 10 mM. El tejido fue transferido a tubos Eppendorf de 1.5 ml conteniendo 360 µl de buffer LiCl y preincubados por 10 minutos a 37°C con o sin drogas. El buffer (para el grupo control) o la ferutinina fueron añadidos y los tejidos estimulados por 60 minutos a 37°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de ácido tricloroacético (concentración final: 6%) y las muestras fueron transferidas a hielo. Los tejidos fueron sometidos a ultrasonido en hielo y centrifugados a 10.000 g durante 15 min., a 4°C. En el sobrenadante se cuantificó la acumulación del InsP₁ mediante cromatografía de intercambio aniónico. Las fracciones (5 ml) que contenían el InsP₁ fueron recolectadas y la radioactividad cuantificada mediante espectrometría de centelleo líquido. La radioactividad asociada a las membranas fue extraída con cloroformo-metanol y cuantificada. Para cada tejido individual, la cantidad de InsP₁ acumulado se expresó como el porcentaje de la radioactividad relativa a la presente en la membrana (InsP₁/InsP₁ + lípidos). Las proteínas tisulares fueron determinadas mediante el método de Lowry y col. (1951).

Los resultados fueron expresados como el promedio ± EEM. Las diferencias estadísticas entre los grupos se analizaron mediante el análisis de varianza de una

vía (ANOVA) y la prueba de Newman Keul.

Resultados y discusión

Las raíces de *Ferula hermonis* fueron obtenidas de fuentes comerciales. La muestra botánica fue identificada por el doctor Stephen Tillet y una muestra fue depositada en el Laboratorio de Bioensayos y Productos Naturales de la Facultad de Farmacia, UCV, con el número 2002-11.

El compuesto aislado ferutinina (1) fue caracterizado por ¹H-RMN y ¹³C-RMN y espectrometría de masas (Figuras 2,4). Las asignaciones de los desplazamientos químicos fueron realizadas sobre la base de espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN (1D y 2D) (Tablas I, II y Figuras 2-4) y por comparación de los datos espectroscópicos de la ferutinina previamente reportados (Galal, 2000; Galal y col., 2001).

Una vez elucidada la estructura del sesquiterpeno aislado, se procedió a evaluar los efectos de la ferutinina (1) sobre la actividad de la NOS y sobre el recambio de fosfoinosítidos en dos áreas del cerebro relacionadas con el control neuroendocrino, como lo son la eminencia media y la pituitaria anterior de la rata. Los estrógenos endógenos ejercen sobre la eminencia media una acción que tiene consecuencias biológicas, tales como producción de NO y liberación de hormonas. Nuestros hallazgos demostraron en la eminencia media, pero no así en la glándula pituitaria, que la ferutinina es capaz de incrementar significativamente la NOS y el recambio de los fosfoinosítidos tisulares (en un 49%) (Figuras 5 y 6), lo que sugiere que este sesquiterpeno es capaz de modular la producción de óxido nítrico en forma selectiva en la EM. Nuestra observación de la elevación del recambio de los fosfoinosítidos y la actividad de NOS, indican que la ferutinina posiblemente ejerce sus efectos neuroendocrinos mediante la activación de un receptor putativo unido al sistema de segundos mensajeros, asociados a la producción de NO y la hidrólisis de los fosfoinosítidos.

Nuestros resultados no permiten establecer el mecanismo mediante el cual la ferutinina incrementa la producción de NO en la EM, los cuales podrían ser multifactoriales. Así, se ha demostrado que el estrógeno y derivados aromáticos y alifáticos del sesquiterpeno alcohol carotano, aislados de *Ferula genus*, son capaces de modular la secreción hormonal a través de la movilización de calcio intracelular (Zamarreava y col., 1997). La ferutinina podría activar la fosfolipasa C (PLC), la cual hidroliza el fosfatidilinositol(4,5)bifosfato (PIP₂), para generar inositol(1,4,5)trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol, la liberación de calcio desde los almacenes intracelulares y a la activación de la PKC, con la consecuente apertura de los canales de calcio (Berridge y

