

Actividad antilipolítica, *in vitro*, de diversos análogos del ácido nicotínico. Relaciones estructura-actividad

J. M.^a García-Mina y F. Grande

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de Zaragoza

(Recibido el 17 de enero de 1983)

J. M.^a GARCIA-MINA and F. GRANDE. *In vitro* Antilipolytic Activity of Nicotinic Acid Analogues. *Structure-Activity Relationships*. Rev. esp. Fisiol., 40, 177-182, 1984.

The antilipolytic activity of a series of N aryl-nicotinamides and of alpha picolinic acid, has been tested *in vitro*. Lipolysis was stimulated by epinephrine (20 µg/ml of incubation medium) using rat's epididymal adipose tissue slices.

Only N(2-carboxy methyl phenyl) nicotinamide showed antilipolytic effect comparable to that of nicotinic acid at similar concentrations (2×10^{-5} M). Picolinic acid (10^{-4} M) showed no antilipolytic effect. These results, together with those of the literature, are discussed in regard to the relations between structure and antilipolytic activity.

Key words: Antilipolytic, Nicotinic acid, Lipolysis.

La presencia de elevados niveles plasmáticos de triglicéridos (TG) y colesterol (Col), así como de ácidos grasos libres (AGL) en diversos trastornos metabólicos es una realidad evidenciada por gran número de trabajos en estos últimos años (3). En consecuencia, todo agente capaz de producir una reducción efectiva en los niveles de dichos lípidos en el plasma de los pacientes tendrá, en principio, gran importancia para el tratamiento de los trastornos antes apuntados, y la prevención de sus complicaciones. Por este motivo, ha sido estudiada una considerable cantidad de sustancias con diversa actividad antilipémica con

vistas a su posible utilización clínica. Entre ellas, una de las que más ha llamado la atención de los investigadores ha sido el ácido nicotínico (A.N.) (7).

De acuerdo con el estudio realizado por el Coronary Drug Project Res. Group en 1975, el tratamiento con A.N. además de su acción rebajando los niveles de los lípidos plasmáticos, causaba también algunos efectos secundarios de diversa consideración (3).

En consecuencia, aun cuando el A.N. hizo descender los niveles plasmáticos de lípidos como se esperaba, debido a la incidencia de continuas molestias gastrointestinales y alteraciones en la com-

posición química de la sangre junto con otros inconvenientes, es necesario usarlo con gran precaución en las personas que sufren enfermedades coronarias. Es evidente que el conocimiento de aquellos grupos funcionales que confieren al A.N. su poder antilipémico, —principalmente antilipolítico—, es enormemente interesante con vistas a conseguir derivados sintéticos de esta droga o análogos, mucho más satisfactorios por presentar efectos secundarios menos marcados o nulos. Es esta la principal razón que motiva la realización de este trabajo en el cual se ensaya la actividad antilipolítica *in vitro* de una serie de N-aril nicotinamidas, así como la del ácido picolínico. Esta información, junto con la recogida en la literatura, permite realizar un estudio estructura-actividad cualitativo para la acción del A.N. y derivados.

Materiales y métodos

Animales. Han sido utilizadas ratas machos Wistar con un peso entre 300-350 g, generosamente donados por el Instituto de Investigación Cuenca Viloro de Zaragoza.

Los animales fueron sacrificados —rotura de las vértebras cervicales—, y los cortes elegidos fueron los correspondientes al tejido epididimal de la rata.

Incubación. Inmediatamente después de la operación las muestras de tejido fueron depositadas en una solución salina (NaCl 0,15 M) fría y cortadas en piezas de aproximadamente 50 mg. Un número de 4-6 piezas (200-300 mg) se colocaron en tubos conteniendo 3 ml de tampon Krebs Ringer fosfato (pH 7,4) sin calcio y conteniendo un 3 % de albúmina bovina (fracción pobre en ácidos grasos libres, Sigma). No se añadió glucosa al medio de incubación. Los tubos se depositaron en un incubador

marca GFL, modelo 1083, manteniendo la temperatura a 37° C, con una agitación de 30 ciclos por minuto durante 1 hora.

