

Estudio del potencial genotóxico del E-5842, un fármaco experimental antipsicótico con afinidad por el receptor sigma, y del mecanismo de inducción de eritrocitos micronucleados en ratón mediante hipotermia.

Tesis Doctoral

Antonio Guzmán Cano

2008



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Unitat de Genètica

Estudio del potencial genotóxico del E-5842, un fármaco experimental antipsicótico con afinidad por el receptor sigma, y del mecanismo de inducción de eritrocitos micronucleados en ratón mediante hipotermia.

Memoria presentada por ANTONIO GUZMÁN CANO, en el marco del programa de Tercer Ciclo de Genética de la Universitat Autònoma de Barcelona, para optar al grado de doctor en Genética por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, Diciembre de 2008

Director de Tesis

Autor

Dr. Ricard Marcos Dauder
Catedrático de Genética
UAB

Antonio Guzmán Cano

AGRADECIMIENTOS

Al escribir esta parte del documento siento una especial satisfacción. En parte porque representa el broche final a un largo trabajo, pero sobre todo porque me permite expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado en este camino y, de una forma o de otra, han contribuido a la consecución de esta meta.

Gracias al Dr. Ricard Marcos, por facilitarme el regreso a ese nido pedagógico del que hace ya algunos años volé. Sin su ayuda, y siempre bien dirigidos consejos, este trabajo no hubiera sido posible. Gracias por esas entrañables tertulias de tarde.

Un especial agradecimiento a los Laboratorios ESTEVE, por su filosofía de empresa y por permitirme utilizar a sus “criaturas químicas”, y a Helmut Buschmann por su apoyo en este proyecto.

Expresar mi gratitud a todos los compañeros de I+D de ESTEVE, porque de una forma o de otra todos ellos son padres de las “criaturas sigma”. Sin el esfuerzo y la ilusión de ese gran grupo de profesionales, este trabajo nunca hubiera sido posible. Un especial recuerdo para los compañeros con los que hace años inicié este camino y que lamentablemente ya no están con nosotros (va por tí Lluís). También quiero dar las gracias a Jesús Giraldo por su siempre entusiasta contribución en el análisis estadístico de los datos (que buenos bolígrafos me ha costado).

Gracias a esa constelación de amigos tan especiales, sin cuyo apoyo este trabajo no hubiera sido posible, y que me hacen sentir tan inmensamente afortunado. Gracias por haber estado ahí. Como siempre.

Especial gratitud hacia mis compañeros del Departamento de Toxicología de ESTEVE. Sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Gracias a Ana-Paz (por su incondicional y siempre entusiasta ayuda en los experimentos), a Maite (no hay bacteria que se le resista), a Toni-II (por sus consejos, ayuda y exhaustiva lectura de este manuscrito) y a Araceli (por su ayuda). Sobre todo, muchísimas gracias a ti Conchi, por tu compañerismo, entusiasmo, rigor y saber hacer.

Gracias a mi familia, por ser como son y por estar siempre ahí. Y en especial gracias a ti Francisca, por tu paciencia, comprensión y por compartir tantas y tantas cosas.

“Ha sido un camino largo y difícil, pero por fin hemos llegado a la Plaça del Monestir.”

Mi más sincera y profunda gratitud a todos.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
RESUMEN	v
ABREVIATURAS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La búsqueda de nuevos fármacos.....	1
1.2. La esquizofrenia	2
1.3. El receptor sigma como diana farmacológica	9
1.4. El fármaco experimental E-5842 y otros derivados de la feniltetrahidro- piridinil butilazolina	12
1.5. El proceso de desarrollo de un fármaco	13
1.6. Los estudios preclínicos de seguridad	16
1.7. Los ensayos de genotoxicidad.....	19
1.8. La batería estándar	22
1.8.1. Los ensayos <i>in vitro</i>	24
1.8.2. Los ensayos <i>in vivo</i>	27
1.8.2.1. El ensayo de micronúcleos en roedor.....	28
1.9. Estudios complementarios.....	32
1.10. Valor predictivo y factores de confusión en los ensayos de genotoxicidad.....	34
1.10.1. Factores de confusión en ensayos <i>in vitro</i>	38
1.10.2. Factores de confusión en ensayos <i>in vivo</i>	42
1.10.2.1. La eritropoyesis como factor de confusión en el ensayo de micronúcleos en roedor	44
1.10.2.2. La temperatura corporal como factor de confusión en el ensayo de micronúcleos en roedor	45
1.10.2.2.1. Inducción de hipertermia	46
1.10.2.2.2. Inducción de hipotermia.....	47
2. OBJETIVOS	51
3. MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1. Sustancias	53
3.1.1. Sustancias de ensayo	53
3.1.2. Sustancias de referencia	53
3.1.3. Formulación y administración de sustancias.....	55
3.2. Ensayos <i>in vitro</i> de genotoxicidad	56
3.2.1. Test de Ames.....	56
3.2.2. Ensayo del linfoma de ratón.....	56
3.2.3. Ensayo de aberraciones cromosómicas	57

3.3. Ensayos <i>in vivo</i> de genotoxicidad	57
3.3.1. Animales y alojamiento.....	57
3.3.2. Ensayo de micronúcleos en ratón.....	58
3.3.2.1. Ensayo de micronúcleos en médula ósea	59
3.3.2.2. Ensayo de micronúcleos en sangre periférica	59
3.3.3. Ensayo de micronúcleos en hígado de rata	60
3.3.4. Valoración de la temperatura corporal	60
3.3.5. Inhibición del efecto hipotérmico	61
3.3.6. Examen morfológico de los micronúcleos	61
3.3.7. Determinación de los niveles de eritropoyetina en sangre.....	61
3.4. Análisis estadístico y evaluación de resultados.....	62
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
4.1. Resumen del contenido del artículo 1	65
Artículo 1: Guzmán A., García C., Fernández de Henestrosa A.R., Riley S., Ruiz M.T., Marín A.P., Tortajada A. (2006). Assessment of the genotoxic potential of the antipsychotic sigma receptor ligand E-5842. <i>Mutat. Res.</i> 605, 63-77.....	67
4.2. Resumen del contenido del artículo 2	85
Artículo 2: Guzmán A., García C., Marín A.P., Ruiz M.T., Tortajada A., Fernández de Henestrosa A.R. (2004). Induction of micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes in association with hypothermia after administration of the sigma receptor ligand E-5842. <i>Mutat. Res.</i> 565, 11-22 ...	87
4.3. Resumen del contenido del artículo 3	89
Artículo 3: Guzmán A., García C., Marín A.P., Proudlock R.J., Fernández de Henestrosa A.R., Ruiz M.T., Tortajada A., Lloyd M., Marcos R. (2008). Evaluation of the genotoxic potential of three phenyltetrahydropyridinyl butylazole-derived sigma-receptor ligand drug candidates. <i>Mutat. Res.</i> 653, 91-98.....	91
4.4. Resumen del contenido del artículo 4	101
Artículo 4: Guzmán A., Marín A.P., García C., Fernández de Henestrosa A.R., Ruiz M.T., Tortajada A., Marcos R. (2008). Induction of hypothermic conditions associated with increased micronuclei formation in sigma-1 receptor knockout mice after administration of the antipsychotic compound E-5842. <i>Environ. Mol. Mutagen.</i> (In press).....	103
4.5. Resumen del contenido del artículo 5	113
Artículo 5: Guzmán A., García C., Marín A.P., Tortajada A., Ruiz M.T., Fernández de Henestrosa A.R., Marcos R. (2008). Formation of micronucleated erythrocytes in mouse bone-marrow under conditions of hypothermia is not associated with stimulation of erythropoiesis. <i>Mutat. Res.</i> 656, 8-13.....	115
4.6. Discusión general de los resultados	123
4.6.1. Valoración del potencial genotóxico del E-5842 y de los compuestos A, B y C.....	123

4.6.2. Investigación del potencial de los ligandos σ_1 derivados de FTHPB de inducir micronúcleos por hipotermia	128
4.6.3. Investigación del mecanismo de inducción de hipotermia tras administración de E-5842.....	131
4.6.4. Investigación del mecanismo de inducción de micronúcleos bajo condiciones de hipotermia.....	134
4.6.5. Importancia en humanos de la inducción de micronúcleos por hipotermia.....	138
5. CONCLUSIONES.....	141
6. BIBLIOGRAFÍA.....	143
7. ANEXOS	163
ANEXO 1: Guzmán A., García C., Marín A.P., Ruiz M.T., Tortajada A., Fernández de Henestrosa A.R. (2004). Induction of micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes in association with hypothermia after administration of the sigma receptor ligand E-5842. Mutat. Res. 565, 11-22.....	165

RESUMEN

Los productos farmacéuticos son una herramienta esencial en la práctica médica actual, con aplicaciones en el tratamiento y prevención de numerosas patologías humanas. Su utilización se fundamenta sobre el principio básico que han de presentar una relación favorable entre beneficio y riesgo. En este sentido, las posibles ventajas que el paciente pueda obtener de su utilización han de compensar el potencial riesgo de sufrir algún tipo de efecto adverso derivado de su uso.

Los ensayos preclínicos de seguridad juegan un papel fundamental en el proceso de valoración de la capacidad de un fármaco para causar efectos adversos. La realización de estos ensayos, que precede y continúa en paralelo a la realización de los ensayos clínicos en humanos, constituye la primera línea de protección frente a la posible inducción de efectos adversos en humanos. La valoración del potencial genotóxico forma parte de este proceso, y es un componente esencial debido a las potenciales consecuencias adversas que para la salud humana se pueden derivar de la exposición a un agente genotóxico, en cuanto a la inducción de efectos hereditarios y cáncer.

En esta Tesis Doctoral se presenta una serie de estudios dirigidos a evaluar el potencial genotóxico de un grupo de cuatro fármacos experimentales con afinidad por el receptor σ_1 , pertenecientes a la clase química de las feniltetrahidropiridinil butilazolininas. Para ello, los fármacos fueron evaluados mediante la realización de una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* de genotoxicidad. Por motivos de confidencialidad estas sustancias se identifican como los compuestos A, B, C y E-5842. Se presentan, asimismo, los resultados obtenidos al profundizar en la valoración del potencial genotóxico *in vivo* del fármaco experimental antipsicótico E-5842, que presentó un resultado positivo en el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de ratón. En estas investigaciones se ha estudiado el papel del receptor σ_1 en la inducción de condiciones de hipotermia asociadas a incrementos en la formación de micronúcleos en ratón, así como el posible mecanismo subyacente a la inducción de micronúcleos bajo condiciones de temperatura corporal disminuida.

Nuestros resultados muestran que los ligandos para el receptor σ_1 derivados de la feniltetrahidropiridinil butilazolina no parecen presentar, como clase química, riesgo de potencial genotóxico. El receptor σ_1 no está implicado en la inducción de condiciones de hipotermia asociadas a la formación de micronúcleos, lo que descarta la posible existencia de

un efecto de clase para este tipo de compuestos en el ensayo de micronúcleos en roedor. Asimismo, nuestros resultados contribuyen al conocimiento sobre los mecanismos subyacentes a la formación de micronúcleos en médula ósea de ratón bajo condiciones de hipotermia, en cuanto que aportan evidencias experimentales que indican que éstos no se producen como consecuencia de una estimulación de la eritropoyesis, y refuerzan la hipótesis de un posible origen aneugénico.

ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
σ	Sigma
σ_1 R-KO	Ratón transgénico deficiente para el gen del receptor sigma-1
AbCr	Aberraciones cromosómicas
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
BfArM	<i>Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte</i> - Instituto Federal para Productos Farmacéuticos y Médicos (Alemania)
BPL	Buenas prácticas de laboratorio
CHO	<i>Chinese hamster ovary cells</i> – Células de ovario de hámster chino
CHL	<i>Chinese hamster lung cells</i> – Células de pulmón de hámster chino
CYP	Citocromo P450
DA	Dopamina
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
DMT	Dosis Máxima Tolerada
EMA	<i>European Medicines Agency</i> - Agencia Europea del Medicamento
ENC	Eritrocito(s) normocromático(s)
ENCMN	Eritrocito(s) normocromático(s) micronucleado(s)
EPC	Eritrocito(s) policromático(s)
EPCMN	Eritrocito(s) policromático(s) micronucleado(s)
EPC/ENC	Relación entre eritrocitos policromáticos y normocromáticos
EPO	Eritropoyetina
ES	<i>Embryonic stem cells</i> – Células madre embrionarias
FTHPB	Feniltetrahidropiridinil butilazolina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> – Administración de Alimentos y Medicamentos (EEUU)
ICH	<i>International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i> - Conferencia Internacional de Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano
I+D	Investigación y desarrollo
K _i	Constante de inhibición
KO	<i>Knockout</i>

ML	<i>Mouse Lymphoma</i> – Linfoma de ratón
MN	Micronúcleo(s)
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> – Ácido ribonucleico mensajero
NA	Naranja de acridina
NMDA	N-metil-D-aspartato
OCDE - <i>OECD</i>	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico - <i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
PK	<i>Pharmacokinetics</i> – Farmacocinética
RET	Reticulocito(s)
RETMN	Reticulocito(s) micronucleado(s)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ácido ribonucleico
SNC	Sistema nervioso central
TFT	Trifluorotimidina
TK; <i>tk</i>	Timidina quinasa; gen de la timidina quinasa
UDS	<i>Unscheduled DNA Synthesis</i> - Síntesis no programada de DNA
WT	<i>Wild type</i> – Silvestre(s)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La búsqueda de nuevos fármacos

El recién finalizado siglo XX se ha caracterizado por un espectacular desarrollo de la ciencia médica. Los avances en el conocimiento sobre los procesos fisiológicos que rigen el funcionamiento de los organismos y sus mecanismos de control, han contribuido de forma significativa a mejorar nuestra comprensión de las causas que conducen al funcionamiento anómalo de los sistemas fisiológicos, y de sus consecuencias negativas para la salud humana. No obstante, a pesar del nivel de protección sanitaria alcanzado por la población humana en general, y por las sociedades occidentales en particular, la necesidad de disponer de nuevas moléculas con actividad terapéutica sigue siendo una realidad. Para ciertas enfermedades y condiciones patológicas la disponibilidad de tratamientos eficaces sigue siendo una necesidad no cubierta. Asimismo, para muchas otras enfermedades para las que sí hay tratamientos, la búsqueda de nuevos fármacos surge de la necesidad de disponer de tratamientos alternativos más eficaces o con un mejor perfil de seguridad, que los actualmente disponibles.

La investigación biomédica básica y la industria farmacéutica juegan un papel fundamental en la consecución de estos objetivos. La primera, aportando nuevos conocimientos biomédicos sobre los procesos fisiológicos implicados en las patologías humanas, así como sobre los factores o causas que los desencadenan o modulan. Estos conocimientos constituyen la base para el diseño y la obtención de nuevas y mejores herramientas para el diagnóstico, el tratamiento o la prevención de las enfermedades humanas. La segunda, dándole una aplicación o utilidad práctica a estos nuevos conocimientos. En este sentido, la industria farmacéutica tiene como misión empresarial la investigación, desarrollo y puesta a disposición de la sociedad, de nuevos fármacos más eficaces y seguros para la prevención o el tratamiento paliativo y curativo de las enfermedades, mejorando la salud y calidad de vida de los pacientes.

La búsqueda de nuevas entidades químicas con propiedades terapéuticas para una determinada indicación se puede abordar, principalmente, mediante dos aproximaciones posibles. La primera de ellas consiste en el diseño de fármacos con actividad sobre dianas farmacológicas o mecanismos fisiopatológicos bien conocidos a nivel molecular, con el fin de obtener nuevas moléculas que presenten mejores propiedades de actividad y/o seguridad. Para ello, una opción es trabajar sobre la base de una estructura química similar a la de un fármaco

que ya ha demostrado actividad terapéutica, pero introduciendo cambios estructurales de mayor o menor magnitud, con el fin de modificar sus propiedades físicas, químicas o biológicas, pero conservando o incrementando su actividad farmacológica o perfil de seguridad. Estos fármacos constituyen los denominados “*me too*” (del inglés “yo también”). Como alternativa, a pesar de trabajar sobre una diana farmacológica conocida se puede intentar partir de estructuras químicas totalmente novedosas, con la esperanza de encontrar estructuras que presenten un perfil de actividad o seguridad diferencial respecto a los fármacos ya disponibles.

Una segunda posible aproximación para la obtención de nuevos fármacos, consiste en la identificación y validación de nuevas dianas farmacológicas que permitan una aproximación alternativa y novedosa. Ésto suele producirse a raíz de la consecución de nuevos descubrimientos en biología y medicina, y suele ser fruto de la elaboración de nuevas hipótesis sobre la implicación de ciertos receptores, enzimas o mecanismos fisiológicos en determinadas condiciones patológicas. Aunque esta aproximación resulta más arriesgada desde el punto de vista de la consecución del éxito empresarial, es sin lugar a dudas una de las grandes fuerzas motrices de la investigación biomédica, de la que se han obtenido grandes avances en el tratamiento farmacológico. En este sentido, los fármacos experimentales objeto de estudio en este trabajo son fruto de la voluntad de la empresa farmacéutica ESTEVE de obtener nuevas entidades químicas con propiedades terapéuticas, activas mediante un mecanismo farmacológico novedoso.

1.2. La esquizofrenia

La esquizofrenia es una enfermedad del sistema nervioso central (SNC) que se caracteriza por la presentación de alteraciones en la forma y en el contenido del pensamiento, el estado de ánimo y la relación del individuo con su entorno. La enfermedad afecta a lo que se considera los principales atributos del ser humano: lenguaje, pensamiento, percepción, afecto y vivencia del yo. Si bien la conciencia y la capacidad intelectual permanecen generalmente conservadas, con el tiempo se pueden desarrollar deficiencias cognitivas.

Las primeras descripciones sobre enfermedades compatibles con un cuadro de esquizofrenia aparecen en documentos de las antiguas civilizaciones romana y griega. Sin embargo, no es hasta finales del siglo XIX cuando la esquizofrenia pasa a ser reconocida como una condición

patológica única y diferenciable de otras condiciones psiquiátricas, siendo bautizada por el psiquiatra alemán Emil Kraepelin, en el año 1893, con el término latín de *dementia praecox* (demencia precoz). En el año 1908, el psiquiatra suizo Eugen Bleuler acuña para esta enfermedad el término de esquizofrenia, derivado de las palabras griegas *schizo* (partido) y *phrenos* (mente).

En términos generales se acepta una prevalencia, a nivel mundial, del 1% de la población adulta, con una incidencia de entre 7,5 y 16,3 casos anuales por cada 100.000 habitantes (Artigas, 2007). La esquizofrenia afecta a la mayoría de las personas por primera vez a una edad cercana a los 20 años. Si bien la incidencia es similar en ambos sexos, existen diferencias en cuanto al tiempo de inicio, produciéndose las primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad habitualmente a la edad de 15-25 años en hombres y 25-35 años en mujeres. A pesar de que la esquizofrenia es una enfermedad de etiología aún desconocida, en el sentido que las causas o mecanismos que conducen a su desarrollo y manifestación no están claramente definidos, se le supone un componente genético ya que se ha comprobado que la probabilidad de padecer esquizofrenia es mayor en personas con familiares afectados.

La manifestación clínica de la esquizofrenia se caracteriza por la presentación de una serie de síntomas que han sido clasificados como positivos, negativos y cognitivos. Los denominados síntomas positivos se caracterizan por una pérdida de contacto con la realidad, e incluyen alucinaciones, delusión (o delirio psicótico), percepción falsa (típicamente auditiva), paranoia, y alteración de la conducta (Andreasen *et al.*, 1990). Generalmente, estos signos se manifiestan de forma esporádica, si bien, en ocasiones, con el tiempo pueden llegar a ser crónicos. Los síntomas negativos se caracterizan por un estado en el que los procesos emocionales o de conducta están disminuidos o ausentes. Incluyen apatía, falta de iniciativa y motivación, pérdida de capacidad de socialización y mutismo. Los síntomas negativos son en general más persistentes que los positivos y, aunque aparentemente son menos dramáticos, son más constantes e inhabilitantes. Los síntomas cognitivos implican alteraciones en funciones cognitivas básicas tales como atención, concentración, aprendizaje, funciones ejecutivas (capacidad de planificar, iniciar y realizar acciones dirigidas a un objetivo) y memoria (en particular la memoria inmediata). Junto con los síntomas negativos, la pérdida de capacidad cognitiva juega un papel importante en el deterioro funcional de los pacientes esquizofrénicos (Artigas, 2007).

Asimismo, en muchos pacientes se observa lo que se denomina síntomas afectivos, como ansiedad y depresión. Se considera que estos síntomas contribuyen de forma significativa a la alta incidencia de suicidios (10%) entre los pacientes esquizofrénicos. En este sentido, los pacientes esquizofrénicos presentan, respecto a la población general, una mayor probabilidad de abuso y adicción a drogas y alcohol (Radomsky *et al.*, 1999).

Durante años, la investigación farmacológica en el tratamiento de la esquizofrenia ha estado dominada principalmente por tres hipótesis. Aunque cada una de ellas se centra en la alteración de la funcionalidad de los neurotransmisores dopamina (DA), serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) y glutamato, respectivamente, éstas no son mutuamente excluyentes dado que la alteración de uno o más sistemas neuronales pueden dar lugar a cambios adaptativos en otros. Las figuras 1.1, 1.2 y 1.3 muestran las estructuras químicas de DA, 5-HT y glutamato, respectivamente.

La hipótesis dopaminérgica postula la hiperactividad de la neurotransmisión dopaminérgica cerebral como factor etiológico de la sintomatología de la esquizofrenia. Como posibles mecanismos moleculares de la hiperactividad se ha sugerido: el exceso de liberación de DA por las neuronas dopaminérgicas, la presencia de receptores dopaminérgicos hipersensitivos, y el incremento en el número de receptores dopaminérgicos presentes (Carlsson y Lindquist, 1963; Carlsson, 1988).

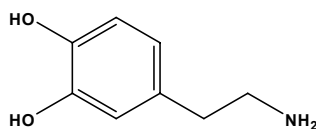


Figura 1.1. Estructura química de la dopamina.

La hipótesis serotoninérgica atribuye la sintomatología de la esquizofrenia a una disfunción del sistema serotoninérgico, con un aumento de la actividad neuronal de la 5-HT en el SNC. La hipótesis sobre la implicación de la 5-HT en la patofisiología de la esquizofrenia se fundamenta, principalmente, sobre dos evidencias indirectas. Por un lado, ciertos agonistas (sustancias que al unirse al receptor provocan el efecto fisiológico en la célula) no selectivos para el receptor 5-HT, como el LSD (dietilamina del ácido lisérgico), o los agonistas para el receptor 5-HT₂, tienen propiedades alucinógenas (Nichols, 2004). Por otro lado, los denominados antipsicóticos atípicos, como la clozapina, presentan actividad antagonista (al unirse al receptor bloquean su activación por sustancias agonistas) sobre los receptores de 5-

HT, mostrando una mayor afinidad por los receptores de la familia 5-HT₂ (subtipos 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}) que por los receptores D₂ de DA (Meltzer, 1999).

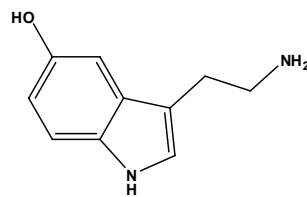


Figura 1.2. Estructura química de la serotonina.

La hipótesis glutamatérgica se fundamenta en la disminución de la funcionalidad del receptor NMDA (debe su nombre al ligando selectivo N-metil-D-aspartato), uno de los receptores sobre el que se une el glutamato (Javitt y Zukin, 1991; Tsai y Coyle, 2002). El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro, estando implicado en aproximadamente el 40% de las sinapsis cerebrales. Se considera probable que la alteración en la neurotransmisión glutamatérgica pueda influir sobre la comunicación entre las áreas cerebrales potencialmente implicadas en la manifestación de los síntomas de la esquizofrenia. La administración de antagonistas para el receptor NMDA, como fenilciclidina (PCP) y ketamina, no sólo induce síntomas positivos, negativos y deficiencias cognitivas que se asemejan a los síntomas característicos de la esquizofrenia (Javitt y Zukin, 1991; Krystal *et al.*, 1994), sino que también acentúan los síntomas clínicos en pacientes esquizofrénicos (Krystal *et al.*, 2003).

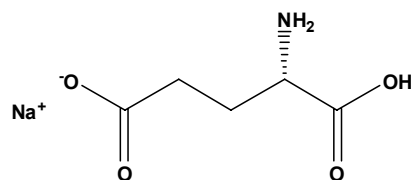


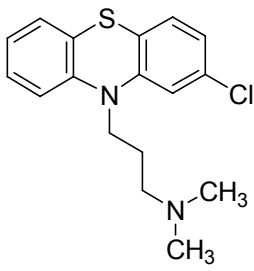
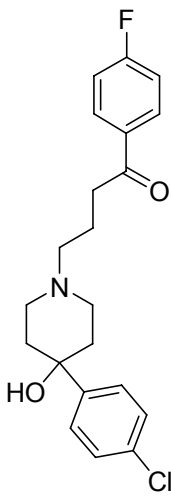
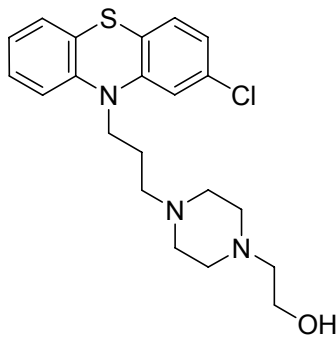
Figura 1.3. Estructura química del glutamato monosódico.

Los denominados fármacos antipsicóticos constituyen la base del tratamiento farmacológico de la esquizofrenia. En la práctica clínica se identifican dos grandes familias de fármacos: los denominados “antipsicóticos típicos”, también conocidos como “clásicos” o “de primera generación”, y los denominados “antipsicóticos atípicos”, de posterior aparición.

El primer fármaco antipsicótico descubierto, en cierta manera de forma accidental, fue la clorpromazina. Comercializada inicialmente como fármaco antiemético, fue en el transcurso de un ensayo clínico en el que se evaluaba su actividad sedativa en pacientes esquizofrénicos

donde quedaron de manifiesto sus propiedades antipsicóticas (Bortolozzi *et al.*, 2007). La clorpromazina fue aprobada para el tratamiento psiquiátrico en 1954, y pronto fue seguida por otros fármacos como el haloperidol y la perfenazina. Esta primera generación de fármacos se conoce bajo el nombre de “antipsicóticos típicos”, para así diferenciarlos de los desarrollados con posterioridad. En consonancia con la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia, los antipsicóticos típicos tienen como base farmacológica la inhibición sobre los receptores D₂ de DA, con la consiguiente reducción de la transmisión dopaminérgica. La aparición de los antipsicóticos típicos, supuso un gran avance en el tratamiento de los pacientes esquizofrénicos, sustituyendo terapias mucho más agresivas y menos eficientes, como los choques de insulina, la terapia electroconvulsiva o la lobotomía (destrucción de las vías nerviosas de los lóbulos frontales del cerebro), procedimientos habituales en esa época (Bortolozzi *et al.*, 2007). En la tabla 1.1. se muestra la estructura química de algunos antipsicóticos típicos.

Tabla 1.1. Estructura química de algunos antipsicóticos típicos.

Clorpromazina	Haloperidol	Perfenazina
		

Si bien demostraron ser especialmente eficientes en la reducción de los síntomas positivos, estos fármacos se caracterizan por la inducción de efectos extrapiramidales en muchos pacientes, incluyendo disquinesia tardía (movimientos involuntarios repetitivos), acatisia, espasmos musculares y distonía, así como trastornos menstruales, disfunción sexual y reducción de la libido (como consecuencia de la inducción de incrementos en los niveles de prolactina) (Jeste y Caligiuri, 1993; Casey, 1993; Maguire, 2002). La inducción de este cuadro

de efectos adversos está ligada a la propia actividad farmacológica de estos fármacos y a su falta de selectividad en el bloqueo de los receptores de DA. Mientras que el bloqueo de los receptores D₂ en las vías mesolímbicas dopaminérgicas se cree que es el responsable de las propiedades terapéuticas, la falta de selectividad y el consiguiente bloqueo de estos receptores en otras vías dopaminérgicas, como el sistema nigroestriatal (implicado en la función motora) y la vía tuberoinfundibular (implicada en la secreción hormonal), serían responsables del cuadro de efectos adversos. Asimismo, el bloqueo de la función dopaminérgica en el córtex prefrontal afectaría de forma adversa a la función cognitiva (Bortolozzi *et al.*, 2007; Artigas, 2007).

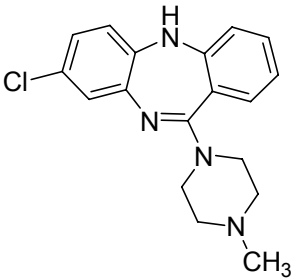
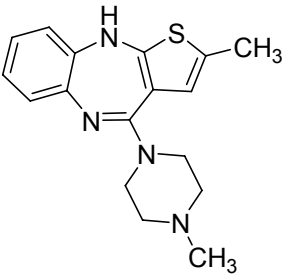
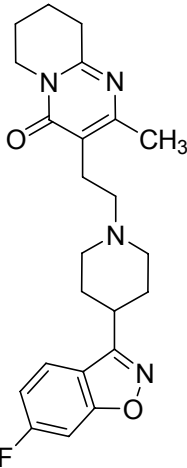
La inducción de efectos extrapiramidales es el efecto adverso más característico y dramático asociado a la administración de los antipsicóticos típicos, generando un cuadro clínico que presenta cierta similitud con la enfermedad de Parkinson. Ésta se caracteriza por un marcado descenso en los niveles de DA en el sistema nigroestriatal y la presencia de síntomas clínicos de temblores, rigidez y lentitud de movimientos, entre otros. Este cuadro de efectos adversos limita la eficacia de estos fármacos y conlleva una disminución en el grado de cumplimiento del tratamiento.

La época de los denominados antipsicóticos atípicos se inicia con la aprobación por la FDA (*Food and Drug Administration, USA*), en el año 1989, de la clozapina para el tratamiento de la esquizofrenia. Curiosamente, la clozapina se había comercializado en Europa en el año 1971, siendo retirada del mercado en el año 1975 al observarse una alta incidencia de agranulocitosis asociada a su administración. Posteriormente, fue nuevamente aprobada al demostrarse su superior eficacia en el tratamiento de la esquizofrenia resistente. Este fármaco demostró una clara actividad antipsicótica clínica en ausencia de la inducción de efectos extrapiramidales. Se acuñó así el término de “antipsicóticos atípicos” para describir a aquellos fármacos que presentaban un menor riesgo de inducir efectos extrapiramidales (Kerwin, 1994). La acción de estos fármacos se produce principalmente a través del bloqueo de receptores serotoninérgicos (5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}), siendo su grado de inhibición sobre los receptores D₂ de DA muy inferior al de los antipsicóticos típicos. La clozapina pronto fue seguida en el mercado por fármacos como la olanzapina y la risperidona, entre otros. En la tabla 1.2 se presenta la estructura química de algunos de estos antipsicóticos atípicos.

A pesar de que presentan una menor incidencia de efectos extrapiramidales, los antipsicóticos atípicos no están exentos de otro tipo de efectos adversos. Destacan entre ellos, la

agranulocitosis asociada a la administración de clozapina, así como el aumento en los niveles de prolactina, el incremento de peso, la hiperglicemia y la diabetes, producidos en individuos susceptibles (Allison *et al.*, 1999; Green *et al.*, 2000). Estos efectos llevan asociados una disminución de la calidad de vida y pueden interferir con el cumplimiento del tratamiento.

Tabla 1.2. Estructura química de algunos antipsicóticos atípicos.

Clozapina	Olanzapina	Risperidona
		

La ausencia de fármacos que permitan un tratamiento adecuado de los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia, el tiempo de acción retardado de los tratamientos disponibles, y la necesidad de disponer de fármacos con un perfil de seguridad más favorable, hace que el tratamiento de la esquizofrenia siga siendo, a día de hoy, una necesidad no cubierta adecuadamente (Jackson *et al.*, 1994). Esto ha conllevado la búsqueda de nuevas sustancias activas con mecanismos de acción novedosos.

La observación de que algunos antipsicóticos típicos como la clorpromazina, el haloperidol y la perfenazina, todos ellos antagonistas para el receptor D_2 , también presentan afinidad hacia el receptor sigma (σ), sugirió la hipótesis de que moléculas con afinidad por este receptor podrían ser eficaces en el tratamiento de la esquizofrenia (Takahashi *et al.*, 1999). Esta hipótesis se vio reforzada por las propiedades antipsicóticas demostradas por diferentes ligandos para el receptor σ , tanto en modelos animales como en ensayos clínicos (Guitart *et al.*, 1999; Huber *et al.*, 1999; Guitart *et al.*, 2004). Los receptores σ están presentes en neuronas dopaminérgicas (Karasawa *et al.*, 2002) y los ligandos σ_1 modulan de forma

eficiente la neurotransmisión dopaminérgica, afectando a la síntesis, metabolismo y liberación de dopamina, y a la actividad eléctrica de las neuronas dopaminérgicas (Maurice *et al.*, 2002). Diferentes líneas de investigación sugieren, asimismo, la posible mediación de los receptores σ en los efectos adversos de los antipsicóticos sobre el sistema motor. En este sentido, destaca la especial abundancia de receptores σ en los núcleos cerebrales implicados en los movimientos oculares, faciales, linguales y de masticación, que suelen estar afectados en los tratamientos con neurolépticos (Matsumoto y Pouw, 2000).

1.3. El receptor sigma como diana farmacológica

La existencia del receptor σ fue propuesta por primera vez por Martin y colaboradores, y su nombre deriva de la primera letra (S) del código de identificación del ligando experimental SKF-10,047 empleado en sus experimentos (Martin *et al.*, 1976). Inicialmente, fue considerado de forma errónea un nuevo subtipo de receptor opióide, demostrando en estudios posteriores un perfil de unión claramente diferenciable al de los receptores opioides. En la actualidad, el receptor σ es considerado como una nueva familia de receptores diferenciable de otras familias de receptores de neurotransmisores u hormonas.

El receptor σ presenta una distribución amplia en el cuerpo, siendo expresado en cerebro y en órganos periféricos como corazón, pulmón, hígado, riñones, células del sistema inmunitario, tracto gastrointestinal y órganos reproductores (Ronsisvalle *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2003). Se considera que existen principalmente dos subtipos de receptores σ , denominados respectivamente sigma-1 (σ_1) y sigma-2 (σ_2), diferenciables en base a sus propiedades farmacológicas y distribución anatómica (Quirion *et al.*, 1992; Hellewell *et al.*, 1994).

Hasta la fecha, sólo se ha clonado el gen del receptor σ_1 , permaneciendo el del σ_2 aún por caracterizar molecularmente. El gen del receptor σ_1 se clonó por primera vez en el año 1996, y su proteína consta de 223 aminoácidos con uno o dos posibles dominios transmembrana (figura 1.4) (Hanner *et al.*, 1996; Kekuda *et al.*, 1996). No existe, hasta la fecha, un modelo tridimensional o una estructura cristalográfica del receptor σ_1 . Éste presenta una alta homología entre especies, con una alta similitud (90-97%) del receptor humano frente al de otras especies como rata, ratón y cobaya, lo que sugiere una función altamente conservada. Su secuencia no presenta similitud con ninguna otra proteína de mamífero (Hanner *et al.*, 1996). A pesar de presentar un 30,3% de identidad y un 66,4% de similitud con la C8-C7 esterol

isomerasa fúngica (enzima implicada en la ruta de biosíntesis del colesterol), los receptores σ_1 no presentan actividad esterol isomerasa (Moebius *et al.*, 1997a; 1997b). Se cree que el receptor σ_1 tiene una localización intracelular en estado de reposo, permaneciendo anclado a la membrana del retículo endoplasmático. En su estado activado, tras la unión de un ligando, se transloca a otros orgánulos celulares, así como a la membrana celular (Hayashi y Su, 2001; 2003).

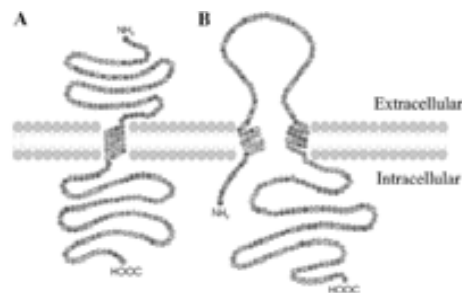


Figura. 1.4. Estructura secundaria propuesta para el receptor σ_1 con uno (A) o dos (B) posibles dominios transmembrana (Guitart *et al.*, 2004).

Hasta la fecha se desconocen con detalle los mecanismos subcelulares de transducción de señal, mediante el cual los ligandos para el receptor σ inducen su efecto. Algunos sistemas de segundos mensajeros, como la movilización de calcio intracelular o la formación de inositol trifosfato por la fosfolipasa C, se han asociado a la acción de los receptores σ (Guitart *et al.*, 2004). Los esteroides neuroactivos, como la progesterona, se han propuesto como posibles ligandos endógenos para el receptor σ_1 (Hanner *et al.*, 1996). No obstante, su baja afinidad hacia el receptor (K_i : 300 nM, aproximadamente) y los bajos niveles endógenos a los que se encuentran presentes, hacen que se cuestione que puedan ser fisiológicamente activos.

La principal propiedad diferencial atribuida al receptor σ_1 es su papel modulador sobre la actividad de diferentes receptores y canales iónicos, actuando como un amplificador intracelular de la señales de transducción, modulando las descargas neuronales y la liberación de diversos neurotransmisores (Hayashi *et al.*, 2000; Hayashi y Su, 2001). En condiciones fisiológicas normales, los agonistas σ_1 no tendrían un efecto por sí mismos, sino que amplificarían la señal de transducción iniciada tras la estimulación de sistemas neuronales como los sistemas glutamatérgico y dopaminérgico (Su y Hayashi, 2003). La utilización de ligandos para el receptor σ_1 podría ser eficaz bajo condiciones patológicas en las que la expresión del receptor σ_1 no esté bien regulada.

En el SNC, el subtipo σ_1 está distribuido en regiones implicadas principalmente en la memoria y en funciones motoras, sensoriales y endocrinas (Ronsisvalle *et al.*, 2001). Diferentes estudios farmacológicos, bioquímicos y de conducta han sugerido un amplio número de potenciales indicaciones terapéuticas para los ligandos σ_1 , tales como esquizofrenia, potencial de abuso, estrés, depresión, aprendizaje, memoria, enfermedades demielinizantes, inflamación, enfermedades neurodegenerativas y analgesia (Corbera *et al.*, 2006). La presencia de receptores σ_1 en estructuras oculares como retina y lente, ha llevado a sugerir la posible utilización de los ligandos σ_1 en el tratamiento de patologías oculares como la degeneración retinal (Wang *et al.*, 2005; Bucolo y Drago, 2007).

Por su parte, el receptor σ_2 se cree implicado en la regulación de la proliferación celular y en el mantenimiento de la viabilidad celular, modulando la muerte celular mediante apoptosis. Esto ha sugerido la posible utilización de los ligandos σ_2 como agentes antitumorales (Crawford y Bowen, 2002). Mientras que el receptor σ_2 parece presentar una actividad proapoptótica, los receptores σ_1 aparentemente tienen una actividad antiapoptótica. El receptor σ_1 reprime el proceso de apoptosis cuando está sobreexpresado, induciendo los antagonistas σ_1 apoptosis en células tumorales (Wang *et al.*, 2005). La sobreexpresión de receptores σ_2 en diferentes tejidos tumorales ha sugerido la posible utilización de ligandos potentes y selectivos para este receptor como posibles marcadores de células tumorales en técnicas de diagnóstico (Colabufo *et al.*, 2004; 2006). En la figura 1.5 se representa la distribución por grupos terapéuticos propuestos para los diferentes compuestos, en fase de investigación y/o desarrollo, para los que se ha sugerido un mecanismo de acción mediado por interacción con el receptor σ .

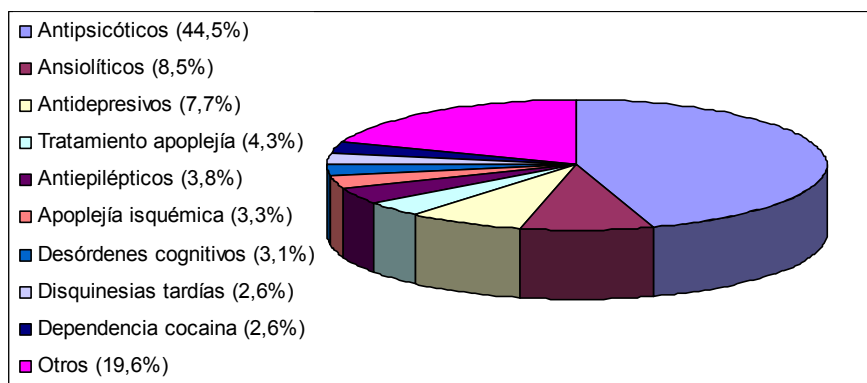


Figura 1.5. Utilización terapéutica propuesta para ligandos del receptor σ . Base de datos Integrity, Prous Science (Octubre 2008).

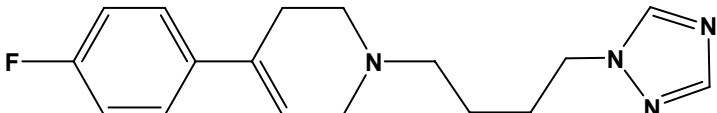
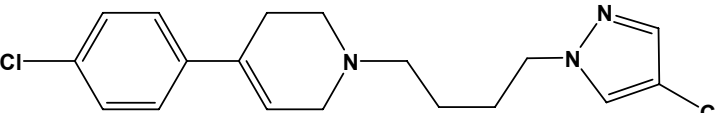
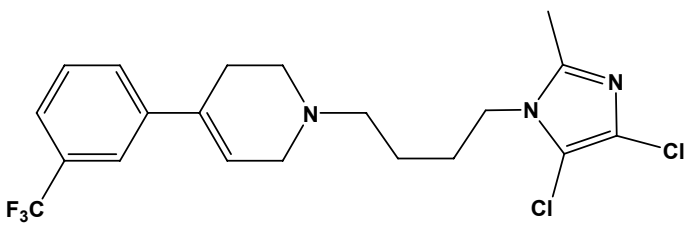
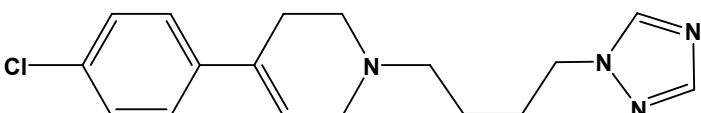
Dado el amplio abanico de posibles indicaciones terapéuticas, el receptor σ representa una aproximación novedosa en la obtención de nuevos fármacos con un mecanismo de acción innovador y con un perfil diferencial, respecto a las terapias actualmente disponibles.

