

IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS DE LA 1,3-DIFENILGUANIDINA Y LA 1,3-DI-O-TOLILGUANIDINA MEDIANTE ESTUDIOS DE METABOLISMO *IN-VITRO* DE HÍGADO HUMANO

Andrea Estévez-Danta¹, Iago Riveiro¹, María Lage-Díaz¹, José Benito Quintana¹, Rosa Montes¹, Rosario Rodil¹

¹Instituto de Investigación del Medio Acuático para Una Salud Global (iARCUS) & Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. C. Constantino Candeira S/N, Edificio IIAA, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España
Email: andreaestevez.danta@usc.es

Abstract

El uso de guanidinas diarílicas como aditivos en productos químicos relacionados con polímeros está en aumento, lo que incrementa el riesgo de exposición humana no intencionada a estos compuestos. El descubrimiento de los efectos peligrosos asociados a la 1,3-difenilguanidina (DPG) y la 1,3-di-o-tolilguanidina (DTG) ha impulsado la necesidad de estudios de biomonitorización para detectar la exposición a estas sustancias. Sin embargo, hay información limitada sobre el metabolismo de estos compuestos. Para abordar esta laguna, este estudio investiga la biotransformación de fase I y II de la DPG y la DTG mediante estudios *in-vitro* utilizando fracciones de microsomas hepáticos y citosólicos humanos. Las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo con cuadrupolo, a través de un enfoque de cribado de sospechosos (*suspect screening*) para identificar posibles metabolitos. El análisis reveló cuatro metabolitos de fase I y dos de fase II análogos para la DPG y la DTG.

1. Introducción

La 1,3-difenilguanidina (DPG) y la 1,3-di-o-tolilguanidina (DTG) son aditivos para caucho que se utilizan en el proceso de vulcanización y, por lo tanto, están presentes en productos como neumáticos y calzado. China es su principal productor mundial, mientras que, en Europa, su producción/importación anual varía ampliamente. Estos compuestos se clasifican como persistentes y móviles, y se encuentran en el ambiente acuático y en el polvo interior debido a su uso en productos domésticos [1, 2]. Sin embargo, a pesar de su amplia presencia en el medioambiente, hay poca información sobre su migración y el posible impacto en la salud humana.

Desde el punto de vista toxicológico, la DPG y la DTG pueden causar dermatitis alérgica por contacto, especialmente en entornos laborales [3]. La DPG también se sospecha que es un disruptor endocrino. Los estudios de biomonitorización humana han sido limitados y han utilizado los propios compuestos como biomarcadores en la orina, lo que complica la distinción entre diferentes fuentes de exposición y no tiene en cuenta el metabolismo, que puede variar entre los diferentes grupos de subpoblación (edad, sexo, etnia etc.) [4].

El metabolismo *in-vitro* del hígado humano es una técnica que simula las transformaciones metabólicas humanas de manera económica, rápida y no invasiva. Utiliza fracciones subcelulares específicas del hígado y cofactores, que se incuban con el compuesto objetivo en una solución tampón a 37 °C durante varias horas [5].

Por todo esto, este estudio es pionero en realizar un cribado completo de los metabolitos de fase I y fase II *in-vitro* de DPG y DTG utilizando espectrometría de masas de alta resolución. Se realizaron ensayos con microsomas hepáticos humanos (HLM) y fracciones de citosol (HLCYT), y las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (MS) y espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Para ello, se utilizó un enfoque *suspect screening* para identificar y caracterizar los metabolitos potenciales empleando un sistema equipado con un analizador de tipo cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF).

2. El ensayo de metabolismo *in-vitro*

Los ensayos de metabolismo *in-vitro* del hígado humano realizados en este estudio comprenden dos etapas, que se describen a continuación.

2.1. Fase I

El metabolismo de fase I transforma moléculas lipofílicas en productos más hidrofílicos mediante la adición o exposición a grupos funcionales polares. Las reacciones más comunes son las oxidaciones, reducciones o hidrólisis. En este estudio el metabolismo *in-vitro* de fase I comprendió 2 sets de muestras (A y B), cada uno con 3 réplicas (ver Fig. 1).

En un medio de reacción tamponado (pH 7,5), se añadieron las disoluciones patrón del compuesto de estudio (DPG o DTG), los HLM y el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). El set A se incubó durante 1 h, mientras que el set B durante 3 h, ambos a 37 °C. Finalmente se detuvieron ambas reacciones con una mezcla de acetonitrilo al 1% con ácido fórmico e irbersartan-d4 (como patrón interno), y se centrifugaron y filtraron antes de inyectarlas en el sistema HPLC-QTOF-MS(/MS).

Por otra parte, para evitar falsos positivos, se realizaron tres controles negativos juntamente con los sets de

muestras de la fase I: (i) sin sustrato, (ii) sin NADPH y (iii) sin HLM.