Tabla I

Desplazamientos Químicos (δ) en el Espectro de ^1H -RMN(CDCl_3 , 400 MHz), de ferutinina

H	H-2	H-3	H-5	H-6	H-7	H-9	H-10	H-11
δ (ppm)	1.60	1.65 1.25	2.06	5.28 2,30	2.56	5.56	2.10 1.95	1.74
mult.	m	m m	m	dd	dd dd	br	m m	m
J (Hz)	—	—	—	11.0; 3.0	11.0; 2.0 5.0; 2.0	—	—	—
H	H-12	H-13	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'		
δ (ppm)	0.92	0.81	6.95	7.91	6.95	7.91	TMSi como Patrón Interno	
mult.	d	d	d	d	d	d		
J (Hz)	7.0	7.0	8.0	8.0	8.0	8.0		

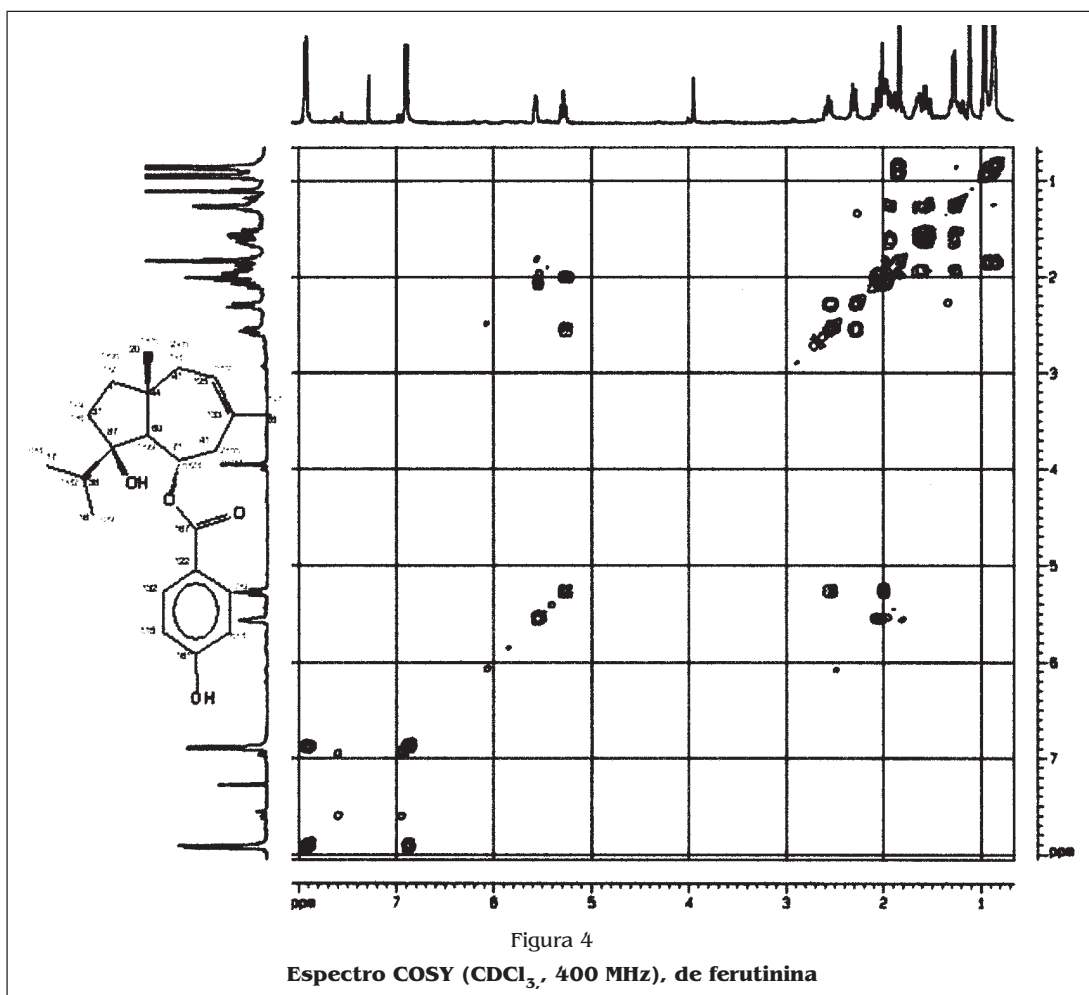


Tabla II
Desplazamientos Químicos (δ) en el Espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz), de ferutina