1.4. El fármaco experimental E-5842 y otros derivados de la feniltetrahidropiridinil butilazolina

El fármaco experimental E-5842, o citrato de 4-(4-fluorofenil)-1,2,3,6-tetrahidro-1-[4-(1,2,4-triazol-1-il)butil]piridina (CAS-220120-14-9), es fruto de un programa de investigación de la empresa farmacéutica ESTEVE dirigido a la síntesis e identificación de nuevas entidades químicas con afinidad por el receptor σ_1 y con propiedades terapéuticas. Como parte de dicho programa, el E-5842 (tabla 1.3) fue seleccionado para su desarrollo como posible agente antipsicótico al presentar una alta afinidad por el receptor σ_1 ($K_i = 4$ nM), una funcionalidad compatible con la de un antagonista para este receptor, una baja a moderada afinidad frente a otros receptores del SNC (como los receptores D_1 , D_2 , D_3 y D_4 de DA y los receptores 5-HT₂ y 5-HT_{1A}), y mostrar actividad farmacológica en diferentes modelos animales predictivos de actividad antipsicótica (Guitart *et al.*, 1998). El E-5842 presentó, asimismo, propiedades fisicoquímicas de estabilidad y solubilidad, y propiedades biológicas de biodisponibilidad y estabilidad metabólica adecuadas para su desarrollo como posible fármaco.

Junto al E-5842 se obtuvo una extensa serie química de moléculas derivadas de la estructura común de la feniltetrahidropiridinil butilazolina (FTHPB), con propiedades de unión al receptor σ_1 . De las distintas estructuras obtenidas, tres productos fueron seleccionados como candidatos para su desarrollo como posibles fármacos, al presentar una alta afinidad y selectividad de unión frente al receptor σ_1 , y mostrar actividad en diferentes modelos preclínicos de actividad farmacológica. Estos fármacos experimentales derivados de la FTHPB y análogos estructurales del E-5842 se han identificado, por motivos de confidencialidad, como “compuesto A” (4-(4-clorofenil)-1-[4-(4-cloro-1H-pirazol-1-il)butil]-1,2,3,6-tetrahidropiridina, CAS 177945-11-8), “compuesto B” (1-[4-(4,5-dicloro-2-metil-1H-imidazol-1-il)butil]-1,2,3,6-tetrahidro-4-[3-(trifluorometil)fenil]piridina, CAS 177945-14-1), y “compuesto C” (4-(4-clorofenil)-1,2,3,6-tetrahidro-1-[4-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butil]piridina, CAS 255736-90-4). Sus estructuras químicas aparecen representadas en la tabla 1.3.

Tabla 1.3.: Estructura química y afinidad de unión al receptor σ_1 del fármaco experimental E-5842 y de los compuestos A, B y C.

Compuesto	Estructura química	K _i (nM) receptor σ_1 [*]
E-5842		4,0 [triazol]
A		14,0 [pirazol]
B		1,4 [imidazol]
C		8,0 [triazol]

[*]: Grupo arilo en el extremo butilo.

1.5. El proceso de desarrollo de un fármaco

Dado que los compuestos que han sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral corresponden a fármacos experimentales en fase de desarrollo, resulta necesario hacer una presentación de lo que representa este proceso.

El proceso de investigación y desarrollo (I+D) de un nuevo fármaco es un proceso secuencial, complejo y costoso, en tiempo y recursos, cuyo objetivo básico es establecer las propiedades de seguridad, eficacia y calidad de los nuevos agentes terapéuticos. Seguridad y eficacia son factores primordiales en el desarrollo de un fármaco, estando ambas propiedades intrínsecamente ligadas a la calidad del producto (estabilidad y pureza química). Las normativas y requerimientos legales para establecer dichas propiedades son de las más

estrictas del mundo empresarial. En este sentido, existe una amplia legislación nacional e internacional que establece los diferentes tipos de investigaciones a realizar, así como los requerimientos mínimos que han de cumplir estos estudios. A nivel nacional, es la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (dependiente del Ministerio de Sanidad y Consumo), la entidad reguladora responsable de velar por el cumplimiento de estas normativas. Para los países miembros de la Unión Europea esta función es ejercida a nivel supranacional por la Agencia Europea del Medicamento (EMA, *European Medicines Agency*). En este sentido, la directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo (y sus posteriores enmiendas) establece un código comunitario común sobre medicamentos para uso humano, sobre la base de los principios de seguridad, calidad y eficacia (CE, 2001).

Durante la fase de investigación tienen lugar las actividades dirigidas a la síntesis, evaluación e identificación de nuevas moléculas de interés para la indicación clínica en estudio. Esta fase se caracteriza por la síntesis de un gran número de estructuras químicas y la valoración de sus propiedades mediante pruebas de cribado de alto rendimiento (*high throughput screening*), indicadoras de potencial actividad sobre la diana biológica perseguida, o de posibles efectos adversos. Aquellas moléculas que presentan las propiedades más favorables son seleccionadas para su desarrollo.

La fase de desarrollo preclínico corresponde a la fase experimental en la que se realizan los estudios necesarios para hacer progresar al fármaco hacia la realización de los ensayos clínicos en humanos y su posterior comercialización. Esta fase se centra, de forma particular, en la valoración de las propiedades terapéuticas (ensayos farmacológicos), los efectos adversos (ensayos toxicológicos) y las propiedades de farmacocinética y metabolismo del fármaco candidato. Para ello se hace uso de sistemas *in silico* (programas informáticos) y de modelos experimentales preclínicos *in vitro* (extractos celulares, bacterias y cultivos celulares) e *in vivo* (animales de experimentación). En el caso concreto de los estudios preclínicos de seguridad, se considera que la fase de desarrollo comienza con el inicio de los primeros estudios de normativa realizados bajo las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), necesarios para la realización del ensayo clínico de primera administración en humanos. Durante esta fase también se profundiza en la valoración de las propiedades fisicoquímicas del nuevo fármaco (composición química, solubilidad, estabilidad, etc.), se optimiza el proceso de síntesis química (pasando de una escala de miligramos a kilogramos), se estudia la idoneidad para la elaboración de la forma

farmacéutica deseada (cápsulas, comprimidos, inyectables, aerosoles, etc.) y su formulación (compatibilidad con excipientes).

En la fase clínica de desarrollo, los fármacos que han superado satisfactoriamente los ensayos preclínicos se evalúan en humanos, con el objetivo de demostrar su eficacia y seguridad. Los ensayos clínicos se subdividen en varias fases. En los ensayos de Fase I, el fármaco se administra a un grupo reducido de voluntarios sanos, con el principal objetivo de comprobar su tolerabilidad y comportamiento farmacocinético. En los ensayos de Fase II el fármaco se administra a un grupo reducido de pacientes con el fin de evaluar su eficacia. Los ensayos de Fase III tienen como objetivo comparar en un grupo amplio de pacientes la eficacia y perfil de efectos adversos del fármaco en estudio, frente a un tratamiento estándar. La duración del periodo de tratamiento de los ensayos clínicos podrá aumentar de forma progresiva sobre la base de que se ha demostrado una seguridad adecuada en los estudios clínicos y preclínicos previos.

Se estima que la probabilidad de que un producto que entra en la fase de desarrollo preclínico consiga progresar hasta su puesta en el mercado es, en el mejor de los casos, inferior al 6% (Kola y Landis, 2004). Para la industria farmacéutica, la posibilidad de detectar lo antes posible, durante el proceso de desarrollo, aquellos factores que pueden conducir al fracaso de un proyecto sigue siendo un objetivo primordial. A principios de la década de 1990, el principal factor responsable del fracaso en el desarrollo de un fármaco era la presencia de propiedades inadecuadas de farmacocinética (PK) y biodisponibilidad. Este panorama ha cambiado gracias a la optimización de los procesos de selección de candidatos, mediante la incorporación de técnicas de cribado de alto rendimiento para valorar propiedades de absorción y metabolismo. En la actualidad, los principales factores responsables del fallo de un proyecto son la falta de eficacia (25%), aspectos de seguridad clínica (12%) y hallazgos toxicológicos en los ensayos preclínicos (20%) (figura 1.6) (Kola y Landis, 2004).

Se estima que el coste económico en llevar al mercado un nuevo producto farmacéutico puede oscilar entre 500 y 2000 millones de dólares, dependiendo de la indicación clínica propuesta (Adams y Brantner, 2006). A pesar del constante incremento que ha experimentado el gasto global en I+D, durante la última década se ha producido un descenso paulatino en el número de nuevas entidades químicas con propiedades terapéuticas aprobadas por las autoridades reguladoras (CMR, 2005). En términos generales, sólo aproximadamente un 11%

de los productos que entran en la fase de desarrollo clínico llegan a alcanzar el mercado (Kola y Landis, 2004).

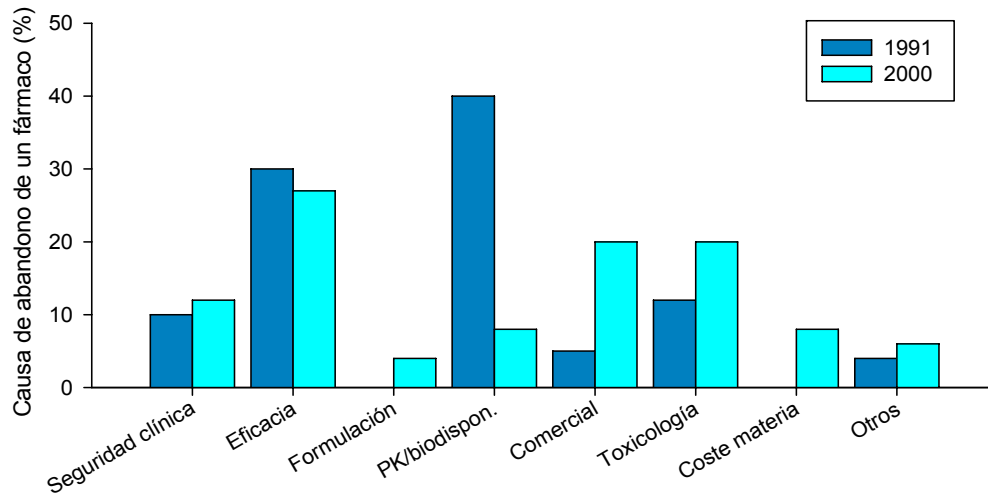


Figura 1.6.: Causas para el abandono de un fármaco durante su desarrollo. Tomado de Kola y Landis (2004).

La aprobación por las autoridades reguladoras de la comercialización de un nuevo fármaco, requiere que éste cumpla dos requisitos fundamentales: en primer lugar que el fármaco sea eficaz en el tratamiento de la indicación clínica propuesta, y en segundo lugar, pero no por ello menos importante, que sea seguro bajo las condiciones clínicas de uso propuestas. Los ensayos preclínicos de seguridad juegan un papel esencial en la consecución de este último objetivo.

1.6. Los estudios preclínicos de seguridad

Los estudios preclínicos de seguridad constituyen un componente esencial en el proceso de desarrollo de nuevas sustancias terapéuticas. Para los productos farmacéuticos, el concepto de seguridad es de especial importancia dado que implican la exposición intencionada a una sustancia generalmente ajena al organismo. Un fármaco sólo será susceptible de ser autorizado cuando el supuesto beneficio para el paciente, derivado de la acción terapéutica, compense el riesgo de sufrir algún efecto adverso. En consecuencia, el tipo o grado de efecto tóxico considerado como aceptable podrá variar en función de la indicación clínica propuesta.

El objetivo de los estudios preclínicos de seguridad es el de poner de manifiesto las propiedades toxicológicas de la sustancia en estudio, con el fin de evitar posibles efectos adversos en los seres humanos. La posibilidad de sufrir algún efecto adverso como consecuencia del tratamiento, deberá ser valorada en su extensión más amplia posible. En este sentido, y de acuerdo con la Directiva 2001/83/CE, la introducción en el mercado de la Unión Europea de un nuevo principio activo requiere que éste sea evaluado mediante estudios de toxicidad general (a dosis única y repetida), genotoxicidad, toxicidad local, toxicidad sobre la reproducción y potencial cancerígeno, entre otros (CE, 2001). Estos estudios tendrán como objetivo caracterizar los posibles efectos tóxicos de la sustancia ensayada e identificar los potenciales órganos diana (identificación del daño tóxico), establecer una relación dosis-respuesta y una relación con la exposición, y determinar la potencial reversibilidad de los efectos inducidos. Los resultados obtenidos deberán ser evaluados en base al conocimiento científico vigente, con el fin de valorar la naturaleza y severidad del efecto tóxico observado en el contexto del modelo experimental empleado, y la probabilidad de que éste se pueda producir en humanos expuestos al fármaco (valoración del riesgo). La información obtenida permitirá estimar una dosis inicial segura para los ensayos clínicos y la selección de parámetros de monitorización de posibles efectos adversos a incluir en los estudios en humanos. Eventualmente, la información obtenida en los ensayos preclínicos de seguridad podrá determinar el abandono del producto.

La valoración preclínica del perfil de seguridad de un fármaco es un proceso continuo, cuya complejidad y coste aumenta de forma progresiva a lo largo de las fases de I+D. Se inicia en las primeras fases de descubrimiento, continúa durante la fase de desarrollo de forma previa y en paralelo a la realización de los ensayos clínicos, y finaliza generalmente justo antes de la presentación de la solicitud de registro. Durante las fases iniciales de descubrimiento y selección de candidatos, se suele hacer uso de métodos *in silico* (sistemas informáticos predictivos de efecto tóxico) e *in vitro* de alto rendimiento, con el fin de identificar y descartar moléculas que presenten propiedades tóxicas consideradas desfavorables o inaceptables. Durante la fase de desarrollo se realizan los estudios preclínicos de seguridad (*in vitro* e *in vivo*) que darán cobertura a la realización de los ensayos clínicos en humanos.

La realización de los estudios preclínicos de seguridad durante la fase de desarrollo es un requerimiento legal y, en la actualidad, su realización viene regulada por las denominadas directrices ICH (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for*

Registration of Pharmaceuticals for Human Use; Conferencia Internacional de Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano). La elaboración de estas directrices ha supuesto la armonización de los requerimientos para el registro de nuevos productos farmacéuticos establecidos por las autoridades reguladoras de Europa (EMA), Estados Unidos (FDA) y Japón (MHW, *Ministry of Health and Welfare, Japan*), permitiendo una mejor utilización de recursos humanos, animales y materiales. Entre las directrices ICH destaca la directriz M3, en la que se establecen las diferentes áreas experimentales mediante las que se ha de valorar el potencial tóxico de un fármaco, así como el momento de su realización en relación con los ensayos clínicos propuestos y la indicación perseguida (ICH M3(R1), 2000).

Además de ser un requerimiento legal, la necesidad de evaluar las propiedades toxicológicas de un fármaco de forma previa a su administración en humanos, también queda establecida en la Declaración de Helsinki sobre Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Seres Humanos, elaborada por la Asociación Médica Mundial (WMA, 2002). En el punto 11 de este documento establece que *“La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados, y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno”*.

A pesar de la creciente utilización de métodos *in vitro*, algunos de los efectos tóxicos a evaluar requieren la utilización de animales de laboratorio, por aportar éstos un mayor valor predictivo frente a posibles efectos adversos en humanos (por ejemplo teratogenia y cancerogénesis). A pesar de la cada vez mayor sofisticación de las técnicas *in vitro*, hasta la fecha sólo los organismos intactos son capaces de reproducir las complejas interacciones que tienen lugar en los seres vivos. Con el fin de aumentar la capacidad de los ensayos de detectar posibles efectos adversos, es práctica habitual emplear dosis/concentraciones y periodos de exposición varios múltiplos superiores a los previstos en la utilización clínica del producto. En el caso concreto de los ensayos *in vivo* con animales, la utilización de dosis altas y tiempos de tratamiento prolongados también pretende compensar el número relativamente bajo de animales empleados en los estudios, respecto a la población final de pacientes pretendida.

El valor predictivo de los ensayos preclínicos con animales, respecto a la identificación de efectos tóxicos, se ha estimado en un 70–90% (EFPIA, 2006). Olson y colaboradores en una

revisión sobre un total del 150 productos farmacéuticos observaron una concordancia del 43 y del 63% entre los efectos adversos observados en humanos y los observados en roedores y no roedores, respectivamente, aumentando hasta el 71% al tomar en consideración ambas especies animales (Olson *et al.*, 2000). La mayor concordancia se daba para efectos hematológicos, cardiovasculares y gastrointestinales.

Desde el punto de vista de la valoración de riesgo, la evaluación del potencial genotóxico se aborda como una entidad diferenciable respecto al resto de efectos tóxicos a valorar. Como ya se ha comentado, uno de los principales objetivos de los estudios preclínicos de seguridad es valorar la posible reversibilidad de los efectos tóxicos inducidos. En este sentido, la inducción de daño genotóxico por un fármaco se considera de especial relevancia debido a la irreversibilidad de este efecto, su carácter acumulativo, y las serias consecuencias que puede tener para la salud humana.

1.7. Los ensayos de genotoxicidad

El concepto de genotoxicidad es un término amplio que hace referencia a cualquier tipo de daño causado sobre el material genético. La fijación y transmisión del cambio inducido en el DNA, bajo la forma de mutación génica, cambios cromosómicos estructurales o cambios cromosómicos numéricos, es considerado un suceso esencial en la inducción de defectos hereditarios (entre ellos las enfermedades genéticas humanas) y la aparición de procesos cancerígenos (ICH S2B, 1997). También se considera implicada en diversos procesos relacionados con la salud, como el envejecimiento, el fallo reproductivo, la toxicidad sobre el desarrollo y diversas enfermedades cutáneas, hematológicas u óseas originadas por mutaciones somáticas (Kramer, 1998; Erickson, 2003).

El posible papel de las sustancias químicas en la inducción de cambios genéticos asociados a defectos hereditarios y procesos cancerígenos en humanos ha llevado al desarrollo de un amplio número de ensayos para valorar el potencial genotóxico. En este sentido, los ensayos de genotoxicidad se definen como ensayos *in vitro* e *in vivo* diseñados para detectar agentes que inducen daño genético de forma directa o indirecta, mediante diversos mecanismos. En el contexto del proceso de desarrollo preclínico, los ensayos de genotoxicidad tienen como objetivo poner de manifiesto la capacidad del fármaco en estudio de inducir cambios en el

DNA. Los resultados obtenidos deben permitir valorar el potencial genotóxico del fármaco y el posible riesgo de daño genotóxico ante una eventual exposición en humanos.

Si bien en su origen fueron desarrollados para la detección de agentes capaces de producir defectos hereditarios, mediante la inducción de mutaciones en células germinales, en la actualidad los ensayos de genotoxicidad constituyen una herramienta esencial en la determinación de riesgo cancerígeno, evaluando sus efectos en células somáticas. Existen evidencias sustanciales de que las mutaciones que causan alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores en las células somáticas están implicadas en la inducción de cáncer en animales de experimentación y en humanos.

La demostración de actividad genotóxica por parte de un producto farmacéutico presenta, desde el punto de vista de la valoración de riesgo, una particularidad diferencial respecto al resto de efectos tóxicos evaluados. Ésta consiste en la asunción de la ausencia de un umbral de efecto. La valoración de riesgo de los denominados efectos tóxicos “clásicos o convencionales” (como por ejemplo la toxicidad hepática o renal), se basa sobre el concepto de que existen unos mecanismos fisiológicos homeostáticos que han de ser superados para que se llegue a manifestar el efecto tóxico. En consecuencia, para este tipo de efectos se asume la existencia de un umbral de efecto tóxico, es decir, una dosis o nivel de exposición al cual y por debajo del cual no se producirá el efecto tóxico. Por debajo de este nivel de exposición, la sustancia, a pesar de estar presente en su diana, será incapaz de producir toxicidad al no poder desencadenar la reacción bioquímica necesaria.

En el caso particular de los efectos genotóxicos, las autoridades reguladoras asumen que para sustancias genotóxicas *in vivo* no existe, *a priori*, un umbral de efecto. Este principio se fundamenta sobre el “dogma” de que, en términos de probabilidad, existe el riesgo de que la interacción de una única molécula genotóxica con el DNA del organismo pueda dar lugar a la formación de una lesión precancerosa o premutágena, y que el efecto producido sobre el material genético es irreversible y acumulativo. En consecuencia, aunque la probabilidad pueda ser extremadamente baja, no se puede definir un nivel de exposición asociado a riesgo genotóxico cero. En base a este principio teórico, para las autoridades reguladoras las sustancias genotóxicas presentan un mecanismo de acción carente de umbral de efecto por lo que, *a priori*, no son aplicables los conceptos de nivel de exposición seguro y margen de seguridad.

Esta particular interpretación simplista, tiene su origen en una decisión de política científica con el objetivo de plantear una aproximación cautelosa de protección sanitaria. No obstante, ésta es ampliamente cuestionada, ya que no toma en consideración procesos biológicos de homeostasis y reparación, e ignora el concepto de hormesis (hace referencia a los efectos beneficiosos de la exposición a niveles subtóxicos), una observación ampliamente reconocida en cancerogénesis química y radiológica (Calabrese y Baldwin, 2003; Humfrey, 2007). En la actualidad, se es consciente de la naturaleza compleja de los mecanismos que conducen al desarrollo de los procesos cancerosos, mas allá de la simple asunción de que una molécula cancerígena causa una mutación que, mediante un proceso azaroso, conduce al desarrollo tumoral (Humfrey, 2007), así como de la existencia de procesos o mecanismos, que no siendo directamente genotóxicos, también parecen jugar un papel en la cancerogénesis (Kramer, 1998).

No obstante, y sobre la base del principio de seguridad, para las autoridades reguladoras la exposición de seres humanos a un fármaco con propiedades genotóxicas representa un riesgo no aceptable, salvo casos excepcionales como puede ser el tratamiento de enfermedades terminales o enfermedades de riesgo vital carentes de tratamientos alternativos. En consecuencia la obtención de resultados positivos en los ensayos de genotoxicidad puede tener un fuerte impacto sobre la viabilidad del proceso de desarrollo de un fármaco. A pesar de ello, las autoridades reguladoras reconocen, sobre una base pragmática, la existencia de niveles de exposición a agentes genotóxicos que no están asociados a riesgo cancerígeno (o asociados a riesgo cancerígeno “aceptable”). En este sentido, la EMEA acepta que la presencia en los productos farmacéuticos de impurezas genotóxicas a niveles que no excedan de una dosis de 1,5 µg/día no está asociada a riesgo cancerígeno relevante (EMEA, 2006).

La valoración del potencial genotóxico de un fármaco es un campo de trabajo fuertemente regulado por directrices internacionales. Entre éstas destacan las directrices de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE, *OECD*), que corresponden a protocolos experimentales específicos y detallados para ensayos individuales con sustancias químicas en general, y las directrices ICH, específicas para productos farmacéuticos, que hacen referencia a aspectos generales de diseño y estrategia. Los ensayos empleados habitualmente corresponden a ensayos bien establecidos y ampliamente aceptados por la comunidad científica internacional. Estos ensayos se realizan siguiendo protocolos rigurosos que optimizan la capacidad de detectar un posible potencial genotóxico, con el fin

de asegurar que un resultado negativo puede ser aceptado con un grado suficiente de confianza. Para algunos de estos ensayos existen directrices de la OCDE que describen una metodología estandarizada y aceptada a nivel internacional. Para otros, existen directrices en elaboración (como es por ejemplo el caso del ensayo de micronúcleos *in vitro*) o se dispone de recomendaciones elaboradas por grupos internacionales de expertos. En el contexto del desarrollo preclínico, la realización de los ensayos de genotoxicidad queda regulada por tres directrices ICH. La directriz S2A establece los requerimientos mínimos, en cuanto a diseño experimental, que han de cumplir los estudios de genotoxicidad para ser considerados válidos (cepas bacterianas a emplear, grado mínimo de toxicidad a alcanzar, interpretación de resultados, etc.) (ICH S2A, 1995). La directriz S2B establece los efectos genéticos a valorar y los ensayos mínimos a realizar, estableciendo lo que se denomina la “batería estándar” (ICH S2B, 1997). Por último, la directriz M3(M) establece cuando, en el contexto del desarrollo preclínico y en concreto respecto a los ensayos clínicos, se han de realizar estos ensayos (ICH M3(R1), 2000). Los denominados productos biotecnológicos o biofarmacéuticos constituyen por su naturaleza biológica un caso particular, y como tal quedan regulados por una directriz ICH específica (ICH S6, 1998).

1.8. La batería estándar

De acuerdo con las actuales recomendaciones científicas y los requerimientos de las autoridades reguladoras, el potencial genotóxico de una nueva entidad química con fines terapéuticos ha de ser valorado mediante la realización de una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* de genotoxicidad (ICH S2B, 1997; Zeiger, 1998). Esto responde principalmente a dos objetivos. El primero es reducir el riesgo de obtener falsos negativos, en el sentido que sustancias con potencial genotóxico real no sean detectadas adecuadamente. El segundo objetivo es poder detectar posibles efectos genotóxicos en los diferentes niveles estructurales de organización del DNA. Existen agentes químicos que sólo (o de forma preferente) producen mutaciones puntuales a nivel génico o aberraciones cromosómicas (roturas y reorganizaciones), y ambos sucesos son considerados de similar relevancia en los procesos cancerígenos (Zeiger, 1998). Los ensayos que valoran la inducción de aberraciones cromosómicas estructurales también permiten valorar, en cierta forma, la inducción de aberraciones cromosómicas numéricas. Aunque en la actualidad existe una mayor evidencia en favor de la actuación como carcinógenos completos de sustancias que inducen

aberraciones estructurales frente a aquellas que modulan exclusivamente el número cromosómico (como los inhibidores del huso mitótico o de la citocinesis), ambos tipos de aberraciones cromosómicas se consideran implicados en la inducción de defectos congénitos y abortos (Norppa y Falck, 2003).

En este sentido, las directrices ICH sobre genotoxicidad recomiendan la realización, como mínimo, de los ensayos que integran la denominada batería estándar (ICH S2B, 1997). Éstos se muestran en la tabla 1.4.

Tabla 1.4: Ensayos recomendados como parte de la batería estándar de genotoxicidad.

Tipo de ensayo	Efecto genotóxico a evaluar y sistema experimental	Ensayo realizado de forma habitual
<i>In vitro</i>	Mutación génica en bacterias	Test de Ames
<i>In vitro</i>	Mutación génica y/o aberraciones cromosómicas en células de mamífero	Ensayo del linfoma de ratón o de aberraciones cromosómicas
<i>In vivo</i>	Aberraciones cromosómicas en células hematopoyéticas de roedor	Ensayo de micronúcleos en roedor

Los ensayos que integran esta batería son considerados eficaces y reproducibles, y de amplia aceptación por la comunidad científica internacional como predictivos de potencial genotóxico y cancerígeno. Estos ensayos se consideran complementarios entre ellos, y su realización debe permitir evaluar la capacidad de la sustancia en estudio de inducir mutación génica y aberraciones cromosómicas estructurales (clastogenicidad) y/o numéricas (aneugenicidad).

De acuerdo con la normativa vigente, los dos estudios *in vitro* se han de realizar de forma previa a la primera exposición de un ser humano al fármaco en investigación (ensayo clínico de Fase I) (ICH M3(R1), 2000). Antes del inicio de los ensayos clínicos de Fase II (estudios en pacientes) se debe completar la batería estándar mediante la realización del ensayo *in vivo* (ICH M3(R1), 2000). Dado que los estudios de Fase I están generalmente limitados a un número muy reducido de voluntarios con una duración de exposición corta, se considera aceptable limitar la valoración genotóxica a los estudios *in vitro*, que son considerados como la parte más sensible (capaces de detectar correctamente sustancias genotóxicas) de la batería. No obstante, es práctica habitual en la industria farmacéutica realizar los tres estudios de forma previa a la realización del primer ensayo clínico de Fase I (Baldrick, 2008).

En base al alto valor predictivo que se le atribuye a la batería estándar como conjunto, la obtención de resultados negativos en los tres ensayos permitiría concluir que la sustancia evaluada carece de potencial genotóxico y, salvo excepciones (ver apartado 1.9.), no será necesario realizar estudios adicionales de genotoxicidad. Si bien la obtención de un resultado positivo en alguno de los ensayos debe ser considerado, *a priori*, indicativo de potencial mutagénico o carcinogénico para humanos, los resultados obtenidos en una batería han de ser evaluados en su conjunto, en el contexto de los ensayos realizados y en base al conocimiento científico vigente. En este sentido, se acepta que bajo ciertas condiciones experimentales se pueden obtener resultados positivos no representativos de potencial genotóxico real para humanos (ver apartado 1.10). Este hecho habitualmente requerirá la realización de estudios adicionales dirigidos a determinar la relevancia de los resultados positivos obtenidos (ICH S2B, 1997).

Existe cierta variabilidad de opinión respecto al número, tipo y extensión de los ensayos que deberían integrar una batería mínima de ensayos de genotoxicidad. Para algunos investigadores la inclusión de un mayor número de ensayos conllevaría el incremento en el número de resultados positivos irrelevantes obtenidos, reduciendo la credibilidad de los ensayos de genotoxicidad. Para otros, la inclusión de un mayor número de ensayos reduciría la incidencia de falsos negativos, reforzando la credibilidad de los ensayos de genotoxicidad (Müller *et al.*, 1999). Si bien se han sugerido diferentes estrategias alternativas a la de la batería estándar, en todas ellas se propone una aproximación secuencial en la que los resultados obtenidos en unos primeros ensayos, que valoran efectos sobre los diferentes niveles estructurales del DNA, supeditan la realización de estudios adicionales (Pfuhrer *et al.*, 2007).

1.8.1. Los ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* de genotoxicidad suelen corresponder a sistemas sencillos que, empleando células aisladas, favorecen la exposición a la sustancia en estudio y permiten valorar de una forma muy directa la inducción de daño genotóxico. Presentan como ventajas, respecto a los ensayos *in vivo*, el bajo coste, la rapidez de realización y la no utilización de animales, estando esto último en línea con el principio de las “tres erres” (Reemplazar, Reducir y Refinar) cuyo objetivo es reducir el impacto de las actividades científicas sobre el bienestar animal (Russell y Burch, 1959). Una ventaja adicional es la baja cantidad de

producto requerido para su realización, factor éste importante en la valoración de fármacos debido al alto coste económico que implica la obtención de estas sustancias en las fases iniciales de I+D, cuando los procesos de síntesis química no están aún optimizados. Asimismo, los ensayos *in vitro* se caracterizan por presentar una mayor sensibilidad en la detección de genotóxicos carcinógenos, en parte gracias a que la exposición de las células diana resulta menos problemática que en los ensayos *in vivo* (Müller *et al.*, 1999; Kirkland *et al.*, 2007b). Los ensayos *in vitro* recomendados como parte de la batería estándar de genotoxicidad son el test de Ames y el ensayo de inducción de aberraciones cromosómicas en células de mamífero o el ensayo del linfoma de ratón. Estos sistemas experimentales, en los que se emplean tanto células procariotas como eucariotas (células de mamífero), toman en consideración la inducción de posibles efectos adversos en los diferentes niveles estructurales de organización del material genético.

El test de Ames constituye el ensayo de genotoxicidad en procariotas por excelencia, destacando por su robustez, sencillez, reproducibilidad, bajo coste y alto valor predictivo en la identificación de carcinógenos en roedor. Fue propuesto a principios de la década de 1970 por Ames y colaboradores para la detección de mutágenos químicos, y la utilización de diferentes cepas bacterianas como indicadores de daño genético se sustenta en el hecho de que cada una de ellas porta mutaciones específicas que revierten frente a una clase particular de compuestos químicos (Ames *et al.*, 1975). En su versión actual, el test de Ames se fundamenta en la utilización de una batería de cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli* auxotróficas para los aminoácidos histidina y triptófano, respectivamente. La exposición a ciertos agentes genotóxicos hace que algunas de las bacterias de la población tratada sufran cambios genéticos que hacen que reviertan hacia un estado autotrófico para histidina/triptófano, de forma que pueden crecer en un medio carente de ellos. El efecto genético valorado corresponde a la inducción de mutación génica por cambio de base o por corrimiento en el patrón de lectura, como consecuencia de la inserción o delección de bases en el DNA. En el caso particular de los productos farmacéuticos, el ensayo se realiza siguiendo un protocolo experimental establecido de forma detallada en directrices internacionales que requiere la utilización de un mínimo de cinco cepas bacterianas, cada una de las cuales es específica para la inducción de un tipo concreto de cambio sobre el DNA (ICH S2A, 1995; OECD, 1997a).

El ensayo de aberraciones cromosómicas (AbCr) *in vitro* evalúa la inducción de cambios cromosómicos estructurales y numéricos en células de mamífero, siendo realizado habitualmente tanto en cultivos primarios de linfocitos humanos como en líneas celulares de mamífero. El tipo de daño genético evaluado en este ensayo corresponde a un nivel estructural superior de organización del DNA, y permite detectar la inducción de aneuploidía, un efecto no valorable en bacterias. Si bien el tipo de aberraciones cromosómicas detectadas y valoradas en este tipo de ensayo son generalmente incompatibles con la viabilidad celular (roturas o intercambios de cromátidas y/o cromosomas), los cambios inducidos se consideran indicativos de la capacidad de la sustancia en ensayo de producir cambios estructurales de menor escala compatibles con la supervivencia celular, tales como pequeñas deleciones y reestructuraciones cromosómicas estables (translocaciones e inversiones), consideradas de gran importancia en el proceso de cancerogénesis.

El ensayo del linfoma de ratón (ML) se fundamenta en la detección de la pérdida de funcionalidad del gen de la timidina kinasa (*tk*) en células de la línea celular de linfoma de ratón L5178Y*tk*^{+/-} (clon 3.7.2c) heterocigótica para el gen *tk*. La timidina quinasa (TK), enzima clave en la biosíntesis del nucleótido timidina trifosfato, presenta la particularidad de que es capaz de incorporar en la célula la sustancia trifluorotimidina (TFT), un análogo tóxico de la timidina que causa la detención del ciclo celular. La exposición a un agente genotóxico podrá producir la pérdida de funcionalidad del único gen *tk* funcional en la célula (ubicado en el brazo q del cromosoma 11), de tal forma que la ausencia de actividad TK le permitirá crecer en un medio que contiene TFT (Cole *et al.*, 1990). El ensayo del ML presenta la particularidad de que permite identificar la inducción tanto de mutación génica como de aberraciones cromosómicas, en base al tamaño de la colonia celular producida. Los análisis moleculares indican que mutantes de colonias grandes (de crecimiento rápido) tienden a representar sucesos en el gen (substitución de pares de bases y deleciones), mientras que los mutantes de colonia pequeña (de crecimiento lento) suelen implicar cambios genéticos de mayor escala, frecuentemente visibles como alteraciones cromosómicas (Kramer, 1998).

Como ocurre con el test de Ames, los ensayos de AbCr y ML se realizan siguiendo protocolos experimentales establecidos en directrices internacionales (ICH S2A, 1995; OECD, 1997b; 1997d).

El principal inconveniente de los ensayos *in vitro* consiste en que la utilización de un modelo unicelular necesariamente implica que éste constituya una simplificación de un ser vivo. Al

encontrarse fuera del contexto de un órgano o tejido funcional, el modelo unicelular no puede proporcionar una imagen fiable de un organismo biológico completo, siendo incapaz de reproducir su complejidad. Una importante limitación de los modelos *in vitro* es su baja capacidad metabólica inherente, lo que condiciona la bioactivación de posibles promutágenos como las aminas aromáticas o los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Esta circunstancia hace necesaria la adición de un sistema exógeno de activación metabólica, consistente generalmente en un extracto de hígado de rata (fracción microsomal S9). En el caso particular de las células de mamífero, su baja tolerancia a la fracción S9 limita los tiempos y concentraciones de exposición, que en ocasiones pueden ser insuficientes para generar niveles detectables de metabolitos genotóxicos (Müller *et al.*, 1999). Todo ello hace que los sistemas *in vitro* sean contemplados como modelos incompletos o limitados de los efectos biológicos que ocurren en los animales tras la administración de un potencial agente tóxico. Los ensayos *in vitro* de forma aislada permiten la detección de daño genotóxico, siendo necesaria la realización de estudios *in vivo* complementarios para una adecuada valoración del riesgo (Zeiger, 1998).

1.8.2. Los ensayos *in vivo*

A pesar de que se les atribuye, respecto a los ensayos *in vitro*, una menor sensibilidad en la detección de agentes cancerígenos, los ensayos *in vivo* de genotoxicidad son considerados un componente fundamental en la valoración de riesgo genotóxico (Müller *et al.*, 1999). Es una premisa en ciencia experimental que a mayor similitud entre el sistema experimental y la especie final de estudio (en este caso el ser humano), mayor es el valor predictivo y la relevancia atribuible al resultado experimental obtenido. En este sentido, los ensayos *in vivo* reproducen la complejidad de un organismo completo y, como tal, toman en consideración los procesos biológicos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). Estos procesos, que determinan la exposición real de la diana de efecto tóxico (el DNA) a la sustancia en estudio o a cualquiera de sus posibles metabolitos, no pueden ser reproducidos en los modelos *in vitro*. Asimismo, a los modelos *in vivo* se les atribuye un mayor nivel y grado de eficiencia en los mecanismos de reparación del DNA, así como un metabolismo de Fase I (activación de grupos funcionales) y Fase II (conjugación a moléculas endógenas) más equilibrado.

Los ensayos *in vivo*, al tomar en consideración la vía de administración y las propiedades de ADME del fármaco, ayudan a establecer la relevancia de resultados positivos obtenidos en

ensayos *in vitro*, al ponerlos en el contexto de un organismo completo. En este sentido la demostración de una adecuada exposición *in vivo* al fármaco (o a sus metabolitos) se considera un elemento esencial en la validez de la interpretación. En consecuencia, la obtención de un resultado positivo en un ensayo *in vivo* se toma como fuerte evidencia de potencial genotóxico, y puede condicionar seriamente la viabilidad del desarrollo de un fármaco.

Un motivo importante para la inclusión de ensayos *in vivo* en la batería de ensayos de genotoxicidad requeridos por las autoridades reguladoras, es evitar el posible fallo de los sistemas *in vitro* en detectar sustancias con verdadero potencial genotóxico *in vivo*. Aunque infrecuente, existen ejemplos en la literatura científica de sustancias con actividad genotóxica *in vivo* que no son detectadas de forma consistente en los ensayos *in vitro* que forman parte de la batería estándar. Sustancias como el benceno, la procarbazona, el uretano y la hidroquinona representan ejemplos clásicos de este tipo de sustancias (Müller *et al.*, 1999; 2003). Otros ejemplos, de sustancias con resultados positivos exclusivamente en estudios *in vivo*, se han presentado en una reciente revisión realizada por la *International Workshop on Genotoxicity Testing Initiative* (IWGT) (Tweats *et al.*, 2007b).

Los ensayos *in vivo* de genotoxicidad implican, como norma general, la utilización de roedores de laboratorio (rata o ratón). Si bien son varios los modelos experimentales disponibles, el ensayo de MN en eritrocitos de roedor es, en cualquiera de sus variantes, el ensayo *in vivo* más empleado en la valoración del potencial genotóxico de sustancias químicas. Como tal, es el ensayo *in vivo* recomendado por las autoridades reguladoras internacionales como parte de la batería estándar de ensayos de genotoxicidad (ICH S2B, 1997).

1.8.2.1. El ensayo de micronúcleos en roedor

Los micronúcleos (MN), también conocidos en hematología bajo el nombre de “cuerpos de Howell-Jolley”, se definen como estructuras cromatínicas presentes en el citoplasma, rodeadas de una membrana sin conexión aparente con el núcleo de la célula. Se originan a partir de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros que durante el proceso de división celular quedan retrasados en la fase de segregación cromosómica (anafase), no siendo incorporados en el núcleo de la célula hija. Estos cromosomas o fragmentos cromosómicos

permanecen visibles en el citoplasma de la célula interfásica bajo la apariencia de un pequeño núcleo o “micronúcleo” (figura 1.7). Los MN se pueden formar en cualquier tipo celular en proliferación, ya sea de forma espontánea (estrés oxidativo, defectos genéticos en puntos de control del ciclo celular o genes de reparación del DNA, deficiencias en cofactores para la síntesis/mantenimiento del DNA o en la maquinaria de segregación cromosómica) o inducida (exposición a clastógenos o aneunógenos) (Norppa y Falck, 2003; Bonassi *et al.*, 2007).

La utilización del examen de MN como ensayo *in vivo* para la detección de potencial genotóxico fue propuesta por primera vez a principios de la década de 1970, de forma independiente, por Schmid (Matter y Schmid, 1971; Schmid, 1975) y por Heddle (Heddle, 1973). El ensayo se fundamentaba en la capacidad de la sustancia en estudio de inducir la formación de MN en los eritroblastos (células precursoras de los eritrocitos) de médula ósea, un linaje celular en constante proliferación y por lo tanto ideal para valorar la inducción de daño genotóxico por agentes clastógenos (roturas cromosómicas) y aneunógenos (pérdida de cromosomas por interacción con el huso mitótico). Al producirse la extrusión del núcleo celular después de la última división de los eritroblastos, la presencia de MN es fácilmente reconocible en los eritrocitos anucleados. La presencia de ácido ribonucleico (RNA) en el citoplasma de los eritrocitos recién formados hace que estos adopten una coloración azul al ser teñidos con colorante Giemsa, siendo denominados eritrocitos policromáticos (EPC). La desaparición gradual del RNA hace que los eritrocitos más maduros adopten una coloración rosa-anaranjada, siendo denominados eritrocitos normocromáticos (ENC).

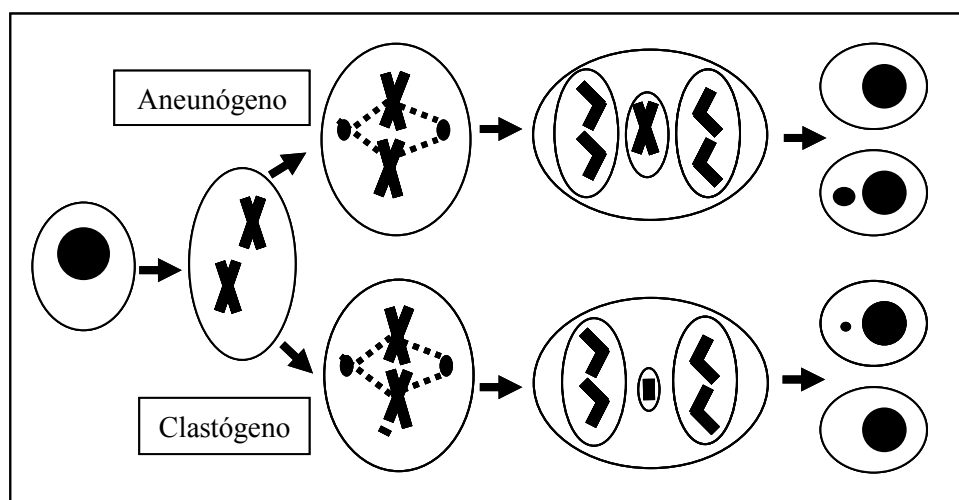


Figura 1.7. Formación de micronúcleos a partir de cromosomas o fragmentos cromosómicos por acción de agentes aneunógenos o clastógenos, respectivamente.