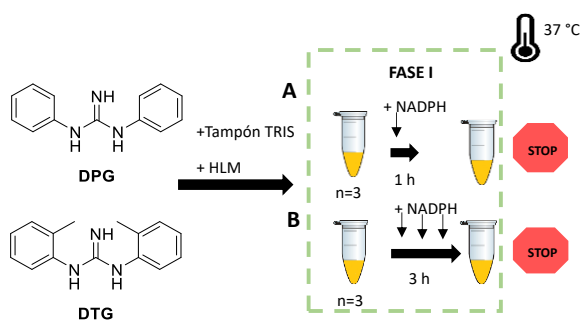


Fig. 1. Esquema de los ensayos de metabolismo *in-vitro* de fase I

2.2. Fase II

El metabolismo de fase II implica reacciones biosintéticas, en las que una fracción química se transfiere desde un cofactor o una coenzima a un sustrato. En este trabajo se ha estudiado la reacción de glucuronidación (GLU, set C) y la de sulfatación (SUL, set D), comprendiendo 3 réplicas cada una (Fig. 2).

En un medio de reacción tamponado (pH 7,5), se añadieron las disoluciones patrón del compuesto de estudio (DPG o DTG). Para la GLU, antes de la incubación a 37 °C, se añadieron los HLM, la alamicetina (que actúa como ionóforo) y la coenzima 2,5-uridinedifosfato ácido glucurónico (UDPGA) a cada hora. Para la SUL, se añadieron los HLCYT y la coenzima adenosina-3'-fosfato 5'-fosfosulfato sal de litio hidrato (PAPS) a cada hora. Tras la incubación de las muestras, ambas reacciones se detuvieron con la disolución de parada mencionada en el apartado anterior, se centrifugaron y filtraron y se inyectaron en el sistema HPLC-QTOF-MS(/MS).

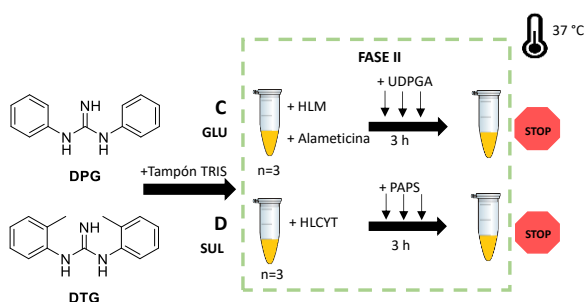


Fig. 2. Esquema de los ensayos de metabolismo *in-vitro* de fase II

2.3. Fase I + fase II

El metabolismo de fase I transforma el sustrato en una molécula más hidrofílica; sin embargo, algunos metabolitos de fase I no son lo suficientemente hidrosolubles (por ejemplo, muchos productos hidroxilados) como para permanecer en la orina y ser eliminados. En consecuencia, estos productos de la fase I

sufrirán reacciones metabólicas de la fase II. Por ello, en este estudio se han simulado las reacciones de la fase I + fase II en dos sets de muestras (E y F) por triplicado (ver Fig. 3).

Como se ha explicado previamente en la sección 2.1, los compuestos diana se incuban en un medio tamponado durante 3 h con los reactivos necesarios para producir las reacciones de fase I. Posteriormente, ambos sets de muestras se introducen en hielo durante 30 segundos y se centrifugan. A continuación, ambos medios de reacción (que contienen metabolitos de la fase I) se someten a reacciones de la fase II. En el set E se recrea la glucuronidación, mientras que en el set F la sulfatación, como se describe en la sección 2.2. Finalmente, ambas reacciones se detienen con la disolución de parada, se centrifugan, se filtran y se inyectan en el sistema HPLC-QTOF-MS(/MS).

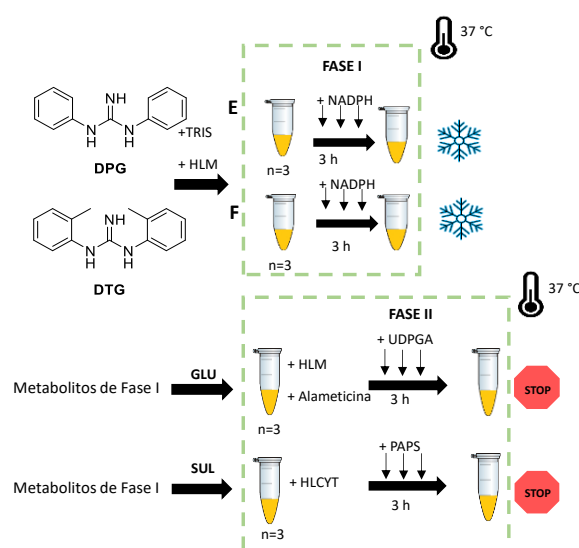


Fig. 3. Esquema de los ensayos de metabolismo *in-vitro* de fase I + fase II

De igual manera que en las reacciones de fase I, de manera paralela a los experimentos de fase II, se introdujeron dos controles negativos que actuaban como control de calidad ante posibles falsos positivos: (i) sin sustrato y (ii) sin coenzima (UDPGA o PAPS).