Adiciones. La serie de clorhidratos de las N-aril nicotinamidas fue preparada en el departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza. Todas las N-aril nicotinamidas fueron añadidas en forma de clorhidrato.

Las N-aril nicotinamidas se señalan en la tabla I. La epinefrina (Sigma), el ácido nicotínico (Merck), los clorhidratos de las N-aril nicotinamidas y el ácido picolínico (Koch-Light Lab.) fueron disueltos en solución salina (NaCl 0,15 M) antes del ensayo. El agente de referencia fue el ácido nicotínico. Las adiciones fueron hechas en un volumen de 100 μ l, para las concentraciones siguientes: Los clorhidratos de las N-aril nicotinamidas y ácido nicotínico: 2×10^{-5} M; ácido picolínico y ácido nicotínico: 10^{-4} M y epinefrina: 20 μ g/ml de medio.

Métodos analíticos. Los AGL fueron medidos en el medio de incubación por el método de NOVAK (10). El glicerol liberado al medio de incubación fue evaluado por el método de FLETCHER (6), fundamentado en la reacción de NASH (9).

Cálculos. Se utilizó un control, sin adición alguna, un control-epinefrina con adición de epinefrina solamente y un problema conteniendo epinefrina y el agente a estudiar. Todas las incubaciones se hicieron por duplicado (n.º de experiencias por agente en la tabla I). Tanto la producción de AGL como la de glicerol fue evaluada por los cambios de ambas sustancias en el medio de incubación. La estimación estadística fue realizada mediante el test t de Student para variables apareadas.

Se utilizó como actividad antilipolítica de referencia la observada con el A.N.

Resultados

Acción sobre la liberación de AGL al medio de incubación (tabla I). Únicamente el clorhidrato de la N(2-carboxi metil fenil) nicotinamida presentó una reducción significativa de la liberación AGL. Su actividad era similar a la del A.N. en las mismas condiciones. El clorhidrato de la N (4-acetil fenil) nicotinamida presentaba una ligera reducción de los AGL que no consideramos significativa. El ácido picolínico no presentó actividad alguna.

Acción sobre la liberación de glicerol al medio de incubación (tabla I). Como en el caso de la liberación de AGL, únicamente el clorhidrato de la N(2-carboxi metil fenil) nicotinamida causó una reducción significativa de la liberación de glicerol al medio. Esta acción era similar a la del A.N. en las mismas condiciones (% inhibición-glicerol: 45,4 A.N., 40,9 clorhidrato de la N (-2-carboxi metil fenil) nicotinamida.

El clorhidrato de la N (4-acetil fenil) nicotinamida presentó una ligera reducción del glicerol liberado al medio de incubación. Teniendo en cuenta el resultado para los AGL con este mismo agente, no consideramos esta acción como significativa.

Tabla I. Inhibición de la lipólisis, (orden de inhibición, % Inhibición-glicerol, y cociente AGL/glicerol), estimulada por epinefrina (20 μ g/ml) in vitro por la siguiente serie de clorhidratos de N-Aril nicotinamidas. N-(2-carboximetil fenil) nicotinamidas (A); N(4-acetil fenil) nicotinamida (B); N-(4-carboximetil fenil) nicotinamida (C); N(2-trifluoro metil fenil) nicotinamida (D); N-(3,4,5-tricloro fenil) nicotinamida (E); N(2-6, dibromo; 4-nitro fenil) nicotinamida (F) a la concentración de 2×10^{-5} M. E-X = Epinefrina-Agente; E-C = Epinefrina-Control.

(*) producción de glicerol y AGL en μ mol/g de tejido en 60 min de incubación. Entre paréntesis número de experimentos.