C	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7
δ (ppm)	44.0	41.3	31.5	86.8	60.1	71.2	41.4
C	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12	C-13	C-14
δ (ppm)	133.5	125.2	41.0	37.1	17.4	18.5	25.4
C	C-15	C=O	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'
δ (ppm)	20.2	167.1	122.2	132.0	115.4	160.8	115.4
C	C-6'						
δ (ppm)	132.0	TMSi como Patrón Interno					

col., 1983). La liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares activaría a la NOS. Adicionalmente, se ha reportado que la ferutina y sus derivados metilados presentan actividades iontoforéticas, aparentemente relacionadas con su capacidad de incrementar la conductancia directamente en la membrana lipídica mediante la formación de un complejo estequiométrico con el calcio (Abramov y col., 2001). Estos hallazgos

sugieren que los sesquiterpenos podrían estar ejerciendo sus acciones estrogénicas a través de múltiples vías que incrementan el calcio intracelular que finalmente resulta en la activación de la NOS y la producción de NO.

En el hipotálamo, específicamente en la eminencia media, el 17β -estradiol es capaz de estimular la liberación de NO, y a su vez éste estimular la secreción de

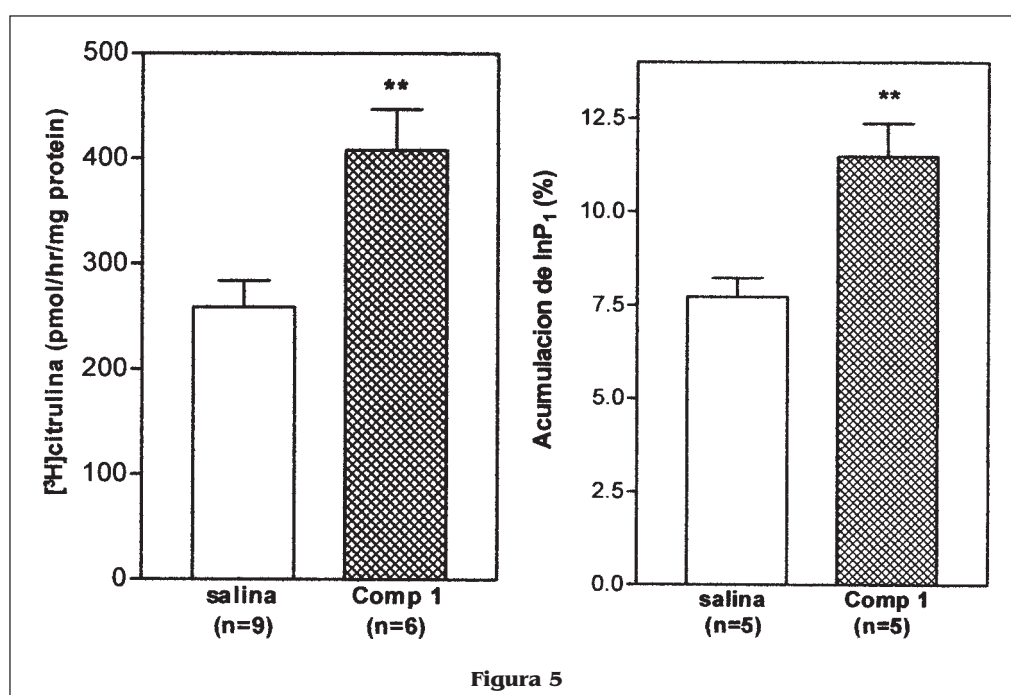


Figura 5

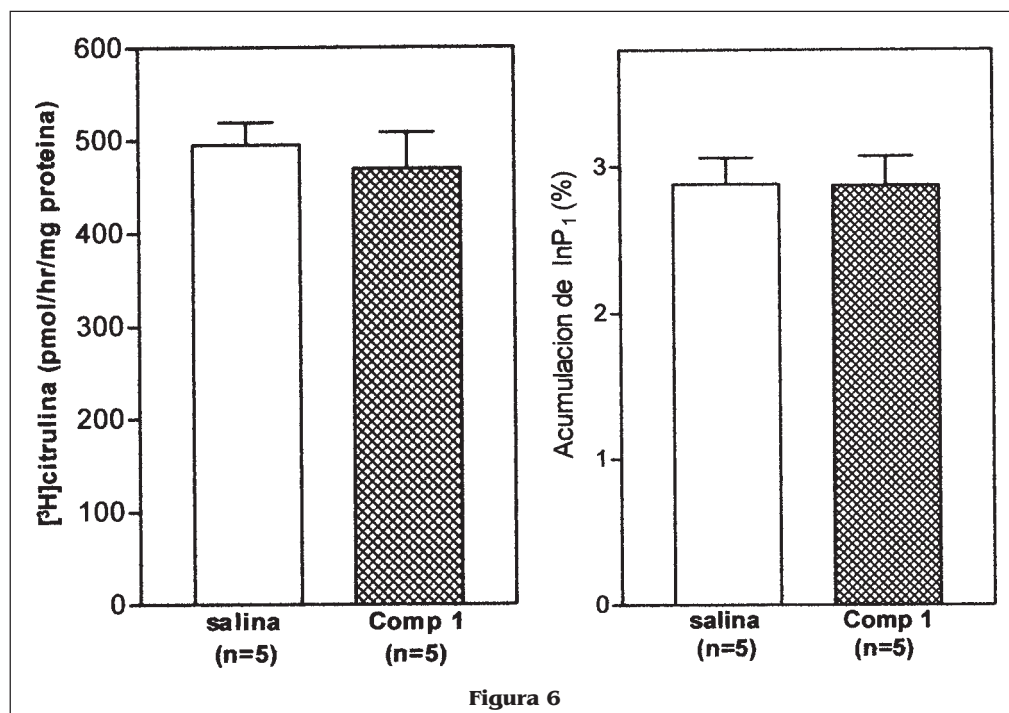


Figura 6