3. Análisis e interpretación de datos

Las muestras se inyectaron en un equipo de alta resolución, HPLC-QTOF-MS(/MS), empleando el modo de adquisición *auto MS/MS* y, cuando fue necesario, *target MS/MS*. La interpretación de los resultados se llevó a cabo utilizando un flujo de trabajo de *suspect screening*, como se muestra en la Fig. 4.

En primer lugar, se generó una lista de potenciales metabolitos basándose en la bibliografía disponible y en herramientas *in-silico* de predicción metabólica. Posteriormente, las muestras se procesaron con el software *MassHunter Qualitative Analysis* y la identificación de los potenciales productos se basó en criterios de selección en el modo MS: presencia de los

analitos (al menos 2 de las 3 réplicas), error de masa (< 5 ppm) y *score* (> 70).

Una vez identificados los potenciales productos, se llevó a cabo la interpretación del espectro de MS/MS y la estructura se categorizó en función de su nivel de confianza, como proponen Emma Schymanski y colaboradores en su publicación [6].

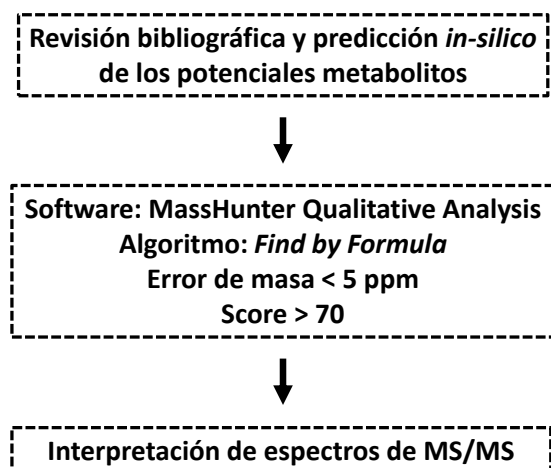


Fig. 4. Esquema del flujo de trabajo de *suspect screening*.

4. Resultados

Se observó una reducción significativa de la señal de DPG y DTG en los distintos sets de experimentos desarrollados, excepto de los experimentos del set D, lo que indica que ambos compuestos han sufrido biotransformaciones de fase I y de fase II con glucuronidación, pero no de fase II con sulfatación. Para ambos compuestos se identificaron los mismos metabolitos análogos.

Por un lado, se identificaron 4 productos de biotransformación de fase I para cada compuesto, que cumplieron los parámetros de calidad. Todos los productos metabólicos se detectaron en las tres réplicas de los sets A y B, en ninguno de los controles negativos, con un error de masa menor de 5 ppm y un *score* mayor de 70. Estos productos de biotransformación se forman mediante reacciones de hidroxilación y ciclación. Además, uno de los metabolitos hidroxilados de fase I se clasificó como el metabolito mayoritario para ambos compuestos.

Por otro lado, se identificaron 2 productos metabólicos de fase II para cada compuesto y ambos fueron resultado del mismo tipo de reacción, la glucuronidación. Uno de los metabolitos se identificó únicamente en las réplicas correspondientes a la fase I + fase II, lo que indica que ese metabolito proviene de un producto hidroxilado resultante de la fase I, mientras que el otro metabolito identificado proviene directamente de la molécula precursora.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación proporcionada por la Xunta de Galicia (ED431C 2021/06, ED481A-2020/258) y la Agencia Estatal de Investigación -

MCIN/AEI/10.13039/501100011033 (ref. PID2020-117686RB-C32).

Referencias

- [1] R. Montes, R. Rodil, R. Cela, J.B. Quintana, Determination of persistent and mobile organic contaminants (PMOCS) in water by mixed-mode liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 91 (2019) 5176-5183. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05792>
- [2] H. Tan, L. Yang, Y. Huang, L. Tao, D. Chen, "Novel" synthetic antioxidants in house dust from multiple locations in the Asia-Pacific region and the United States, *Environ. Sci. Tech.*, 55 (2021) 8675-8682. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c00195>
- [3] G. Dejonckheere, A. Herman, M. Baeck, Allergic contact dermatitis caused by synthetic rubber gloves in healthcare workers: Sensitization to 1,3-diphenylguanidine is common, *Cont. Derm.*, 81 (2019) 167-173. <https://doi.org/10.1111/cod.13269>
- [4] Z.M. Li, K. Kannan, Determination of 1,3-diphenylguanidine, 1,3-di-o-tolylguanidine, and 1,2,3-triphenylguanidine in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Environ. Sci. Tech.*, 57 (2023) 8883-8889. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c00412>
- [5] A.L. Phillips, N.J. Herkert, J.C. Ulrich, J.H. Hartman, M.T. Ruis, E.M. Cooper, P.L. Ferguson, H.M. Stapleton, In vitro metabolism of isopropylated and tert-butylated triarylphosphate esters using human liver subcellular fractions, *Chem. Res. Toxicol.*, 33 (2020) 1428-1441. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00002>
- [6] E.L. Schymanski, J. Jeon, R. Gulde, K. Fenner, M. Ruff, H.P. Singer, J. Hollender, Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence, *Environ. Sci. Tech.*, 48 (2014) 2097-2098. <https://doi.org/10.1021/es5002105>