Agente	Concentración		Lipólisis ($\bar{x} \pm S.E.$)		% Inhibición-glicerol $\frac{E-X}{E-C} \times 100$	Relación AGL Glicerol
			Glicerol*	AGL*		
Control		(5)	2,74 $\pm$ 0,04	3,88 $\pm$ 0,10		
Epinefrina = E	20 μ g/ml	(5)	6,26 $\pm$ 0,10	17,00 $\pm$ 0,09		
E+						
Acido nicotínico	2×10^{-5} M	(5)	4,66 $\pm$ 0,10 ^a	12,40 $\pm$ 0,04 ^a	45,4	2,66
E + (A)	"	(5)	4,82 $\pm$ 0,06 ^a	12,80 $\pm$ 0,11 ^a	40,9	2,65
E + (B)	"	(5)	6,07 $\pm$ 0,08 ^b	16,69 $\pm$ 0,16 ^c		
E + (C)	"	(4)	6,36 $\pm$ 0,06	17,09 $\pm$ 0,07		
E + (D)	"	(3)	6,21 $\pm$ 0,06	16,84 $\pm$ 0,07		
E + (E)	"	(3)	6,20 $\pm$ 0,08	16,80 $\pm$ 0,12		
E + (F)	"	(3)	6,22 $\pm$ 0,06	16,95 $\pm$ 0,08		
E +						
Acido nicotínico	10^{-4} M	(3)	3,58 $\pm$ 0,14	11,42 $\pm$ 0,10	71,6	3,18
E +						
Acido picolínico	10^{-4} M	(3)	6,39 $\pm$ 0,10	16,84 $\pm$ 0,15		

^a p < 0,001; ^b p < 0,5; ^c p < 0,1.

El ácido picolínico no presentó ninguna actividad.

Cociente AGL/glicerol. El clorhidrato de la N(2-carboxi metil fenil) nicotinamida presentó un valor de 2,65 frente al de A.N. que fue de 2,66.

Discusión

De la serie de los clorhidratos de N-aril nicotinamidas ensayadas por nosotros —en los que el grupo carboxilo del A.N. está bloqueado—, únicamente el derivado que posee el éster metílico en la posición 2 del sustituyente (clorhidrato de la N(2-carboxi metil fenil) nicotinamida) presenta actividad antilipolítica significativa ($p < 0.001$). Sin embargo, la N-aril nicotinamida con el éster en posición 4 no presenta actividad alguna. Habrá que aguardar a realizar un estudio dosis-efecto, así como el cálculo del tipo de inhibición, para poder discutir con precisión el mecanismo antilipolítico *in vitro* de esta sustancia.

Los resultados de los ensayos con A.N. y sus derivados, *in vitro* e *in vivo*, sugieren que el grupo carboxilo, como único sustituyente en la posición 3 de la piridina, tiene una especial responsabilidad en la actividad antilipolítica de esta sustancia:

SKIDMORE *et al.* (11), investigaron la actividad antilipolítica *in vitro* de los ácidos 3-piridil acético; W(3-piridil) propanoico; W(3-piridil) acrílico; W(3-piridil) butírico y W(3-piridil) valérico. Únicamente el 3-piridil acético mostró actividad significativa, siendo ésta inferior a la del A.N. para una concentración de 10^{-3} M. Estos resultados coinciden con los obtenidos por CARLSON *et al.* (1), y vienen a poner de relieve la importancia del carboxilo libre, puesto que al alargamiento de la cadena se traduce en reducción significativa de la actividad.

Efecto estérico: DALTON *et al.* (4), comprobaron que la sustitución en las posiciones 2 y/o 4 y 2-4 del anillo piridínico del A.N. causaba la total desaparición a su actividad antilipolítica, *in vitro*, para una concentración de 10^{-3} M y frente a ácido nicotínico a la misma concentración, que sí mostraba actividad significativa. Teniendo en cuenta que este efecto es independiente de la naturaleza del sustituyente (activante o desactivante), todo parece indicar que estos grupos podrían actuar impidiendo la acción del carboxilo (impedimento estérico principalmente) en la posición 3. Únicamente existe actividad cuando el sustituyente en la posición 2 es el grupo OH. Este resultado no está en contradicción con la hipótesis discutida, ya que ELGUERO *et al.* (5), han demostrado que las 2-hidroxipiridinas se encuentran principalmente en forma de piridona —también las 2-hidroxi N-aril nicotinamidas (2)—, con lo que el impedimento estérico de grupo OH desaparecería. Con todo hay que señalar que la actividad del ácido 2-hidroxi nicotínico es muy inferior a la del A.N. debido, posiblemente, al impedimento estérico —menor que el del grupo OH— del carbonilo de la piridona formada. La sustitución en la posición 5 de la piridina afecta a la actividad significativamente, desde un punto de vista cuantitativo, según experimentos *in vivo* (4).