Se estima que se necesita un tiempo aproximado de 10-12 h para la primera aparición de MN en EPC tras la exposición a un agente genotóxico. Éste es el tiempo considerado necesario para que tenga lugar (1) la progresión del eritroblasto hacia la mitosis, (2) el posible retraso mitótico inducido por el tratamiento, (3) la propia formación de los MN a partir de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros no incluidos en el núcleo de la célula hija y (4) la extrusión del núcleo principal tras la última mitosis para convertirse en EPC. Los EPC recién formados permanecen en la médula ósea de ratón aproximadamente unas 20 h. Durante este tiempo se producirá la acumulación de EPC micronucleados (EPCMN) en la médula ósea, ya que la formación de MN se puede extender a lo largo de un tiempo considerable. El grado de formación continuada de células con MN dependerá de la persistencia del agente inductor, del tipo de lesión inducida sobre el DNA, de la combinación de las velocidades de formación y eliminación de aberraciones cromosómicas, y de la velocidad de recuperación del retraso del ciclo celular (Mavournin *et al.*, 1990). Dado el tiempo de transición entre EPC y ENC (aproximadamente 20 h) no cabe esperar incrementos sustanciales en la incidencia de ENC con micronúcleos (ENCMN) 24 h tras la administración de la sustancia en estudio. La inducción de un efecto citotóxico sobre las células nucleadas precursoras de la médula ósea, causando muerte celular o reducción de la división celular, causará un descenso en la formación de EPC quedando reflejado como un descenso en la relación entre EPC y ENC.

La popularidad de este ensayo es atribuible en gran parte a que el examen de MN es mucho más sencillo y rápido que el examen de aberraciones cromosómicas y requiere un menor nivel de entrenamiento. Asimismo, la capacidad para examinar en un mayor número de células la presencia/ausencia de MN que no de aberraciones cromosómicas, le confiere a este ensayo una mayor potencia estadística y en consecuencia una mayor sensibilidad. También se han desarrollado metodologías experimentales para valorar la inducción de MN en otros tipos celulares como hepatocitos, células intestinales, etc. No obstante, diferentes variantes e innovaciones técnicas aplicadas sobre la metodología inicialmente propuesta por Schmid y Heddle han contribuido en hacer del ensayo de MN en eritrocitos de roedor el ensayo *in vivo* de genotoxicidad por excelencia. Entre éstas, destacan la utilización de sangre periférica como tejido de examen, desarrollada inicialmente en ratón por MacGregor (MacGregor *et al.*, 1980), posibilitando la toma de muestras sin necesidad de sacrificar a los animales, y la introducción de la tinción fluorescente con naranja de acridina (NA) desarrollada por Hayashi y colaboradores (Hayashi *et al.*, 1983; 1990) permitiendo la identificación de eritrocitos inmaduros en sangre periférica. Junto a la observación microscópica tradicional, la aplicación

de técnicas de citometría de flujo utilizando fluorocromos específicos de DNA y/o RNA (Hutter y Stöhr, 1982), y el uso de anticuerpos dirigidos hacia marcadores de superficie específicos, que permiten diferenciar a los eritrocitos inmaduros (Dertinger *et al.*, 1996), ha permitido automatizar y mejorar el rendimiento en el análisis de las muestras.

La inducción de MN en un ensayo *in vivo* de genotoxicidad se considera, *a priori*, una fuerte señal indicativa de riesgo genotóxico para humanos. Para la valoración de riesgo será de suma importancia conocer si los MN se han generado mediante un mecanismo clastogénico o aneugénico, dado que el modo de acción puede influir sobre la interpretación del resultado (Norppa y Falck, 2003). La aplicación de técnicas de morfometría de los MN (Schmid, 1975; Yamamoto y Kikuchi, 1980; Tinwell y Ashby, 1991; Van Hummelen *et al.*, 1992) o técnicas de citogenética molecular, tales como la tinción con anticuerpos anticinetocoro (aislados del suero de pacientes con una forma particular de escleroderma, síndrome CREST) (Gudi *et al.*, 1990; Miller y Adler, 1990), o la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con sondas de DNA que hibridan con regiones centroméricas (Miller *et al.*, 1991), han demostrado ser de gran utilidad para establecer el posible origen aneugénico o clastogénico de los MN.

La importancia de la formación de MN reside en las posibles consecuencias adversas para la célula afectada. La inclusión de genes supresores tumorales en los MN, y su consiguiente inactivación o la pérdida del MN, pueden ocasionar la transformación celular, siendo un paso hacia la cancerogénesis. Varias observaciones apoyan la existencia de una asociación entre la inducción de MN y el desarrollo de cáncer. La alta frecuencia de MN detectados en tejidos precancerosos y la correlación observada entre frecuencia de MN y transformación maligna de células, sugieren que la formación de MN constituye un proceso relevante en la cancerogénesis (Stopper y Müller, 1997). Pacientes con cáncer (no sometidos a tratamiento) y personas afectadas por enfermedades congénitas con predisposición al cáncer (como p.e. ataxia telangiectasia o síndrome de Bloom) presentan niveles altos de MN (Fenech *et al.*, 1999; Fenech, 2002), y se ha reivindicado una clara correlación entre agentes genotóxicos inductores de MN (como la radiación ionizante) y cancerogénesis (Chang *et al.*, 1997). También se han observado incrementos en la frecuencia de MN en linfocitos de pacientes afectados por enfermedades como lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica o encefalomiopatía mitocondrial (Norppa y Falck, 2003), y en pacientes afectados por enfermedades del SNC como Parkinson y Alzheimer (Petrozzi *et al.*, 2002; Norppa y Falck, 2003).

La presencia de MN en células somáticas (linfocitos, células epiteliales bucales, nasales, uroteliales, etc.) se emplea de forma habitual como biomarcador de daño cromosómico y estabilidad cromosómica en poblaciones humanas, y hay evidencias que indican que la frecuencia de MN también puede ser un biomarcador predictivo del riesgo de padecer cáncer. Un reciente estudio multinacional de seguimiento de cohorte (6718 sujetos) ha reivindicado la existencia de una relación entre frecuencia alta de MN en linfocitos y la incidencia de cáncer, especialmente urogenital, gastrointestinal y de mama (Bonassi *et al.*, 2007). Esta observación apoya la hipótesis de que la extensión del daño genético valorado en los linfocitos es un reflejo de los sucesos carcinogénicos iniciales acontecidos, mediante factores genéticos, dietarios o ambientales comunes, en el tejido diana (Bonassi *et al.*, 2007).

1.9. Estudios complementarios

En el contexto del proceso de desarrollo de un fármaco, la realización de estudios complementarios suele estar marcada por la necesidad de obtener información adicional a la generada previamente en los ensayos de la batería estándar de genotoxicidad. Esta circunstancia se podrá producir como consecuencia de la obtención de un resultado positivo en alguno de los ensayos de la batería o, para productos negativos en los ensayos de la batería, por la obtención durante la fase de desarrollo de información complementaria que ponga en cuestión su valor predictivo en cuanto a la ausencia de potencial genotóxico. En ambas circunstancias el principal objetivo de los estudios complementarios será aportar información adicional que permita identificar un modo de acción genotóxica o reforzar el peso de la evidencia experimental, de forma que se pueda establecer la relevancia biológica del resultado.

El tipo y diseño del estudio(s) a realizar estará en función del objetivo perseguido, pudiéndose emplear modelos experimentales que evalúen parámetros de efecto genotóxico no evaluables en los ensayos de la batería estándar. Así, además de valorar la inducción de mutaciones (génica o cromosómica), es frecuente que se valore la inducción de efectos indicadores relacionados con la mutagénesis, como por ejemplo, inducción de modificaciones o reparación en el DNA. Para algunos de estos ensayos su menor utilización sistemática (al no ser ensayos de rutina) hace que su valor predictivo, en términos de riesgo, sea menos conocido.

La obtención de un resultado positivo o equívoco en algún ensayo de la batería estándar, puede requerir la realización de estudios que permitan establecer la reproducibilidad del resultado, o la determinación del posible modo de acción subyacente. En estas circunstancias, será de especial relevancia la realización de ensayos que valoren el mismo efecto genético en el que se ha obtenido el resultado positivo. La obtención de un resultado positivo no reproducible en diferentes sistemas experimentales, hace que su relevancia biológica sea cuestionable. La incapacidad de los ensayos habituales de la batería estándar de valorar adecuadamente ciertas sustancias también puede motivar la realización de estudios complementarios: por ejemplo, la existencia de un metabolismo diferencial entre sistemas experimentales o especies, o la incompatibilidad de los sistemas procariontes para evaluar ciertos antibacterianos (ICH S2A, 1995). En particular, sustancias portadoras de ciertas alertas estructurales de genotoxicidad, como la presencia de grupos azo, nitro, epóxido o aminas aromáticas (Ashby y Tennant, 1988; 1991), puede requerir la realización de estudios adicionales o con una metodología experimental optimizada.

En cualquiera de estos supuestos, la realización de estudios *in vivo* resulta de especial relevancia ya que son de gran valor en el peso de la evidencia experimental. Tradicionalmente ha sido frecuente la realización de ensayos de inducción de MN o de síntesis no programada de DNA (UDS, *Unscheduled DNA Synthesis*) en hígado de roedor, por ser éste un órgano bien perfundido y generalmente bien expuesto a la sustancia en ensayo. En la última década ha adquirido especial importancia la utilización del ensayo del cometa, principalmente por su sensibilidad, rapidez y bajo coste. Esta técnica permite cuantificar en células individuales la presencia de roturas en la cadena de DNA, lesiones primarias que son consideradas de relevancia en la inducción de mutación génica y cromosómica (translocaciones e inversiones). En este sentido, los ensayos *in vivo* de genotoxicidad habituales, como los que emplean médula ósea (ensayo de MN) o hígado (ensayo de MN o UDS) como órgano diana, también tienen sus limitaciones, sobre todo si la sustancia en estudio forma intermediarios reactivos de vida corta. Bajo este supuesto, la utilización de métodos *in vivo* alternativos que valoren en tejidos con mayor exposición la inducción de efectos directos, como la formación de aductos (^{32}P -*postlabelling*), roturas de cadenas de DNA (ensayo del cometa) o mutaciones génicas (detección de mutaciones en animales transgénicos), pueden ser de utilidad.

La observación de que una sustancia negativa en los ensayos de genotoxicidad induce la formación de tumores en ensayos de cancerogénesis en roedor, puede requerir la realización

de estudios adicionales que ayuden a determinar el modo de acción del efecto cancerígeno. La diferenciación entre un modo de acción genotóxico y uno no genotóxico (o epigenético) en la inducción de tumores, es de suma importancia en el modo con que el efecto cancerígeno es tratado en el ámbito regulador (Kasper *et al.*, 2007). En estos casos, el objetivo de los estudios complementarios suele ser el determinar la posible existencia de un efecto genotóxico órgano-específico sobre aquellos órganos en los que se ha observado el efecto cancerígeno. Los ensayos con animales transgénicos, el ensayo del cometa o los estudios de unión al DNA se consideran los más adecuados en la consecución de este fin (Kasper *et al.*, 2007).

Una práctica cada vez más frecuente en la investigación biofarmacéutica actual consiste en la utilización de animales modificados genéticamente. La utilización de modelos de ratones transgénicos como el “MutaTMMouse” (Gossen *et al.*, 1989) o el “Big Blue” (Kohler *et al.*, 1991), que contienen una sonda vector del bacteriófago lambda con un gen bacteriano (*lacZ* o *lacI*, respectivamente) como diana mutacional integrado en el genoma del ratón, permite que se pueda valorar la inducción de mutación génica en condiciones *in vivo*, un efecto genotóxico no valorable en el habitual ensayo de MN en roedor. Curiosamente, aunque estos modelos transgénicos y el ensayo de MN en ratón evalúan efectos genotóxicos diferentes (mutación génica frente a aberración cromosómica), para ambos se ha observado una buena correlación en la predicción de cancerogénesis en ratón (Wahnschaffe *et al.*, 2005). Los modelos transgénicos han resultado ser una importante herramienta de investigación como soporte a los ensayos de normativa, aportando información sobre mecanismos subyacentes a los efectos tóxicos inducidos y su relevancia para la seguridad humana (Bolon, 2004). Incluso han pasado a formar parte de los estudios requeridos por normativa, de tal forma que varios modelos de animales transgénicos son aceptados como alternativa al tradicional estudio de cancerogénesis en ratón de dos años de duración (Goldsworthy *et al.*, 1994; ICH S1B, 1997).

1.10. Valor predictivo y factores de confusión en los ensayos de genotoxicidad

La valoración del riesgo genotóxico se fundamenta sobre la premisa que sustancias positivas en ensayos que detectan daño genético son consideradas, *a priori*, potencialmente mutágenas o cancerígenas en humanos. Para las autoridades reguladoras la práctica habitual es asumir que sustancias consideradas genotóxicas *in vivo* poseen el potencial de dañar el DNA en cualquier nivel de exposición, y que ese daño puede conducir o contribuir al desarrollo de tumores.

El valor predictivo de un ensayo de genotoxicidad lo determina su sensibilidad (capacidad de identificar correctamente como positiva una sustancia genotóxica) y su especificidad (capacidad de identificar correctamente como negativa una sustancia no genotóxica). Cuanto mayor es el grado de sensibilidad y especificidad del ensayo, mayor es su valor predictivo. Desde el punto de vista de la valoración del potencial cancerígeno, la sensibilidad y especificidad del ensayo vendrán determinadas por su capacidad de identificar correctamente sustancias cancerígenas y no cancerígenas, respectivamente. Una sensibilidad baja conlleva el riesgo que sustancias genotóxicas no sean identificadas correctamente (“falsos negativos”), con las consecuencias adversas que esto puede representar para la salud humana. Por el contrario, una especificidad baja implica que sustancias no genotóxicas sean identificadas incorrectamente como positivas (“falsos positivos”) (Kirkland *et al.*, 2005).

La generación órgano-específica de metabolitos reactivos con el DNA se considera la principal fuente potencial del fallo de los ensayos de la batería estándar para detectar carcinógenos (Kasper *et al.*, 2007). No obstante, actualmente existe un amplio consenso en que debido al alto grado de sensibilidad alcanzado en los ensayos de genotoxicidad, como consecuencia del rigor y la estandarización de los protocolos experimentales, la probabilidad de errar en la detección de una sustancia genotóxica al ser evaluada en una batería de ensayos similar a la de la batería estándar es remota (Kirkland y Müller, 2000). Una cuestión aparte la constituyen los denominados carcinógenos no genotóxicos (o epigenéticos). Para estas sustancias, la inducción de tumores en animales de experimentación está condicionada a la administración de dosis altas durante periodos de tiempo prolongados, produciéndose la inducción de tumores como consecuencia de un mecanismo indirecto de proliferación celular y, por lo tanto, no son detectables en estudios de genotoxicidad. Estas sustancias no cabe esperar que den resultados positivos en los habituales ensayos *in vitro* o *in vivo* de genotoxicidad, y en el caso de hacerlo pueden no ser representativos de su mecanismo de acción cancerígena (Kirkland *et al.*, 2007a).

La experiencia acumulada desde la implantación de los ensayos de genotoxicidad ha puesto de manifiesto que hay una alta proporción de sustancias farmacéuticas que producen resultados positivos en alguno de los ensayos realizados. Diferentes revisiones han mostrado que para una alta proporción de estas sustancias no hay evidencias claras de que exista una interacción real con el DNA. Entre los ensayos de genotoxicidad con resultados positivos destacan los ensayos *in vitro* con células de mamífero. Müller y Kasper comprobaron que de

335 fármacos evaluados para su registro en el Instituto Federal para Productos Farmacéuticos y Médicos alemán (BfArM, *Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte*), prácticamente el 30% de ellos presentaba un resultado positivo en, como mínimo, uno de los ensayos realizados (Müller y Kasper, 2000a). Sólo aproximadamente el 25% de éstos correspondían a sustancias con potencial genotóxico conocido (agentes alquilantes, análogos de nucleósidos o inhibidores de la girasa, entre otros). De manera similar, en una revisión sobre 352 fármacos comercializados en EEUU, Snyder y Green comprobaron que el 28,7% de los productos presentaban uno o más resultados positivos en los ensayos de genotoxicidad en los que habían sido evaluados (Snyder y Green, 2001).

Ante este hecho, en la actualidad se considera que no todos los resultados positivos han de ser interpretados de la misma forma. La experiencia acumulada y el mejor conocimiento de los diferentes mecanismos de acción implicados en el proceso de mutagénesis, han puesto de manifiesto que bajo ciertas condiciones experimentales se pueden obtener resultados positivos que no han de ser considerados indicativos de potencial genotóxico o cancerígeno real en humanos.

El principal elemento que condiciona el valor predictivo de los ensayos de genotoxicidad son los positivos producidos por los denominados “genotóxicos indirectos”. Éstas son sustancias capaces de inducir efectos genotóxicos mediante mecanismos indirectos, como consecuencia de la inducción de condiciones experimentales de estrés fisiológico, o mediante la interacción con dianas biológicas diferentes al DNA. El efecto genotóxico, por lo tanto, no se produce como consecuencia de una acción directa de la sustancia sobre el material genético, sino mediante un mecanismo indirecto. Entre estos mecanismos indirectos se encuentran, la inducción de peroxidación lipídica, inhibición de enzimas de reparación, interferencia con la síntesis de DNA o el control del ciclo celular, inhibición o agotamiento de proteínas de defensa frente a daño oxidativo (glutación) o de enzimas metabólicos, interferencia con tubulinas del huso mitótico/meiótico, citotoxicidad e inducción de apoptosis o necrosis (Scott *et al.*, 1991; Müller y Kasper, 2000a; Kirsch-Volders *et al.*, 2003b; Kirkland, *et al.*, 2007a). Aunque el efecto genotóxico detectado es real, desde el punto de vista de la predicción de riesgo cancerígeno o genotóxico *in vivo*, la falta de relevancia de los positivos obtenidos bajo algunas de estas condiciones hace que éstos coloquialmente sean referenciados como “falsos positivos” (Kirkland, *et al.*, 2007a). También la alteración de condiciones fisiológicas de pH,

osmolaridad o temperatura pueden inducir resultados positivos no relevantes en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

La demostración experimental de la implicación de un mecanismo genotóxico indirecto en el resultado positivo generado puede tener importantes implicaciones para la valoración del riesgo. Las condiciones experimentales asociadas a un mecanismo genotóxico indirecto pueden no ser reproducibles a niveles de exposición reales en humanos, siendo por lo tanto de cuestionable relevancia biológica. Desde un punto de vista teórico, y a diferencia de lo que ocurre con los genotóxicos directos, los genotóxicos que actúan mediante un mecanismo indirecto son susceptibles de presentar una curva dosis-respuesta con un umbral de efecto. Para estas sustancias puede ser posible establecer niveles de exposición sin riesgo de daño genotóxico.

De forma similar, algunos resultados positivos producidos mediante mecanismos genotóxicos directos (positivos verdaderos) pueden no ser extrapolables a humanos, como consecuencia de factores de especificidad fisiológica o metabólica del sistema experimental empleado. Entre ellos está la generación en el sistema experimental de metabolitos genotóxicos no existentes en humanos. Sirva a modo de ejemplo, la formación en bacterias pero no en células de mamífero de la azidoalanina, el metabolito genotóxico de la azida sódica (Arenaz *et al.*, 1989). La saturación de rutas metabólicas o de mecanismos de conjugación, puede dar lugar a la formación de metabolitos genotóxicos que no estarán presentes bajo condiciones reales *in vivo*. El paracetamol, un fármaco ampliamente consumido, genera un metabolito quinona-imina electrofílico capaz de inducir aberraciones cromosómicas *in vitro* e *in vivo* a concentraciones altas. A niveles terapéuticos normales este metabolito es conjugado de forma eficiente, por lo que los resultados positivos obtenidos a concentraciones que exceden ampliamente las concentraciones alcanzables de forma razonable en humanos son considerados biológicamente irrelevantes (Bergman *et al.*, 1996). En el caso particular de los ensayos *in vitro*, la fracción S9 puede generar metabolitos diferentes a los producidos por el metabolismo hepático humano (Kirkland *et al.*, 2007a).

Se han establecido así, una serie de condiciones experimentales que pueden inducir la obtención de resultados positivos no atribuibles a daño genotóxico directo por la sustancia en estudio, o no representativos de potencial genotóxico real. Independientemente del mecanismo por el que se ha generado, la obtención de un resultado positivo en un ensayo de la batería estándar conlleva, en el mejor de los casos, la realización de estudios adicionales.

En el peor de los casos puede conllevar el innecesario abandono de un fármaco con posible potencial terapéutico. En consecuencia, la correcta interpretación de los resultados obtenidos requiere que éstos sean evaluados en el contexto del modelo experimental en el que se han obtenido, que se considere la naturaleza de los efectos observados, y que éstos sean interpretados en base al conocimiento científico vigente.

1.10.1. Factores de confusión en ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* de genotoxicidad son considerados muy sensibles en la detección de sustancias genotóxicas o cancerígenas. Kirkland y colaboradores, en el análisis de 553 sustancias carcinógenas en roedores, obtuvieron valores de sensibilidad del 58,8, 73,1 y 65,6% para los ensayos de test de Ames, ML y AbCr, respectivamente (Kirkland *et al.*, 2005). El 93% de las sustancias presentaba un resultado positivo en, como mínimo, uno de los ensayos, y la combinación de dos ensayos permitía detectar a más del 90% de ellas. Por el contrario, el análisis de los datos de genotoxicidad de 177 compuestos no carcinógenos en roedor puso de manifiesto la baja especificidad de los ensayos *in vitro* en general, con valores del 73,9, 39,0 y 44,9% para Ames, ML y AbCr, respectivamente (Kirkland *et al.*, 2005). Al combinar los tres ensayos, del 75 al 95% de los compuestos no cancerígenos presentaron un resultado positivo en, como mínimo, uno de ellos.

Esta baja especificidad de los ensayos *in vitro*, sobre todo de los ensayos con células de mamífero, es atribuida a que éstos han sido optimizados para la detección de sustancias genotóxicas (alta sensibilidad). Con el fin de asegurar la interacción del fármaco en ensayo con la diana de efecto (el DNA), se hace uso de concentraciones extremas y tiempos de exposición prolongados, y se requiere la inducción de niveles elevados de toxicidad como evidencia indirecta de la interacción con la sustancia en ensayo. Esta alta sensibilidad ha llevado asociada la disminución del grado de especificidad, con la consiguiente obtención de “falsos positivos”. Esto suele conllevar la realización de estudios adicionales, incluyendo generalmente la realización de ensayos *in vivo*.

El test de mutación génica en bacterias (test de Ames) destaca por ser considerado uno de los ensayos *in vitro* más robustos, y con mayor grado de sensibilidad y especificidad. Se le ha atribuido un valor predictivo del 77 al 90% en la detección de sustancias cancerígenas en roedores (Mortelmans y Zeiger, 2000). Si bien ha sido asociado con mucha menor frecuencia

a la obtención de falsos positivos, comparado con los ensayos *in vitro* con células de mamífero, existen no obstante ciertas condiciones experimentales que pueden dar lugar a éstos. Las cepas de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* empleadas habitualmente, son muy eficientes en las reacciones metabólicas de nitroreducción, de forma que moléculas con grupos nitro pueden ser convertidas de forma eficiente a especies electrofílicas reactivas. En células de mamífero el metabolismo reductor es generalmente inhibido por el oxígeno, por lo que bajo ciertas condiciones de exposición la obtención de un resultado positivo en bacterias podrá carecer de relevancia biológica (Kirkland y Müller, 2000). Los resultados positivos inducidos por sustancias antibacterianas como las quinolonas (inhibidores de la DNA girasa bacteriana) son considerados no relevantes en humanos, ya que son una consecuencia de su mecanismo de acción, y su diana biológica no está presente en las células eucariotas (Herbold *et al.*, 2001).

Diferentes revisiones han puesto de manifiesto una alta incidencia de resultados positivos en los ensayos *in vitro* en células de mamífero. Müller y Kasper comprobaron que sobre 335 sustancias evaluadas por el BfArM (1990-1997), el 28,9 y 26,9% de ellas presentaban resultados positivos en los ensayo *in vitro* de AbCr y ML, respectivamente (Müller y Kasper, 2000a). En una alta proporción de ellos los resultados positivos estaban asociados a valores altos de citotoxicidad. Una revisión posterior sobre 600 fármacos valorados por el BfArM (1995-2005) obtuvo un 25-30% de resultados positivos en los ensayos *in vitro* de AbCr y ML (Kirkland *et al.*, 2007a). Valores similares fueron obtenidos por Broschinski y colaboradores para productos químicos en general, con un 25,2 y 37,0% de positivos en los ensayos *in vitro* de AbCr y ML, respectivamente (Broschinski *et al.*, 1998).

Galloway, en una revisión sobre 1420 sustancias químicas (la mayoría productos farmacéuticos), obtuvo un 18% de resultados positivos o equívocos en los ensayos de AbCr *in vitro* (Galloway, 2000). Entre las sustancias consideradas carentes de evidencias claras de ser genotóxicas (en base a los resultados de otros ensayos, estructura o función), había una alta proporción de positivos asociados a valores altos de citotoxicidad (Galloway, 2000). De igual manera, Snyder y Green en su revisión sobre 352 fármacos comercializados en EEUU, obtuvieron un 24,8 y 25,0% de resultados positivos en los ensayos *in vitro* de AbCr y ML (Snyder y Green, 2001).

Muchos resultados positivos obtenidos en los ensayos *in vitro* de ML y AbCr se producen bajo condiciones de citotoxicidad elevada, y son atribuidos a la inducción de condiciones de

estrés ambiental derivadas de una excesiva toxicidad. Se han descrito así, una serie de mecanismos indirectos de genotoxicidad que pueden tener lugar bajo condiciones citotóxicas, y que pueden generar falsos positivos no representativos de riesgo genotóxico real en humanos. Estos incluyen, entre otros, inhibición de la síntesis de DNA, inhibición o desnaturalización de proteínas, liberación de nucleasas de los lisosomas, depleción energética, inducción de apoptosis o necrosis y la generación de especies de oxígeno reactivas (estrés oxidativo) (Scott *et al.*, 1991; Galloway *et al.*, 1998; Kirkland *et al.*, 2007a). La generación de peróxido de hidrógeno (un agente clastógeno) por la oxidación en el medio de cultivo de un amplio abanico de sustancias se ha asociado a la inducción de aberraciones cromosómicas y a la formación de colonias pequeñas en el ensayo de ML (Kirkland *et al.*, 2007a).

A diferencia de los “falsos genotóxicos”, los verdaderos genotóxicos son generalmente capaces de inducir efectos genotóxicos en ausencia de un alto grado de citotoxicidad (Galloway *et al.*, 1998). En ocasiones, las condiciones de citotoxicidad excesiva se producen como consecuencia de una valoración inexacta del grado real de citotoxicidad mediante parámetros como el índice mitótico o el número celular (Kirkland *et al.*, 2007a). Resultados positivos obtenidos en ensayos *in vitro* bajo condiciones de citotoxicidad elevada y en ausencia de efectos positivos en estudios *in vivo* a niveles de exposición que excedan con un margen de seguridad razonable los niveles alcanzables en humanos, son considerados carentes de significación biológica (Kirkland, 1992). En el caso particular de las células L5178Y (ensayo del ML), su alta susceptibilidad a la inducción de daño genético, respecto a otras líneas celulares, ha sido atribuida a un deficiente funcionamiento del gen supresor tumoral *p53*. El funcionamiento deficiente del mecanismo de apoptosis permitiría a estas células sobrevivir bajo condiciones de citotoxicidad elevada, haciéndolas anormalmente susceptibles a la inducción de alteraciones genéticas (Kramer, 1998).

La exposición a condiciones de cultivo con variaciones excesivas en los valores de pH u osmolaridad, con la consiguiente alteración de las condiciones fisiológicas de las células, puede conllevar la obtención de falsos positivos (Scott *et al.*, 1991; Galloway *et al.*, 1998; Müller y Sofuni, 2000b). Valores bajos de pH se han asociado a la inducción de aberraciones cromosómicas en diferentes tipos celulares: CHO (ovario de hámster chino), L5178Y, CHO-K1, CHL (pulmón de hámster chino), V79 379A, HeLa y linfocitos humanos primarios (Brusick, 1986; Cifone *et al.*, 1987; Morita *et al.*, 1992). Aunque existen diferencias de susceptibilidad entre tipos celulares, la mayoría presentan incrementos en la frecuencia de

aberraciones cromosómicas a valores de pH inferiores a 6,5, sin observarse una clara correlación con la inducción de citotoxicidad. El tipo de aberración cromosómica observada corresponde mayoritariamente a roturas o gaps cromatídicos, sugiriendo como posible causa la pérdida de histonas de la cromatina (por inhibición de la síntesis protéica) y consiguiente desestabilización del DNA (Morita *et al.*, 1992). La exposición a condiciones de pH ligeramente ácidos (pH 6 – 6,8) induce en el ensayo del ML efectos mutagénicos y clastogénicos, siendo particularmente abundantes estos últimos (Cifone *et al.*, 1987).

De forma similar, la exposición a condiciones de osmolaridad aumentada se ha asociado a la inducción de aberraciones cromosómicas, MN y mutaciones en el gen *tk* en células L5178Y, así como a la transformación de ciertos tipos celulares (Brusick, 1986; Scott *et al.*, 1991; Meintieres y Marzin, 2004). Como posible mecanismo subyacente se ha sugerido la inducción de apoptosis. Incrementos en la frecuencia de MN *in vitro* en células CTTL-2 inducidos por exposición a condiciones de osmolaridad aumentada o disminuida (así como de pH aumentado), se producen en presencia de incrementos en los niveles de anexina V, un indicador de apoptosis (Meintieres y Marzin, 2004).

Las altas concentraciones de producto ensayadas (5000 µg/mL-placa o 10 mM) y los niveles de citotoxicidad requeridos por las actuales directrices internacionales (>50% en ensayos de AbCr, y >80% en ensayo de ML), son consideradas las principales causas en la generación *in vitro* de resultados positivos irrelevantes. Esta circunstancia ha sido ampliamente cuestionada por la comunidad científica internacional (Galloway, 2000; Müller y Sofuni, 2000b; Kirkland *et al.*, 2007a), y ha llevado a las autoridades reguladoras a plantear una revisión de las actuales directrices. En el momento de elaborarse esta Tesis, se encuentra en fase de elaboración y discusión una nueva directriz ICH sobre ensayos de genotoxicidad (ICH S2(R1), 2008). En este documento, aún en fase de borrador, destaca la propuesta de reducir la concentración máxima a ensayar y el grado de citotoxicidad requerido en ensayos *in vitro* con células de mamífero.

Muchas de las desventajas atribuidas a los ensayos *in vitro* para detectar adecuadamente ciertos genotóxicos (falsos negativos), están relacionadas con un metabolismo inadecuado. Un sistema metabólico artificial como la fracción microsomal S9 de hígado de roedor no puede reproducir la capacidad biometabólica de un organismo en toda su extensión. La administración a los animales de inductores enzimáticos como el Aroclor 1254, durante el proceso de obtención del S9, produce la sobreexpresión de ciertos isoenzimas del citocromo

P450 (CYP), como los CYP1A y 2B, y la represión de otros, estando ausente o disminuida la actividad de enzimas metabólicos como sulfotransferasas o acetiltransferasas (Kirkland *et al.*, 2007a). La no detección por los sistemas *in vitro* estándar del carcinógeno genotóxico uretano, se atribuye a la ausencia o baja presencia del CYP2E1 en la fracción S9, siendo este isoenzima necesario para la generación de su metabolito reactivo (Müller *et al.*, 1999). La utilización de un sistema exógeno de metabolización puede condicionar la exposición de la diana (el DNA) a los metabolitos generados, siendo la penetración a través de la membrana celular especialmente baja para metabolitos reactivos de vida corta (Kirkland *et al.*, 2007a). Si bien se han realizado diferentes aproximaciones mediante la construcción de líneas celulares modificadas genéticamente que expresan sistemas metabólicos humanos (Kirkland *et al.*, 2007a), la existencia de diferencias en la distribución cuantitativa y cualitativa de metabolitos dependiendo del órgano, tipo celular, especie o individuo, hace que hasta la fecha sea difícil que estas líneas sean una alternativa a la utilización de la fracción microsomal S9.

1.10.2. Factores de confusión en ensayos *in vivo*

Los ensayos *in vivo* son considerados relativamente poco sensibles, en comparación con los ensayos *in vitro*, en la detección de sustancias cancerígenas. Se puede considerar que los ensayos *in vivo*, como el de MN en médula ósea, sólo permiten la detección de un subgrupo de sustancias genotóxicas *in vitro*: aquellas que alcancen concentraciones suficientemente elevadas en el tejido diana como para inducir daño cromosómico en las células de estudio. Mientras una exposición adecuada a la sustancia en estudio no suele ser un problema en los ensayos *in vitro*, en los ensayos *in vivo* esto puede ser especialmente problemático para sustancias que presenten una baja biodisponibilidad, o para intermediarios reactivos de vida corta (Müller *et al.*, 1999).

Por el contrario, a los ensayos *in vivo* se les atribuye una alta especificidad, por lo que sustancias positivas en estos ensayos tienen una muy alta probabilidad de ser genotóxicas o cancerígenas en humanos. Esta alta especificidad y la mayor proximidad del modelo experimental *in vivo* a una situación real en humanos, hace que la obtención de un resultado positivo en uno de estos ensayos tenga una especial relevancia desde el punto de vista de la valoración de riesgo. Diferentes revisiones han puesto de manifiesto la baja incidencia de resultados positivos en ensayos *in vivo* con productos comercializados. Müller y Sofuni en una revisión sobre 335 fármacos observaron un escaso 6,7% de resultados positivos en el

ensayo *in vivo* de AbCr (MN) en médula ósea, correspondiendo la mayoría a sustancias con un mecanismo de acción conocido (inhibidores de topoisomerasas o microtúbulos, agentes alquilantes, etc.) (Müller y Sofuni, 2000b). Snyder y Green en una revisión de 352 fármacos observaron un 11,5% de positivos en el ensayo de AbCr *in vivo* (Snyder y Green, 2001), y Kirkland y Müller obtuvieron un 7,5% de positivos sobre un total de 240 sustancias (productos farmacéuticos, agroquímicos y químicos industriales) evaluadas en el ensayo *in vivo* de MN (Kirkland y Müller, 2000). Esta baja proporción de positivos es consecuencia del alto valor predictivo atribuido a los ensayos *in vivo*, en el sentido que muchas de estas sustancias habrán sido descartadas durante el proceso de desarrollo. Entre las comercializadas, muchos de los positivos obtenidos corresponden a sustancias cuya indicación terapéutica es compatible con la aceptación de cierto riesgo genotóxico (antitumorales, enfermedades terminales, etc).

En el caso de los ensayos *in vivo* también se han descrito ciertas condiciones experimentales que pueden producir resultados positivos no representativos de potencial genotóxico real. Como ocurre en los ensayos *in vitro*, la citotoxicidad puede ser un factor de confusión en la interpretación de ensayos *in vivo*. La obtención de resultados positivos a dosis asociadas a un alto grado de toxicidad o mortalidad animal (excediendo la dosis máxima tolerada, DMT) no pueden ser interpretados con certeza en cuanto a su significación biológica debido a los factores de confusión asociados a la toxicidad (COM, 2003). La inducción de roturas en la cadena de DNA por efectos citotóxicos o apoptóticos requiere que tales efectos sean controlados en ensayos como los de UDS o del cometa.

El ensayo de MN en roedor destaca por ser el principal ensayo *in vivo* empleado en la valoración del potencial genotóxico de fármacos. La experiencia acumulada desde su implantación, ha puesto de manifiesto que condiciones experimentales que alteran la fisiología normal de los animales, pueden inducir incrementos en la frecuencia de MN en eritrocitos. Destacan entre éstas la estimulación de la eritropoyesis y la inducción de cambios en la temperatura corporal de los animales. La inducción en el ensayo de MN en roedor de estas condiciones de estrés fisiológico, es reconocida por diferentes autoridades reguladoras y órganos consultivos como un posible factor de confusión en la interpretación de los resultados (COM, 2003; EMEA, 2006; Tweats *et al.*, 2007a). A pesar de producirse mediante mecanismos indirectos, que no implican una actividad genotóxica inherente a la sustancia

evaluada, sustancias capaces de inducir cambios fisiológicos similares en humanos, han de ser considerados, no obstante, como un motivo de preocupación (Tweats *et al.*, 2007a).

1.10.2.1 La eritropoyesis como factor de confusión en el ensayo de micronúcleos en roedor

El proceso de eritropoyesis está regulado por la hormona glicoproteica eritropoyetina (EPO). La vida limitada de los eritrocitos hace de la eritropoyesis una necesidad continua durante la vida de un organismo, y se estima que cada segundo se generan aproximadamente 2 millones de nuevos reticulocitos (RET) (eritrocitos inmaduros de reciente formación) (Lee *et al.*, 2004). Sintetizada principalmente en los riñones, la EPO regula la proliferación y diferenciación de las células precursoras de los eritrocitos, siendo las células BFU-E (*burst-forming unit erythroid cells*, unidades formadoras de colonias eritroides) las primeras células precursoras eritroides que responden a su estimulación (Jones *et al.*, 2005). Las células precursoras eritroides poseen la capacidad de proliferar de forma rápida ante situaciones de anemia e hipoxia, proceso éste conocido como “eritropoyesis de estrés”. La interacción de la EPO con su receptor induce la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células precursoras eritroides (Suzuki *et al.*, 2006).

Las primeras referencias a la inducción de incrementos en la frecuencia de MN en eritrocitos de médula ósea de ratón asociados a estimulación de la eritropoyesis, corresponden a los experimentos de Steinheider y colaboradores con inducción de anemia por sangrado o por hemólisis tras administración de fenilhidrazina (Steinheider *et al.*, 1985), y a los ensayos de Suzuki y colaboradores e Irai y colaboradores dirigidos a aumentar la sensibilidad del ensayo de MN en roedor mediante la administración de EPO o el sangrado previo de los animales, respectivamente (Suzuki *et al.*, 1989; Hirai *et al.*, 1991). En estudios posteriores, Yajima y colaboradores observaron que la administración a ratones de EPO recombinante humana, producía incrementos moderados en la frecuencia de EPCMN en médula ósea, y un incremento mucho mayor en la frecuencia de reticulocitos micronucleados (RETMN) en sangre periférica (Yajima *et al.*, 1993a; Yajima *et al.*, 1993b).

Como posibles causas del incremento en la formación de MN bajo condiciones de estimulación de la eritropoyesis se han sugerido, la disminución del tiempo disponible para reparar daños espontáneos en el DNA haciendo que los eritroblastos sean más susceptibles a la inducción de daño genotóxico (Suzuki *et al.*, 1989; Kirkland, 1991), la alteración de la

formación del huso mitótico durante la proliferación celular acelerada (Suzuki *et al.*, 1993) y errores durante el proceso de enucleación de los eritrocitos (Yajima *et al.*, 1993b). El incremento en la formación de MN se produciría por lo tanto mediante un mecanismo indirecto asociado a condiciones de estrés proliferativo. Por tanto, incrementos en la formación de MN bajo estas condiciones, y en ausencia de resultados positivos en el resto de ensayos realizados (sobre todo ensayos *in vivo*), son considerados carentes de relevancia biológica.

La administración de sustancias estimuladoras de la secreción de EPO, como cobalto y AMP cíclico (Suzuki *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 2008), y la exposición a condiciones de hipoxia ambiental (Snyder y Diehl, 2005) también se han relacionado con la inducción de MN mediante un proceso de estimulación de la eritropoyesis. Los ligeros incrementos en la frecuencia de EPCMN en médula ósea observados tras la administración de sustancias como anilina (Jones y Fox, 2003) y 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (principal ingrediente del tinte natural henna) han sido atribuidos a toxicidad eritrocitaria y estimulación de la eritropoyesis (Kirkland y Marzin, 2003). La inducción de anemia también se ha propuesto como posible causa del incremento en la frecuencia de MN en eritrocitos de ratón tras la administración de fenolftaleína (Holden, 1998). Se ha sugerido que la inducción de signos clínicos de hipoactividad y sedación intensas asociados a descensos en los niveles de oxígeno en sangre, podrían producir estimulación de la eritropoyesis y, como consecuencia, inducir incrementos en la formación de MN (Snyder y Diehl, 2005). Se han descrito, asimismo, incrementos en la frecuencia de EPCMN en médula ósea de ratones tras la privación de alimento y agua (Gollapudi *et al.*, 1986), y si bien este incremento es probablemente atribuible a una alteración fisiológica, el mecanismo subyacente es incierto.

1.10.2.2. La temperatura corporal como factor de confusión en el ensayo de micronúcleos en roedor

La inducción de cambios en la temperatura corporal, ya sean provocados por la administración de sustancias químicas o por la exposición a condiciones ambientales, se ha asociado a incrementos en la frecuencia de MN en eritrocitos de roedor. La temperatura es un factor que ejerce una fuerte influencia sobre gran número de procesos biológicos, afectando a las funciones celulares y a la fisiología animal (Lundgren-Eriksson *et al.*, 2001). La generación de calor corporal y el mantenimiento de una temperatura interna estable son

procesos fisiológicos fundamentales para la homeostasis de los organismos homeotermos. La regulación de la temperatura corporal es un proceso complejo, en el que intervienen diferentes mecanismos fisiológicos, tales como termogénesis, termolisis, actividad motora, y procesos periféricos como vasodilatación y vasoconstricción. El aumento de la temperatura corporal produce incrementos en procesos fisiológicos como la velocidad de conducción neuronal, el transporte axonal, la frecuencia cardíaca, la división celular y el metabolismo tisular (Gordon *et al.*, 2008). El descenso de la temperatura por debajo de niveles fisiológicos puede afectar de forma importante al funcionamiento celular y a la fisiología del organismo (Lundgren-Eriksson *et al.*, 2001), incidiendo sobre procesos básicos como la cinética del ciclo celular (Sisken *et al.*, 1965) y la reparación del DNA (Burton *et al.*, 1997; Digue *et al.*, 1999).

1.10.2.2.1. Inducción de hipertermia

La inducción de incrementos en la temperatura corporal de los animales se ha asociado a incrementos en la frecuencia de MN en el ensayo de MN en eritrocitos de roedor. Las primeras referencias en este sentido se remontan a las investigaciones de Chrisman y Baumgartner, que observaron incrementos en la frecuencia de MN tras la exposición de ratones a una temperatura ambiental de 35 °C durante 33 h (Chrisman y Baumgartner, 1980). King y Wild observaron efectos similares tras periodos de exposición superiores a 20 h a temperaturas de 35-36 °C (King y Wild, 1983).