GnRH (Prevot y col., 1999), sugiriendo un papel funcional para este mensajero gaseoso en la neurosecreción y en la regulación de eventos reproductivos. Por lo tanto, la liberación de NO inducida por fitoestrógenos podría desempeñar un papel crucial en la regulación del eje hipotálamo-pituitaria-gónadas, lo que explicaría los efectos afrodisíacos y a actividad en la impotencia sexual reportada para la ferutinina (Brann y col., 1997).

Conclusiones

La ferutinina aislada de la planta *Ferula hermonis* incrementa la actividad de la óxido nítrico sintasa y el recambio de fosfoinosítidos (49%) en tejido nervioso. Estos resultados soportan el concepto que este compuesto es uno de los principios activos responsables de la actividad afrodisíaca de *Ferula hermonis*.

Agradecimientos

A SECAB-CYTED /grant: número 2003-EP 0358-D4; al CDCH 06.30.5167-2003. Al Dr. Stephen Tillet por las determinaciones botánicas. A CYTED-XF RIDEST por HREIMS. Al Laboratorio de RMN de la Facultad de Farmacia, UCV.

Referencias bibliográficas

ABRAMOV, A.Y.; ZAMARAIEVA, M.V.; HÄGELGANS, A.I.; AZIMOV, R.R.; KRASILNIKOV, O.V.; 2001. Influence of plants terpenoids on the permeability of mitochondria and lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1512, 98-110.

AHMED, A.; 1990. New sesquiterpenes from *Ferula sinaica*. *Journal of Natural Products* 53, 483-487.