La unión del grupo carboxílico en otra posición del anillo piridínico distinta de la 3, reduce significativamente la actividad. En nuestro trabajo hemos observado que el ácido picolínico (grupo carboxilo en la posición 2 de la piridina) no presenta actividad alguna sobre la lipólisis estimulada por epinefrina en el tejido adiposo de la rata incubado *in vitro*. De igual manera, el ácido isonicotínico (grupo carboxilo en la posición 4 de la piridina) no parece poseer actividad antilipolítica *in vitro*, para una concentración de 10^{-3} M y frente a ácido

nicotínico a la misma concentración, que si mostraba actividad (8).

Igualmente, la gran mayoría de los derivados del A.N. con el carboxilo bloqueado por la formación de un éster o una amida y que presentan actividad antilipolítica e hipolipémica *in vivo* parecen actuar debido a su transformación metabólica a A.N. en el organismo liberándose o formándose el carboxilo libre (7).

Agradecimientos

Agradecemos al Profesor Enrique Meléndez y Dr. Carlos Cativila, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias (Zaragoza), su ayuda y estímulo durante la preparación del presente trabajo. También a la Srta. Mayte Laborda por la correcta presentación del artículo. Terminar agradeciendo igualmente el ánimo del Dr. Pocoví y el Dr. Ordovás durante la elaboración del presente estudio.

Resumen

Se ensaya la actividad antilipolítica *in vitro* de una serie de N-aril nicotinamidas y del ácido picolínico. La lipólisis es estimulada por epinefrina (20 μ g/ml de medio) y se utilizaron cortes del tejido epididimal de la rata. Unicamente la 2(N-carboxi metil fenil) nicotinamida presenta actividad significativa y similar a la del ácido nicotínico en las mismas condiciones y concentración (2×10^{-5} M). El ácido picolínico (10^{-4} M) no presenta actividad antilipolítica. De esta información, junto con la recogida en la literatura, se realiza un

estudio cualitativo de las relaciones entre estructura y actividad para la acción antilipolítica del ácido nicotínico y derivados.

Bibliografía

1. CARLSON, L. A., HELGSTRAND, A. J., SJÖBERG, B. O., STJERNSTROM, N. E.: S. African 67, 06.685; 29 mayo 1968. Swed. Appl. 16 noviembre 1966, p. 16.
2. CATIVIELA, C., ELGUERO, J., FERNÁNDEZ, J., MELÉNDEZ, E., MULLER, R.: *Bull. Soc. Chin. Fran.*, 11-12, II425-II428, 1981.
3. CORONARY DRUG PROJECT RESEARCH GROUP: *J.A.M.A.*, 231, 360-381, 1975.
4. DALTON, C., VANTRABERT, T. C., DWYER, J. X.: En «Metabolic Effects of Nicotinic Acid and its Derivatives» (Gey, K. F., Carlson, L. A., eds.). Hans Huber Publishers, Berna, 1971, p. 193-196.
5. ELGUERO, J., MARZIN, C., KATRITZKY, R., LINDA, P.: En «The Tautomerism of Heterocycles». Academic Press, Nueva York, 1976, pp. 47, 87, 93, 100.
6. FLETCHER, M.: *Clin. Chim. Acta*, 22, 393-397, 1968.
7. GEY, K. F., CARLSON, L. A.: «Metabolic Effects of Nicotinic Acid and its Derivatives» Hans Huber Publishers, Berna, 1971.
8. KRITCHEVSKY, D.: En «Metabolic Effects of Nicotinic Acid and its Derivatives» (Gey, K. F., Carlson, L. A., eds.). Hans Huber Publishers, Berna, 1971, pp. 585-586.
9. NASH, T.: *Nature*, 170, 976, 1952.
10. NOVAK, T.: *J. Lipid. Res.*, 6, 431-433, 1965.
11. SKIDMORE, I. F., KRITCHEVSKY, D., SCHONHÖFER, R.: En «Metabolic Effects of Nicotinic Acid and its Derivatives» (Gey, K. F., Carlson, L. A., eds.). Hans Huber Publishers, Berna, 1971, pp. 53-62.