Asanami y Shimono, tras exponer animales a diferentes temperaturas ambientales en tiempos variables, sugirieron que se requería que la temperatura corporal excediera de 39,5 °C durante más de 30 min para producir incrementos en la frecuencia de EPCMN en médula ósea de ratón (24 h tras la exposición) (Asanami y Shimono, 1997a). El mayor tamaño de los MN formados llevó a los autores a sugerir un efecto de interferencia con el huso mitótico. Al estudiar el efecto de la administración de agentes genotóxicos a ratones hipertérmicos, comprobaron que mientras la administración de 5-fluorouracilo (un antimetabolito) o colchicina no aumentaba la frecuencia de EPCMN (24 h), sí lo hacía la administración de agentes alquilantes como mitomicina C y ciclofosfamida (Asanami y Shimono, 1999); atribuyeron el efecto sinérgico a un descenso de la capacidad de reparación del daño sobre el DNA. Estudios *in vitro* con células de mamífero han confirmado la capacidad de la hipertermia de inducir la formación de MN y aberraciones cromosómicas (Asanami *et al.*, 2001).

En estudios recientes, también se ha descrito la inducción de MN asociados a hipertermia tras la administración de un fármaco. La administración de oximorfona (un potente agonista opioide) en rata y ratón se ha asociado a incrementos en la temperatura corporal a valores de hasta 39,5 °C, así como a incrementos en la frecuencia de EPCMN a las 24 h (Shuey *et al.*, 2007). En rata, la administración previa del agente antipirético salicilato de sodio, revertía la intensidad y duración de la hipertermia así como el incremento en la frecuencia de EPCMN. La ausencia de cinetocoros en los MN inducidos llevó a los investigadores a sugerir un origen no aneugénico.

1.10.2.2.2. Inducción de hipotermia

La inducción de descensos intensos y prolongados de la temperatura corporal se ha asociado a la inducción de MN tanto en ratones como en ratas (Asanami y Shimono, 1997b; 2000; Asanami *et al.*, 1998). La primera confirmación experimental de la existencia de una relación causa-efecto entre la inducción de hipotermia y la formación de MN en eritrocitos de roedor la obtuvieron Asanami y Shimono en sus experimentos con el antipsicótico reserpina (Asanami y Shimono, 1997b). Estos autores comprobaron que la administración de reserpina producía incrementos ligeros en la frecuencia de EPCMN en médula ósea de ratón, a tiempos de muestreo tardíos y en ausencia de toxicidad medular. El incremento en la frecuencia de EPCMN estaba acompañado por un intenso y prolongado descenso de la temperatura corporal (inferior a 33 °C durante más de 24 h). Al exponer los animales a condiciones de temperatura ambiental aumentada (30 °C, 48 h) tras la administración de reserpina, se evitaba el efecto hipotérmico y se revertía el incremento de EPCMN. En estudios posteriores, Asanami y colaboradores demostraron el mismo tipo de efecto tras la administración del antipsicótico clorpromazina en ratón (Asanami *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos en sus ensayos con clorpromazina les llevaron a proponer la consecución de una temperatura corporal inferior a 33 °C durante un mínimo de 11 h, como umbral de efecto para la inducción de EPCMN asociados a condiciones de hipotermia.

La inducción de condiciones de hipotermia se puede producir como consecuencia de la alteración de los mecanismos de regulación térmica, así como de los mecanismos termogénicos (Gordon *et al.*, 2008). Los roedores, y en particular los ratones, son especialmente susceptibles a la inducción de hipotermia, debido a su alta relación entre superficie y masa corporal. El descenso de la temperatura corporal y del metabolismo, es una

respuesta habitual en roedores tras la exposición aguda a dosis altas de sustancias químicas. Considerada tradicionalmente una respuesta inespecífica de toxicidad, diferentes evidencias experimentales han llevado a sugerir que también puede ser considerada una respuesta fisiológica adaptativa capaz de modular el grado de toxicidad en situaciones de intoxicación, aumentando la probabilidad de supervivencia (Gordon, 1991; Gordon *et al.*, 2008). En este sentido se ha observado que, tras una intoxicación aguda, el grado de toxicidad es menor cuando se permite el descenso libre de la temperatura corporal. Estudios realizados con ratas y ratones en zonas con gradiente de temperatura han mostrado la preferencia de los animales a situarse en zonas frías tras una exposición aguda tóxica (Gordon *et al.*, 2008). A medida que aumenta la masa corporal de un organismo, disminuye su capacidad para reducir la temperatura corporal en respuesta a una intoxicación. La presencia de este mecanismo protector en roedores y su ausencia en humanos ha llevado a sugerir que la valoración de riesgo derivada de estudios de toxicidad aguda en roedores podría llevar a subestimar el grado real de toxicidad en humanos (Gordon, 1991).

En el caso de las sustancias con propiedades psicoactivas, la inducción de estados de poiquiloterma (incapacidad para regular la temperatura corporal) es un efecto secundario ampliamente descrito en roedores (Asanami *et al.*, 1998; Oerther y Ahlenius, 2000), siendo incluso empleado como un parámetro indirecto para valorar la actividad farmacológica de nuevas entidades químicas (Hedlund *et al.*, 2003; Shuey *et al.*, 2007). En el caso particular de los fármacos neurolépticos, la interferencia con los mecanismos de regulación de la temperatura corporal es un efecto secundario ampliamente conocido, atribuido generalmente a la interacción con receptores de DA, 5-HT y α_2 -adrenérgicos, considerados implicados en la regulación de la temperatura corporal de mamíferos (Ahlenius, 1999; Cryan *et al.*, 1999; 2000; Oerther, 2000; Oerther y Ahlenius, 2001; Perachon *et al.*, 2000).

También se ha descrito la inducción de efectos hipotérmicos en animales de laboratorio por sustancias que interaccionan con el receptor σ . La capacidad de sustancias como la 1,3,-di-*o*-tolilguanidina (DTG) y el BMY14802 de inducir hipotermia en roedores ha sido atribuida a sus propiedades de unión al receptor σ (Bejanian *et al.*, 1991; Kest *et al.*, 1995; Rawls *et al.*, 2002). La alteración de la regulación de la temperatura corporal en gato tras la administración intracerebroventricular del fármaco experimental N-alil-normetazocina (SKF 10,047) o de pentazocina, también se ha atribuido a su afinidad por el receptor σ (Clark *et al.*, 1981). Estudios de unión a receptor mediante técnicas de autorradiografía han puesto de manifiesto

la existencia de zonas con alta densidad de expresión del receptor σ en el hipotálamo (Largent *et al.*, 1986) y una especial abundancia de puntos de unión σ_1 en el núcleo hipotalámico (Bouchard y Quirion, 1997), zona que se cree juega un papel fundamental en los procesos de termorregulación (Boulant, 1981).

En la actualidad se han formulado varias hipótesis sobre el posible mecanismo subyacente a la inducción de MN en eritrocitos de roedor bajo condiciones de hipotermia. La hipótesis más destacada sugiere que la baja temperatura interfiere con la formación de un huso mitótico funcional, alterando los procesos de segregación cromosómica y división celular. A principios de la década de 1990, Parton y colaboradores sugirieron que sustancias que presentaban efectos farmacológicos de hipotermia (o hipertermia) tenían la capacidad de interferir con la polimerización de las subunidades que forman los microtúbulos, produciendo el retraso de cromosomas durante el proceso de división celular y dando lugar a la formación de MN (Parton *et al.*, 1991). El ensamblaje de los microtúbulos para la formación de un huso mitótico funcional ha demostrado ser un proceso dependiente de la temperatura en diferentes especies animales (Detrich, III *et al.*, 1989; Wallin *et al.*, 1993). En este sentido, es sabido que condiciones de temperatura baja pueden promover el desensamblaje de los microtúbulos (Digue *et al.*, 1999). Asanami y Shimono en sus experimentos de inducción de hipotermia en ratón mediante administración de reserpina, observaron un incremento en el tamaño relativo de los MN inducidos (Asanami y Shimono, 1997b). La inducción de MN de tamaño relativo grande se considera un indicador de efecto aneugénico (Schmid, 1975; Yamamoto y Kikuchi, 1980; Tinwell y Ashby, 1991; Van Hummelen *et al.*, 1992), lo que llevó a los autores a sugerir la alteración del huso mitótico como posible mecanismo de inducción de EPCMN en médula ósea de ratón bajo condiciones de hipotermia (Asanami y Shimono, 1997b). Estudios posteriores de inducción de hipotermia mediante administración de clorpromazina en ratón confirmaron la inducción en médula ósea de EPCMN con MN de tamaño relativo grande (Asanami *et al.*, 1998).

En cuanto a condiciones de hipotermia en ausencia de exposición a agentes químicos, estudios *in vitro* han confirmado la capacidad de inducir la formación de MN. Así, Asanami y colaboradores demostraron que la exposición de células CHL a condiciones de hipertermia producía aberraciones cromosómicas (40 °C, 24 h) y MN (42 °C, 2 h), mientras que la exposición a hipotermia sólo producía MN (31 °C, 24 h) (Asanami *et al.*, 2001). Estos resultados vendrían a apoyar el posible origen aneugénico de los MN inducidos por

hipotermia. En lo que respecta a condiciones *in vivo*, varias comunicaciones científicas han citado incrementos en la frecuencia de EPCMN en médula ósea tras la exposición de ratones a una temperatura ambiental de 12 °C durante 7 h bajo condiciones de inmovilización (Spencer *et al.*, 2005; Gollapudi *et al.*, 2006).

Como hipótesis alternativa se ha sugerido que el incremento en la formación de MN en eritrocitos de roedor asociado a hipotermia podría producirse como consecuencia de una estimulación de la eritropoyesis (Bundy *et al.*, 2004; Tweats *et al.*, 2007a). Esta estimulación se produciría como consecuencia del descenso de los niveles de oxígeno en sangre asociado a las condiciones de hipotermia. El descenso de la temperatura corporal suele ir acompañado del descenso de la frecuencia respiratoria y del flujo sanguíneo de los órganos, siendo el riñón, órgano donde tiene lugar la síntesis y liberación de EPO, especialmente susceptible a este efecto. Condiciones de actividad disminuida, como las observadas generalmente en animales con hipotermia intensa, han sido asociadas en roedores a descensos en los niveles de oxígeno en sangre (Snyder y Diehl, 2005). Por otro lado, se considera que el consumo de oxígeno disminuye proporcionalmente con el descenso de la temperatura celular (Wong, 1983). En este sentido, la inducción de hipotermia se ha propuesto como una respuesta adaptativa frente a situaciones de hipoxia reduciendo la demanda de oxígeno de los tejidos (Wood, 1991). Así pues, de acuerdo con esta hipótesis, el incremento en la formación de MN bajo condiciones de hipotermia tendría su origen en la inducción de condiciones de estrés proliferativo en el proceso de eritropoyesis, afectando a la división de los eritroblastos y al proceso de enucleación (Tweats *et al.*, 2007a). Esta hipótesis, no obstante, parece basarse en evidencias indirectas y, hasta la fecha, no parecen existir evidencias experimentales directas que relacionen la formación de MN bajo condiciones de hipotermia con la estimulación de la eritropoyesis. La realización de estudios que investiguen con mayor detalle este posible mecanismo parece por lo tanto ciertamente necesaria.

En cualquier caso, la confirmación de que la formación de MN bajo condiciones de hipotermia es un efecto secundario a la inducción de hipotermia, y no una consecuencia de la interacción de la sustancia evaluada con el DNA, hace que la obtención de un resultado positivo sea de cuestionable significación biológica.

2. OBJETIVOS

Esta Tesis se enmarca en el contexto de las líneas de investigación desarrolladas en el Departamento de Toxicología de la empresa farmacéutica ESTEVE y el Departament de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, dirigidas a valorar el potencial genotóxico de una serie de fármacos experimentales con afinidad por el receptor σ_1 pertenecientes a la clase química de los derivados de feniltetrahidropiridinil butilazolina, y a la dilucidación de posibles mecanismos indirectos de genotoxicidad susceptibles de inducir falsos resultados positivos en el ensayo *in vivo* de MN en ratón. En este contexto, los objetivos concretos propuestos en este trabajo son los siguientes:

- 1.- Estudiar el posible potencial genotóxico del fármaco experimental E-5842, mediante la realización de una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* de genotoxicidad.
- 2.- Estudiar el efecto de la administración oral de E-5842 sobre la temperatura corporal en ratón, así como la posible relación entre el efecto hipotérmico inducido tras la administración de E-5842 y el incremento de la frecuencia de EPCMN en médula ósea.
- 3.- Establecer el posible mecanismo implicado en la inducción de EPCMN bajo condiciones de hipotermia inducida tras la administración de E-5842, mediante la determinación del tamaño relativo de los MN.
- 4.- Estudiar el posible potencial genotóxico de los fármacos experimentales A, B y C mediante una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* de genotoxicidad, y determinar la posible existencia de efectos de clase atribuibles a su diana farmacológica de acción, el receptor σ_1 , o derivados de su estructura química común de feniltetrahidropiridinil butilazolina.
- 5.- Estudiar la implicación del receptor σ_1 en la inducción de condiciones de hipotermia intensa y prolongada, asociadas a la formación de MN en eritrocitos de roedor, mediante la utilización de animales transgénicos *knockout* para el receptor σ_1 .
- 6.- Contribuir a la investigación del mecanismo subyacente a la inducción de EPCMN bajo condiciones de hipotermia, estudiando la posible existencia de un mecanismo de estimulación de la eritropoyesis.
- 7.- Valorar el potencial riesgo genotóxico de la utilización clínica de los fármacos experimentales E-5842, A, B y C.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se hace una breve descripción de los materiales y métodos empleados en la realización de los diferentes estudios. Una descripción más detallada de éstos consta en los apartados de Materiales y Métodos de los correspondientes artículos.

3.1. Sustancias

3.1.1. Sustancias de ensayo

Los siguientes fármacos experimentales fueron sintetizados en el Departamento de Síntesis Química de la empresa farmacéutica ESTEVE (Barcelona, España):

- E-5842 (citrate de 4-(4-fluorofenil)-1,2,3,6-tetrahydro-1-[4-(1,2,4-triazol-1-il)butil]piridina, CAS-220120-14-9).
- Compuesto A (4-(4-clorofenil)-1-[4-(4-cloro-1H-pirazol-1-il)butil]-1,2,3,6-tetrahydro-piridina, CAS 177945-11-8).
- Compuesto B (1-[4-(4,5-dicloro-2-metil-1H-imidazol-1-il)butil]-1,2,3,6-tetrahydro-4-[3-(trifluorometil)fenil]piridina, CAS 177945-14-1).
- Compuesto C (4-(4-clorofenil)-1,2,3,6-tetrahydro-1-[4-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butil]piridina, CAS 255736-90-4).

El nivel de pureza de los lotes empleados en los ensayos fue siempre superior al 99,4%, quedando así minimizada la probabilidad de detectar efectos asociados a la presencia de impurezas.

La sustancia E-5842 se ensayó en su forma de sal de citrato, excepto en el estudio del ML en el que fue ensayada en su forma de sal de clorhidrato. Los compuestos A, B y C se ensayaron en su forma de sal de metanosulfonato, clorhidrato y citrato, respectivamente.

3.1.2. Sustancias de referencia

En cada uno de los ensayos realizados se ha empleado como control negativo de referencia el vehículo utilizado en la formulación de la correspondiente sustancia de ensayo. Los vehículos empleados fueron seleccionados en función de las propiedades fisicoquímicas y de solubilidad de las sustancias en el correspondiente modelo experimental. En la tabla 3.1 se presentan los

diferentes vehículos empleados para cada una de las sustancias ensayadas en los diferentes estudios realizados.

Tabla 3.1. Vehículos empleados como control negativo de referencia.

Sustancia de ensayo	Estudio	Vehículo
E-5842	Test de Ames	Agua
	ML	Agua
	AbCr	Agua
	MN en ratón	Agua
	MN en hígado de rata	Agua
Compuesto A	Test de Ames	DMSO
	ML	DMSO
	MN en ratón	Agua
Compuesto B	Test de Ames	Agua
	ML	Agua
	MN en ratón	Metilcelulosa 1%
Compuesto C	Test de Ames	Dimetilformamida
	ML	Agua
	MN en ratón	Agua

Como sustancia de referencia en el estudio de determinación de los niveles de EPO bajo condiciones de hipotermia, se ha empleado el fármaco clorpromazina (CAS-69-09-0, Sigma-Aldrich). Para su administración, la clorpromazina se disolvió en suero fisiológico.

Para demostrar el correcto funcionamiento de los diferentes procedimientos experimentales empleados, en cada uno de los ensayos realizados se ha incluido como control(es) positivo(s) sustancias de conocido potencial genotóxico. En la tabla 3.2 se presentan las diferentes sustancias empleadas.

Tabla 3.2. Sustancias empleadas como control positivo.

Sustancia, Proveedor	Vehículo	Estudio	Referencia
2-aminoantraceno (AAN), <i>Sigma-Aldrich</i>	DMSO	Ames	Artículos 1, 3
2-nitrofluoreno (2NF), <i>Koch-Light, Sigma-Aldrich</i>	DMSO	Ames	Artículos 1, 3
4-nitro-O-fenilenodiamina (NOPD), <i>Sigma-Aldrich</i>	DMSO	Ames	Artículo 3
9-aminoacridina (AAC), <i>Koch-Light</i>	DMSO	Ames	Artículos 1, 3
Azida sódica (NaN ₃), <i>Sigma-Aldrich</i>	Agua	Ames	Artículos 1,3
Benzo(a)pireno (BP), <i>Sigma-Aldrich</i>	DMSO	ML	Artículos 1, 3
Ciclofosfamida (CP), <i>Sigma-Aldrich</i>	Agua	MN en ratón	Artículos 1, 3, 4, 5 Anexo 1
	Suero fisiológico	MN en ratón (dosis repetida)	Artículo 1
	DMSO	AbCr	Artículo 1
Colchicina, <i>Sigma-Aldrich</i>	Suero fisiológico	MN en ratón	Anexo 1
Dimetilnitrosamina (DMN), <i>Sigma-Aldrich</i>	Agua	MN hígado de rata	Artículo 1
Mitomicina C (MMC), <i>BDH</i>	Agua	MN en ratón	Artículo 3
Oxido de 4-nitroquinolina (NQ), <i>Sigma-Aldrich, Fluka</i>	DMSO	Ames	Artículos 1, 3
	DMSO	AbCr, ML	Artículo 1

3.1.3. Formulación y administración de sustancias

Las soluciones y suspensiones de las sustancias de ensayo, así como de las sustancias de referencia, se prepararon justo antes de su administración a los animales o a los cultivos celulares. Los volúmenes de administración y concentraciones ensayadas constan en los apartados de Materiales y Métodos de los correspondientes artículos. En los estudios *in vivo*, los animales fueron pesados inmediatamente antes de la administración y recibieron el volumen de vehículo, sustancia de ensayo o de referencia correspondiente a su peso corporal.

3.2. Ensayos *in vitro* de genotoxicidad

De acuerdo con las directrices internacionales que rigen los ensayos de genotoxicidad con productos farmacéuticos (ICH y OCDE), todos los ensayos *in vitro* se han realizado por duplicado, tanto en ausencia como en presencia de un sistema exógeno de activación metabólica (fracción microsomal S9 de hígado de rata).

3.2.1. Test de Ames

Los ensayos de mutación génica en bacterias fueron realizados según las recomendaciones de Maron y Ames (1983) y siguiendo el protocolo experimental establecido en la directriz de la OCDE nº 471 (OECD, 1997a). De forma breve, cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) y de *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* pKM101) auxotróficas para histidina y triptófano, respectivamente, fueron expuestas a las sustancias de ensayo, o a sus correspondientes controles vehículo y positivos. Las concentraciones finales así como las condiciones experimentales ensayadas constan en los apartados de Materiales y Métodos de los correspondientes artículos (Artículos 1 y 3). Tras un periodo de incubación de 48-72 h a 37 °C en oscuridad, se procedió al recuento de colonias revertientes.

3.2.2. Ensayo del linfoma de ratón

Los ensayos de mutación génica en células de linfoma de ratón se llevaron a cabo según el método de fluctuación en placas de 96 pocillos (Cole *et al.*, 1990) y siguiendo el protocolo experimental establecido en la directriz de la OCDE nº 476 (OECD, 1997d). De forma breve, células L5178Y *tk*^{+/-} de linfoma de ratón fueron expuestas a las sustancias de ensayo, o a sus correspondientes controles vehículo y positivos. Las concentraciones finales y condiciones experimentales ensayadas constan en los apartados de Materiales y Métodos de los correspondientes artículos (Artículos 1 y 3). Tras un periodo de exposición de 3 ó 24 h, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos durante 8 días (37 °C, 5% CO₂) para la determinación de valores de citotoxicidad, y durante 10-12 días (tras un periodo de expresión de 2 días) para la determinación de la frecuencia de mutación.

3.2.3. Ensayo de aberraciones cromosómicas

El ensayo de AbCr fue realizado siguiendo la metodología descrita por Dean y Danford (1984) y siguiendo el protocolo experimental establecido en la directriz de la OCDE nº 473 (OECD, 1983). De forma breve, linfocitos de sangre periférica humana en estado de proliferación mediante estimulación con fitohemaglutinina, fueron expuestos a la sustancia en estudio, o a sus correspondientes controles vehículo y positivos. Tras un periodo de exposición de 3 ó 20 h, y el correspondiente periodo de recuperación, se obtuvieron preparaciones de metafases para su examen al microscópico óptico (x200 – x1000), con la finalidad de detectar la presencia de aberraciones cromosómicas.

3.3. Ensayos *in vivo* de genotoxicidad

Todos los procedimientos en los que han estado implicados animales se han realizado en conformidad con la Guía de la Comunidad Europea para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (EEC, 1986). En la tabla 3.3 se presentan las diferentes especies animales y cepas empleadas en los estudios.

Tabla 3.3. Animales empleados en los estudios *in vivo* de genotoxicidad.

Especie	Cepa	Proveedor	Referencia
Ratón	Albino Swiss CFLP	Harlan Interfauna Ibérica	Artículo 1
	CD-1	Charles River UK	Artículos 1, 3
		Harlan UK	Artículo 3, Anexo 1
		Harlan Interfauna Iberica	Artículos 4, 5
	σ_1 R-KO (CD-1)	Colonia de cría ESTEVE	Artículo 4
Rata	Wistar	Charles River UK	Artículo 1

3.3.1. Animales y alojamiento

Los animales fueron alojados en salas acondicionadas con valores de temperatura y humedad relativa fijados a 22 °C y 50%, respectivamente, un flujo constante de renovación de aire, y una iluminación regulada para dar un ciclo de luz/oscuridad de 12 h.

En general, los animales fueron alojados en grupos (sexos separados), con el fin de favorecer la interacción social de los animales durante las fases de aclimatación y tratamiento. En el caso particular de los ratones macho empleados para la determinación de los niveles de EPO en sangre, éstos fueron alojados de forma individual con el fin de evitar que se infligieran heridas. Estudios preliminares realizados han mostrado la influencia de la presencia de hemorragia asociada a heridas, sobre la variabilidad de los niveles de EPO.

3.3.2. Ensayo de micronúcleos en ratón

Los ensayos de MN en ratón fueron realizados según el método descrito por Schmid (1975). En el caso particular de los ensayos de normativa realizados como parte del programa de desarrollo preclínico para el registro farmacéutico (Artículos 1 y 3), éstos fueron realizados según el protocolo experimental establecido en la directriz de la OCDE nº 474 (OECD, 1997c). De forma breve, los animales fueron tratados con las sustancias de estudio, o con sus correspondientes controles vehículo y positivos. En los tiempos seleccionados, los animales fueron sacrificados para la obtención de muestras de médula ósea. En el caso del ensayo de MN en sangre circulante, se obtuvieron muestras de sangre periférica antes del sacrificio de los animales. Los tamaños de grupo, vías de administración, dosis administradas y tiempos de muestreo o sacrificio constan en los apartados de Materiales y Métodos de los correspondientes artículos.

En los ensayos de normativa (Artículos 1 y 3) se emplearon ratones macho y hembra, con el fin de estudiar la posible existencia de diferencias entre sexos en la respuesta a las sustancias evaluadas. Al no observarse diferencias entre sexos tras la administración de E-5842 (Artículo 1), en el resto de estudios se emplearon exclusivamente ratones macho. Está descrito que este sexo presenta una respuesta cuantitativa generalmente superior frente a la inducción de MN (CSGMT, 1986; Vanparrys *et al.*, 1992).

Los ratones transgénicos deficientes para el gen del receptor σ_1 (σ_1 R-KO) se obtuvieron de la colonia de cría de la empresa farmacéutica ESTEVE. El proceso de obtención y caracterización de esta cepa de ratón ha sido ampliamente descrita (Langa *et al.*, 2003). De forma breve, el gen que codifica el receptor σ_1 fue inactivado en células madre embrionarias (ES) R1 de ratón mediante la técnica de recombinación homóloga. Células ES *knockout* (KO) para el receptor σ_1 fueron agregadas a mórulas de 8 células de ratones CD-1 no

consanguíneos. Las quimeras viables fueron apareadas con animales CD-1 no consanguíneos, y los animales homocigóticos mutantes para el receptor σ_1 fueron expandidos. La colonia de cría de ratones σ_1 R-KO se obtuvo a partir de la cepa original CD-1 x 129Sv mediante retrocruzamiento con ratones CD-1 durante un mínimo de 10 generaciones.

En los diferentes ensayos, se contabilizaron como MN aquellos que cumplían con las siguientes características:

- Forma redondeada con un contorno claramente definido.
- Fuertemente teñido y con una coloración similar al núcleo de otras células (en el caso de eritrocitos) o al núcleo celular (en el caso de hepatocitos).
- Fuerte fluorescencia verde-amarilla en la tinción con NA.
- Situado en el mismo plano focal de la célula.
- Ausencia de estructuras semejantes a MN alrededor de la célula.

3.3.2.1. Ensayo de micronúcleos en médula ósea

En los tiempos indicados en los apartados de Materiales y Métodos de los diferentes artículos, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se extrajo la médula ósea de los dos fémures mediante una aguja desechable y se efectuó una extensión directa sobre un portaobjetos que contenía una gota de suero fetal bovino. Las extensiones se fijaron con metanol durante 5 min y, una vez secas, se tiñeron con colorante Giemsa al 5% (pH 6,8, Buffer Sorenson 0,01M) durante 25-30 min. Las extensiones se montaron con DPX y fueron examinadas al microscopio óptico (x400 – x1000) bajo código. Para cada animal se determinó la relación entre EPC y ENC mediante el examen de un mínimo de 1000 eritrocitos totales. Se examinaron un total de 2000 EPC por animal registrándose el número de ellos que presentaban MN.

3.3.2.2 Ensayo de micronúcleos en sangre periférica

En el tiempo indicado (Artículo 4, Materiales y Métodos) se obtuvieron muestras de sangre periférica (5 μ L) por punción de una vena de la cola, siendo teñidas mediante tinción supravital con NA (Hayashi *et al.*, 1990). De forma breve, se mezclaron 5 μ L de sangre con 10 μ L de una solución de suero fetal bovino con 25 mM de EDTA, y se depositaron un par de

gotas sobre portaobjetos previamente cubiertos con 10 μ L de una solución de NA (1 mg/mL, en agua). Las preparaciones fueron examinadas bajo código con un microscopio de epifluorescencia (x400) con un filtro dicróico (filtro de excitación 450-490 nm, filtro barrera 520 nm), registrándose para cada animal el número de RET presentes en 1000 eritrocitos y el número de MN en 2000 RET. El recuento de RET se limitó a los tipos I, II y III (Vander *et al.*, 1963).

3.3.3. Ensayo de micronúcleos en hígado de rata

Los animales fueron administrados 24 h antes y 24 h después (E-5842 y control vehículo) de una hepatectomía parcial consistente en la extirpación, bajo anestesia con halotano, de los lóbulos hepáticos medio y lateral izquierdo. La hepatectomía y la doble administración tienen como objetivo inducir la proliferación de los hepatocitos y maximizar el potencial de detección de efectos genotóxicos, respectivamente. En los tiempos de muestreo indicados en el apartado de Materiales y Métodos (Artículo 1) los animales fueron anestesiados profundamente con halotano, y se procedió a la disgregación del hígado mediante la técnica de perfusión en dos fases para la obtención de una suspensión de hepatocitos (Seglen, 1976). Se obtuvieron extensiones que se tiñeron con reactivo de Schiff (30 min) y colorante *light green* al 1% (1 min). Las preparaciones se examinaron al microscopio óptico (x1000) bajo código, examinándose la presencia de MN en 2000 hepatocitos, y el número de células en mitosis en 1000 hepatocitos.

3.3.4. Valoración de la temperatura corporal

En los tiempos indicados en los apartados de Materiales y Métodos de los correspondientes artículos, se registró la temperatura corporal de los animales mediante la inserción rectal de una sonda térmica (Modelo 443, Selecta) conectada a un termómetro digital (Pb 0331, Panlab). Para ello, los animales se inmovilizaron suavemente con una mano, mientras la sonda era introducida cuidadosamente en el recto del animal hasta una profundidad de aproximadamente 18 mm. Se registró la temperatura aproximadamente a los 5 segundos de estabilizarse la lectura.

3.3.5. Inhibición del efecto hipotérmico

Para inhibir el descenso de la temperatura corporal producido por la administración de E-5842 los animales fueron expuestos a condiciones de temperatura ambiental aumentada, aislándose así el efecto hipotérmico del posible efecto del E-5842 sobre las células de la médula ósea (Anexo 1). Para ello, tras la administración los animales fueron introducidos en una estufa de aire caliente (Modelo 381, Selecta), con una temperatura ambiental interna de aproximadamente 30 °C y 30% de humedad relativa. Transcurridas 24 h, los animales fueron mantenidos bajo condiciones normales de temperatura ambiental (22 °C).

3.3.6. Examen morfológico de los micronúcleos

La inducción de MN con un tamaño relativo grande se considera un indicador de posible efecto aneugénico, y la determinación del área o diámetro relativo de los MN han mostrado ser métodos válidos para distinguir el posible origen aneunógeno o clastógeno de los mismos (Yamamoto y Kikuchi, 1980; Vanparys *et al.*, 1990; Van Hummelen *et al.*, 1992). Las extensiones de médula ósea evaluadas (Anexo 1) fueron examinadas al microscopio óptico (x1000), obteniéndose de cada animal imágenes digitales de 30 EPCMN mediante una cámara fotográfica digital (Olympus DP11). Las imágenes digitales se procesaron mediante el *software* de tratamiento de imagen SigmaScan Pro 5.0.0 (SPSS Inc.), obteniéndose los valores de diámetro (d) y área (a) de cada MN, así como de diámetro (D) y área (A) del eritrocito que lo contenía. Con estos datos se establecieron los correspondientes valores de diámetro y área relativa de MN. Para cada grupo de tratamiento se estableció, el patrón de distribución de los valores de área relativa de MN según el procedimiento descrito por Vanparys y colaboradores (1990), así como la presencia de MN de “tamaño relativo grande” según el criterio de Yamamoto y Kikuchi ($d \geq \frac{1}{4}D$) (Yamamoto y Kikuchi, 1980).

3.3.7. Determinación de los niveles de eritropoyetina en sangre

En los tiempos indicados (Artículo 5, Materiales y Métodos) los animales fueron anestesiados profundamente mediante inhalación con isoflurano, obteniéndose mediante punción cardíaca muestras de sangre (0,5 mL) para la determinación de niveles de EPO. Las muestras se dejaron coagular durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras centrifugar durante

20 min a 1000 x g se obtuvo el suero, que fue congelado a -20 °C hasta su procesamiento. Para la determinación de los niveles de EPO, las muestras de suero fueron valoradas mediante el kit de inmunoensayo enzimático (ELISA) “Quantikine mouse EPO Immunoassay kit” (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA), según las instrucciones del fabricante. Con el estándar interno (EPO de ratón) se obtuvieron valores lineales de concentración de EPO comprendidos entre 47 y 3000 pg/mL, presentando la recta patrón un coeficiente de regresión de 0,998 (figura 3.1). Los valores de absorbancia obtenidos con las muestras experimentales ($Abs_{450\text{ nm}} - Abs_{570\text{ nm}}$) fueron extrapolados sobre la recta patrón, obteniéndose así los valores experimentales de niveles de EPO en suero.

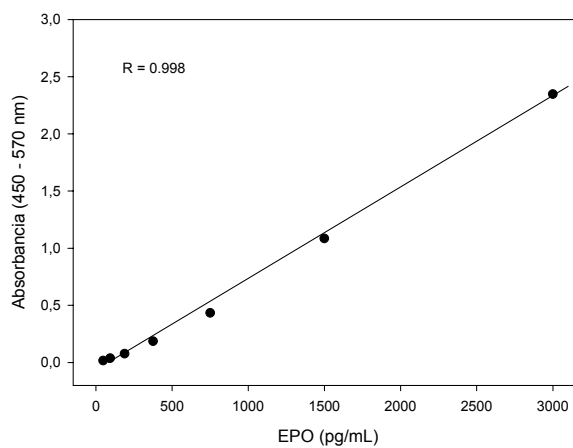


Figura 3.1. Recta patrón del estándar interno de EPO (47 – 3000 pg/mL).

3.4. Análisis estadístico y evaluación de resultados

Tal como se indica en los apartados de Materiales y Métodos de los correspondientes artículos, a partir de los valores individuales de los parámetros evaluados se calcularon los valores medios y sus desviaciones estándar, para cada uno de los grupos experimentales. Los valores obtenidos en los diferentes grupos experimentales fueron comparados respecto al valor de su correspondiente grupo control vehículo. Los datos fueron procesados mediante el software de análisis estadísticos SAS/STAT[®] versión 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). En la tabla 3.4. se muestran los diferentes ensayos estadísticos realizados, así como el criterio de significación estadística aplicado para la designación de resultado positivo.

Tabla 3.4. Análisis estadístico y evaluación de resultados.

Ensayo	Parámetro evaluado	Ensayo estadístico	Resultado positivo
Ames	Nº de colonias revertientes	ANOVA, Test de Dunnett ^A	$P \leq 0,01$
ML	Frecuencia de mutación	ANOVA, Test de Dunnett ^A	$p < 0,05$
AbCr	Nº de metafases con aberraciones cromosómicas	Test exacto de Fisher ^B	$p < 0,05$
MN en ratón	EPCMN	ANOVA, Test de Dunnett ^{A, D}	$p < 0,05$
	RETMN	ANOVA, Test de Dunnett ^{A, D}	$p < 0,05$
	MN con “ $d \geq \frac{1}{4}D$ ”	ANOVA, Test de Dunnett ^A	$p < 0,05$
MN hepatocitos de rata	Hepatocitos con MN	Ji-cuadrado ^C	
Temperatura corporal	Diferencias entre tratamientos	ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo), Test de Dunnett ^A	$p < 0,05$
	Diferencias entre tratamientos y cepas de ratón	ANOVA de tres factores (tratamiento, tiempo y cepa), Test de Dunnett ^A	$p < 0,05$
EPO	Niveles de EPO en sangre	ANOVA, Test de Dunnett ^A	$p < 0,05$

^A (Dunnett, 1955); ^B (Richardson *et al.*, 1989); ^C (Lovell *et al.*, 1989); ^D Previa transformación en rangos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resumen del contenido del artículo 1

Assessment of the genotoxic potential of the antipsychotic sigma receptor ligand E-5842.

El E-5842 es un fármaco experimental con afinidad por el receptor σ_1 , seleccionado para su desarrollo como posible agente antipsicótico para el tratamiento de la esquizofrenia. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial genotóxico del E-5842.

De acuerdo con los requerimientos establecidos por las autoridades reguladoras para la valoración del potencial genotóxico de productos farmacéuticos, el E-5842 fue evaluado mediante una extensa batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* de genotoxicidad (ICH S2B, 1997). Estos incluyeron un ensayo *in vitro* de mutación génica en bacterias (test de Ames), un ensayo *in vitro* de mutación génica y aberraciones cromosómicas en células de mamífero (ensayo del ML), un ensayo *in vitro* de AbCr en linfocitos humanos, dos ensayos *in vivo* de MN en eritrocitos de médula ósea de ratón tras administración oral a dosis única y dosis repetida, respectivamente, y un ensayo *in vivo* de MN en hígado de rata tras administración oral a dosis repetida.

Se obtuvieron resultados positivos en el ensayo *in vitro* de AbCr en linfocitos humanos y en el ensayo de MN en ratón tras la administración a dosis única, observándose incrementos en la frecuencia de aberraciones cromosómicas y EPCMN, respectivamente. El E-5842 demostró carecer de potencial genotóxico en el test de Ames, en el ensayo del ML, y en los ensayos *in vivo* de MN en hígado de rata y en médula ósea de ratón tras administración repetida. El incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas observado en el ensayo *in vitro* con linfocitos humanos se considera atribuible a condiciones de toxicidad excesiva, y carente de relevancia biológica. Estudios complementarios (ver Anexo 1) han demostrado que el incremento en la frecuencia de EPCMN observado en el ensayo de MN en ratón con administración única, se produce como un efecto secundario a la inducción de hipotermia tras la administración de E-5842.

El peso de las pruebas experimentales obtenidas en los diferentes ensayos *in vivo* e *in vitro* realizados, indica que la exposición de pacientes al fármaco experimental E-5842 bajo condiciones clínicas de uso, no debería representar ningún riesgo genotóxico.

ARTÍCULO 1

Assessment of the genotoxic potential of the antipsychotic sigma receptor ligand E-5842.

Guzmán A., García C., Fernández de Henestrosa A.R., Riley S., Ruíz M.T., Marín A.P,
Tortajada A.

Mutat. Res. 2006: 605, 63-77.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Mutation Research 605 (2006) 63–77

Genetic Toxicology and
Environmental Mutagenesiswww.elsevier.com/locate/gentoxCommunity address: www.elsevier.com/locate/mutres

Assessment of the genotoxic potential of the antipsychotic sigma receptor ligand E-5842

Antonio Guzmán^{a,*}, Concepción García^a, Antonio R. Fernández de Henestrosa^a,
Sue Riley^b, Maria Teresa Ruiz^a, Ana-Paz Marín^a, Araceli Tortajada^a

^a Department of Toxicology, ESTEVE, Mare de Déu de Montserrat 221, 08041 Barcelona, Spain

^b Covance Laboratories Ltd., Otley Road, Harrogate, North Yorkshire HG3 1PY, UK

Received 10 October 2005; received in revised form 20 December 2005; accepted 4 February 2006

Available online 4 May 2006

Abstract

The genotoxic potential of E-5842, a sigma ligand compound being developed as an antipsychotic drug, was evaluated by means of an extensive battery of *in vitro* and *in vivo* assays. Negative results were obtained in an Ames test (up to 5000 µg/plate), a mouse lymphoma assay (up to 535.1 µg/ml (–S9) and 891.8 µg/ml (+S9)), an *in vivo* rat hepatocyte micronucleus assay (up to 100 mg/kg/day on 2 days), and a two-dose mouse micronucleus assay (up to 40 mg/kg/day on 2 days). In a single-dose mouse bone-marrow micronucleus assay (up to 400 mg/kg; 24, 48 and 72 h sampling) a slight and non-statistically significant increase in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) was observed 48 h after administration of a 200 mg/kg dose, in the absence of bone-marrow toxicity. This minor increase in MNPCE frequency was considered of questionable biological relevance, because it was observed under conditions of marked animal toxicity including mortality. In addition, it occurred in association with a strong hypothermic effect produced by administration of E-5842.

A clear increase in the frequency of structural chromosomal aberrations was observed in human lymphocytes at concentrations ≥ 350.6 and 1685.4 µg/ml in the presence and absence of S9, respectively. Mitotic accumulation was observed at those concentrations at which clastogenic effects were observed, a condition that may have masked toxicity. Concentrations lacking clastogenic effects in this chromosome aberration assay (300.7 and 173.2 µg/ml in the presence and absence of S9, respectively) were well in excess of maximum human plasma concentrations attained in clinical studies at the maximum tolerated dose (19.1 ng/ml). A weight-of-evidence analysis, taking into consideration the results obtained in the different *in vitro* and *in vivo* assays and the conditions of clinical use, suggest that E-5842 would not pose a genotoxic risk under clinical conditions.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Sigma receptor; Genotoxicity; Antipsychotic drug; Risk assessment; Mitotic accumulation

1. Introduction

Schizophrenia is a serious central nervous system disorder of still unknown aetiology, characterized by

disturbances in form and content of thought, mood behaviour, sense of self and relationship to the external world. The symptoms of this disorder have been classified according to positive and negative symptoms. Positive symptoms include hallucinations, delusions, psychosis, paranoia, disorganized speech and behaviour, and negative symptoms include loss of energy, deficiency of speech, lack of initiative, loss of sociability and blunting of emotions [1]. Dopamine D₂ receptor antag-

* Corresponding author. Tel.: +34 93 446 60 65;

fax: +34 93 450 16 11.

E-mail address: aguzman@esteva.es (A. Guzmán).

onists (D_2 antagonists), the major therapeutic agents for treatment of schizophrenia, have been shown to be effective in improving positive symptoms of schizophrenia. However, D_2 antagonists are not sufficiently effective in improving the negative symptoms of schizophrenia and they induce clinical extrapyramidal adverse effects (e.g. dystonia, tardive dyskinesia, and akathisia). Therefore, there is a need to search for novel antipsychotic agents with different mechanism(s) of action and better activity and tolerability profiles [2]. Among these new agents, sigma (σ) receptor ligands have emerged as potential pharmacological targets for developing compounds with antipsychotic properties. The hypothesis for the possible use of σ ligands for treatment of schizophrenia originated from the observation that some of the typical antipsychotic agents such as haloperidol, perphenazine and chlorpromazine, which are D_2 antagonists, also have affinities for σ receptors [3]. Antipsychotic properties have been demonstrated for σ receptor ligands in both animal studies and clinical trials [4,5].

E-5842 (4-(4-fluorophenyl)-1,2,3,6-tetrahydro-1-[4-(1,2,4-triazol-1-yl)butyl]pyridine citrate, CAS-220120-14-9) is a newly developed and potential atypical antipsychotic drug with very high affinity for the σ_1 receptor ($K_i = 4$ nM), and moderate to low affinity for other central nervous system receptors, including the dopamine D_1 , D_2 , D_3 , and D_4 receptors and the serotonin 5-HT $_2$ and 5-HT $_{1A}$ receptors [6]. E-5842 has shown to be active in different animal models predictive of antipsychotic activity, with a low tendency to cause extrapyramidal side-effects and with efficacy against positive and negative symptoms of schizophrenia [6]. Assessment of genotoxic potential is a crucial and mandatory step in the development process of a pharmaceutical compound, because of the nature of the effect being evaluated and its relevance to human safety in relation to the potential induction of cancer and hereditary defects. Here we report the results of the battery of studies that were undertaken to evaluate the possible genotoxic potential of E-5842, as part of the pre-clinical safety-assessment program for development of this substance as a putative antipsychotic compound. E-5842 was tested for genotoxicity in a battery of three in vitro and three in vivo assays: an Ames test, an in vitro chromosome aberration assay in human lymphocytes, an in vitro gene mutation assay in mouse lymphoma L5178Y $tk^{+/-}$ cells, an in vivo rat hepatocyte micronucleus assay, and both a single-dose and a two-dose in vivo mouse micronucleus assay. The results obtained in these studies and their relevance to risk assessment are discussed.