APPENDINO, G.; SPAGLIARDI, P.; CRAVOTO, G.; POCOCCO, V.; MILLIGAN, S.; 2002. Daucane Phytoestrogens: A Structure-Activity Study. *Journal Natural Products* 65, 1612-1615.

BERRIDGE, M.J.; DAWSON, R.M.; DOWNES, C.P.; HESLOP, J.P.; IRVINE, R.F.; 1983. Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochemical Journal* 212, 473-82.

BRANN, D.W.; BHAT, G.K.; LAMAR, C.A.; MAHESH, V.B.; 1997. Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 65, 385-395.

BREDT, D.S.; GLATT, C.E.; HWANG, P.M.; FOTUHI, M.; DAWSON, T.M.; SNYDER, S.H.; 1991. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7, 615-624.

GALAL, A.M.; 2000. Sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. *Boiss. Die Pharmazie* 55, 961-964.

GALAL, A.M.; EHAB, A.; ABOURASHED, SAMIR A.R.; MAHMOUD, A.; EL SOHLY, MANSOURS S.; AL-SAID AND FAROUK S. EL-FERALLY; 2001. Daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. *Journal of Natural Products* 64, 399-405.

GARRIDO, M.R. AND ISRAEL, A.; 2004. Endothelin ETB receptor signaling in the median eminence and subfornical organ of the rat brain. *Neuropeptides* 38, 304-310.

GONZÁLEZ, A.G.; BARRIER, J.B.; 1995. Chemistry and sources of mono and bicyclic sesquiterpenes from *Ferula* species. *Progress Chemical Organic Natural Products* 64, 1-92.

HADIDI, K.A.; ABURJAI, T. AND BAITAH, A.K.; 2003. To comparative study of *Ferula hermonis* root extracts and sildenafil on copulatory behavior of male rats. *Fitoterapia* 74, 242-246.

- HERBISON, A.E.; SIMONIAN, S.X.; NORRIS, P.J.; EMSON, P.C.; 1996. Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat. *Journal of Neuroendocrinology* 343 8, 73-82.
- IGNATKOV, V.; AKHMEDKHODZHAIEVA, K.T.; BABICHEV, V.N.; 1990. The effect of tefestrol on the secretion of luteinizing hormone from the hypophysis. *Farmakol Toksikol* 53, 37-38.
- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. and RANDALL, R.; 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- MATHISON, Y.; ISRAEL, A.; 1998. Endothelin ETB receptor subtype mediates nitric/oxide cGMP formation in rat adrenal medulla. *Brain Research Bulletin* 45, 15-19.
- MORETTO, M.; LÓPEZ, F.J.; NEGRO-VILAR, A.; 1993. Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 133, 2399-2402.
- PREVOT, V.; BOURET, S.; STEFANO, G.B.; BEAUVILLAIN, J.C.; 2000. Median eminence nitric oxide signaling. *Brain Research Reviews* 34, 21-41.
- PREVOT, V.; CROIX, D.; RIALAS, CH.M.; POULAIN, P.; FRICCHIONE, G.Y.; STEFANO, G.B.; BEAUVILLAIN, J.C.; 1999. Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormonal release from rat median eminence via a membrane receptor. *Endocrinology* 140, 652-657.
- ZANOLI, P.; RIVASI, M.; ZAVATTI, M.; BRUSIANI, F.; VEZZALINI, F. AND BARALDI, M.; 2005. Activity of single components of *Ferula hermonis* on male rat sexual behavior. *International Journal of Impotence Research*. 17, 513-516.
- ZAMARAIEVA, M.V.; HAGELGANS, A.I.; LUBNINA, L.V.; ABRAMOV, A.Y.; AHMEDHODJAEVA, H.S.; SAIDHODJAEV, A.I.; GLAZYRINA, N.G.; SALAKHUTDINOV, B.A.; 1997. Ionophoretic properties of ferutinin. *Cell Calcium* 22, 235-241.

Recibido: febrero 2005
 Aceptado: abril 2005