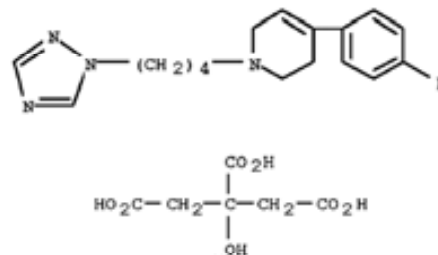


Fig. 1. Chemical structure of E-5842.

2. Materials and methods

2.1. Test substance

E-5842 bulk powder was synthesised by Laboratorios Dr. Esteve (Barcelona, Spain) (Fig. 1). E-5842 was administered as its citrate salt in all studies except for the mouse lymphoma assay where it was administered as its hydrochloride salt. Purity was always above 98.5%. For exposure comparison with animal and human plasma levels, in vitro tested concentrations of E-5842 are expressed as equivalents of its base. Test article solutions were prepared by dissolving E-5842 in reverse-osmosis water immediately prior to the assays. For in vitro studies, a stock solution was prepared at the maximum required treatment concentration, filter-sterilized (0.22 μ m) and then further diluted in sterile reverse-osmosis water to the required concentrations. Analysis of the concentration of the test substance was performed in one of the in vitro assays and confirmed the validity of the formulation procedure. The vehicle (reverse-osmosis water) was used as negative control for all studies. Positive control chemicals were obtained from the following manufacturers: cyclophosphamide (CP, Sigma), 4-nitroquinoline 1-oxide (NQO, Aldrich and Fluka), 2-nitrofluorene (2NF, Koch-Light), sodium azide (NaN_3 , Sigma), 9-aminoacridine (AAC, Koch-Light), 2-aminoanthracene (AAN, Sigma), benzo(a)pyrene (BP, Aldrich), dimethylnitrosamine (DMN, Sigma). All other chemicals were of the purest grade available. Prior to the assays, NaN_3 and DMN were dissolved in water, CP was dissolved in water or physiological saline (for the single-dose and the two-dose mouse micronucleus assays, respectively), and the remaining positive control chemicals were dissolved in DMSO.

2.2. Metabolic activation system

For all in vitro assays, mammalian liver post-mitochondrial fraction (S9) was used for metabolic activation. S9 fraction prepared from the livers of male Sprague–Dawley rats induced with Aroclor 1254 was obtained from Molecular Toxicology Incorporated (Moltox; Maryland, USA), stored frozen at approximately -80°C , thawed just prior to use and supplemented with NADPH-generating system. Final concentrations

of the S9 fraction in the treatment medium of the different *in vitro* assays were 0.24% for the Ames test and 2% for both the mouse lymphoma and the human lymphocyte chromosome aberration assays.

2.3. Animal housing

Animals used in the *in vivo* genotoxicity studies were housed in rooms with temperature and relative humidity set at target values of 22 °C and 50%, respectively; lighting was controlled to give a 12h light–dark cycle; air conditioning guaranteed a minimum of 15 volume changes of air per hour. All procedures involving animals and their care were conducted in strict conformity with the European Community Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [7].

2.4. Ames test

The method used followed the recommendations by Maron and Ames [8]. Four histidine auxotrophic strains of *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) and an *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* pKM101) strain were used.

These strains were obtained from CECT (Valencia, Spain) except for the *E. coli* strain, which was originally obtained from Moltex (Maryland, USA). A frozen sample of each tester strain was thawed and a late-exponential culture was prepared. Two independent experiments were performed, both without and with metabolic activation, using triplicate plates for each test substance concentration, positive and vehicle controls. Test concentrations and conditions are detailed in Table 1. 2NF, NaN₃, NQO, AAC, and AAN were used as positive controls, and sterile reverse-osmosis water as vehicle control. Experiment 1 followed the plate-incorporation assay procedure. Briefly, 0.1 ml of test substance (or control solution), 0.1 ml of bacterial culture and 0.5 ml of 10% S9 mix (phosphate buffer solution for treatment without activation) were mixed and poured on to Vogel Bonner-E minimal agar plates after addition of 2 ml of top agar at 42 °C. For Experiment 2, the preincubation assay was employed, with 0.1 ml of test substance (or control solution), 0.1 ml of bacterial culture and 0.5 ml of 10% S9 mix (phosphate buffer solution for treatment without activation) being mixed and incubated for 20 min at 37 °C, before addition of 2 ml molten agar at 42 °C. Plates were inverted and incubated at 37 °C in the dark for 3 days. Revertant colonies were counted and the background

Table 1
Ames test with E-5842

Treatment	Mean number revertant colonies per plate ^a									
	TA98		TA100		TA1535		TA1537		<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	
	–S9	+S9	–S9	+S9	–S9	+S9	–S9	+S9	–S9	+S9
Experiment 1										
Vehicle control	22.7	19.3	112.0	103.3	17.7	11.7	14.0	15.0	96.0	107.3
Test dose (µg/plate)										
20.6	31.0	25.0	128.3	112.0	18.0	15.0	11.3	14.3	103.7	115.7
61.7	19.3	23.7	118.7	120.0	16.7	12.7	15.3	17.7	95.0	127.3
185.2	16.7	26.0	110.0	120.0	13.7	9.7	14.7	9.7	91.3	156.0
555.6	17.0	21.3	121.3	128.7	21.7	17.7	14.3	17.3	82.7	79.3
1666.7	22.3	20.3	119.3	93.0	23.7	8.0	10.3	13.7	74.0	72.3
5000	19.3	18.0	111.0	131.0	33.3	22.7	10.3	12.0	62.0	62.7
Positive control ^b	83.7	107.0	334.0	364.7	227.7	84.3	>2000	169.0	684.3	274.7
Experiment 2										
Vehicle control	43.3	53.7	115.0	115.3	13.3	12.3	10.0	14.3	126.3	152.7
Test dose (µg/plate)										
20.6	38.3	44.7	117.7	115.0	16.7	12.3	12.7	13.3	122.3	170.3
61.7	30.7	38.7	129.7	132.3	16.0	13.7	17.0	18.0	120.7	136.3
185.2	37.3	42.3	131.0	122.0	20.0	11.0	10.3	13.7	114.7	117.7
555.6	39.7	39.7	130.7	93.0	18.0	15.3	11.0	14.7	117.7	176.7
1666.7	38.0	40.7	116.0	86.7	14.7	12.3	10.0	11.3	132.0	137.0
5000	37.0	29.7	128.0	80.7	6.7	11.3	12.3	8.0	92.3	90.7
Positive control ^b	184.3	165.0	350.0	288.3	194.3	69.3	>2000	56.7	931.3	355.3

^a Mean of three replicas for all tested conditions.

^b In absence of S9, TA98: 2NF (2 µg/plate); TA100: NaN₃ (0.5 µg/plate) and TA1535: NaN₃ (0.25 µg/plate); TA1537: AAC (50 µg/plate); *E. coli* WP2 *uvrA* (pKM101): NQO (0.125 µg/plate). In presence of S9, AAN, TA98, TA100 and TA1535 (1 µg/plate); TA1537 (2 µg/plate); *E. coli* WP2 *uvrA* (pKM101) (4 µg/plate).

lawn inspected for signs of toxicity. From the individual plate counts the mean and standard deviation for each treatment were determined. The Dunnett's test [9] was used to compare counts of each test substance concentration with its corresponding vehicle control. Presence of a dose-response was checked by linear regression analysis [10]. A result was evaluated as positive for mutagenic activity when the Dunnett's test gave a significant response ($p \leq 0.01$), the data set showed a significant dose-correlation, and the positive effect was reproducible.

2.5. Human lymphocyte chromosome aberration assay

This test was conducted following the method previously described by Dean and Danford [11]. Two independent assays were performed both without and with metabolic activation. Heparinised whole blood samples were obtained from two healthy adult subjects (male and female for Experiments 1 and 2, respectively). Cultures were established by placing 0.4 ml

of heparinised whole blood into 9 ml RPMI medium supplemented with 20% foetal calf serum, 50 µg/ml gentamycin and 10 µg/ml phytohaemagglutinin. Cultures were incubated for approximately 48 h at 37 °C and rocked continuously, prior to start of treatment. Both for treatment in the absence and presence of S9, quadruplicate cultures for vehicle and duplicate cultures for each test substance concentration and the positive controls were set up. Test concentrations and conditions are detailed in Table 2. Vehicle-control cultures were treated with sterile reverse-osmosis water and positive control cultures with NQO or CP in the absence and presence of S9, respectively. Cultures were treated for 20 h in the absence of S9, and for 3 h in the presence of S9, followed by 17 h recovery. In Experiment 2 an additional 3 h treatment in the presence of S9 followed by 41 h recovery was also performed. After treatment in the presence of S9, cells were washed twice with sterile saline and resuspended in fresh medium for completion of the recovery phase. Colchicine at a final concentration of 1 µg/ml was added 1.5 h prior to harvest. In Experiment 1, osmolal-

Table 3
Mouse lymphoma assay with E-5842

-S9				+S9			
Treatment	Concentration (µg/ml)	%RS	Mutant frequency ^a	Treatment	Concentration (µg/ml)	%RS	Mutant frequency ^a
Experiment 1							
Vehicle	-	100	184	Vehicle	-	100	170
E-5842	55.7	90.9	137	E-5842	223.0	96.3	102
	111.5	81.9	297 ^b		445.9	85.1	101
	233.0	61.1	151		668.9	41.7	136
	445.9	31.4	213		891.8	6.6	155
	668.9 ^b	1.1			1337.7 ^b	0.2	
	891.8 ^b	0.1			1783.6 ^b	0.0	
	Linear trend		NS		Linear trend		NS
NQO	0.05	81.3	353	BP	2	99.0	570
	0.1	70.8	536		3	54.1	1088
Experiment 2							
Vehicle	-	100	129	Vehicle	-	100	137
E-5842	178.4 ^b	79.2	173	E-5842	178.4	82	127
	267.5	80.1	173		356.7	76	131
	356.7	63.7	149		535.1	72	140
	445.9	62.7	164		713.4	59	165
	535.1	46.3	165		891.8	15	263 ^b
	624.3 ^b	9.5			1070.2 ^c	2	
	713.4 ^b	1.8			Linear trend		***
	Linear trend		NS		Linear trend		***
NQO	0.05	66.3	425	BP	2	60.1	638
	0.1	72.2	521		3	40.0	1087

^a Per 10⁶ viable cells.

^b Not plated for viability/5-TFT resistance.

^c Excluded due to excessive toxicity.

^{*} $p < 0.05$ Dunnett's test.

*** $p < 0.001$ chi-square test.

ity and pH measurements were performed in post-treatment media both without and with S9. Cells were collected by centrifugation, resuspended in hypotonic solution (0.075KCl) for 15 min, and fixed in ice-cold methanol/glacial acetic acid solution (3:1, v/v). Several drops of the cell suspension were transferred to microscope slides. The slides were air-dried and stained with Giemsa in pH 6.8 buffer. After examination of the mitotic index (MI), three test substance concentrations for each treatment condition were selected for cytogenetic analysis. For vehicle control and each test substance concentration, 200 well-spread metaphase figures were analysed for structural chromosomal aberrations. Fifty metaphase figures were analysed for the positive controls. The classification of structural aberrations was carried out as described in the International System for Cytogenetic Nomenclature (ISCN) [12]. The presence of polyploid, endoreduplicated and hyperdiploid cells was also recorded. For each treatment condition the proportion of cells with structural aberrations excluding gaps was compared with that of the corresponding vehicle control using Fisher's exact test [13]. The assay was considered positive when there was a statistically significant increase in the proportion of cells with structural aberrations (excluding gaps) at any one concentration, it exceeded the normal range, and the effect was reproducible.

2.6. Mouse lymphoma thymidine kinase assay

The method used corresponded to the fluctuation protocol [14]. L5178Y TK⁺ mouse lymphoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Two independent experiments were performed, each conducted in the absence and presence of metabolic activation. Test concentrations for Experiment 1 were selected based on the results of a preliminary assay. Test concentrations and conditions are detailed in Table 3. Control cultures were treated with sterile reverse-osmosis water (vehicle control), and NQO or BP (positive controls in the absence and presence of S9, respectively). Approximately 10^7 cells were exposed in RPMI medium supplemented with 5% horse serum, 100 μ g/ml gentamycin and 2.5 μ g/ml fungizone, to several concentrations of E-5842 for 3 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Duplicate cultures were set up for the vehicle control and each test substance concentration, and single cultures for the positive control. After the 3 h treatment cells were washed with tissue culture medium, resuspended in 10% serum-supplemented RPMI medium, and, when appropriate, the cell concentration was adjusted to 2×10^5 cells/ml. To determine cell survival, samples were diluted to 8 cells/ml in 20% serum-supplemented medium, seeded into 96-well microplates at an average of 1.6 cells per well, and incubated for 8 days at 37 °C in 5% CO₂. Wells containing viable clones were identified and counted. For assessment of mutations, cells were submitted to an expression period of 2 days during which they were maintained in flasks and their concentration adjusted not to exceed 1×10^6 cells/ml. At the end of the expression period the cells were plated into 96-well plates at an average of 1.6 cells per well and incu-

bated for 10–11 days for assessment of viability, and at an average of 2×10^5 cells per well in the presence of 3 μ g/ml of 5-trifluorothymidine and incubated for 12 days for assessment of mutation. Wells containing clones were identified and counted. Large and small colonies were scored for vehicle and positive controls and for test substance concentrations showing a significant increase in mutant frequency. For each treatment condition the percentage relative survival (%RS) as compared with the vehicle-control culture and the mutant frequency per 10^6 viable cells (MF) were determined. The vehicle-control log mutant frequency was compared with that from each treatment concentration by means of the Dunnett's test [9] and checked for a linear trend by chi-square analysis, according to UKEMS guidelines [15]. The result was considered positive when there was a significant increase in the mutant frequency above control at one or more concentrations, there was a significant dose–response, and the effect was reproducible.

2.7. Single-dose mouse bone-marrow micronucleus test

The micronucleus test was performed according to the method of Schmid [16]. Albino Swiss CFLP mice were obtained from Interfauna Ibérica (Sant Felip de Codines, Spain). On the first day of dosing animals were approximately 9–10 weeks of age and in a weight range of 25–32 g for males and 21–29 g for females. Animals were caged in groups of maximum five, according to sex. They had access to water and commercial rodent diet (Panlab S.L.) ad libitum, except that they were kept under fasting conditions the night prior to treatment. On the basis of a preliminary study, E-5842 doses of 100, 200 and 400 mg/kg were selected. Groups of 15 male and 15 female animals each received either vehicle (reverse-osmosis water) or E-5842. A positive control group of five males and five females received CP at 50 mg/kg. All animals were dosed by oral gavage at a dose-volume of 10 ml/kg. Groups of five male and five female mice were sacrificed by cervical dislocation 24, 48 or 72 h after vehicle or E-5842 administration. CP-treated animals were sacrificed 24 h after administration (Table 4). For each animal, the femurs were dissected and a direct bone-marrow smear was made on a slide with a drop of fetal calf serum (two slides per animal). The smears were fixed with methanol and stained with 5% Giemsa. Slides were coded and examined with light microscopy. For each animal, the relative proportion of polychromatic erythrocytes (PCE) and normochromatic erythrocytes (NCE) was determined by counting a total of 1000 erythrocytes. The number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) among 2000 PCE was determined. The number of micronucleated PCE in each treated group (males and females separately and combined) were compared with the corresponding vehicle group by means of the Dunnett's test [9] after rank transformation of data. The result was considered positive when there was a statistically significant increase ($p < 0.05$) in the frequency of MNPCE at least at one dose, which exceeded the historical vehicle-control range.

Table 4
Single dose mouse micronucleus test with E-5842

Sampling time	Treatment	Dose (mg/kg)	N	PCE/NCE (mean \pm S.D.)	MNPCE/1000 PCEs (mean \pm S.D.)	Animals with MNPCE $\geq 6\%$
24 h	Vehicle	–	10	1.09 \pm 0.28	1.8 \pm 1.3	0
	E-5842	100	10	1.10 \pm 0.23	2.6 \pm 1.3	0
		200	10	1.06 \pm 0.31	2.8 \pm 1.7	0
		400	10	0.95 \pm 0.36	2.2 \pm 1.4	0
	CP	50	10	0.54 \pm 0.21	21.9 \pm 8.2***	10
48 h	Vehicle	–	10	0.59 \pm 0.11	2.4 \pm 1.5	0
	E-5842	100	10	0.85 \pm 0.30	3.0 \pm 1.7	1
		200	10	0.69 \pm 0.33	5.3 \pm 3.0	4
		400	10	0.47 \pm 0.15	2.8 \pm 1.9	1
72 h	Vehicle	–	10	1.41 \pm 0.25	3.0 \pm 1.6	1
	E-5842	100	10	1.55 \pm 0.52	2.3 \pm 1.5	0
		200	10	1.29 \pm 0.41	3.8 \pm 2.5	1
		400	10 ^a	0.57 \pm 0.43	4.2 \pm 1.5	2

^a Only nine animals were examined for MNPCE, one was not analysable due to marked bone-marrow toxicity.

*** $p < 0.001$ Dunnett's test.

2.8. Two-dose mouse bone-marrow micronucleus test

Male and female CD-1 mice were obtained from Charles River UK Ltd. (Margate, UK). On the first day of dosing animals were approximately 5–6 weeks of age and in a weight range of 22–31 g for males and 21–26 g for females. They were caged in groups of maximum 4, according to sex. Animals had access to water and commercial rodent diet (Special Diets Services Ltd.) ad libitum. Groups of 10 male and 10 female animals each were dosed once daily on two consecutive days with either the vehicle (reverse-osmosis water) or E-5842 at doses of 10, 20 or 40 mg/kg. Dose levels were selected on the basis of a preliminary study. A positive control group of five males and five females received CP at a single dose of 80 mg/kg on the second day of dosing. Animals were treated by oral gavage at a dose-volume of 20 ml/kg, without prior starvation. Groups of five male and five female mice were sacrificed by carbon dioxide asphyxiation and cervical dislocation at 24 or 48 h after the second dose of vehicle or E-5842. CP-treated animals were sacrificed 24 h after administration. For each animal, bone marrow of the femur was flushed into a test tube with fetal bovine serum. Smears of bone-marrow cells were prepared and stained with Giemsa. Slides were coded and examined with light microscopy. For each animal, the relative proportions of PCE and NCE were determined by counting a total of 1000 erythrocytes. The number of MNPCE among 2000 PCE was determined. The number of MNPCE in each treated group (males and females, separately and combined) were compared with the corresponding vehicle groups by means of the Dunnett's test [9] after rank transformation of the data. The result was considered positive when there was a statistically significant increase ($p < 0.05$) in the frequency of MNPCE, at least at one dose, which exceeded the historical vehicle control range. For assessment of E-5842 plasma levels, blood samples were obtained by cardiac puncture from a satellite group of three

male and three female animals, 1 h after administration of a single 40 mg/kg dose of E-5842.

2.9. Rat liver micronucleus assay

Male Wistar rats were obtained from Charles River UK Ltd. (Margate, UK). Animals were housed in groups of maximum four animals and were provided water and commercial rodent diet (Special Diets Services Ltd.) ad libitum. On the first day of treatment animals were approximately 7–8-weeks old and in a weight range of 210–261 g. On the basis of a preliminary study dose levels of 50 and 100 mg/kg of E-5842 were selected. Vehicle control animals received reverse-osmosis water, and positive control animals received 10 mg/kg of DMN. Animals were treated by oral gavage at a dose-volume of 10 ml/kg, without prior starvation. Vehicle- and E-5842-treated animals received a first oral dose 24 h before, and a second one 24 h after a partial hepatectomy. Positive control animals were dosed once only, 24 h before this surgical procedure. Partial hepatectomy consisted in the removal of the median and left lateral lobes under halothane anaesthesia. Liver hepatocytes were obtained 72 and 96 h after the first dose from five animals of each of the groups receiving vehicle and the 50 and 100 mg/kg doses, and 96 h after administration from three animals receiving the positive control substance. Groups receiving 50 and 100 mg/kg and sampled at 96 h were treated on different occasions with their corresponding vehicle and positive controls. According to the two-step perfusion procedure [17], the liver was first perfused with calcium-free medium followed by perfusion with medium supplemented with calcium and collagenase. A hepatocyte suspension was obtained and after several rinses in Williams E medium, several drops were placed on slides and a smear was prepared. Slides were immersed in 5 M hydrochloric acid for 30 min, rinsed in water, immersed in Schiff's reagent for 30 min, rinsed in water, and counterstained with 1% light green

stain for 1 min. Slides were rinsed, air-dried and mounted. After coding, slides were examined at 1000 \times magnification and a minimum of 2000 cells per animal were analysed. All hepatocytes containing micronuclei were recorded. The number of mitotic cells per 1000 examined hepatocytes was also recorded. The number of micronucleated hepatocytes in each group was compared with the number in the vehicle control groups by using the chi-square test [18]. The assay was considered positive when a statistically significant increase in the frequency of micronucleated cells occurred at least at one dose at one sampling time, and when the increase exceeded the historical vehicle-control range. For assessment of E-5842 plasma levels, blood samples were obtained by cardiac puncture from a satellite group of three male animals, 1 h after a single administration of a 100 mg/kg dose of E-5842.

3. Results

3.1. Ames test

No increases in the number of revertants were observed when E-5842 was tested in any of the strains in the test battery at concentrations of up to 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$, both in the presence and absence of a rat liver metabolic activation system (S9). Results are shown in Table 1. There was no evidence of precipitation of E-5842 at any of the concentrations assayed. Evidence of toxicity in the form of a reduction in the number of revertants was only observed for strain *E. coli* WP2 *uvrA* pKM101 at the highest concentration tested, both in Experiments 1 and 2 (5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$). Positive controls increased significantly, as expected, the number of revertants over vehicle-control values. It was concluded that E-5842 was not mutagenic in this bacterial assay.

3.2. Human lymphocyte chromosome aberration assay

Human peripheral blood lymphocytes were exposed in vitro to E-5842 at concentrations of up to 3003.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (equivalent to 10 mM), both in the presence and absence of S9. Results of the mitotic index evaluation are shown in Fig. 2. In both repeat assays, an initial decrease in mitotic index with increasing concentrations of E-5842 was followed by a clear increase in mitotic index at higher concentrations, and a final decrease at the highest concentrations tested. This pattern, observed both in the absence and presence of S9, suggests that mitotic accumulation may have occurred. Concentrations for metaphase analysis were selected trying to include the concentrations that showed mitotic accumulation, and concentrations showing an overall reduction in mitotic index. A clear increase in chromosome aberration

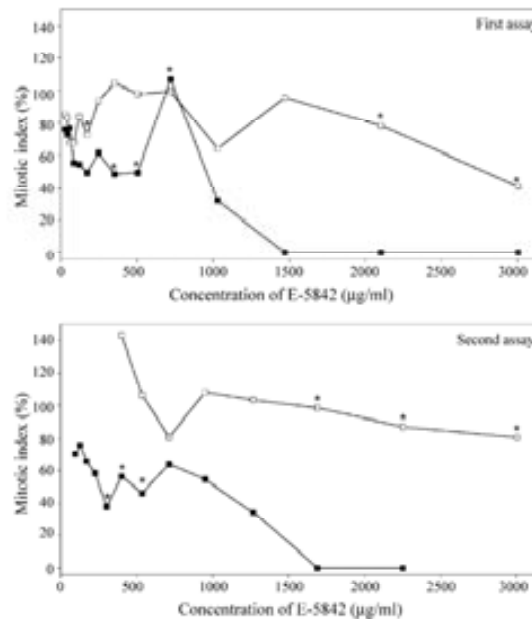


Fig. 2. Effect of E-5842 on mitotic index of in vitro cultured human lymphocytes. Cells were exposed to different concentrations of E-5842 for 20 h in the absence of S9 (■), or for 3 h in the presence of S9 (□) followed by a 17-h recovery period. The symbol (*) indicates the concentrations analysed for chromosomal aberrations. Results indicate that with increasing concentrations of E-5842 there was an initial decrease in mitotic index followed by a clear increase in mitotic index at higher concentrations, and a final decrease at the highest concentrations tested, thus suggesting a possible mitotic accumulation effect.

frequency was observed in both experiments both in the presence and absence of S9 (Table 2). Treatment in the absence of S9 resulted in statistically significant increases in the frequency of cells with structural aberrations in both experiments at all concentrations except for the lowest, i.e. 300.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Experiment 2). At this concentration a mitotic index of 38% of the corresponding vehicle-control value was recorded. In Experiment 1, treatment for 3 h in the presence of S9 with sampling at 20 h resulted in a statistically significant increase in the proportion of cells with chromosomal aberrations at the highest concentration tested (3003.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$). In Experiment 2, with cells from a different donor, the increase was more marked and seen at all three concentrations (1689.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and higher). Cultures treated in the presence of S9 and sampled at the later time point (44 h) showed frequencies of cells with structural aberrations that were similar to those seen in the concurrent solvent-control cultures. This may suggest loss of cells with chromosome aberrations at this late sampling time [19]. An apparent increase in polyploidy was

observed in the 3 + 17 h treatment in the presence of S9 in Experiment 2. Although similar clear increases were not observed in both replicate cultures at any concentration analysed, a relation with the treatment cannot be ruled out. Osmolality measurements performed in post-treatment media (both without and with S9) showed no marked changes that could account for the increased frequency of chromosome aberrations [20]. Similarly, pH measurements showed that at the highest test concentration (3003.8 µg/ml) the pH was reduced from 7.33 to 6.51 in the absence of S9, and from 7.25 to 6.30 in the presence of S9, with less marked shifts at lower concentrations. The pH values attained in treatment media thus fell within the range of plus or minus one pH unit at which no clastogenic effects would normally be expected [20]. It was concluded that E-5842 induced clastogenic effects in the chromosome aberration assay.

3.3. Mouse lymphoma

The results of the mouse lymphoma assay are shown in Table 3. There were no relevant increases in the mutant frequency in both repeat assays. In the absence of S9, a small but statistically significant increase in the mutant frequency was observed at the intermediate concentration of 111.5 µg/ml in Experiment 1. However, as no linear trend was observed and no statistically significant increases in mutant frequency were seen in Experiment 2 at any concentration tested, the slight increase observed at 111.5 µg/ml in the absence of S9 in Experiment 1 was considered attributable to chance and of no biological significance. In the presence of S9, a small but statistically significant increase in mutant frequency was observed in Experiment 2 at the highest concentration tested (891.8 µg/ml). This concentration was, however, highly cytotoxic: viability was depressed in day 2 of the expression period and relative cell survival was 15%. Furthermore, no statistically significant increase in mutant frequency was observed at this same concentration in Experiment 1, where it was also shown to be extremely toxic (<10% relative survival). Thus, the slight increase in mutant frequency observed at 891.8 µg/ml in the presence of S9 in Experiment 2 was considered to be associated with high toxicity and of no biological significance. Clear increases in mutant frequency were observed in cultures treated with the positive controls NQO and BP in the absence and presence of S9, respectively, thus showing the validity of the experimental model used. Thus, E-5842 was considered to be not genotoxic in the mouse lymphoma assay.

3.4. Single-dose bone-marrow mouse micronucleus test

Mortality was recorded among animals receiving the 200 and 400 mg/kg doses. One animal receiving the 200 mg/kg dose was found dead approximately 30 min after administration, and three males and one female receiving the 400 mg/kg dose were found dead approximately 1 h after administration. For bone-marrow sampling, dying animals were replaced by satellite animals receiving these same dosages. Clinical signs were recorded in all animals receiving E-5842, all of them showing decreased motor activity, ataxia, ptosis, hunched back, prostration and drop of body temperature. Loss of postural reflex, convulsions, vocalization, vacuous jaw movements and front paw pedalling were also observed in some animals receiving the high dose. While animals receiving the 100 and 200 mg/kg doses showed full recovery at 24 h after treatment, clinical signs were still present 48 h after treatment in some animals that had received the 400 mg/kg dose. The intensity of the observed clinical signs and the recorded mortality suggest that the maximum tolerated dose was exceeded [21]. At bone marrow examination, no statistically significant increases in the numbers of MNPCE were observed at any tested dose and sampling time (Table 4). However, animals receiving the 200 mg/kg dose showed at the 48 h sampling a mean MNPCE frequency that was considered to exceed (above 1.5 times) the upper limit of the historical vehicle-control group mean values with this strain of mice at the test facility (range: 1.1–3.3‰; $n = 332$). Historical background data for this strain indicated that only 1.2% of vehicle-control animals had shown individual MNPCE values of >6‰ (the highest individual value observed in vehicle-control animals in this study), while 4 out of 10 animals receiving the 200 mg/kg dose and sampled at 48 h showed individual MNPCE values of >6‰. Animals with MNPCE values outside the historical control range have been considered to provide an alert to the beginning of a possible dose-response effect [22]. The marked decrease in mean EPC/ENC ratio observed at the 72 h sampling in animals receiving the 400 mg/kg dose was considered indicative of bone-marrow toxicity, and may have accounted for the absence of an effect on MNPCE frequency at the 48 h sampling, as observed for the 200 mg/kg dose, and the slightly higher value observed at 72 h. Vehicle-control animals and those receiving 100 and 200 mg/kg of E-5842 all showed, as compared with the 24 h values, a mild decrease in mean EPC/ENC ratio values at the 48 h sampling, with a post-treatment recovery at 72 h. This pattern is considered to be attributed to the overnight

starvation period to which the animals were submitted prior to administration, as this is a common observation in vehicle-control animals of this strain when submitted to an overnight fasting period (unpublished results). The positive control CP induced a marked and statistically significant increase in MNPCE frequency, thus showing the sensitivity of the test system.

The slight increase in MNPCE frequency observed in the 200 mg/kg dose group at 48 h in the absence of evidence of suppression of bone-marrow cell proliferation was considered to be different from that of typical mutagens [23]. Although the effect on MNPCE frequency was marginal, lacked statistical significance and was present at a dose level at which marked toxicity and mortality were observed—thus rendering it of uncertain biological relevance, it was considered to warrant further research. The follow-up-studies performed to further investigate this effect showed that it was attributable to a marked hypothermic effect produced by E-5842 administration [24].

3.5. Two-dose bone-marrow mouse micronucleus test

Due to the marked clinical signs and mortality observed in the single-dose mouse bone-marrow micronucleus assay, it was considered appropriate to perform a second assay using lower doses and a different treatment regimen. In this second assay animals were treated on two consecutive days. No mortality was recorded among animals receiving E-5842. Lethargy, irregular breathing and palpebral ptosis were observed in all animals receiving the 40 mg/kg/day dose, with some of them showing prostration, tremors and loss of body temperature.

No significant increase in MNPCE frequency was observed in animals receiving E-5842 at any dose or

sampling time tested (Table 5). The positive control CP induced a marked and statistically significant increase in MNPCE frequency, thus showing the sensitivity of the test system. There was no effect of treatment with E-5842 on the PCE/NCE ratio. Mean plasma concentration of E-5842 one hour after administration of a 40 mg/kg dose, as determined with HPLC-fluorescence detection, was 2026.8 ± 458.5 ng/ml. It was concluded that E-5842 lacked genotoxic potential in this *in vivo* assay.

3.6. Rat liver micronucleus assay

One animal receiving the 100 mg/kg dose of E-5842 two times was killed in extremis after showing marked clinical signs. Clinical signs observed among animals receiving the 100 mg/kg dose two times included lethargy, palpebral ptosis, abnormal gait, chromodachryorrhea and red staining on snout and forepaws, piloerection, prostration and hunched back. These observations suggested that the maximum tolerated dose had been achieved. Group mean frequencies of micronucleated hepatocytes and mitotic indices of groups receiving E-5842 were similar to those of the concurrent vehicle-control groups (Table 6). The small but statistically significant ($p < 0.05$) increase in the group mean frequency of micronucleated hepatocytes in the 72 h sampling of animals receiving the 100 mg/kg (two times) dose, was well within the normal background range (range: 0–2.4 micronucleated hepatocytes/1000 cells; group mean frequency: 1.2), and was considered of no biological significance. The positive control DMN induced a statistically significant increase in the frequency of micronucleated hepatocytes, thus showing the sensitivity of the test system. The mean plasma concentration of E-5842 one hour after administration of a 100 mg/kg dose, as determined by HPLC-fluorescence detector, was 424.5 ± 16.2 ng/ml. It was concluded that there was no

Table 5
Twice dosing mouse micronucleus test with E-5842

Sampling time	Treatment	Dose (mg/kg)	N	PCE/NCE (mean \pm S.D.)	MNPCE/1000 PCEs (mean \pm S.D.)
24 h	Vehicle	–	8 ^a	1.35 \pm 0.29	0.1 \pm 0.18
	E-5842	10	10	1.19 \pm 0.65	0.3 \pm 0.54
		20	10	1.15 \pm 0.73	0.3 \pm 0.35
		40	9 ^a	0.94 \pm 0.23	0.3 \pm 0.67
		80	10	0.67 \pm 0.28	18.4 \pm 11.22 ^{**}
48 h	Vehicle	–	10	1.05 \pm 0.15	0.3 \pm 0.39
	E-5842	10	10	0.84 \pm 0.22	0.3 \pm 0.26
		20	10	1.24 \pm 0.46	0.4 \pm 0.47
		40	10	1.23 \pm 0.49	0.4 \pm 0.53

^a Two and one slide, respectively, not considered suitable for analysis.

^{**} $p < 0.01$ Dunnett's test.

Table 6
Rat liver micronucleus test

Sampling time	Treatment	Dose (mg/kg × 2)	N	Mitotic index (%) (mean ± S.D.)	No. of hepatocytes analysed	MN hepatocytes/ 1000 hepatocytes
72 h	Vehicle	–	5	0.76 ± 0.44	10000	0.6
	E-5842	50	5	1.00 ± 0.33	10000	1.1
		100	5	0.53 ± 0.72	10000	1.8 ^a
96 h	Vehicle	–	10	0.25 ± 0.20	20000	2.6
	E-5842	50	5	0.21 ± 0.18	10000	2.2
		100	5	0.12 ± 0.08	10000	1.6
		DMN	10 ^b	6	0.16 ± 0.12	12000

^a Single dose.

^b $p < 0.05$ chi-square test.

^{***} $p < 0.001$ chi-square test.

evidence of genotoxic potential of E-5842 in this in vivo assay.

4. Discussion

E-5842 is a σ receptor ligand being developed as potential antipsychotic compound. As part of the preclinical safety-assessment program for this compound, its genotoxic potential was evaluated by means of an extensive battery of in vitro and in vivo genetic toxicity assays. These comprised an Ames test, a chromosome aberration assay in Human Lymphocytes, a Mouse Lymphoma gene mutation assay, a rat hepatocyte micronucleus assay, and both a single-dose and a two-dose mouse micronucleus assay. E-5842 did not show genotoxic potential in the Ames test, the mouse lymphoma assay, the rat liver micronucleus test, and the mouse bone-marrow micronucleus assay. However, a clear increase in the frequency of chromosome aberrations was observed in the chromosome aberration assay in human lymphocytes, both in the presence and absence of S9.

In the single-dose mouse bone-marrow micronucleus assay a slight increase in MNPCE frequency was observed at the 48 h sampling time point in animals receiving the 200 mg/kg dose. Although the difference with the vehicle-control value did not reach statistical significance, it was concluded that both the mean and individual MNPCE frequencies slightly exceeded the upper limit of the in-house mean background vehicle-control values, which ranged from 1.1 to 3.3‰ and were comparable to those reported in the literature for this strain of mice [25,26]. Although this marginal increase in MNPCE frequency was observed at a dose level that was considered to have exceeded the maximum tolerated dose in this study, which renders it of uncertain biological relevance, further follow-up experiments were performed in order to elucidate the possible mechanism

underlying this effect. The results of these studies have been reported elsewhere [24].

Briefly, in these experiments it was shown that oral administration of E-5842 to mice at the same dose levels as used in the single-dose micronucleus test, produced a marked, sustained and dose-related decrease in body temperature. The slight increase in MNPCE frequency observed 48 h after administration of a 200 mg/kg dose of E-5842 was also shown to be reproducible. Animals receiving this particular dosage experienced a decrease in mean rectal temperature of up to approximately 12 °C below the pre-administration temperature value (36.2 °C), with mean temperature values remaining well below 33 °C for a period in excess of 11 h. However, when the hypothermic effect of E-5842 administration was avoided by housing the treated animals at increased environmental temperature (30 °C) for 24 h, the MNPCE frequency reverted to control values, showing that the slight increase in the frequency of MNPCE observed 48 h after administration of a 200 mg/kg dose was due to the marked hypothermic effect, not to a direct effect of E-5842 on DNA. Morphological examination further showed a clear increase in the number of relatively large micronuclei in animals submitted to the hypothermic effect of E-5842, in a pattern similar to that of spindle poisons, thus suggesting disturbance of the mitotic apparatus as a possible underlying mechanism [16,27–30]. Similar increases in micronucleus frequency secondary to a hypothermic effect have been reported in mice for other compounds with antidepressant activity, such as chlorpromazine and reserpine [31,32]. Although of lesser magnitude, similar effects have also been reported in rats [33].

The results of these follow-up experiments thus confirm the lack of biological significance of the observed marginal increase in MNPCE frequency at the 48 h sampling of animals treated with 200 mg/kg E-5842, sug-

gesting that this compound by itself lacks genotoxic potential in the *in vivo* assays reported here.

Several surveys on pharmaceutical compounds have mentioned the *in vitro* chromosome aberration assay, together with the mouse lymphoma assay, as being the genotoxicity assay from the ICH standard battery test [34,35] for which more frequent positive or equivocal results have been claimed [36,37], with a considerable number of *in vitro* clastogens and mouse lymphoma positives lacking supportive evidence for DNA reactivity [37,38]. In a survey performed by Snyder [39] on marketed pharmaceutical compounds, 28.7% of the evaluated compounds were reported to have a positive result in at least one genotoxicity assay of the pre-ICH/OECD standard four-test battery (bacterial mutagenesis, *in vitro* cytogenetics, mouse lymphoma assay, *in vivo* cytogenetics). Both the mouse lymphoma and the *in vitro* cytogenetic assays were the ones for which more positives were reported, representing 24.8 and 25% of the compounds tested, respectively. Of the pharmaceutical compounds yielding positive results in particular in *in vitro* mammalian cell assays, approximately 25% have been considered to have known genotoxic potential, like alkylating agents, nucleoside analogues or gyrase inhibitors [37]. For some of the remaining compounds, positive results have been associated to clear cytotoxic effects, but for others no obvious explanation could be identified [37].

It has been acknowledged that biologically irrelevant *in vitro* positive results may be produced under conditions of high cytotoxicity, and that this problem is most often encountered with the chromosome aberration and mouse lymphoma assays [37]. Chromosome aberrations seen *in vitro* under conditions of high toxicity are in some cases not considered to be biologically relevant [40]. For E-5842 no marked decreases in mitotic index were observed at concentrations showing an increased frequency of chromosome aberrations in the human lymphocyte assay and no changes in pH or osmolarity in the treatment medium were recorded that could account for the observed clastogenic effects. However, the pattern of mitotic inhibition suggests that mitotic accumulation was occurring, and this may have masked toxicity higher than was apparent from the mitotic index data. In this respect, cultures exposed to 300.7 $\mu\text{g/ml}$ of E-5842 for 20 h in the absence of S9 (Experiment 2), a concentration at which no clastogenicity was observed, showed a mitotic index of 38% of the vehicle-control value. Altogether, this would be in agreement with the idea that determination of the mitotic index can be a suboptimal choice for assessing toxicity [41].

The mechanism by which E-5842 could induce this mitotic accumulation is so far unclear, but a possible sigma receptor-mediated effect on cell-cycle kinetics of the lymphocytes cannot be ruled out. Several psychoactive drugs have been reported to interact with cells of the immune system and modulate immune function [42]. Sigma receptors are not only present in a variety of regions in the central nervous system but also in many peripheral tissues [43]. The existence of sigma sites in human peripheral blood leukocytes was first described by Su et al. [44] and Wolfe et al. [45], and the presence of the two types of sigma receptors (types 1 and 2) on leukocytes was later confirmed by Carr et al. [46]. Since then, several observations have suggested a physiological role for sigma ligands in the modulation of immune function [47], and *in vitro* suppression or inhibition of human lymphocyte proliferation in response to mitogens has been reported for several sigma ligands like (+)-pentazocine [48], SR31747 [49] and igmesine [50]. The potential of sigma ligands to inhibit proliferation of various tumor cell types has suggested that these compounds may be suitable antineoplastic agents, and induction of apoptosis or cell-cycle arrest has been suggested as a possible underlying mechanism [51,52].

Despite the mouse lymphoma assay being considered capable of detecting compounds with potential to induce gene mutation and/or clastogenic effects [53–56], E-5842 proved negative in this assay. Although both the mouse bone-marrow micronucleus assay and the rat liver micronucleus assay are considered particularly suitable for detecting clastogenic effects, no *in vivo* correlation was found for the positive result obtained with E-5842 in the human lymphocyte chromosome aberration assay. The induction of developmental abnormalities is a well-known adverse effect of exposure to genotoxic agents. Mechanisms known to be involved in the induction of teratogenic effects are genotoxic stress-induced cell death and accumulation of DNA damage, which can result in changes in both the rate and fidelity of the transcription of key developmental genes. In this respect, E-5842 has been shown to lack potential for inducing embryo-fetal developmental abnormalities both in rats and rabbits after oral administration, as was established in two regulatory embryofetal developmental toxicity studies (unpublished results). These results would further support the assumption that E-5842 would lack *in vivo* genotoxic potential.

In the human lymphocyte chromosome aberration assay the dose of 300.7 $\mu\text{g/ml}$ (20 h exposure) was the highest at which no clastogenic effects were observed in the absence of S9. For treatment in the presence of S9, 173.2 $\mu\text{g/ml}$ (3 h exposure) could be considered as the

highest concentration lacking clastogenic effects in this assay.

In clinical studies, the mean peak plasma concentration (C_{max}) values reached under steady-state conditions in healthy human volunteers after repeated oral administration of E-5842 at the maximum tolerated dose (MTD) of 10 mg/day, were determined to be 19.1 ng/ml (unpublished results). Thus, concentrations at which no clastogenic effects were observed in the human chromosome aberration assay were about 9000–15,700 times higher than the peak plasma levels measured in humans at the MTD. In the mouse lymphoma assay negative results were obtained at concentrations that ranged from 55.7 μ g/ml up to 3003.8 μ g/ml (i.e. ≥ 2900 times the human C_{max} value). Mean plasma concentrations determined in the in vivo genotoxicity assays from which blood samples were taken 1 hour after E-5842 administration, were 2026.8 ng/ml for mice (40 mg/kg) and 424.5 ng/ml for rats (100 mg/kg). Thus, exposure in humans at the MTD would be at least between 20 and 100 times lower than the concentrations covered by the in vivo assays in rats and mice, respectively.

In conclusion, despite the positive result obtained in the Human Lymphocyte chromosome aberration assay, a weight-of-evidence analysis, taking into consideration the results obtained in the different in vitro and in vivo assays and the conditions of proposed clinical use, would suggest that E-5842 would not pose a genotoxic risk to humans.

Acknowledgments

We thank Dr. Ricard Marcos for his guidance and helpful comments on the setup of this manuscript. Antonio Guzman is taking part in the PhD program of the Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Spain).

References

- [1] N.C. Andreasen, M. Flaum, V.W. Swayze, G. Tyrrell, S. Arndt, Positive and negative symptoms in schizophrenia. A critical reappraisal, *Arch. Gen. Psychiatry* 47 (1990) 615–621.
- [2] D.M. Jackson, C. Ryan, J. Evenden, N. Mobell, Preclinical findings with new antipsychotic agents: what makes them atypical? *Acta Psychiatr. Scand., Suppl.* 380 (1994) 41–48.
- [3] S. Takahashi, K. Sonehara, K. Takagi, T. Miwa, K. Horikomi, N. Mita, H. Nagase, K. Iizuka, K. Sakai, Pharmacological profile of MS-377, a novel antipsychotic agent with selective affinity for sigma receptors, *Psychopharmacology (Berlin)* 145 (1999) 295–302.
- [4] X. Guitart, M. Ballarín, X. Codony, A. Dordal, A.J. Farre, J. Frigola, R. Merce, E-5842, *Drugs Future* 24 (1999) 386–392.
- [5] X. Guitart, X. Codony, X. Monroy, Sigma receptors: biology and therapeutic potential, *Psychopharmacology (Berlin)* 174 (2004) 301–319.
- [6] X. Guitart, X. Codony, M. Ballarín, A. Dordal, A.J. Farre, E-5842: A new potent and preferential sigma ligand. Preclinical pharmacological profile, *CNS Drug Rev.* 4 (1998) 201–224.
- [7] EEC Council Directive 86/609, OJ L 358, 1, December 12, 1987.
- [8] D.M. Maron, B.N. Ames, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.* 113 (1983) 173–215.
- [9] C.W. Dunnett, A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, *J. Am. Stat. Assoc.* 50 (1955) 1096–1121.
- [10] G.A.T. Mahon, M.H.L. Green, B. Middleton, I.G. Mitchell, W.D. Robinson, D.J. Tweats, Analysis of data from microbial colony assays, in: D.J. Kirkland (Ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data (UKEMS Guidelines Subcommittee Report, Part III)*, Cambridge University Press, 1989, pp. 26–65.
- [11] B.J. Dean, N. Danford, Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells, in: S. Venitt, J.M. Parry (Eds.), *Mutagenicity Testing: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1984, pp. 187–232.
- [12] An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN), Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 21 (1985) 1–117.
- [13] C. Richardson, J.A. Williams, J.A. Allen, G. Amphlett, D.O. Chanter, B. Philips, Analysis of data from in vitro cytogenetic assays, in: D.J. Kirkland (Ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data (UKEMS Guidelines Subcommittee Report, Part III)*, Cambridge University Press, 1989, pp. 141–154.
- [14] J. Cole, D.B. Mc Gregor, M. Fox, R.C. Graner, J. Thacker, Gene mutation assay in cultured mammalian cells, in: D.J. Kirkland (Ed.), *Basic Mutagenicity Tests UKEMS Recommended Procedures*, Cambridge University Press, 1990, pp. 87–114.
- [15] W.D. Robinson, M.H.L. Green, J. Cole, R.C. Garner, M.J.R. Healy, D.G. Gatehouse, Statistical evaluation of bacteria/mammalian fluctuation test, in: D.J. Kirkland (Ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Cambridge University Press, 1990, pp. 102–140.
- [16] W. Schmid, The micronucleus test, *Mutat. Res.* 31 (1975) 9–15.
- [17] P.O. Seglen, Preparation of isolated rat liver cells, *Meth. Cell Biol.* 13 (1976) 29–83.
- [18] D.P. Lovell, D. Anderson, R. Albanese, G.E. Amphlett, G. Clare, R. Ferguson, M. Richold, D.G. Papworth, J.R.K. Savage, Statistical analysis of in vivo cytogenetic assays, in: D.J. Kirkland (Ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data (UKEMS Guidelines Subcommittee Report, Part III)*, Cambridge University Press, 1989, pp. 184–232.
- [19] G. Clare, J. Clements, Industrial Genotoxicology Group (IGG): cytotoxicity in vitro, Royal Society of Medicine, London, UK, December 6, 1999, *Mutagenesis* 16 (2001) 179–182.
- [20] D. Scott, S.M. Galloway, R.R. Marshall, M. Ishidate Jr., D. Brusick, J. Ashby, B.C. Myhr, International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutat. Res.* 257 (1991) 147–205.
- [21] R.J. Fielder, J.A. Allen, A.R. Boobis, P.A. Botham, J. Doe, D.J. Esdaile, D.G. Gatehouse, G. Hodson-Walker, D.B. Mor-

- ton, D.J. Kirkland, Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group, Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, *Mutagenesis* 7 (1992) 313–319.
- [22] V. Morrison, J. Ashby, High resolution rodent bone marrow micronucleus assays of 1,2-dimethylhydrazine: implication of systemic toxicity and individual responders, *Mutagenesis* 10 (1995) 129–135.
- [23] M. Hayashi, T. Sofuni, M. Ishidate Jr., Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow, *Mutat. Res.* 127 (1984) 129–137.
- [24] A. Guzmán, C. García, A.P. Marín, M.T. Ruiz, A. Tortajada, A.R. Fernández de Henestrosa, Induction of micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes in association with hypothermia after administration of the sigma receptor ligand E-5842, *Mutat. Res.* 565 (2004) 11–22.
- [25] G. Krishna, G. Urdá, J. Paulissen, Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, *Mutat. Res.* 453 (2000) 45–50.
- [26] M.F. Salamone, K.H. Mavourin, Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, *Environ. Mol. Mutagen.* 23 (1994) 239–273.
- [27] H. Tinwell, J. Ashby, Micronucleus morphology as a means to distinguish aneugens and clastogens in the mouse bone marrow micronucleus assay, *Mutagenesis* 6 (1991) 193–198.
- [28] P. Van Hammelen, A. Deleener, P. Vanparys, M. Kirsch-Volders, Discrimination of aneuploidogens from clastogens by C-banding, DNA and area measurements of micronuclei from mouse bone marrow, *Mutat. Res.* 271 (1992) 13–28.
- [29] P. Vanparys, F. Vermeiren, M. Sysmans, R. Temmerman, The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity, *Mutat. Res.* 244 (1990) 95–103.
- [30] K.I. Yamamoto, Y. Kikuchi, A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons, *Mutat. Res.* 71 (1980) 127–131.
- [31] S. Asanami, K. Shimono, Hypothermia induces micronuclei in mouse bone marrow cells, *Mutat. Res.* 393 (1997) 91–98.
- [32] S. Asanami, K. Shimono, S. Kaneda, Transient hypothermia induces micronuclei in mice, *Mutat. Res.* 413 (1998) 7–14.
- [33] S. Asanami, K. Shimono, Effects of chemically- and environmentally-induced hypothermia on micronucleus induction in rats, *Mutat. Res.* 471 (2000) 81–86.
- [34] ICH Topic S2A (ICH-S2A), Genotoxicity: guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals, Step 5, September 1, 1995.
- [35] ICH Topic S2B (ICH-S2B), Genotoxicity: a standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals, Step 4, September 1, 1997.
- [36] S.M. Galloway, Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 191–201.
- [37] L. Müller, T. Sofuni, Appropriate levels of cytotoxicity for genotoxicity tests using mammalian cells *in vitro*, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 202–205.
- [38] S.M. Galloway, J.E. Miller, M.J. Armstrong, C.L. Bean, T.R. Skopek, W.W. Nichols, DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of DNA-reactive and non-DNA-reactive clastogens, *Mutat. Res.* 400 (1998) 169–186.
- [39] R.D. Snyder, J.W. Green, A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals, *Mutat. Res.* 488 (2001) 151–169.
- [40] D.J. Kirkland, Chromosomal aberration tests *in vitro*: problems with protocol design and interpretation of results, *Mutagenesis* 7 (1992) 95–106.
- [41] M. Kirsch-Volders, T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate Jr., S. Kirchner, E. Lorge, T. Morita, H. Norppa, J. Surrallés, A. Vanhauwaert, A. Wakata, Report from the *in vitro* micronucleus assay working group, *Mutat. Res.* 540 (2003) 153–163.
- [42] P. Sacerdote, M. Bianchi, A.E. Panerai, *In vivo* and *in vitro* clomipramine treatment decreases the migration of macrophages in the rat, *Eur. J. Pharmacol.* 319 (1997) 287–290.
- [43] R. Paul, S. Lavastre, D. Floutard, R. Floutard, X. Canat, P. Casellas, G. Le Fur, J.C. Brelviere, Allosteric modulation of peripheral sigma binding sites by a new selective ligand: SR 31747, *J. Neuroimmunol.* 52 (1994) 183–192.
- [44] T.P. Su, E.D. London, J.H. Jaffe, Steroid binding at sigma receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune systems, *Science* 240 (1988) 219–221.
- [45] S.A. Wolfe Jr., C. Kulsakdinun, G. Battaglia, J.H. Jaffe, E.B. De Souza, Initial identification and characterization of sigma receptors on human peripheral blood leukocytes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247 (1988) 1114–1119.
- [46] D.J. Carr, B.R. De Costa, L. Radesca, J.E. Blalock, Functional assessment and partial characterization of [³H](+)-pentazocine binding sites on cells of the immune system, *J. Neuroimmunol.* 35 (1991) 153–166.
- [47] P. Casellas, B. Bourrie, X. Canat, P. Carayon, I. Buisson, R. Paul, J.C. Brelviere, G.L. Fur, Immunopharmacological profile of SR 31747: *in vitro* and *in vivo* studies on humoral and cellular responses, *J. Neuroimmunol.* 52 (1994) 193–203.
- [48] D.J. Carr, S. Mayo, T.W. Woolley, B.R. DeCosta, Immunoregulatory properties of (+)-pentazocine and sigma ligands, *Immunology* 77 (1992) 527–531.
- [49] J.M. Derooq, B. Bourrie, M. Segui, G. Le Fur, P. Casellas, *In vivo* inhibition of endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines production by the sigma ligand SR 31747, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272 (1995) 224–230.
- [50] C. Song, B.E. Leonard, Comparison between the effects of sigma receptor ligand JO 1784 and neuropeptide Y on immune functions, *Eur. J. Pharmacol.* 345 (1998) 79–87.
- [51] A. Renando, V. Watry, A.A. Chassot, G. Ponzio, J. Ehrenfeld, O. Soriani, Inhibition of tumor cell proliferation by sigma ligands is associated with K⁺ channel inhibition and p27kip1 accumulation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311 (2004) 1105–1114.
- [52] N.A. Colabufo, F. Berardi, M. Contino, M. Niso, C. Abate, R. Perrone, V. Tortorella, Antiproliferative and cytotoxic effects of some sigma2 agonists and sigma1 antagonists in tumour cell lines, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 370 (2004) 106–113.
- [53] M.L. Applegate, M.M. Moore, C.B. Broder, A. Burrell, G. Juhn, K.L. Kasweck, P.F. Lin, A. Wadhams, J.C. Hozier, Molecular dissection of mutations at the heterozygous thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (1990) 51–55.
- [54] R.D. Combes, H. Stopper, W.J. Caspary, The use of L5178Y mouse lymphoma cells to assess the mutagenic, clastogenic and aneugenic properties of chemicals, *Mutagenesis* 10 (1995) 403–408.

- [55] A.D. Mitchell, A.E. Auletta, D. Clive, P.E. Kirby, M.M. Moore, B.C. Myhr, The L5178Y/tk⁺ mouse lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay a phase III report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutat. Res.* 394 (1997) 177–303.
- [56] M.M. Moore, D. Clive, J.C. Hozier, B.E. Howard, A.G. Batson, N.T. Turner, J. Sawyer, Analysis of trifluorothymidine-resistant (TFTi) mutants of L5178Y/tk⁺ mouse lymphoma cells, *Mutat. Res.* 151 (1985) 161–174.

4.2. Resumen del contenido del artículo 2

Induction of micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes in association with hypothermia after administration of the sigma receptor ligand E-5842.

El fármaco experimental E-5842 ha mostrado inducir un ligero incremento en la frecuencia de EPCMN en el ensayo de MN en médula ósea de ratón (ver Artículo 1). Este efecto fue considerado atípico por producirse a una dosis intermedia (200 mg/Kg) y a un tiempo de muestreo tardío (48 h). La observación de que los animales se mostraban fríos al tacto hizo sospechar en la existencia de un posible efecto hipotérmico. La inducción de hipotermia se considera un posible factor de confusión en la realización e interpretación del ensayo de MN en roedor, en cuanto que condiciones de hipotermia intensa y prolongada se han asociado a incrementos en la formación de MN en eritrocitos de roedor (COM, 2003; EMEA, 2006; Tweats *et al.*, 2007a).

El presente trabajo constó de dos estudios. En el primero, se estudió el efecto de la administración oral de E-5842 sobre la temperatura corporal en ratón y sobre la frecuencia de EPCMN en médula ósea. En el segundo estudio, se evaluó el efecto que la reversión de la hipotermia producida por la administración de E-5842 tenía sobre la frecuencia de EPCMN. Asimismo, se estudió el tamaño relativo de los MN inducidos con el fin de establecer su posible origen clastogénico o aneugénico.

Los resultados obtenidos confirman que la administración oral de E-5842 produce hipotermia en ratones, aumentando la intensidad y duración del efecto con la dosis administrada. A la dosis de 200 mg/Kg, el efecto hipotérmico estaba asociado a un incremento en la frecuencia de EPCMN en médula ósea (48 h), confirmando los resultados obtenidos previamente en este ensayo *in vivo* (ver Artículo 1). Al evitar el efecto hipotérmico mediante la exposición de los animales a condiciones de temperatura ambiental aumentada (30 °C, 24 h), los valores de frecuencia de EPCMN reversionaron a valores basales. Nuestros resultados indican que el incremento en la frecuencia de EPCMN observado en este ensayo *in vivo* (200 mg/Kg, 48 h) es atribuible al intenso y prolongado efecto hipotérmico producido por la administración de E-5842, y no a una actividad genotóxica intrínseca de este fármaco experimental.

El contenido de este artículo consta en el Anexo 1.

ARTÍCULO 2

Induction of micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes in association with hypothermia after administration of the sigma receptor ligand E-5842.

Guzmán A., García C., Marín A.P., Ruiz M.T., Tortajada A., Fernández de Henestrosa A.R.

Mutat. Res. 2004: 565 11-22.

Ver Anexo 1.

4.3. Resumen del contenido del artículo 3

Evaluation of the genotoxic potential of three phenyltetrahydropyridinyl butylazole-derived sigma-receptor ligand drug candidates.

Como parte del programa de investigación realizado en ESTEVE para la síntesis de nuevos fármacos con afinidad por el receptor σ , se obtuvieron una serie de análogos estructurales del E-5842 derivados de la estructura común de feniltetrahidropiridinil butilazolina (FTHPB). Entre los productos sintetizados destacaron los fármacos experimentales A, B y C, seleccionados para su desarrollo por su perfil de actividad en modelos preclínicos de actividad farmacológica.

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial genotóxico de los fármacos experimentales A, B y C, mediante la realización de una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* de genotoxicidad, de acuerdo con los requerimientos establecidos por las autoridades reguladoras (ICH S2B, 1997). Los tres fármacos fueron evaluados en el ensayo *in vitro* de mutación génica en bacterias (test de Ames), el ensayo *in vitro* de mutación génica y aberraciones cromosómicas en células de mamífero (ML), y el ensayo *in vivo* de MN en eritrocitos de médula ósea de ratón tras administración oral a dosis única. Junto a la valoración del potencial genotóxico, los estudios realizados tenían como objetivo comprobar la existencia de posibles efectos de clase, derivados de su diana farmacológica común (el receptor σ_1), o de su similar estructura química derivada de la FTHPB.

De los resultados obtenidos se concluye que los fármacos experimentales A, B y C carecen de potencial genotóxico en los ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados, lo que sugiere que la exposición a estos fármacos bajo condiciones clínicas de uso no representa riesgo genotóxico. En el ensayo *in vivo* de MN en ratón, la administración oral de los fármacos A, B y C produce un claro descenso de la temperatura corporal a las dosis superiores ensayadas, siendo la intensidad y duración del efecto hipotérmico claramente inferiores a la inducida por el E-5842. Nuestros resultados sugieren que para esta serie química de ligandos para el receptor σ_1 , la inducción de hipotermia tras la administración oral en ratón podría constituir un posible efecto de clase. No obstante, la inducción de incrementos en la frecuencia de EPCMN como efecto secundario a la inducción de hipotermia parece ser un efecto aislado del E-5842 y no un efecto de clase de los ligandos para el receptor σ_1 derivados de FTHPB.

ARTÍCULO 3

Evaluation of the genotoxic potential of three phenyltetrahydropyridinyl butylazole-derived sigma-receptor ligand drug candidates.

Guzmán A., García C., Marín A.P., Proudlock R.J., Fernández de Henestrosa A.R., Ruiz M.T., Tortajada A., Lloyd M., Marcos R.

Mutat. Res. 2008: 653, 91-98.



Contents lists available at ScienceDirect

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/genotox
 Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Evaluation of the genotoxic potential of three phenyltetrahydropyridinyl butylazole-derived sigma-receptor ligand drug candidates

Antonio Guzmán^{a,b,*}, Concepción García^a, Ana-Paz Marín^a, Raymond J. Proudlock^{c,1},
 Antonio R. Fernández de Henestrosa^a, Maria Teresa Ruiz^a, Araceli Tortajada^a,
 Mel Lloyd^d, Ricard Marcos^b

^a Toxicology Department, ESTEVE, Mare de Deu de Montserrat 221, 08041 Barcelona, Spain

^b Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

^c Huntingdon Life Sciences, Huntingdon, Cambridgeshire PE28 4HS, UK

^d Covance Laboratories Ltd., Otley Road, Harrogate, North Yorkshire HG3 1PY, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2007

Received in revised form 7 March 2008

Accepted 28 March 2008

Available online 16 April 2008

Dedicated to the memory of Muntia Dosda.

Keywords:

Genotoxicity

Sigma receptor

Phenyltetrahydropyridinyl butylazole

Hypothermia

ABSTRACT

Three structurally related phenyltetrahydropyridinyl butylazole (PTHPB)-derived drug candidates with sigma receptor-binding properties were evaluated for genotoxic potential in the ICH standard battery of genetic toxicology assays. These comprised an Ames test, a mouse-lymphoma assay, and a mouse bone-marrow micronucleus test. The maximum test concentrations in the *in vitro* assays were determined by the solubility and/or the cytotoxicity of the compounds. In the mouse micronucleus assay, the compounds were administered orally at three levels up to the maximum tolerated dose (MTD). Negative results were obtained for all three drug candidates in the Ames test and in the mouse-lymphoma assay, both in the absence or presence of metabolic activation. In the mouse micronucleus test, there was no effect on the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in bone marrow after oral administration of any of the three test compounds, at any dose level or sampling time (24 and 48 h). Administration of all three compounds at the MTD induced a clear decrease in mouse body-temperature of 3.1–4.8 °C below normal; the temperature returned to normal within 8 h of dose administration. The produced mild hypothermia and absence of micronucleus induction was in contrast to the induction of MNPCE secondary to marked hypothermia reported for a structurally similar PTHPB-derived sigma-receptor ligand, the antipsychotic compound E-5842. The results obtained in the current series of studies suggest that exposure to the three tested PTHPB-derived drug candidates would not pose a genotoxic risk under clinical conditions.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the search for new therapeutic alternatives, sigma (σ) receptors have been suggested as possible pharmacological targets for the therapeutic treatment of several conditions affecting both central nervous system and peripheral tissues [1]. The existence of σ receptors was first proposed about 30 years ago by Martin et al. [2], and although they were originally classed as a subtype of the opioid receptor, currently they are accepted as a new receptor family, distinct from neurotransmitter or hormonal receptors.

Based on pharmacological and anatomical distribution properties, at least two receptor subtypes are identifiable, called, respectively, sigma-1 (σ_1) and sigma-2 (σ_2) [3,4]. The σ_1 -receptors are thought to modulate the activity of a variety of receptors and ionic channels, including neuronal firing and release of several neurotransmitters. As such, an extensive range of therapeutic indications has been proposed for this receptor subtype, including treatment of schizophrenia, drug abuse, stress, depression, demyelinating illnesses and inflammation [1]. The σ_2 -receptor is thought to be involved in the regulation of cell proliferation and maintenance of cellular viability, suggesting the possible use of σ_2 -receptor ligands as antitumour agents [5].

As part of a research programme devoted to the synthesis and identification of new chemical entities with optimized σ_1 -receptor binding and drug-like properties, a series of phenyltetrahydropyridinyl butylazole (PTHPB)-derived drug candidates were selected for development as potential therapeutic agents. These compounds

* Corresponding author at: Toxicology Department, ESTEVE, Mare de Deu de Montserrat 221, 08041 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4466065; fax: +34 93 4501611.
 E-mail address: aguzman@esteve.es (A. Guzmán).

¹ Present address: Charles River Laboratories Preclinical Services Montreal Inc. Senneville, Québec, Canada.

included 4-(4-chlorophenyl)-1-[4-(4-chloro-1H-pyrazol-1-yl)butyl]-1,2,3,6-tetrahydropyridine (compound A, CAS 177945-11-8), 1-[4-(4,5-dichloro-2-methyl-1H-imidazol-1-yl)butyl]-1,2,3,6-tetrahydro-4-[3-(trifluoromethyl)phenyl]pyridine (compound B, CAS 177945-14-1), and 4-(4-chlorophenyl)-1,2,3,6-tetrahydro-1-[4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butyl] pyridine (compound C, CAS 255736-90-4).

The process of assessing the genotoxic potential of a drug candidate is a crucial and mandatory step within its development programme, because of the relevance for human safety in relation to the potential induction of carcinogenesis and hereditary defects. No single genotoxicity test is capable of detecting all relevant genotoxic agents so, in accordance with current regulatory requirements, pharmaceutical compounds are assessed for genotoxic potential by testing them in a battery of *in vitro* and *in vivo* genotoxicity assays [6,7].

Current published information on the genotoxic potential of PTHPB-derived sigma-receptor ligands has, to be best of our knowledge, been limited to the studies conducted with the antipsychotic drug candidate E-5842. This compound was assessed for genotoxicity in an extended battery of *in vitro* and *in vivo* regulatory genotoxicity assays and, on a weight-of-evidence basis, considered to have no genotoxic risk under clinical conditions of human exposure [8]. Negative results were obtained in the Ames test, the mouse-lymphoma assay, and in two-dose mouse bone-marrow and single-dose rat-liver micronucleus tests. A positive result was obtained in an *in vitro* human lymphocyte chromosome aberration assay, and a marginal increase in MNPCE frequency above historical background level was observed in a single-dose mouse bone-marrow micronucleus test. These findings were attributed to high cytotoxicity and compound-induced hypothermia in mice, respectively, and considered to lack biological significance [8]. However, the increase in micronucleus (MN) frequency secondary to E-5842-induced hypothermia prompted concern for assessment of genotoxicity becoming a complicating factor in assessment of genotoxicity of other sigma-receptor ligand drug candidates.

We report here the results that were obtained when, as part of their preclinical safety assessment programme, three PTHPB-derived sigma-receptor ligand drug candidates (compounds A,

B and C) were assessed for genotoxic activity in the ICH standard battery of genetic toxicology assays conducted according to internationally accepted standards. These comprised a bacterial reverse-mutation assay (Ames test), an *in vitro* mammalian gene mutation and chromosome aberration assay in mouse-lymphoma L5178Y tk^{-/-} cells, and an *in vivo* mouse bone-marrow micronucleus test. The results obtained and their relevance in terms of risk assessment and in the context of current knowledge on previously tested PTHPB-derived sigma-receptor ligands are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Compound A, B and C bulk powders were synthesised by Esteve (Barcelona, Spain) (Table 1), and were administered as methanesulfonate, hydrochloride and citrate salts, respectively. All concentrations and dose levels are expressed in terms of their corresponding free base. Purity of bulk powders was always above 99.4%.

For the *in vitro* studies, solutions were made in dimethyl sulfoxide (DMSO) for compound A, in reverse-osmosis water for compound B, and in dimethylformamide (Ames test) or water (mouse-lymphoma assay) for compound C. For *in vivo* studies, compounds A and C were formulated as solutions in water, and compound B was prepared as a suspension in aqueous 1% methylcellulose. Animals were dosed orally by gavage using a dose volume of 10 (compounds A and C) or 20 ml/kg bodyweight (compound B). Vehicles used for test substance formulation were given as negative control (vehicle control) in the corresponding studies.

The following chemicals were used as positive controls: 9-aminoacridine (AAC), 2-aminoanthracene (AAN), benzo(a)pyrene (BP), cyclophosphamide (CP), mitomycin C (MMC), 2-nitrofluorene (2NF), 4-nitro-O-phenylenediamine (NOPD), 4-nitroquinoline 1-oxide (NQ), and sodium azide (NaN₃). MMC was obtained from BDH, and rest of compounds from Sigma-Aldrich. For treatment, CP, MMC and NaN₃ were dissolved in water, and the remaining positive controls were dissolved in DMSO. Vehicle and positive controls were administered at the same dose volume as their corresponding test compound.

2.2. Ames test

The preincubation version of the Ames test was carried out in accordance with the recommendations of Maron and Ames [9] and the current OECD guidelines [10]. Four *Salmonella typhimurium* histidine-auxotrophic strains (TA98, TA100, TA1535 and TA1537) and an *Escherichia coli* tryptophan-requiring strain (WP2uvrA pKM101) were used. Bacterial strains were obtained from the following suppliers: TA98, TA100 and TA1535 from CECT (Valencia, Spain), TA1537 from Moltox (Maryland, USA), and *E. coli* from DSMZ (Braunschweig, Germany).

Table 1
Chemical structure and σ_1 -receptor-binding affinity of the three tested phenyltetrahydropyridinyl butylazole-derived sigma-receptor ligands, and of E-5842

Compound	Chemical structure	Ki σ_1 -receptor
A		14.0
B		1.4
C		8.0
E-5842		4.0

Table 2
Results of Ames tests conducted with the three tested phenyltetrahydropyridinyl butylazole analogues

Test substance	Treatment ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Mean number revertant colonies per plate ^a										
		TA98		TA100		TA1535		TA1537		E. coli WP2 <i>uvrA</i>		
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
Compound A												
Experiment 1	Vehicle	21.7	31.7	147.0	153.0	26.7	21.7	11.7	12.0	42.0	146.7	
	7.67	23.0	30.3	147.3	151.3	27.0	21.3	12.0	11.0	39.7	146.3	
	15.33	22.3	31.0	145.0	150.7	26.3	20.3	11.0	12.3	44.0	147.0	
	30.66	22.7	31.0	144.0	149.3	25.7	21.7	11.7	12.3	37.7	145.0	
	61.32	21.3	30.3	144.0	151.0	26.3	22.0	11.0	11.0	46.0	144.0	
	122.65	23.0	30.7	141.7	149.7	26.7	20.7	2.0	12.7	44.0	144.3	
	245.29	20.0	31.7	101.7	152.3	27.0	21.0	1.0	11.0	43.3	141.7	
	Pos. control ^b	104.0 ^c	106.0 ^c	448.7 ^c	376.0 ^c	294.7 ^c	65.0 ^c	187.7 ^c	29.7 ^c	>1000 ^c	320.0 ^c	
	Experiment 2	Vehicle	22.0	30.0	135.3	130.0	20.7	13.0	14.3	11.0	59.0	114.7
		15.33	25.0	36.3	126.3	128.3	17.7	15.0	15.0	12.0	59.3	121.0
		30.66	28.0	35.4	116.3	121.7	19.0	11.7	13.3	13.0	64.0	116.7
		61.32	23.3	42.3	103.7	121.0	20.3	12.0	7.7	8.0	57.7	121.0
		122.65	26.0	24.7	116.0	128.0	27.7	11.7	11.0	8.3	60.7	115.3
		245.29	23.7	28.7	122.0	120.3	24.3	15.7	6.0	3.0	48.3	88.7
		490.58	20.0	22.3	101.7	87.0	17.3	1.7	4.0	-	35.7	47.7
		Pos. control ^b	84.0 ^c	148.7 ^c	423.3 ^c	404.0 ^c	295.3 ^c	85.0 ^c	584.7 ^c	75.3 ^c	>1000 ^c	351.0 ^c
		Compound B										
Experiment 1		Vehicle	27.7	35.7	119.3	136.0	16.7	15.0	7.3	13.7	67.7	124.3
	6.25	26.0	44.0	117.7	120.7	19.7	13.3	5.0	7.3	66.3	105.0	
	12.50	26.3	39.0	115.0	119.3	14.0	15.3	9.7	13.3	68.3	113.7	
	25.00	29.3	41.0	116.0	120.7	12.7	15.0	11.3	10.3	67.7	100.7	
	50.00	15.3	41.3	68.3	112.0	11.7	8.0	4.7	9.0	45.0	123.3	
	100.00	26.0	35.3	16.0	116.7	7.3	15.0	6.7	7.0	38.7	103.7	
	200.00	27.7	39.7	11.0	110.7	4.3	6.7	-	1.0	12.7	102.0	
	Pos. control ^b	126.0 ^c	153.0 ^c	401.7 ^c	478.7 ^c	289.0 ^c	101.0 ^c	49.0 ^c	89.3 ^c	>1000 ^c	267.7 ^c	
	Experiment 2	Vehicle	21.3	42.3	125.0	123.7	15.0	15.3	8.0	17.3	70.7	124.7
		6.25	26.7	34.0	102.7	120.7	11.0	11.7	7.3	12.3	62.3	135.7
		12.50	24.3	38.0	113.7	134.7	10.3	15.0	11.0	14.0	61.0	137.7
		25.00	28.3	30.3	112.7	116.0	16.7	13.7	9.7	8.0	77.7	103.0
		50.00	17.3	37.7	90.0	140.7	11.3	12.3	5.0	12.3	58.3	116.3
		100.00	8.0	30.0	96.3	117.0	13.3	16.7	7.0	9.0	65.3	104.3
		200.00	8.7	39.3	63.3	108.0	3.3	13.7	0.7	2.3	41.3	95.3
		Pos. control ^b	105.3 ^c	191.0 ^c	405.0 ^c	410.3 ^c	288.3 ^c	119.0 ^c	381.0 ^c	72.0 ^c	>1000 ^c	287.3 ^c
		Compound C										
Experiment 1		Vehicle	24.0	34.3	100.0	115.0	24.3	15.7	11.0	10.0	47.0	134.0
	48.65	23.7	34.3	99.3	115.7	22.3	16.0	11.0	9.3	45.7	133.3	
	97.29	25.3	33.7	100.0	116.0	23.0	16.3	10.7	10.0	42.7	132.7	
	194.58	23.7	32.7	52.0	115.7	24.0	17.0	11.3	8.7	30.3	133.3	
	389.17	24.3	34.0	-	115.0	23.7	-	10.7	9.7	37.7	133.0	
	778.33	22.7	33.3	-	64.7	24.3	-	11.0	9.0	33.7	132.3	
	1556.66	15.0	33.7	-	-	16.7	-	-	11.0	23.0	92.0	
	Pos. control ^b	157.7 ^c	281.3 ^c	327.7 ^c	283.3 ^c	551.3 ^c	68.7 ^c	28.0 ^c	41.0 ^c	>1000 ^c	291.3 ^c	
	Experiment 2	Vehicle	22.3	28.0	101.0	123.3	24.7	20.0	12.0	15.7	37.0	119.3
		48.65	21.3	NT	100.7	122.3	NT	19.3	11.3	NT	43.7	119.0
		97.29	21.3	NT	100.0	121.7	22.7	19.0	11.3	NT	51.3	118.7
		194.58	21.7	26.7	73.7	121.7	22.3	19.3	11.7	14.0	37.3	119.3
		389.17	22.3	26.7	71.0	123.3	22.3	19.3	11.0	14.7	32.3	119.3
		778.33	19.0	26.7	60.0	122.0	23.3	15.0	11.3	14.3	44.3	118.3
		1556.66	11.0	26.3	23.7	87.3	17.0	4.3	1.0	14.0	23.0	83.3
		3113.31	-	10.0	-	-	12.3	-	-	9.3	-	-
		Pos. control ^b	186.7 ^c	195.3 ^c	257.3 ^c	266.0 ^c	596.7 ^c	52.7 ^c	29.3 ^c	32.0 ^c	>1000 ^c	206.7 ^c

^a Mean of 3 replicas for all tested conditions.

^b In absence of S9. TA98: NOPD/2NF (1/2 $\mu\text{g}/\text{plate}$); TA100 and TA1535: Na₂S₂O₈ (0.25–1 $\mu\text{g}/\text{plate}$); TA1537: AAC (5–50 $\mu\text{g}/\text{plate}$); E. coli WP2 *uvrA* (pKM101): NQ (0.125 $\mu\text{g}/\text{plate}$). In presence of S9, AAN (1–5 $\mu\text{g}/\text{plate}$). * $p < 0.01$ Student's *t*-test; -: no revertants due to toxicity.

A frozen sample of each tester strain was thawed and cultures prepared and used in late exponential growth phase. Each test substance was assessed in two independent experiments, each conducted in absence and presence of an S9 (Trinova Biochem, Germany) metabolic activation system, using triplicate plates for each test substance concentration, vehicle or positive control, and treatment condition. For Experiment 1, test concentrations were selected based on the results of a preliminary study. Test concentrations and conditions are detailed in Table 2.

Briefly, 0.1 ml of test substance (or vehicle- or positive-control solution), 0.1 ml of bacterial culture and 0.5 ml of 10% S9 mix (phosphate-buffer solution for treatment without activation) were mixed and incubated for 20 min at 37 °C, before addition

of 2 ml molten agar at 42 °C and poured onto Vogel Bonner-E minimal glucose agar plates. Plates were inverted and incubated for 48–72 h at 37 °C in the dark. Revertant colonies were counted and background lawn was inspected for signs of toxicity or compound precipitation. Mean plate counts were calculated for each experimental point. Dunnett's test [11] was used to compare counts of each test substance concentration with the corresponding vehicle control. For the positive control, Student's *t*-test [12] was used to compare counts with negative-control counts. The assay was considered positive for mutagenic activity when the Dunnett's test gave a significant response ($p \leq 0.01$), the data set showed dose-correlation, and the positive effect was reproducible.

Table 3
Results of mouse-lymphoma assays conducted with the three tested phenyltetrahydropyridinyl butylazole analogues

Test substance	Experiment 1						Experiment 2					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Treatment ^a (µg/ml)	%RS	MF	Treatment ^a (µg/ml)	%RS	MF ^b	Treatment ^a (µg/ml)	%RS	MF	Treatment ^a (µg/ml)	%RS	MF ^b
Compound A	Vehicle	100	111	Vehicle	100	110	Vehicle	100	111	Vehicle	100	222
	3.12	102	117	6.25	102	97	1.2	98	107	6.25	113	214
	6.25	88	113	12.5	105	106	2.4	85	115	12.5	104	235
	12.5	77	117	25	67	99	4.7	66	71	25	97	213
	25	48	139	50 ^c	52	112	5.5	56	67	50	54	208
	50 ^d	27	137	100 ^e	25	148	6.3	44	94	100	22	421 ^f
							7.1	21	99			
							7.8	12	104			
							7.8	12	104			
		NQ, 0.05	91	415	BP, 2	67	1221	NQ, 0.02	86	252	BP, 2	67
Compound B	Vehicle	100	88	Vehicle	100	90	Vehicle	100	80	Vehicle	100	97
	2.31 ^b	90	4.61 ^b	95	0.58	92	73	9.22	79	83		
	4.61	88	79	9.22	95	81	1.15	69	77	18.4	92	97
	9.22	81	86	18.4	91	73	2.31	82	80	27.7	85	105
	18.4	67	91	27.7	79	80	4.61	104	113	36.9	49	89
	23.1	43	89	36.9	50	68	9.22	55	81	46.1	21	90
	27.7	20	99	46.1	21	95	13.8	21	81	50.7	10	121
	32.3 ^c	8	102	55.3 ^c	7	131	18.4 ^d	6	111			
		NQ, 0.05	90	370	BP, 2	61	637	NQ, 0.02	64	204	BP, 2	51
Compound C	Vehicle	100	314	Vehicle	100	290	Vehicle	100	111	Vehicle	100	105
	25 ^e	100	25 ^e	103	2.5	38	117	50	80	88		
	50 ^f	99	50 ^f	79	5	41	134	100	82	120		
	75	75	275	100	72	291	10	37	114	15.0	60	100
	100	40	266	150	55	261	20	39	100	200	25	93
	113	31	231	200	40	222	25	37	114	225	13	128
	125	33	247	213	38	278	30	41	130			
	138	25	291	225	32	233	35	28	103			
	150	12	275	250	11	306	40	14	99			
		NQ, 0.05	169	344	BP, 2	38	680	NQ, 0.02	67	170	BP, 2	75

^a 3 h in presence of S9; 3 h (Exp.1) and 24 h (Exp.2) in absence of S9. MF: Mutant frequency per 10⁶ viable cells.

^b Not plated for viability/5-TFT resistance.

^c Excluded from statistical analysis due to excessive toxicity.

^d Test substance precipitate.

^e $p < 0.05$ Dunnett's test; ^f $p < 0.05$, ^g $p < 0.01$ chi-square.

2.2. Mouse-lymphoma thymidine-kinase assay

The microwell fluctuation version of the assay [13] was carried out in accordance with the current OECD guidelines [14]. L5178Y TK⁺ mouse-lymphoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Each test substance was assayed in two independent experiments, each conducted in the absence and presence of S9 (Moltox, USA) metabolic activation system. Experiment 1 consisted of a 3-h treatment period in the absence and presence of S9 (2% final concentration) with compound concentrations selected based on the results of a preliminary assay. For Experiment 2, treatment in the absence of S9 was extended to 24 h. Test concentrations and conditions are detailed in Table 3.

Maximum vehicle concentrations in treatment medium were 1 and 10% for DMSO and water, respectively. For treatment, approximately 10⁷ cells were exposed in RPMI 1640 medium supplemented with 5 or 10% horse serum (for the 3 and 24-h treatments, respectively), 100 µg/ml gentamicin and 2.5 µg/ml amphotericin B, at 37°C and 5% CO₂. Duplicate cultures were set-up for the vehicle control and each test substance concentration, and single cultures for positive controls. After the 3 or 24-h treatment, the cells were washed with culture medium, re-suspended in medium with 10% serum and, when appropriate, their concentration adjusted to 2 × 10⁶ cells/ml.

For determination of survival, culture samples were diluted to 8 cells/ml in medium with 20% serum, seeded into 96-well microplates at an average of 1.6 cells/well, and incubated for 8 days. Wells containing viable clones were identified and counted. For assessment of mutations, cells were allowed an expression period of 2 days with the cell concentration adjusted so as not to exceed 1 × 10⁶ cells/ml. At the end of the expression period, cells were plated onto 96-well plates at an average of 1.6 cells/well and incubated for 10–11 days for assessment of viability. Cells were plated at an average of 2 × 10³ cells/well in the presence of 5-trifluorothymidine (3 µg/ml), and incubated for 12 days for assessment of mutations. Wells containing clones were identified and counted. Large and small colonies were scored for vehicle and positive controls. For each treatment condition the percentage relative survival (%RS) as compared with vehicle-control cultures and the mutant frequency per 10⁶ viable cells (MF) were determined. The log mutant frequency for the vehicle control was compared with that from each treatment concentration by means of Dunnett's test [11] and checked for a linear trend by

chi-square, according to UKEMS guidelines [15]. The result was considered positive when there was a significant increase in the mutant frequency over the vehicle control at one or more concentrations, and there was a significant dose-response.

2.4. Mouse bone-marrow micronucleus test

The micronucleus test was performed according to the method of Schmid [16] with appropriate modifications to conform with current scientific recommendations and regulatory requirements [17]. Male and female CD-1 albino outbred mice were obtained from Harlan UK or Charles River UK. Animals were randomly allocated to treatment groups and caged in groups of maximum five of the same sex. Animals were housed in air-conditioned rooms with temperature and relative humidity set at target values of 22°C and 50%; lighting was controlled to give a 12-h light-dark cycle. Animals had free access to commercial rodent diet (Panlab S.L. and Special Diets Services) and were allowed to acclimatize to the conditions described for at least 5 days before treatment. On the day of dosing, animals were approximately 7–9 weeks old, and in a weight range of 25–35 g for males and 18–26 g for females. All procedures involving animals and their care were conducted in strict conformity with the European Community Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [18]. Dose levels were selected based on preliminary studies, with severity of observed clinical signs and/or mortality being applied as dose-limiting criteria [19]. The dose levels for the main study are shown in Table 4. For each study, five male and five female mice from vehicle and positive controls and from each test substance dose-group were sacrificed by cervical dislocation 24 h after dosing. In addition, five male and five female mice from the vehicle and high-dose groups were sacrificed 48 h after dosing. Immediately after euthanasia, the femurs were dissected, bone marrow extracted, mixed with foetal calf serum and bone-marrow smears prepared. The smears were fixed with methanol and stained with Giemsa. Slides were coded and examined under light microscopy. For each animal, the relative proportion of polychromatic (PCE) and normochromatic erythrocytes (NCE) was determined by counting a total of 1000 erythrocytes. The number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) was determined by examination of 2000 PCEs per animal.

To check for possible compound-induced hypothermia as a confounding factor [20], rectal temperature was measured in groups of three male animals each receiving the highest test dose (150, 177 and 120 mg/kg for compounds A, B and C,

Table 4
Results of mouse bone-marrow micronucleus tests conducted with the three tested phenyltetrahydropyridinyl butylazole analogues

Test substance	Treatment (mg/kg)	Sampling time (h)	N	PCE/NCE (mean ± S.D.)	MNPCE/1000 PCEs (mean ± S.D.)
Compound A	Vehicle	24	10	1.36 ± 0.41	2.1 ± 0.80
	Vehicle	48	10	1.31 ± 0.27	1.1 ± 0.81
	38	24	10	1.51 ± 0.31	2.0 ± 1.20
	75	24	10	1.64 ± 0.57	1.7 ± 0.71
	150	24	10	1.65 ± 0.42	1.5 ± 0.62
	150	48	10	1.41 ± 0.28	1.7 ± 1.14
	CP-50	24	10	0.86 ± 0.25	37.3 ± 14.19 ^{***}
Compound B	Vehicle	24	10	0.94 ± 0.10	0.8 ± 0.48
	Vehicle	48	10	0.88 ± 0.13	0.8 ± 0.54
	44	24	10	0.97 ± 0.12	0.8 ± 0.42
	88	24	10	0.95 ± 0.21	0.5 ± 0.47
	177	24	10	1.00 ± 0.13	0.7 ± 0.47
	177	48	10	0.93 ± 0.07	1.0 ± 0.67
	MMMC-12	24	10	0.88 ± 0.13	27.6 ± 15.53 ^{***}
	Vehicle	24	10	1.67 ± 0.70	1.5 ± 1.08
Compound C	Vehicle	48	10	1.43 ± 0.26	0.3 ± 0.98
	30	24	10	1.18 ± 0.22	1.6 ± 0.93
	60	24	10	1.47 ± 0.50	1.3 ± 0.71
	120	24	10	1.25 ± 0.22	1.5 ± 0.33
	120	48	10	1.32 ± 0.27	0.4 ± 1.07
	CP-50	24	10	0.95 ± 0.37	34.5 ± 7.80 ^{***}

^{***} $p < 0.001$ Dunnett's test.

respectively). A similar group receiving water acted as a negative control for rectal temperature measurements. Rectal temperature was recorded by means of a digital thermometer (Pb 0331, Panlab) connected to a thermal probe (Model 443, Selecta). The probe was carefully inserted rectally in the mouse (about 18 mm), which was gently restrained by hand, and the temperature was recorded 5 s after readout stabilization. Measurements were performed just prior (basal temperature) and 1, 2, 4, 6, 8 and 24 h after treatment.

For each treatment group, the frequency of MNPCE (males and females, separately and combined) was compared with that in the corresponding vehicle-control group by means of the Dunnett's test [11] after rank transformation of the data. The result was considered positive when there was a statistically significant increase ($p < 0.05$) in the frequency of MNPCE for at least at one dose, with the group mean exceeding the historical vehicle-control range. For assessment of effects on body-temperature, individual rectal temperature values were converted into percentages relative to individual animal basal temperature. A two-way (treatment, time) analysis of variance (ANOVA) with repeated measures on the time factor was performed, followed by individual comparisons of group mean values against the concurrent negative-control group using Dunnett's test [11]. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Ames test

The results of the Ames tests are shown in Table 2. After exposure to the test compounds there was no increase in the number of revertants in any of the treated strains and at any of the test concentrations, either in the presence or absence of S9. Precipitation of the test substance was observed for compound A at the highest test concentration (490.58 µg/plate) in most strains. Evidence of toxicity in the form of a reduction in the number of revertants was apparent for all three tested compounds in most strains following treatment at the highest test concentrations, both in the presence and absence of S9. The lower toxicity shown by the triazol-substituted PTHPB analogue (compound C), as compared to the pyrazole- and imidazole-substituted compounds (compounds A and B, respectively), allowed testing at higher concentrations. For compounds B and C cytotoxicity was generally higher in absence of S9, while for compound A this trend was less obvious. Positive controls produced statistically significant increases ($p < 0.01$) in the number of revertants, confirming the sensitivity of the test system and the activity of the S9 mix. It was concluded that the three PTHPB-derived compounds were not genotoxic in this bacterial system.

3.2. Mouse-lymphoma assay

The results of the mouse-lymphoma assays are shown in Table 3. There was no relevant increase in the mutant frequency after exposure to any of the three test compounds. For compound A, a small but statistically significant increase in the mutant frequency was observed in Experiment 2 at the highest tested concentration (100 µg/ml) in the presence of S9, which reached a value (421) that exceeded the sum of the mean of the vehicle control (222) and the Global Evaluation Factor (126), as recommended by Moore et al. [21]. This slight increase was, however, considered without biological significance as it was attributed to severe delayed toxicity indicated by a poor growth in suspension during the expression period and a depression in plating efficiency on Day 2 (6% relative total growth). In addition, a similar effect was not seen at this same concentration in Experiment 1. Weak linear trends were seen both in Experiments 1 and 2 in the presence of S9, which were due to slightly increased mutant frequencies at the top dose and were considered to be of no biological significance. The triazol-substituted PTHPB analogue (compound C) was less cytotoxic compared with the structural analogues (compounds A and B). All three test compounds generally showed higher toxicity in the absence of S9. Test substance precipitation was only observed for compound A in Experiment 1, at the highest concentration tested in the absence of S9 and at the highest two doses in the presence of S9. A clear increase in mutant frequency was observed in cultures treated with the positive controls, thus showing the validity of the experimental model used. Thus, the three tested PTHPB-derived compounds were considered to be not genotoxic in the mouse-lymphoma assay.

3.3. Bone-marrow mouse micronucleus test

After oral administration of the three PTHPB-derived compounds, clinical signs of CNS excitation, including tremors, convulsions and twitching, were observed among high-dose group animals. Clinical signs such as decreased motor activity, ataxia, ptosis and hunched back were also occasionally observed among some of the mid- and low-dose group animals. Animals generally recovered their normal outward appearance approximately 6 h after administration. A single death occurred at the highest dose

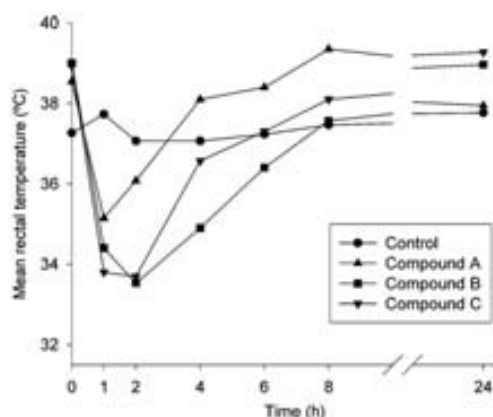


Fig. 1. Effect of oral administration of compounds A, B and C at their corresponding MTDs on mice rectal temperature. Rectal temperature was registered with a digital thermometer at 7 time points during a 24 h period after administration of either, water (●), compound A (▲), compound B (■) or compound C (▼).

tested for compound B (177 mg/kg). The recorded mortality and intensity of the clinical signs confirmed that maximum tolerated doses (MTD) had been effectively achieved [19]. For all studies, MNPCE mean frequencies in vehicle-control animals were consistent with historical negative-control values in the laboratory, and comparable with those reported in the literature for this strain of mice [22,23]. During analysis of the bone marrow no statistically or biologically significant increase in MNPCE frequency was observed in the treated groups, at any test dose or sampling time (Table 4). Positive-control substances induced marked and statistically significant increases ($p < 0.001$) in MNPCE frequency, confirming the sensitivity of the test system. No evidence of bone-marrow toxicity, as indicated by a decrease in the PCE/NCE ratio, was observed after administration of any of the three test compounds. Among animals treated with the positive control CP, a clear decrease in the mean PCE/NCE ratio was observed. It was concluded that the three PTHPB analogues showed no potential for genotoxic activity in this *in vivo* assay.

The effect of oral administration of the PTHPB-derived analogues at their MTDs on the rectal temperature of the mice is shown in Fig. 1. Mean basal temperature before administration of either negative control (water) or test compounds was 38.3 ± 0.88 °C ($n = 12$). Negative-control animals experienced no significant change in mean rectal temperature after treatment. A clear decrease in mean rectal temperature was observed after administration of each of the three PTHPB-derived analogues, with maximum effects being achieved 1 and 2 h after administration of compound A and compounds B and C, respectively. Temperatures reached at these time points were 35.2, 33.5 and 33.7 °C for compounds A, B and C, representing decreases of 3.1, 4.8 and 4.6 °C from basal values, respectively. Recovery to pre-administration values was observed 4 and 8 h after administration of compounds A and compounds B and C, respectively. Pair-wise comparisons of treatment-group temperature versus the negative control showed statistical significance for compounds B ($p < 0.001$) and C ($p < 0.01$), but not for compound A ($p = 0.17$).

4. Discussion

Three structurally related PTHPB-derived drug candidates with sigma-receptor-binding properties (compounds A, B and C) were tested for genotoxicity in the ICH standard battery of genetic toxicology assays.

These comprised a bacterial reverse-mutation assay (Ames test), an *in vitro* gene mutation and chromosome aberration test in mouse-lymphoma cells, and an *in vivo* mouse bone-marrow micronucleus assay.

The three tested drug candidates were shown to lack *in vitro* genotoxic activity when assessed for induction of gene mutation and chromosome aberration in the Ames and mouse-lymphoma assays, respectively, the highest test concentrations being limited by solubility and/or toxicity. For all three tested PTHPB-derived drug candidates, toxicity was generally higher when tested in absence of exogenous metabolic activation (S9), which could suggest a higher cytotoxic potential for parent compounds than for their putative metabolites. Further, the triazole-substituted drug candidate (compound C) displayed a lower toxicity towards both bacteria and mouse-lymphoma cells, compared with the pyrazole- and imidazole-substituted compounds A and B.

The negative results obtained in the two *in vitro* assays are in agreement with those previously reported for another PTHPB-derived structural analogue, the antipsychotic σ -receptor ligand E-5842 (4-(4-fluorophenyl)-1,2,3,6-tetrahydro-1-[4-(1,2,4-triazol-1-yl)butyl]pyridine citrate, CAS-220120-14-9) [8]. E-5842 was reported as negative in both the Ames test and mouse-lymphoma assay, but shown to induce chromosomal aberrations in human lymphocytes, both in presence and absence of S9. However, the observed aberrations were reported to occur at concentrations associated with mitotic accumulation, suggesting that the general toxic effects were underestimated by the use of mitotic index data.

Oral administration of the three tested PTHPB-derived compounds did not cause any significant increase in mouse bone-marrow MNPCE frequency at any tested dose or sampling time, indicating lack of *in vivo* genotoxic potential. When administered at their respective MTDs, all three compounds produced a clear hypothermic effect. Maximum decreases from basal body-temperature ranged from 3.1 to 4.8 °C, with animals recovering their normal temperature 4–8 h after administration. The observed hypothermic effect was of lesser intensity and duration compared with that previously reported for the antipsychotic σ -receptor ligand E-5842 [24]. Oral administration of E-5842 at the MTD (200 mg/kg) caused a decrease in rectal temperature up to approximately 12 °C from basal conditions, with animals recovering their normal temperature 24 h after administration. For E-5842, this severe and long-lasting hypothermia was associated with a slight increase in bone-marrow MNPCE frequency 48 h after administration, which was shown to be abolished when the hypothermic conditions were avoided [24].

Similar moderate increases in MNPCE frequency in mouse bone-marrow, evident at late sampling times (≥ 48 h) and secondary to hypothermia, have been reported for a limited number of other compounds. These include the CNS-active substances reserpine [25], chlorpromazine [26], and the coded compound "Covance compound No. 4" [27], for which the increase in MN formation after administration has been shown to be reversed when the hypothermic conditions were avoided. There is, however, a certain discussion in relation to the mechanism underlying hypothermia-induced MN. In experiments with reserpine, Asanami and Shimono suggested that disturbance of the mitotic apparatus as a consequence of low temperature could be a possible mechanism for increased MNPCE formation, with the observed increase in MN size suggesting an aneugenic origin [25]. Alternatively, the increased MN size that has also been reported under hypothermic conditions after administration of chlorpromazine [26] and E-5842 [24], could also suggest possible interference with the erythrocyte enucleation process. Stimulation of erythropoiesis as consequence of reduced blood-oxygen tension associated with the induced hypothermic conditions has also been proposed as a pos-

sible mechanism for increased MN formation [27]. Decreased time for repair of spontaneously occurring DNA damage [28,29], disruption of spindle formation during rapid cell division [30], and errors in the process of enucleation of erythrocytes [31] have been suggested as a possible source of increased MN formation associated with stimulation of erythropoiesis. Similarly, anoxic conditions associated with marked clinical signs such as hypoactivity and sedation, with which hypothermia is commonly associated, have also been proposed to possibly stimulate erythropoiesis and increased MN formation [32]. Further research into the mechanism underlying hypothermia-related MN induction is certainly needed.

The moderate hypothermic effect induced by the currently tested PTHPB-derived candidates, in terms of intensity (3.1–4.8 °C) and duration (<8 h), was not associated with an increase in MN/PCE frequency, which is consistent with the concept of a temperature-duration threshold of at least 11 h below 33 °C for induction of MN, as proposed by Asanami et al. [26]. This empirical value, based on their experiments with chlorpromazine, is largely in agreement with the intensity and duration of the MN-inducing hypothermic conditions that have been reported for compounds such as reserpine [25], E-5842 [24] and "Covance compound No. 4" [27]. These results add new data to the literature and help in defining which departure from normal physiological conditions has been associated to increased MN formation.

Induction of hypothermia in rodents by some toxic agents has been proposed as a physiological adaptive response, attenuating their toxic effects and increasing survival [33]. For psychoactive drugs, interference with body-temperature regulation has been mainly linked to interaction with dopamine (D), serotonin (5HT) and α_2 -adrenergic receptors, all of which are known to be involved in mammalian temperature regulation [34–39]. Interaction with sigma receptors has also been suggested to mediate induction of hypothermia in rodents [40–42], and dense expression of the σ -receptor in the hypothalamus [43,44], a brain region thought to play a major role in thermoregulation, has been reported.

Despite similarities in chemical structure and binding affinity for the σ_1 -receptor (Table 1), E-5842 clearly produces more marked hypothermia in mice than compounds A, B and C. In this respect, compound C is most remarkable, because it only differs from E-5842 in the halogen substitution at the benzene ring (i.e. fluorine instead of chlorine atom). When considering a possible underlying cause for this differential response a few aspects need to be taken into account.

Differences in the applied dose levels *per se* are unlikely to account for the different hypothermic inducing potential, as E-5842 dose levels well below the MTD have been reported to induce hypothermic conditions of higher intensity and duration [24]. The observed clinical signs support the presence of biologically active doses of the administered PTHPB-derived compounds in peripheral blood. However, their shorter duration relative to that reported for E-5842 [8] could suggest a faster clearance and possibly a longer *in vivo* σ -receptor interaction for E-5842.

In terms of metabolic fate, while the generation of E-5842-related metabolites with improved sigma-receptor affinity cannot be ruled out, it seems unlikely as both E-5842 and the PTHPB analogues currently tested all originate from an extensive drug-discovery programme devoted to obtaining compounds with optimized sigma-receptor binding. The same may, however, not necessarily hold true for the generation of putative metabolites that potentially interact with other receptors involved in mammalian thermo-regulatory systems. In this respect, E-5842 has been shown to display moderate to low affinity for other central nervous system receptors such as the dopamine D₁₋₄-receptor and the serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors [45]. Off-target interaction with

these receptors could well account for or contribute to its particular hypothermic effect. Thus, while the current observations after administration of the tested PTHPB-derived drug candidates seem to question interaction with σ_1 -receptors as a relevant contributing factor to the marked hypothermic effect of E-5842, the contribution of compound-specific pharmacokinetics, tissue distribution and/or metabolic factors cannot be ruled out.

Bearing in mind the requirement for genotoxicity testing of all new pharmaceutical candidates, the results obtained with the tested PTHPB-derived sigma-receptor ligands suggest that genotoxic activity *a priori* does not seem to be of particular concern for similar backup drug candidates of this same chemical series. The results obtained so far suggest that induction of hypothermia is a possible class effect of this chemical series of sigma-receptor ligands after oral administration to mice, and support the conclusion that induction of MN by E-5842 secondary to hypothermia is an isolated finding for this particular compound.

In summary, the results obtained in the current series of studies have shown that the three tested PTHPB-derived sigma-receptor ligands (compounds A, B and C) lacked genotoxic activity when tested in a battery of *in vitro* and *in vivo* genotoxicity assays, and suggest that exposure to any of these three drug candidates under clinical conditions does not pose a genotoxic risk.

Acknowledgment

We thank Dr. Jesús Giraldo (Institut de Neurociències i Unitat de Bioestadística, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain) for his assistance in the statistical analysis of the data.

References

- [1] J. Corbera, D. Vahó, D. Martínez, J.M. Vela, D. Zamanillo, A. Dordal, F. Andreu, E. Hernandez, R. Perez, M. Escriche, L. Salgado, S. Yeste, M.T. Serafini, R. Pascual, J. Alegre, M.C. Calver, N. Cano, M. Carro, H. Buschmann, J. Holenz, A medicinal-chemistry-guided approach to selective and druglike sigma 1 ligands, *ChemMedChem* 1 (2006) 140–154.
- [2] W.R. Martin, C.G. Eades, J.A. Thompson, R.E. Huppler, P.E. Gilbert, The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197 (1976) 517–532.
- [3] R. Quirion, W.D. Bowen, Y. Itzhak, J.L. Junien, J.M. Musacchio, R.B. Rothman, T.P. Su, S.W. Tam, D.P. Taylor, A proposal for the classification of sigma binding sites, *Trends Pharmacol. Sci.* 13 (1992) 85–86.
- [4] S.B. Hellewell, A. Bruce, G. Feinstein, J. Orringer, W. Williams, W.D. Bowen, Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling, *Eur. J. Pharmacol.* 268 (1994) 9–18.
- [5] K.W. Crawford, W.D. Bowen, Sigma-2 receptor agonists activate a novel apoptotic pathway and potentiate antineoplastic drugs in breast tumor cell lines, *Cancer Res.* 62 (2002) 313–322.
- [6] ICH, Topic S7A Genotoxicity: Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Approved September 1995.
- [7] ICH, Topic S2B, Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Step 4 Guideline, 16 July 1997.
- [8] A. Guzmán, C. García, A.R. de Henestrosa, S. Riley, M.T. Ruiz, A.P. Marín, A. Tortajada, Assessment of the genotoxic potential of the antipsychotic sigma receptor ligand E-5842, *Mutat. Res.* 605 (2006) 63–77.
- [9] D.M. Maron, B.N. Ames, Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.* 113 (1983) 173–215.
- [10] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), OECD guideline for testing of chemicals, No. 471, in: *Genetic Toxicology: Bacterial Reverse Mutation Test*, 1997.
- [11] C.W. Dunnett, A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, *J. Am. Stat. Assoc.* 50 (1955) 1096–1121.
- [12] Student, The probable error of a mean, *Biometrika* 6 (1908) 1–25.
- [13] J. Cole, D.B. Mc Gregor, M. Fox, R.C. Gramer, J. Thacker, Gene mutation assay in cultured mammalian cells, in: D.J. Kirkland (Ed.), *Basic Mutagenicity Tests UKEMS Recommended Procedures*, Cambridge University Press, 1990, pp. 87–114.

- [14] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD guideline for the testing of chemicals, No. 476, in: *Genetic Toxicology: In vitro mammalian cell gene mutation test*, 1997.
- [15] W.D. Robinson, M.H.L. Green, J. Cole, R.C. Garner, M.J.R. Healy, D.G. Gatehouse, Statistical evaluation of bacteria/mammalian fluctuation test, in: D.J. Kirkland (Ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Cambridge University Press, 1990, pp. 102–140.
- [16] W. Schmid, The micronucleus test, *Mutat. Res.* 31 (1975) 9–15.
- [17] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD guideline for the testing of chemicals, No. 474, in: *Genetic Toxicology: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*, 1997.
- [18] EEC, Council Directive 86/609/EEC, 24 November 1986.
- [19] R.J. Fielder, J.A. Allen, A.R. Boobis, P.A. Botham, J. Doe, D.J. Estelle, D.G. Gatehouse, G. Hodson-Walker, D.B. Morton, D.J. Kirkland, Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, *Mutagenesis* 7 (1992) 313–319.
- [20] European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use, 28 June 2006, Guideline on the limits of genotoxic impurities.
- [21] M.M. Moore, M. Honma, J. Clements, G. Bolcsfoldi, B. Burlinson, M. Cifone, J. Clarke, R. DeLongchamp, R. Durward, M. Fellows, B. Gollapudi, S. Hou, P. Jenkinson, M. Lloyd, J. Majeska, B. Myhr, M. O'Donovan, T. Omori, C. Riach, R. San, L.F. Stankowski Jr., A.K. Thakur, F. Van Goethem, S. Wakuri, I. Yoshimura, Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: follow-up meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing—Aberdeen, Scotland, 2003—Assay acceptance criteria, positive controls, and data evaluation, *Environ. Mol. Mutagen.* 47 (2006) 1–5.
- [22] G. Krishna, G. Urdá, J. Paulissen, Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, *Mutat. Res.* 453 (2000) 45–50.
- [23] M.F. Salamone, K.H. Mavournin, Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, *Environ. Mol. Mutagen.* 23 (1994) 239–273.
- [24] A. Guzman, C. Garcia, A.P. Marin, M.T. Ruiz, A. Tortajada, A.R. Fernandez de Henestrosa, Induction of micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes in association with hypothermia after administration of the sigma receptor ligand E-5842, *Mutat. Res.* 565 (2004) 11–22.
- [25] S. Asanami, K. Shimono, Hypothermia induces micronuclei in mouse bone marrow cells, *Mutat. Res.* 393 (1997) 91–98.
- [26] S. Asanami, K. Shimono, S. Kaneda, Transient hypothermia induces micronuclei in mice, *Mutat. Res.* 413 (1998) 7–14.
- [27] D.J. Tweats, D. Blakey, R.H. Helflich, A. Jacobs, S.D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M.R. O'Donovan, Y.F. Sasaki, T. Sofuni, R. Tice, Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards, *Mutat. Res.* 627 (2007) 78–91.
- [28] Y. Suzuki, Y. Nagae, T. Ishikawa, Y. Watanabe, T. Nagashima, K. Matsukubo, H. Shimizu, Effect of erythropoietin on the micronucleus test, *Environ. Mol. Mutagen.* 13 (1989) 314–318.
- [29] D. Kirkland, Selection of mutagenicity and cell transformation tests—interpretation of results, in: *Preclinical Evaluation of Peptides and Recombinant Proteins*, Association of the Swedish Pharmaceutical Industry and the Swedish National board of Health and Welfare, 1991, pp. 49–56.
- [30] Y. Suzuki, H. Shimizu, Y. Nagae, M. Fukumoto, H. Okonogi, M. Kadokura, Micronucleus test and erythropoiesis: effect of cobalt on the induction of micronuclei by mutagens, *Environ. Mol. Mutagen.* 22 (1993) 101–106.
- [31] N. Yajima, Y. Kurata, T. Sawai, Y. Takeshita, Induction of micronucleated erythrocytes by recombinant human erythropoietin, *Mutagenesis* 8 (1993) 221–229.
- [32] R.D. Snyder, M.S. Diehl, Hypoxia-induced micronucleus formation in mice, *Drug Chem. Toxicol.* 28 (2005) 373–378.
- [33] P.J. Spencer, B.B. Gollapudi, J.M. Waechter Jr., Induction of micronuclei by phenel in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, *Toxicol. Sci.* 97 (2007) 120–127.
- [34] S. Ahlenius, Clozapine: dopamine D1 receptor agonism in the prefrontal cortex as the code to decipher a Rosetta stone of antipsychotic drugs, *Pharmacol. Toxicol.* 84 (1999) 193–196.
- [35] J.F. Cryan, P. Kellihfer, J.P. Kelly, B.E. Leonard, Comparative effects of serotonergic agonists with varying efficacy at the 5-HT_{1A} receptor on core body temperature: modification by the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100635, *J. Psychopharmacol.* 13 (1999) 278–283.
- [36] J.F. Cryan, A. Harkin, M. Naughton, J.P. Kelly, B.E. Leonard, Characterization of D-fenfluramine-induced hypothermia: evidence for multiple sites of action, *Eur. J. Pharmacol.* 390 (2000) 275–285.
- [37] S. Oerther, Temperature set-point changes induced by DA D_{2/3} and 5-HT_{1A} receptor agonists in the rat, *Neuroreport* 11 (2000) 3949–3951.
- [38] S. Oerther, S. Ahlenius, Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors for citalopram-induced hypothermia in the rat, *Psychopharmacology (Berl.)* 154 (2001) 429–434.
- [39] S. Perachon, C. Betancur, C. Pilon, W. Rostene, J.C. Schwartz, P. Sokoloff, Role of dopamine D3 receptors in thermoregulation: a reappraisal, *Neuroreport* 11 (2000) 221–225.
- [40] M. Bejanian, R.N. Pechnick, M.P. Bova, R. George, Effects of subcutaneous and intracerebroventricular administration of the sigma receptor ligand 1,3-di-*o*-tolylguanidine on body temperature in the rat: interactions with BMY 14802 and rimcazole, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258 (1991) 88–93.
- [41] B. Kest, J.S. Mogil, W.F. Sternberg, R.N. Pechnick, J.C. Liebeskind, Antinociception following 1,3-di-*o*-tolylguanidine, a selective sigma receptor ligand, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50 (1995) 587–592.
- [42] S.M. Rawls, D.A. Baron, E.B. Geller, M.W. Adler, Sigma sites mediate DTG-evoked hypothermia in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73 (2002) 779–786.
- [43] B.L. Largent, A.L. Gundlach, S.H. Snyder, Pharmacological and autoradiographic discrimination of sigma and phencyclidine receptor binding sites in brain with (+)-[3H]SKF 10,047, (+)-[3H]-3-[3-hydroxyphenyl]-N-(1-propyl)piperidine and [3H]-1-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperidine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238 (1986) 739–748.
- [44] P. Bouchard, R. Quirion, [3H]1,3-di-*o*-tolylguanidine and [3H](+)-pentazocine binding sites in the rat brain: autoradiographic visualization of the putative sigma₁ and sigma₂ receptor subtypes, *Neuroscience* 76 (1997) 467–477.
- [45] X. Guitart, X. Codony, M. Ballarín, A. Dordal, A.J. Farré, E-5842: a new potent and preferential sigma ligand. Preclinical pharmacological profile, *CNS, Drug. Rev.* 4 (1998) 201–224.

4.4. Resumen del contenido del artículo 4

Induction of hypothermic conditions associated with increased micronuclei formation in sigma-1 receptor knockout mice after administration of the antipsychotic compound E-5842.

El fármaco experimental E-5842 ha mostrado que es capaz de inducir condiciones de hipotermia asociadas a incrementos en la frecuencia de EPCMN en el ensayo de MN en médula ósea de ratón (ver Anexo 1). La posible implicación del receptor σ_1 en la inducción de hipotermia por E-5842 fue considerada factible, generando preocupación sobre la introducción de un factor de confusión en la valoración del potencial genotóxico de otros fármacos experimentales con afinidad por el receptor σ_1 , en este ensayo *in vivo* de genotoxicidad. En este sentido, los fármacos experimentales A, B y C, análogos estructurales del E-5842 y con similar afinidad por el receptor σ_1 , también han mostrado inducir hipotermia tras su administración oral en ratón (ver Artículo 3). La intensidad y duración del efecto hipotérmico inducido por estos fármacos fue inferior al producido por el E-5842, no pudiendo descartarse la implicación de posible factores farmacocinéticos o metabólicos en esta diferente actividad hipotérmica.

El objetivo de este estudio fue comprobar la contribución del receptor σ_1 en la inducción de condiciones de hipotermia asociadas a incrementos en la formación de MN en eritrocitos de ratón. Para ello, se estudió el efecto de la administración de E-5842 (200 mg/Kg) sobre la temperatura corporal y la frecuencia de EPCMN en médula ósea y de RETMN en sangre circulante en ratones *knockout* para el receptor σ_1 (σ_1 R-KO). La utilización de este modelo de animal transgénico deficiente para el receptor σ_1 permitió de forma simultánea valorar la posible contribución de cualquier hipotético metabolito con afinidad por el receptor σ_1 .

Los resultados obtenidos muestran que los animales σ_1 R-KO responden a la administración de E-5842 de forma similar a los animales silvestres (WT), observándose en ambos un fuerte y sostenido descenso de la temperatura corporal, y un ligero incremento en la frecuencia de EPCMN (48 h). Nuestros resultados indican que la inducción de condiciones de hipotermia asociadas a la formación de EPCMN no está mediada por la interacción del E-5842 con el receptor σ_1 , descartando así la posible existencia de un efecto de clase de los ligandos para el receptor σ_1 .

ARTÍCULO 4

Induction of hypothermic conditions associated with increased micronuclei formation in sigma-1 receptor knockout mice after administration of the antipsychotic compound E-5842.

Guzmán A., Marín A.P., García C., Fernández de Henestrosa A.R., Ruiz M.T., Tortajada A., Marcos R.

Environ. Mol. Mutagen. 2008 (In press).

Research Article

Induction of Hypothermic Conditions Associated with Increased Micronuclei Formation in Sigma-1 Receptor Knockout Mice after Administration of the Antipsychotic Compound E-5842

Antonio Guzmán,^{1,2*} Ana-Paz Marín,¹ Concepción García,¹
Antonio R. Fernández de Henestrosa,¹ María Teresa Ruiz,¹
Araceli Tortajada,¹ and Ricard Marcos²

¹Toxicology Department, ESTEVE, Mare de Déu de Montserrat 221, 08041, Barcelona, Spain

²Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

The antipsychotic sigma-1 (σ_1) receptor ligand E-5842 has been shown to increase micronucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) frequency in mouse bone marrow secondary to compound-induced hypothermia. Interaction with σ_1 receptor has been considered a plausible contributing factor for E-5842-induced hypothermia, raising concern for a possible class effect of sigma receptor ligands in the mouse micronucleus (MN) test. We assessed the potential of E-5842 (200 mg/kg, oral) to produce hypothermic conditions associated with increased micronuclei formation in σ_1 receptor knockout (σ_1 R-KO) and wild type (WT) mice. After administration, animal's rectal temperature was recorded and peripheral blood and bone marrow samples were obtained (48 hr) and assessed for induction of micronucleated reticulocytes (MNRET) and MNPCE, respectively. E-5842 administration produced marked hypothermia both in σ_1 R-KO and WT mice. Maxi-

mum decreases from preadministration temperature were 12.2 and 13.5°C in σ_1 R-KO and WT mice, respectively. Temperature returned to normal approximately 32 hr after administration. Bone marrow examination revealed a statistical significant increase ($P < 0.05$) in MNPCE frequency both in σ_1 R-KO and WT animals. Examination of peripheral blood samples showed a slight, although nonstatistical significant, increase in MNRET frequency in σ_1 R-KO mice. No similar effect was observed among WT animals. The results obtained after E-5842 administration to σ_1 R-KO mice indicate that induction of hypothermic conditions associated with increased MNPCE formation is not mediated by compound interaction with σ_1 receptor, ruling out concern for a possible class effect of similar high affinity σ_1 receptor ligands in the mouse MN test. *Environ. Mol. Mutagen.* 49:000–000, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: sigma receptor; knockout mice; genotoxicity; hypothermia; mouse micronucleus

INTRODUCTION

Assessment for genotoxic potential is a crucial and mandatory step in the development process of a pharmaceutical compound because of its relevance for human safety in relation to potential induction of carcinogenesis and hereditary defects. No single genotoxicity test being considered capable of detecting all relevant genotoxic agents, the current practice of using a test battery aims at reducing the risk of genotoxic compounds not being properly detected, avoiding the adverse consequences this could represent for human health [Muller et al., 1999]. Conforming to current scientific recommendations and regulatory requirements, pharmaceuticals are assessed for genotoxic potential by testing in a battery of in vitro and

in vivo assays. This generally comprises, assessment for induction of gene mutation in bacteria, in vitro gene mutation and/or chromosomal damage in mammalian cells, and in vivo chromosomal damage in rodent haematopoietic cells [ICH S2B, 1997].

*Correspondence to: Antonio Guzmán, Toxicology Department, ESTEVE, Mare de Déu de Montserrat 221, 08041 Barcelona, Spain. E-mail: aguzman@esteva.es

Received 23 April 2008; provisionally accepted 9 June 2008; and in final form 10 July 2008

DOI 10.1002/em.20428

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

In vitro assays are generally considered to show higher sensitivity for detecting genotoxic carcinogens, a contributing factor being that the exposure of target cells is less problematic when compared with in vivo assays. Despite their suggested lower sensitivity, in vivo assays are considered a pivotal component of genotoxicity test batteries. By taking into account biological processes of absorption, distribution, metabolism, and excretion, which are not accounted for by in vitro assays, they are considered to mimic closer the human situation, and allow putting in vitro positive results into context. A further aim of in vivo testing is to avoid failure of in vitro assays to detect relevant in vivo genotoxins. Although this is considered a rare occurrence, compounds such as procarbazine, urethane, and benzene are "classical" examples of in vivo genotoxins which have proved difficult to be consistently detected in common ICH standard battery in vitro assays [Muller et al., 1999]. Further examples of in vivo-only positive compounds have been reported in a recent survey conducted by the International Workshop on Genotoxicity Testing initiative (IWGT) [Tweats et al., 2007b]. Consequently, in vivo positive results are taken as strong evidence for genotoxic potential and given a great regulatory weight.

The rodent erythrocyte micronucleus (MN) assay assesses the induction of chromosomal damage by both clastogenic and aneugenic agents in proliferating erythroblasts, and stands out as the most widely used in vivo assay when testing pharmaceutical compounds for genotoxic potential. Increased MN formation in rodent erythrocytes of questionable biological relevance has been acknowledged to occur under experimental conditions inducing prolonged departure from normal physiology. These include, chemical and environmentally induced changes in body temperature [Chrisman and Baumgartner, 1980; King and Wild, 1983; Asanami and Shimono, 1997a, 1997b; Asanami et al., 1998] and erythropoiesis stimulation, either directly by compound administration (e.g., cobalt or erythropoietin) [Suzuki et al., 1993; Yajima et al., 1993] or indirectly as consequence of bleeding, chemically-induced haemolytic anemia or hypoxia [Steinheider et al., 1985; Hirai et al., 1991; Snyder and Diehl, 2005].

The high affinity sigma-1 (σ_1) receptor ligand antipsychotic drug candidate E-5842 (4-(4-fluorophenyl)-1,2,3,6-tetrahydro-1-[4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butyl]pyridine citrate, CAS-220120-14-9), has been shown to increase micronucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) formation in mouse bone marrow, as consequence of compound-induced hypothermia. MNPCE frequency was increased 48 hr after administration of a 200 mg/kg dose, and the effect was abolished when hypothermia was avoided [Guzman et al., 2004]. Results obtained in an extended battery of in vitro and in vivo genotoxicity assays further supported absence of real in vivo genotoxic potential [Guzman et al., 2006]. Interaction with sigma (σ) recep-

tors was considered a plausible contributing mechanism to the marked and lasting hypothermia induced by E-5842. Compounds interacting with σ receptors have been reported to produce hypothermia in rodents [Bejanian et al., 1991; Kest et al., 1995; Rawls et al., 2002], and several phenyltetrahydropyridinyl butylazole-derived σ_1 receptor ligand drug candidates, structurally related to E-5842, have also been shown to produce hypothermia in mice [Guzman et al., 2008]. Dense expression of σ receptor in the hypothalamus [Largent et al., 1986; Bouchard and Quirion, 1997], a brain region thought to play a major role in thermoregulation, has been reported. Existence of a possible class effect with σ_1 receptor ligands inducing hypothermic conditions in mice was considered of concern for this being a possible confounding factor in the mouse MN assay [EMEA, 2006].

Genetically modified animal models have proved as an outstanding tool in biological research. Their use has become increasingly prominent in toxicological investigations, particularly in mechanistic toxicology, genotoxicity, and carcinogenicity [Goldsworthy et al., 1994]. A relevant contribution of genetically modified animals to genotoxicity research has been as investigative tool in support of standard regulatory assays, improving our understanding of underlying mechanisms of drug induced effects and their relevance for human safety [Bolon, 2004]. To investigate the role of σ_1 receptors in induction of hypothermic conditions associated with increase MN formation in mice, and to disclose the possible existence of a class effect of σ_1 receptor ligands in the mouse MN test, we studied the effect of E-5842 administration to genetically modified mice lacking a functional σ_1 receptor. We report here the results obtained when σ_1 receptor knockout (σ_{1R} -KO) mice were tested for induction of hypothermia and MN formation in peripheral blood and bone marrow erythrocytes, after oral administration of the σ receptor ligand E-5842.

MATERIALS AND METHODS

Test Substance

E-5842 bulk powder (99.4% purity) was synthesized by Esteve (Barcelona, Spain). Cyclophosphamide (CP, Sigma) was used as reference compound for genotoxic activity. Test article solutions were prepared by dissolving E-5842 (20 mg/ml) and CP (2.5 mg/ml) in reverse osmosis water immediately before animal administration. The vehicle (reverse osmosis water) was used as negative control. All animals were administered orally by gavage at a dose volume of 10 ml/kg bodyweight.

Animals

Male CD-1 wild type (WT) and σ_{1R} -KO mice were obtained from Harlan Interfauna Iberica (Sant Felu de Codines, Spain) and the breeding colony of Esteve, respectively. The generation by homologous recombination technique of a mouse strain containing a null mutation in the σ_1 receptor gene and its characterization has previously been

TABLE I. Bone Marrow Mouse Micronucleus Test

Mouse strain	Treatment	Dose (mg/kg)	Sampling time (hr)	N	PCE/NCE (mean \pm SD)	MNPCE	
						Individual data/2,000 PCE	Group mean/1,000 PCEs (mean \pm SD)
WT	Vehicle	—	48	5	1.06 \pm 0.67	5, 2, 2, 3, 1	1.3 \pm 0.76
	E-5842	200	48	5	0.60 \pm 0.26	9, 10, 3, 7, 6	3.5 \pm 1.37 ^a
	CP	25	24	5	0.77 \pm 0.37	7, 25, 16, 25, 15	8.8 \pm 3.80 ^b
KO	Vehicle	—	48	5	0.90 \pm 0.28	1, 4, 7, 3, 3	1.8 \pm 1.10
	E-5842	200	48	5	0.90 \pm 0.36	5, 5, 9, 5, 11	3.5 \pm 1.41 ^a
	CP	25	24	5	1.03 \pm 0.16	29, 26, 30, 9, 14	10.8 \pm 4.75 ^b

^a*P* < 0.05.^b*P* < 0.001 Dunnett test.

described by Langa et al. [2003]. A breeding colony of σ_1R -KO mice was obtained from the original CD-1 \times 129Sv strain after backcrossing with CD-1 mice until the N10 generation was reached. Animals were randomly allocated to treatment groups and caged in groups of maximum five according to strain. Animals were housed in air-conditioned rooms with temperature and relative humidity set at target values of 22°C and 50%; lighting was controlled to give a 12-hr light-dark cycle. Animals were allowed free access to commercial rodent diet (Panlab S.L.), and acclimatized to the conditions described for minimum 5 days before treatment. On day of dosing animals were approximately 14 weeks old and in a weight range of 34–49 g. All procedures involving animals and their care were conducted in strict conformity with the European Community Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [EEC, 1986].

Mouse Micronucleus Test

Induction of micronucleated erythrocytes was assessed both in bone marrow and peripheral blood samples. Groups of five males of each mouse strain received vehicle (water), E-5842 (200 mg/kg), or CP (25 mg/kg). E-5842 selected dose level has previously been shown to produce marked and long lasting hypothermia in mice and an associated increase in MNPCE frequency [Guzman et al., 2004]. The bone marrow MN test was performed according to the method of Schmid [1975]. Animals were sacrificed by cervical dislocation 48 hr after administration of vehicle or E-5842, and 24 hr after administration of CP. For each animal, the femurs were dissected, bone marrow extracted, mixed with foetal calf serum, and a bone marrow smear prepared (two slides per animal). The smears were fixed with methanol and stained with Giemsa. Slides were coded and examined under light microscopy. For each animal, the relative proportion of polychromatic (PCE) and normochromatic erythrocytes (NCE) was determined by counting a total of 1,000 erythrocytes. Frequency of MNPCE was determined by examining 2,000 polychromatic erythrocytes per animal.

Short before sacrifice, a 5 μ l peripheral blood sample was obtained from a tail vein of vehicle and E-5842 treated animals, and stained supravivally with acridine orange (AO) according to the method described by Hayashi et al. [1990]. The peripheral blood MN test was performed to check for possible earlier effects on bone marrow MN formation. Peripheral blood reticulocytes (RET) sampled 48 hr after treatment are considered representative of PCE present at 24 hr in mouse bone marrow [MacGregor et al., 1980]. As positive control for AO slide staining and analysis, peripheral blood samples were obtained from a group of CP treated WT mice 48 hr after administration. AO-stained slides were coded, examined under fluorescent microscopy and the number of RET among 1,000 total erythrocytes, and of micronucleated reticulocytes (MNRET) among 2,000 RET per animal were recorded. RET count was restricted to types I, II, and III of the classification by Vander et al. [1963]. For each mouse strain, the number of MNRET and

MNPCE of each treated group was compared with the corresponding vehicle control group value by means of Dunnett's test after rank transformation of the data. The results were considered positive when there was a statistically significant increase (*P* < 0.05) in the frequency of MNPCE or MNRET that exceeded the historical vehicle control range.

Rectal Temperature Measurements

Animals rectal temperature was recorded by means of a digital thermometer (Pb 0331, Panlab) connected to a thermal probe (Model 443, Selecta). At the scheduled time points, the probe was carefully inserted rectally in the mouse (about 18 mm), which was gently restrained with a hand. The temperature was recorded 5 sec after readout stabilization. Measurements were performed on all vehicle and E-5842-treated animals just before administration (basal temperature) and 1, 4, 8, 10, 12, 24, and 32 hr after treatment.

For assessment of effects on body temperature, individual rectal temperature values were converted into percentages relative to individual animal basal temperature. A three-way (strain, treatment, and time) analysis of variance (ANOVA) with repeated measures on the time factor was performed. Results were considered statistically significant when *P* < 0.05. Data analyses were carried out with the SAS/STAT[®] release 9.1 statistical package (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTS

Mouse Micronucleus Test

No mortality was recorded. Clinical signs of CNS excitation including tremors, ataxia, and convulsions were observed both in WT and σ_1R -KO mice after E-5842 administration. Decreased motor activity, prostration, ptosis, and hunched back were also observed. The intensity and duration of the observed clinical signs were similar in both mouse strains. No clinical signs were observed in vehicle or CP-treated animals.

Results of bone marrow examination are shown in Table I. Vehicle-treated WT and σ_1R -KO animals showed similar basal MNPCE mean frequencies. Attained values were consistent with laboratory historical (WT) vehicle control values, and similar to that reported in the literature for mice of the CD-1 strain [Salamone and Mavourain, 1994; Krishna et al., 2000]. Administration of E-5842 (200 mg/kg) induced a slight and statistical significant increase (*P* < 0.05) in MNPCE frequency (48 hr) both in

TABLE II. Peripheral Blood Mouse Micronucleus Test

Mouse strain	Treatment	Dose (mg/kg)	Sampling time (hr)	N	Reticulocyte (%) (mean \pm SD)	MNRET	
						Individual data/2,000 Ret.	Group mean/1,000 Ret. (mean \pm SD)
WT	Vehicle	—	48	5	57.4 \pm 7.3	0, 2, 2, 1, 5	1.00 \pm 0.94
	E-5842	200	48	5	63.6 \pm 8.4	2, 2, 2, 3, 1	1.00 \pm 0.35
	CP	25	48	5	23.6 \pm 3.4	11, 16, 13, 21, 14	7.50 \pm 1.9 ^a
KO	Vehicle	—	48	5	62.6 \pm 18.0	2, 2, 5, 2, 1	1.20 \pm 0.76
	E-5842	200	48	5	44.8 \pm 7.0	4, 8, 1, 6, 8	2.70 \pm 1.48

^a $P < 0.001$ Dunnett test.

WT and σ_1 R-KO mice, with attained values exceeding the upper limit of current laboratory historical vehicle control mean values (range: 0.35–2.05‰). The positive control (CP, 25 mg/kg) induced a marked and statistically significant increase ($P < 0.001$) in MNPCE frequency both in WT and σ_1 R-KO mice, confirming the sensitivity of the test system. No evidence of bone marrow toxicity, as indicated by a decrease in the PCE/NCE ratio, was observed in WT or σ_1 R-KO animals after administration of either E-5842 or CP. The apparent slight decrease in PCE/NCE ratio in E-5842-treated WT animals was attributable to a single vehicle control WT animal showing an unusually high value.

Results of peripheral blood sample examination are shown in Table II. Individual and group mean RET and MNRET values of vehicle treated WT and σ_1 R-KO mice were similar, consistent with laboratory historical (WT) vehicle control values, and similar to those reported in the literature for CD-1 mice [CSGMT, 1992; Torous et al., 2005]. E-5842 administration had no effect on RET frequency neither in WT nor in σ_1 R-KO mice. E-5842-treated σ_1 R-KO mice showed a slightly increased MNRET frequency, and although the difference from vehicle-treated σ_1 R-KO mice was not statistically significant, some of the individual values slightly exceed the upper range of the laboratory historical vehicle control (range 0.0–5.0 MNRET/2000RET). No similar effect was observed in E-5842-treated WT mice, this being consistent with the reported absence of increased bone marrow MNPCE frequency 24 hr after administration of E-5842 [Guzman et al., 2004, 2006]. To this respect, the slightly increased MNRET frequency (48 hr) in E-5842-treated σ_1 R-KO mice was an unexpected finding. The positive control (CP) induced a marked and statistical significant increase ($P < 0.001$) in MNRET frequency in WT mice, confirming the sensitivity of the test system.

Rectal Temperature

Group mean rectal temperature values attained by the different treatment groups are represented in Figure 1. Mean basal temperature before treatment of either vehicle

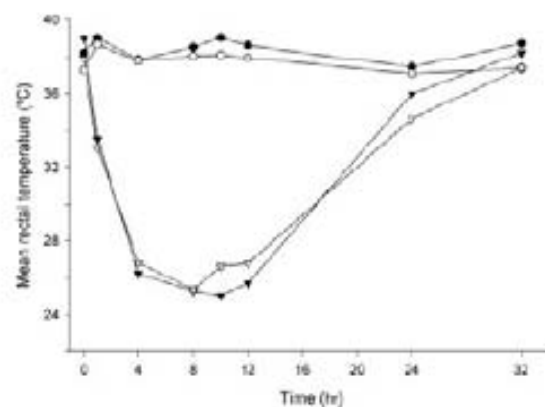


Fig. 1. Effect of E-5842 (200 mg/kg) administration on mice rectal temperature. Rectal temperature was registered with a digital thermometer at eight time points during a 32 hr period as detailed in material and methods. Sigma-1 receptor knockout mice (open symbols) and wild type mice (closed symbols) received either vehicle (circles) or E-5842 (triangles). Oral administration of the vehicle to wild type (●) or sigma-1 receptor knockout mice (○) did not cause a significant variation of body temperature when compared with pretreatment values. Oral administration of E-5842 produced marked and sustained hypothermia both in wild type (▼) and sigma-1 receptor knockout mice (▽).

(water) or E-5842 were $38.6 \pm 0.58^\circ\text{C}$ and $37.6 \pm 0.52^\circ\text{C}$ for WT and σ_1 R-KO mice, respectively ($n = 10$ /strain). No significant changes in mean rectal temperature value were observed among WT or σ_1 R-KO animals after vehicle administration. E-5842 administration produced a marked and sustained decrease in mean rectal temperature both in WT and σ_1 R-KO mice, with maximum decreases being achieved 10 and 8 hr after administration, respectively. Mean rectal temperature values attained at these time points were 25.1 and 25.4°C , thus representing decreases of 13.5 and 12.2°C from basal in WT and σ_1 R-KO mice, respectively. Recovery of mean rectal temperature to basal values was observed 32 hr after administration in all animals. The three-way ANOVA of the temperature-time profile of the different treatment groups showed statistical significance ($P < 0.001$) for treatment, time, and treatment-time interaction. All other interactions were not statistically significant, indicating that for each

treatment (i.e., either vehicle or E-5842) both mouse strains displayed similar temperature-time profiles.

DISCUSSION

According to current regulatory requirements, pharmaceutical compounds are assessed for genotoxic potential by testing in a battery of *in vitro* and *in vivo* assays [ICH S2B, 1997]. Proper assessment requires for the outcome of the assessed genetic endpoints and associated complementary investigations to be taken into account, for it is acknowledged that under certain experimental conditions positive results of questionable biological relevance can be obtained. In the rodent erythrocyte MN test, increased MN formation through indirect mechanisms is acknowledged to occur under conditions of physiological perturbation such as produced by acute stimulation of erythropoiesis or marked departure from basal body temperature [Tweats et al., 2007a].

The antipsychotic σ_1 receptor ligand E-5842 has been shown to increase MNPCE formation in mouse bone marrow (48 hr), secondary to compound-induced hypothermia [Guzman et al., 2004]. Similar moderate increases in MNPCE frequency at late sampling times (>24 hr), as consequence of compound-induced hypothermia, have also been reported for the CNS active compounds reserpine [Asanami and Shimono, 1997b], chlorpromazine [Asanami et al., 1998], and "Covance Compound Number 4" [Tweats, et al., 2007a]. Interference with chromosome segregation and/or enucleation processes in maturing erythrocytes has been suggested as possible underlying mechanisms for hypothermia-associated MNPCE formation [Asanami and Shimono, 1997b; Tweats et al., 2007a]. Microtubule assembly, and consequent formation of a functional mitotic spindle, has shown to be a temperature-dependent process in several animal species [Detrich et al., 1989; Wallin et al., 1993], cold being a condition known to promote microtubule disassembly [Digue et al., 1999]. Processes such as DNA repair [Burton et al., 1997] and cell cycle kinetics [Sisken et al., 1965] have also been reported to be affected when decreasing temperature below physiological levels.

Decreased body temperature in rodents is considered a common response after high-dose administration of some toxicants, being suggested as a physiological adaptive response modulating acute lethality [Gordon, 1991]. Impairment of thermoregulatory function and heat production processes can both contribute to induction of hypothermia [Gordon et al., 2008], mice being particularly susceptible because of their high surface area to body weight ratio. Interference with body temperature regulation is a well known side effect of neuroleptic drugs. This has been linked to binding properties on dopamine, serotonin, and α_2 -adrenergic receptors, which are known to be involved in mammalian thermoregulation [Ahlenius, 1999; Cryan

et al., 1999, 2000; Oerther, 2000; Perachon et al., 2000; Oerther and Ahlenius, 2001]. For E-5842, contribution of a σ_1 receptor mediated mechanism in induction of hypothermia was considered plausible. σ_1 receptors are considered to play a modulatory role on a variety of receptors and ion channels [Corbera et al., 2006]. Dense σ site expression in the hypothalamus [Largent et al., 1986] and abundance of σ_1 binding sites in hypothalamic nuclei, a brain region thought to play a major role in mammalian thermoregulation has been reported [Bouchard and Quirion, 1997]. Induction of hypothermia in rodents by compounds such as 1,3-di-*o*-tolylguanidine (DTG) or BMY14802 has been related to their σ receptor binding properties [Rawls et al., 2002]. Some E-5842-structurally related high affinity σ_1 receptor ligands (binding K_i values ranging 1.4–14.0 nM; 4.0 nM for E-5842) have also been shown to produce hypothermia when administered at the maximum tolerated dose in the mouse MN test [Guzman et al., 2008]. Compared to E-5842, the hypothermic effect was of lesser intensity (3.1–4.8°C decrease from basal) and duration (< 8 hr). Possible contribution of compound specific pharmacokinetic, metabolic, and/or tissue distribution factors modulating *in vivo* σ_1 receptors interaction and thus hypothermic response, could however not be ruled out.

Despite σ_1 receptors show an extensive body distribution (e.g., brain, heart, lung, liver, kidney, intestine, and reproductive organs) [Matsumoto et al., 2003], mice deficient in σ_1 receptor expression and activity have shown no unusual phenotype so far, suggesting that σ_1 receptors are not essential for mammalian development and physiological homeostasis. Nevertheless, σ_1 R-KO mice have shown a differential pharmacodynamic response to σ_1 receptor binding agents [Langa et al., 2003], and a reduced response in front of pain stimulus [Cendan et al., 2005]. In the current investigation, vehicle-treated σ_1 R-KO mice showed bone marrow PCE/NCE and MNPCE and peripheral blood RET and MNRET values similar to those observed in vehicle-treated WT mice. Positive control treated σ_1 R-KO animals (CP, 25 mg/kg) showed a similar increase in MNPCE frequency (24 hr) as observed in CP-treated WT mice, confirming the metabolic competence of this genetically modified mouse strain for the bioactivation of the model clastogen CP. Altogether, these data confirmed the σ_1 R-KO mouse strain as suitable for the conduct of this comparative mouse MN assay.

The response of σ_1 R-KO mice to the oral administration of E-5842 (200 mg/kg) did not differ significantly from that of their WT counterparts. Observed clinical signs and their intensity were similar in both mouse strains. In terms of rectal temperature, E-5842 administration produced marked and long lasting hypothermia of similar intensity and duration in σ_1 R-KO and WT mice. The response seen in σ_1 R-KO mice indicates that compound interaction with functional σ_1 receptors was not required for induction of marked and long lasting hypo-

thermia. It further rules out any theoretical contribution of putative E-5842-metabolites with σ_1 receptor binding properties. The reported dose-dependent hypothermia [Guzman et al., 2004] and fast onset after E-5842 administration, nevertheless, supports for a pharmacologically mediated effect on thermoregulatory function. E-5842 has been reported to show moderate to low affinity for dopamine, serotonin, and α_2 -adrenergic receptors [Guitart et al., 1998]. Off target interaction with these receptors due to pharmacokinetic conditions associated to high dose administration, stands out as a possible underlying mechanism. In addition, the intensity and duration of the induced hypothermic effect suggests that impairment of metabolic heat production could also have been a contributing factor [Gordon et al., 2008].

Bone marrow examination (48 hr) revealed a slight and statistical significant increase in MNPCE frequency of E-5842 (200 mg/kg)-treated σ_1 R-KO and WT mice, this being consistent with the observed hypothermia. Attained MNPCE values were similar in both mouse strains and in the same range to that reported in previous studies [Guzman et al., 2004, 2006]. The slightly increased peripheral blood MNRET frequency observed in σ_1 R-KO mice 48 hr after E-5842 administration was an unexpected finding for no similar increases of MNPCE frequency in 24 hr bone marrow samples have been reported [Guzman et al., 2004, 2006] and could suggest for earlier appearance of MNPCE and/or their faster transition from organopoietic organs to peripheral blood. The reason for this increased MNRET frequency is so far unclear, but the existence of slight differences in the kinetics of erythropoiesis in σ_1 R-KO, either under basal conditions or in response to hypothermia, cannot be ruled out.

In summary, oral administration of E-5842 (200 mg/kg) to σ_1 R-KO mice produced marked and long lasting hypothermia and an associated increase in bone marrow MNPCE frequency (48 hr). The intensity and duration of the hypothermic effect produced in σ_1 R-KO mice and the associated increase in MNPCE frequency were similar to that observed in E-5842-treated WT mice. The response seen in σ_1 R-KO mice indicate that induction of hypothermic conditions associated with increased MNPCE formation after administration of E-5842 is not mediated by interaction with σ_1 receptor. The current results rule out concern for a possible class effect of high affinity σ_1 receptor ligands when tested for *in vivo* genotoxic potential in the mouse MN test.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Jesús Giraldo (Institut de Neurociències i Unitat de Bioestadística, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain) for his assistance in the statistical analysis of the data.

REFERENCES

- Ahlenius S. 1999. Clozapine: Dopamine D1 receptor agonism in the prefrontal cortex as the code to decipher a Rosetta stone of antipsychotic drugs. *Pharmacol Toxicol* 84:193–196.
- Asanami S, Shimono K. 1997a. High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow. *Mutat Res* 390:79–83.
- Asanami S, Shimono K. 1997b. Hypothermia induces micronuclei in mouse bone marrow cells. *Mutat Res* 393:91–98.
- Asanami S, Shimono K, Kaneda S. 1998. Transient hypothermia induces micronuclei in mice. *Mutat Res* 413:7–14.
- Bejanian M, Pechnick RN, Bova MP, George R. 1991. Effects of subcutaneous and intracerebroventricular administration of the sigma receptor ligand 1,3-Di-*o*-tolylguanidine on body temperature in the rat: Interactions with BMY 14802 and rimcazole. *J Pharmacol Exp Ther* 258:88–93.
- Bolon B. 2004. Genetically engineered animals in drug discovery and development: A maturing resource for toxicologic research. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 95:154–161.
- Bouchard P, Quirion R. 1997. [³H]1,3-di(2-tolyl)guanidine and [³H](+) pentazocine binding sites in the rat brain: Autoradiographic visualization of the putative sigma1 and sigma2 receptor subtypes. *Neuroscience* 76:467–477.
- Burton SA, Paljug WR, Kalnicki S, Werts ED. 1997. Hypothermia-enhanced human tumor cell radiosensitivity. *Cryobiology* 35:70–78.
- Cendan CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Monoliu L, Baeyens JM. 2005. Formalin-induced pain is reduced in sigma(1) receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* 511:73–74.
- Chrisman CL, Baumgartner AP. 1980. Micronuclei in bone-marrow cells of mice subjected to hyperthermia. *Mutat Res* 77:95–97.
- Corbera J, Vaño D, Martínez D, Vela JM, Zamaniño D, Dordal A, Andreu F, Hernandez E, Perez R, Escriche M, Salgado L, Yeste S, Semfín MT, Pascual R, Alegre J, Calver MC, Cano N, Carro M, Buschmann H, Holenz J. 2006. A medicinal-chemistry-guided approach to selective and druglike sigma 1 ligands. *ChemMedChem* 1:140–154.
- Cryan JP, Kelliber P, Kelly JP, Leonard BE. 1999. Comparative effects of serotonergic agonists with varying efficacy at the 5-HT(1A) receptor on core body temperature: Modification by the selective 5-HT(1A) receptor antagonist WAY 100635. *J Psychopharmacol* 13:278–283.
- Cryan JP, Harkin A, Naughton M, Kelly JP, Leonard BE. 2000. Characterization of *n*-fenfluramine-induced hypothermia: Evidence for multiple sites of action. *Eur J Pharmacol* 390:275–285.
- The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT). 1992. Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS/MMS. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. *Mutat Res* 278:83–98.
- Detrich HW III, Johnson KA, Marchese-Ragona SP. 1989. Polymerization of Antarctic fish tubulins at low temperatures: Energetic aspects. *Biochemistry* 28:10085–10093.
- Digue L, Orsiere T, De Meo M, Manzi MG, Deperris D, Duffaud F, Favre R, Botta A. 1999. Evaluation of the genotoxic activity of paclitaxel by the *in vitro* micronucleus test in combination with fluorescent *in situ* hybridization of a DNA centromeric probe and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human T-lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 34:269–278.
- European Economic Community (EEC). 1986. Council Directive 86/609/EEC, Brussels.
- European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use. 2006. Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities. London.
- Goldsworthy TL, Revio L, Brown K, Donehower LA, Mirsalis JC, Tennant RW, Purchase IF. 1994. Transgenic animals in toxicology. *Fundam Appl Toxicol* 22:8–19.

- Gordon CJ. 1991. Toxic-induced hypothermia and hypometabolism: Do they increase uncertainty in the extrapolation of toxicological data from experimental animals to humans? *Neurosci Biobehav Rev* 15:95–98.
- Gordon CJ, Spencer PJ, Hotchkiss J, Miller DB, Hinderliter PM, Pauluhn J. 2008. Thermoregulation and its influence on toxicity assessment. *Toxicology* 244:87–97.
- Guitart X, Codony X, Ballarín M, Dordal A, Farré AJ. 1998. E-5842: A new potent and preferential sigma ligand. Preclinical pharmacological profile. *CNS Drug Rev* 4:201–224.
- Guzmán A, García C, Marín AP, Ruiz MT, Tortajada A, Fernández de Henestrosa AR. 2004. Induction of micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes in association with hypothermia after administration of the sigma receptor ligand E-5842. *Mutat Res* 565:11–22.
- Guzmán A, García C, Fernández de Henestrosa AR, Riley S, Ruiz MT, Marín AP, Tortajada A. 2006. Assessment of the genotoxic potential of the antipsychotic sigma receptor ligand E-5842. *Mutat Res* 605:63–77.
- Guzmán A, García C, Marín AP, Proudlock RJ, Fernández de Henestrosa AR, Ruiz MT, Tortajada A, Lloyd M, Marcos R. 2008. Evaluation of the genotoxic potential of three phenyltetrahydropyridinyl butylazole-derived sigma receptor ligand drug candidates. *Mutat Res* 653:91–98.
- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M Jr. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res* 245:245–249.
- Hirai O, Miyamae Y, Fujino Y, Izumi H, Miyamoto A, Noguchi H. 1991. Prior bleeding enhances the sensitivity of the in vivo micronucleus test. *Mutat Res* 264:109–114.
- ICH Topic S2B. Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Step 4 Guideline. 1997.
- Kest B, Mogil JS, Sternberg WF, Pechnick RN, Liebeskind JC. 1995. Antinociception following 1,3-di-*o*-tolylguanidine, a selective sigma receptor ligand. *Pharmacol Biochem Behav* 50:587–592.
- King MT, Wild D. 1983. The mutagenic potential of hyperthermia and fever in mice. *Mutat Res* 111:219–226.
- Krishna G, Urdá G, Paulissen J. 2000. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mutat Res* 453:45–50.
- Langa F, Codony X, Tovar V, Lavado A, Gimenez E, Cozar P, Cantero M, Dordal A, Hernandez E, Perez R, Monroy X, Zamanillo D, Guitart X, Montoliu L. 2003. Generation and phenotypic analysis of sigma receptor type 1 (sigma 1) knockout mice. *Eur J Neurosci* 18:2188–2196.
- Largent BL, Gundlach AL, Snyder SH. 1986. Pharmacological and autoradiographic discrimination of sigma and phencyclidine receptor binding sites in brain with (+)-[3H]SKF 10,047, (+)-[3H]-3-[3-hydroxyphenyl]-*N*-(1-propyl)piperidine and [3H]-1-[1-(2-thienyl)-cyclohexyl]piperidine. *J Pharmacol Exp Ther* 238:739–748.
- MacGregor JT, Wehr CM, Gould DH. 1980. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. *Environ Mutagen* 2:509–514.
- Mabumoto RR, Liu Y, Lemmer M, Howard EW, Brackett DJ. 2003. Sigma receptors: Potential medications development target for anti-cocaine agents. *Eur J Pharmacol* 469:1–12.
- Muller L, Kikuchi Y, Probst G, Schechtman L, Shimada H, Sofuni T, Tweats D. 1999. ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: Evolution, reasoning and impact. *Mutat Res* 436:195–225.
- Oerther S. 2000. Temperature set-point changes induced by DA D2/3 and 5-HT1A receptor agonists in the rat. *Neuroreport* 11:3949–3951.
- Oerther S, Ahlenius S. 2001. Involvement of 5-HT1A and 5-HT1B receptors for citalopram-induced hypothermia in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 154:429–434.
- Perachon S, Betancur C, Pilon C, Rostene W, Schwartz JC, Sokoloff P. 2000. Role of dopamine D3 receptors in thermoregulation: A reappraisal. *Neuroreport* 11:221–225.
- Rawls SM, Baron DA, Geller EB, Adler MW. 2002. Sigma sites mediate DTG-evoked hypothermia in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:779–786.
- Salamone MF, Mavroumin KH. 1994. Bone marrow micronucleus assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environ Mol Mutagen* 23:239–273.
- Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutat Res* 31:9–15.
- Sisken JE, Morasca L, Kibby S. 1965. Effects of temperature on the kinetics of the mitotic cycle of mammalian cells in culture. *Exp Cell Res* 39:103–116.
- Snyder RD, Diehl MS. 2005. Hypoxia-induced micronucleus formation in mice. *Drug Chem Toxicol* 28:373–378.
- Steinheider G, Neth R, Marquardt H. 1985. Evaluation of nongenotoxic and genotoxic factors modulating the frequency of micronucleated erythrocytes in the peripheral blood of mice. *Cell Biol Toxicol* 1:197–211.
- Suzuki Y, Shimizu H, Nagae Y, Fukumoto M, Okonogi H, Kadokura M. 1993. Micronucleus test and erythropoiesis: Effect of cobalt on the induction of micronuclei by mutagens. *Environ Mol Mutagen* 22:101–106.
- Torous DK, Hall NE, Illi-Love AH, Diehl MS, Cederbrant K, Sandelin K, Ponten L, Bolcsfoldi G, Ferguson LR, Pearson A, Majeska JB, Taca JP, Hynes GM, Lynch AM, McNamee JP, Bellier PV, Parenteau M, Blakey D, Bayley J, van der Leede BJ, Vanparys P, Harbich PR, Zhao S, Filipunas AL, Johnson CW, Tometko CR, Derringer SD. 2005. Interlaboratory validation of a CD71-based flow cytometric method (Microflow) for the scoring of micronucleated reticulocytes in mouse peripheral blood. *Environ Mol Mutagen* 45:44–55.
- Tweats DJ, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Morita T, Nohmi T, O'donovan MR, Sasaki YF, Sofuni T, Tice R. 2007a. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory in vivo tests I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. *Mutat Res* 627:78–91.
- Tweats DJ, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Morita T, Nohmi T, O'donovan MR, Sasaki YF, Sofuni T, Tice R. 2007b. Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. *Mutat Res* 627:92–105.
- Vander JB, Harris CA, Elli SR. 1963. Reticulocyte counts by means of fluorescence microscopy. *J Lab Clin Med* 62:132–140.
- Wallin M, Bülger M, Stromberg T, Stromberg E. 1993. Assembly of Atlantic cod (*Gadus morhua*) brain microtubules at different temperatures: Dependency of microtubule-associated proteins is relative to temperature. *Arch Biochem Biophys* 307:200–205.
- Yajima N, Kurata Y, Sawai T, Takeshita Y. 1993. Induction of micronucleated erythrocytes by recombinant human erythropoietin. *Mutagenesis* 8:221–229.

Accepted by—
R. Snyder

4.5. Resumen del contenido del artículo 5

Formation of micronucleated erythrocytes in mouse bone-marrow under conditions of hypothermia is not associated with stimulation of erythropoiesis.

La inducción de condiciones de hipotermia intensa y prolongada en ratón está asociada a incrementos en la formación de EPCMN en médula ósea. Fármacos como la reserpina, la clorpromazina y el E-5842 (ver Anexo 1) han mostrado inducir incrementos en la frecuencia de EPCMN en roedores de forma secundaria a la inducción de condiciones de hipotermia, siendo el efecto revertido cuando se evita el descenso de la temperatura corporal. Se han propuesto diferentes posibles mecanismos para la formación de EPCMN bajo condiciones de hipotermia. La hipótesis más destacada sugiere que la formación de MN podría ser atribuible a la alteración del huso mitótico como consecuencia de la baja temperatura (Asanami y Shimono, 1997b). Una segunda hipótesis más reciente, sugiere que el incremento en la formación de MN bajo condiciones de hipotermia se produce como consecuencia de la estimulación de la eritropoyesis (Bundy *et al.*, 2004; Tweats *et al.*, 2007a). Ésta se produciría debido al incremento en la secreción de EPO, como consecuencia del descenso de los niveles de oxígeno en sangre asociados al descenso de la temperatura corporal (Tweats *et al.*, 2007a).

El objetivo de este trabajo fue comprobar si la inducción de EPCMN bajo condiciones de hipotermia está asociada a una estimulación de la eritropoyesis. Para ello se determinaron los niveles de EPO en sangre tras la inducción de condiciones de hipotermia asociadas a la formación de EPCMN, mediante la administración de E-5842 (200 mg/Kg) o clorpromazina (100 mg/Kg), así como tras la inducción de anemia por sangrado (0,5 mL).

Los resultados obtenidos muestran que el incremento en la formación de EPCMN en médula ósea de ratón bajo condiciones de hipotermia, tras la administración de E-5842 o clorpromazina, no está asociado a incrementos en los niveles de EPO en sangre. Los animales en los que se indujo anemia por sangrado presentaron un claro incremento en los niveles de EPO en sangre. Nuestros resultados indican que el incremento en la formación de MN en eritrocitos de roedor bajo condiciones de hipotermia no se produce como consecuencia de una estimulación de la eritropoyesis.

ARTÍCULO 5

Formation of micronucleated erythrocytes in mouse bone-marrow under conditions of hypothermia is not associated with stimulation of erythropoiesis.

Guzmán A., García C., Marín A.P., Tortajada A., Ruiz M.T., Fernández de Henestrosa A.R., Marcos. R.

Mutat. Res. 2008: 656, 8-13.



Contents lists available at ScienceDirect
**Mutation Research/Genetic Toxicology and
 Environmental Mutagenesis**

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gentox
 Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Formation of micronucleated erythrocytes in mouse bone-marrow under conditions of hypothermia is not associated with stimulation of erythropoiesis

Antonio Guzmán^{a,b,*}, Concepción García^a, Ana-Paz Marín^a, Araceli Tortajada^a,
 María Teresa Ruiz^a, Antonio R. Fernández de Henestrosa^a, Ricard Marcos^b

^a Toxicology Department, ESTEVE, Mare de Déu de Montserrat 221, 08041 Barcelona, Spain

^b Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2008
 Received in revised form 13 June 2008
 Accepted 27 June 2008
 Available online 30 July 2008

Keywords:

Hypothermia
 Mouse micronucleus
 Erythropoietin
 Erythropoiesis
 E-5842
 Chlorpromazine

ABSTRACT

Conditions of marked and long-lasting hypothermia have been shown to increase the formation of micronucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) in mouse bone-marrow. Stimulation of erythropoiesis as a consequence of anoxic conditions associated with decreased body temperature has been suggested as a possible mechanism for hypothermia-induced micronucleus formation. We examined whether chemically induced hypothermic conditions that produced increased MNPCE formation were associated with stimulation of erythropoiesis by measuring erythropoietin (EPO) concentrations in blood. Marked and long-lasting hypothermia was induced in male mice by oral administration of the antipsychotic compounds E-5842 (200 mg/kg) or chlorpromazine (100 mg/kg). Maximum decreases from the basal temperature, achieved 8 h after treatment, were 14.8 and 12.8 °C, respectively. A statistically significant increase in bone-marrow MNPCE frequency was observed 48 h after administration of E-5842 ($p < 0.01$) or chlorpromazine ($p < 0.05$). Mice made anaemic by retro-orbital bleeding (0.5 ml), which acted as positive control for stimulation of erythropoiesis, showed no relevant variation in mean rectal temperature and a slight non-statistically significant increase in MNPCE frequency after 48 h. Blood samples for determination of EPO levels were obtained 4 (bleed-control animals only), 8, 16 and 24 h after treatment. In spite of the induced hypothermia, no significant variation in EPO blood levels was observed after administration of E-5842 or chlorpromazine. Bleed-induced anaemic mice showed a clear increase in EPO blood levels at all sampled time points, differences from baseline values being statistically significant ($p < 0.001$) at the 8-h samplings and beyond. These results indicate that induction of MNPCE secondary to chemically induced hypothermia is not mediated by stimulation of erythropoiesis.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The rodent micronucleus (MN) test is a pivotal component of the standard battery of genotoxicity assays requested by regulatory authorities for assessing the genotoxic potential of pharmaceutical drug candidates [1]. It assesses the induction of chromosomal damage in the proliferating erythrocyte precursor cells (erythroblasts). Chromosomal fragments or whole chromosomes that are not incorporated into the daughter cell nuclei after the last cell division of the erythroblast, and not expelled from the cell during the enucleation process, remain visible in the non-nucleated immature erythrocyte as small micronuclei. Positive results in this assay are considered

indicative of potentially similar chromosomal effects occurring in humans, which could lead to a variety of long-term adverse health effects including carcinogenesis and hereditary defects. As a consequence, positive results obtained in the rodent micronucleus test can have a dramatic impact on the viability of the developmental program of a pharmaceutical candidate.

It is currently acknowledged that certain experimental conditions inducing prolonged deviation from normal physiology can produce increased MN formation in rodent erythrocytes not related to intrinsic genotoxicity of the test compound, and unlikely to be relevant in the assessment of health effects in humans. This has led several advisory and regulatory bodies to issue recommendations for a proper interpretation of study results obtained under disturbed physiological conditions [2–4]. Bleeding [5,6], chemically induced haemolytic anaemia [5], chemical and/or environmentally induced changes in body temperature [7–11], and exposure to hypoxic conditions [12] have all been reported to increase MN formation in mice.

* Corresponding author at: Toxicology Department, ESTEVE, Mare de Déu de Montserrat 221, 08041 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 446 60 65; fax: +34 93 450 36 11.
 E-mail address: aguzman@estevena.es (A. Guzmán).

Stimulation of erythropoiesis by administration of exogenous erythropoietin (EPO) has been shown to increase MN formation in rodent erythrocytes [13–15]. Increased EPO secretion and the consequent stimulation of erythropoiesis is considered a common underlying mechanism for MN-inducing conditions such as bleeding, chemical-induced anaemia and exposure to anoxic/hypoxic conditions. An increased rate of cell division and a decreased time for repair of spontaneously occurring DNA damage [13,16], disruption of spindle formation during rapid cell division [17], and errors in the process of enucleation or differentiation of erythrocytes [15] have been suggested as possible sources of increased MN formation. Despite acting through indirect mechanisms, compounds increasing MN formation in rodents as a consequence of disturbed physiological conditions are still considered as possible cause for concern in case they are able to induce the same physiological changes in humans [4].

Chemically induced conditions of marked and lasting hypothermia have been shown to increase the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in mouse bone-marrow at late sampling times (>24 h) after a single treatment [4,10,11,18]. The potential for hypothermia to induce MN formation in the absence of any chemical treatment has been confirmed both *in vitro* and *in vivo*. Exposure of Chinese hamster lung cells to 31–33 °C for 24 h has been shown to increase MN formation but not chromosome aberrations [19], suggesting an effect on chromosomal segregation. Similarly, decreasing body temperature by 12 °C from normal, by a 7-h exposure to an environmental temperature of 12 °C under restrained conditions, has been reported to increase the MNPCE frequency [20]. Interference with chromosomal segregation and/or enucleation processes in maturing erythrocytes has been suggested as probable underlying mechanism for hypothermia-induced MNPCE formation [4,10]. Recently, stimulation of erythropoiesis through increased EPO release as a consequence of reduced blood-oxygen tension associated with hypothermic conditions, has also been proposed as a possible mechanism of increased MNPCE formation [4,21]. However, experimental evidence supporting this latter hypothesis is, to the best of our knowledge, not available in the open scientific literature.

Here we present the results of our investigations to assess whether chemically induced hypothermic conditions that produce increased MNPCE formation in mouse bone-marrow were associated with increased EPO blood levels. Marked and long-lasting hypothermia was induced in male mice by oral administration of the antipsychotic compounds E-5842 or chlorpromazine. These two neuroleptic drugs are considered to lack genotoxic potential and have been reported to increase MNPCE formation in mouse bone-marrow as a consequence of compound-induced hypothermia [11,18]. As a positive control for stimulation of erythropoiesis and EPO blood-level determinations, a further group of mice were made anaemic by bleeding. We provide here experimental evidence indicating that induction of MNPCE secondary to chemically induced hypothermia is not associated with stimulation of erythropoiesis.

2. Materials and methods

2.1. Test substance

E-5842 citrate (CAS-220120-14-9) bulk powder (purity 99.4%) was synthesised by Esteve (Barcelona, Spain) and chlorpromazine hydrochloride (CAS-69-09-0) was obtained from Sigma. Concentrations and dose levels are expressed in terms of the corresponding free base of these compounds. Solutions of the test substances were prepared by dissolving E-5842 or chlorpromazine in reverse-osmosis water (20 mg/ml) and saline (10 mg/ml), respectively. Cyclophosphamide (CP, Sigma), dissolved in reverse-osmosis water at a final concentration of 2.5 mg/ml, was used as a positive control for clastogenicity. Vehicle-control animals received

reverse-osmosis water. Test substances were formulated immediately before administration.

2.2. Animal treatment

Male CD-1 albino outbred mice were obtained from Harlan Interfauna Ibérica (Sant Feliu de Codines, Spain). Animals were randomly allocated to treatment groups, caged individually and housed in air-conditioned rooms with temperature and relative humidity set at target values of 22 °C and 50%; lighting was controlled to give a 12-h light-dark cycle. Animals were allowed free access to commercial rodent diet (Panlab S.L.), and acclimatised to the conditions described for a minimum of 5 days before treatment. On the day of dosing animals were approximately 8–9 weeks old and in a weight range of 30.4–42.2 g. All procedures involving animals and their care were conducted in strict conformity with the European Community Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [22].

All animals were given a dose volume of 10 ml/kg bodyweight by oral gavage, except for chlorpromazine, which was administered by i.p. injection. Groups of mice received water (vehicle-control), E-5842 (200 mg/kg bw) or chlorpromazine (100 mg/kg bw). Selected dose levels had previously been shown to produce marked and long-lasting hypothermia in mice, with an associated increase in MNPCE frequency in bone-marrow [11,18]. As a positive control for stimulation of erythropoiesis and increased EPO secretion, a further group of mice was made anaemic by bleeding approximately 0.5 ml from the retro-orbital plexus, under isoflurane anaesthesia. Animals receiving cyclophosphamide (25 mg/kg bw) acted as positive control for induction of MNPCE.

2.3. Measurements of rectal temperature

Rectal temperature of the animals was recorded by means of a digital thermometer (Pb 0331, Panlab) connected to a thermal probe (Model 443, Selecta). At the scheduled time points, the probe was carefully inserted rectally in the mouse (about 18 mm), which was gently restrained by hand. The temperature was recorded at 5 s after readout stabilisation. Measurements were performed on all vehicle-control, E-5842- and chlorpromazine-treated animals as well as the bled animals just before treatment (basal temperature) and 1, 2, 4, 8, 10, 12, 24, 32 and 48 h after treatment. Rectal temperature was also measured at 16 h in animals sampled for determination of EPO blood levels. Temperature was not monitored in CP-treated mice since there was extensive previous experience showing no effect on body temperature at the administered dose.

For assessment of effects on body temperature, individual rectal temperature values were converted into a percentage relative to the individual basal temperature of the animal. A two-way (treatment, time) analysis of variance (ANOVA) with repeated measures on the time factor was performed, followed by individual comparisons of group mean values against the concurrent vehicle-control group using Dunnett's test. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$. Data analysis was carried out with the SAS/STAT® release 9.1 statistical package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

2.4. Mouse-micronucleus test

The bone-marrow micronucleus test was performed according to the method of Schmid [23]. Bone-marrow samples were obtained (5 animals/treatment) 48 h after water (vehicle-control), E-5842 or chlorpromazine administration and the anaemia-inducing bleed, and 24 h after treatment with the positive control (CP, 25 mg/kg).

At the stated time points animals were sacrificed by cervical dislocation, the femurs were dissected, bone-marrow extracted, mixed with foetal calf serum and a bone-marrow smear prepared (two slides per animal). The smears were fixed with methanol and stained with Giemsa. Slides were coded and examined under light microscopy. For each animal, the relative proportion of polychromatic (PCE) and normochromatic erythrocytes (NCE) was determined by counting a total of 1000 erythrocytes. The number of MNPCE was determined by examining 2000 PCEs per animal. For each treatment group, the frequency of MNPCE was compared with that in the vehicle-control group by means of the Dunnett's test after rank-transformation of data.

2.5. EPO blood-level measurements

Basal EPO blood concentrations were determined by sampling five animals before treatment, at two different time points. Blood samples were obtained (3 animals/treatment per sample time) from E-5842- and chlorpromazine-treated and bleed-induced anaemic animals, 4 (bleed-control animals only), 8, 16 and 24 h after treatment. Time points for EPO blood-measurements were selected according to the results of previously conducted exploratory work (unpublished results).

At the stated time points, animals were brought into deep anaesthesia by isoflurane inhalation and blood samples were obtained by cardiac puncture. Animals were not allowed to recover from anaesthesia after blood sampling. Serum samples were analyzed for mouse EPO concentration using the Quantikine mouse EPO Immunoassay kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA). A one-way ANOVA was performed, followed by individual comparisons of group mean values against the

concurrent basal control group using Dunnett's test. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Rectal temperature

Group mean rectal temperature values attained by the different treatment groups are presented in Fig. 1. Mean basal temperature before treatment was $37.7 \pm 0.73^\circ\text{C}$ ($n = 55$). No significant change in mean rectal temperature was observed after vehicle administration. Bleeding (0.5 ml) to induce anaemia produced a marginal and short-lasting decrease in rectal temperature. Maximum decrease was achieved 1 h after bleeding, with a mean rectal temperature value of 35.2°C . Recovery of rectal temperature to basal values occurred approximately 4 h after bleeding. This mild decrease in body temperature was consistent with a normal physiological response to the induced anaemia.

Administration of E-5842 (200 mg/kg) or chlorpromazine (100 mg/kg) produced a marked and sustained decrease in mean rectal temperature, with maximum decreases being achieved 8 h after administration. Mean rectal temperature values attained at this time point were 22.9 and 24.9°C , representing decreases of 14.8 and 12.8°C from mean basal values in E-5842- and chlorpromazine-treated animals, respectively. In E-5842-treated animals, recovery of mean rectal temperature to basal values was observed at 32 h after administration. Chlorpromazine-treated animals still showed a mean rectal temperature value of 30.1°C at the 48-h time point. Pair-wise comparisons of treatment-group temperature vs. the vehicle-control group showed statistical significance for E-5842 and chlorpromazine treatments ($p < 0.001$), but not for bleed-induced anaemic animals.

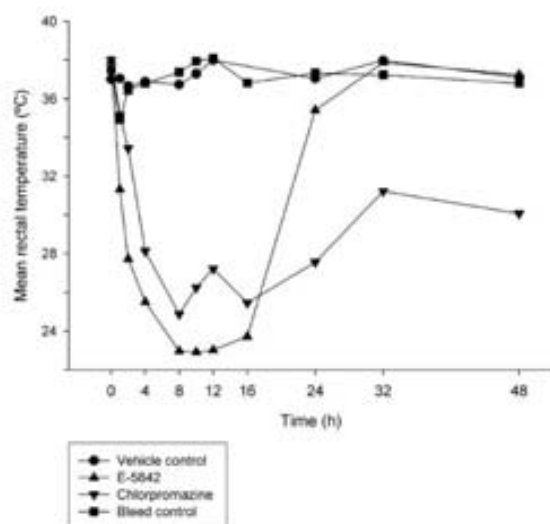


Fig. 1. Time course of rectal temperature in mice after oral administration of E-5842 (200 mg/kg), chlorpromazine (100 mg/kg) and after an anaemia-inducing bleed. Rectal temperature was registered with a digital thermometer at 11 time points during a 48-h period after administration of water (●), E-5842 (▲) or chlorpromazine (▼), and induction of anaemia by bleeding (0.5 ml) (■). Oral administration of water (●) did not cause a significant variation of body temperature as compared to pre-treatment values. E-5842 (▲) and chlorpromazine (▼) administration produced marked and sustained hypothermia. Anaemia-inducing bleed (■) produced a very mild and short-lasting decrease in rectal temperature.

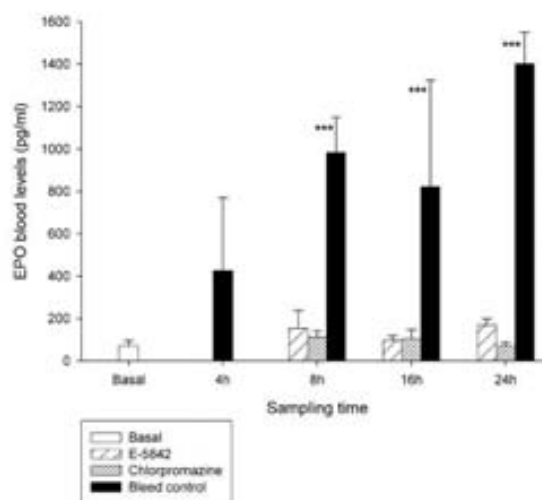


Fig. 2. Time course of mouse EPO serum levels after oral administration of E-5842 (200 mg/kg), chlorpromazine (100 mg/kg) and after an anaemia-inducing bleed. Blood samples were taken by cardiac puncture before treatment (basal conditions) and at the stated time points after administration of E-5842 or chlorpromazine, and induction of anaemia by bleeding (0.5 ml). Administration of E-5842 or chlorpromazine did not produce significant variations in EPO blood levels. Anaemia-inducing bleed produced a clear and time-dependent increase in EPO blood levels.

3.2. Mouse micronucleus test

One animal each receiving E-5842 or chlorpromazine were found dead during the observation period (replaced by satellite animals). Clinical signs observed in E-5842- and chlorpromazine-treated animals included ataxia and mild convulsions shortly after administration, followed by decreased motor activity, ptosis and prostration. No clinical signs were observed among bleed-induced anaemic animals, vehicle-control, or CP-treated animals.

Results of bone-marrow examination are shown in Table 1. Slight and statistically significant increases in bone-marrow MNPCE frequency were observed 48 h after administration of chlorpromazine ($p < 0.05$) and E-5842 ($p < 0.01$). The MNPCE values slightly exceeded the upper limit of current laboratory historical vehicle-control mean values (range: 0.35–2.05%), increases from basal being similar to those previously reported for these two neuroleptic compounds [11,18]. These results confirmed that MNPCE-inducing hypothermic conditions had been effectively achieved. A slight but non-statistically significant increase in MNPCE frequency was observed in bleed-induced anaemic mice (48 h). The positive control (CP, 25 mg/kg) induced a marked and statistically significant increase ($p < 0.001$) in MNPCE frequency, confirming the sensitivity of the test system. No evidence of bone-marrow toxicity, as indicated by a decrease in the PCE/NCE ratio, was observed after administration of E-5842, chlorpromazine or CP. There was a clear increase in PCE/NCE ratio among bled animals, consistent with stimulation of erythropoiesis.

3.3. EPO blood levels

Group mean EPO serum levels are presented in Fig. 2. Mean EPO serum levels under basal conditions were 71.0 ± 23.9 pg/ml. Animals made anaemic by bleeding showed a clear and time-related increase in EPO serum levels, this being consistent with stimulation of regenerative erythropoiesis. Group comparison vs. basal conditions showed statistical significance ($p < 0.001$) at the 8-, 16- and

Table 1
Mouse bone-marrow micronucleus test

Treatment	Dose (mg/kg)	Sampling time (h)	N	PCE/NCE (mean ± S.D.)	MNPCE	
					Individual data/2000 PCE	Group mean/1000 PCEs (mean ± S.D.)
Vehicle-control	–	48	5	0.79 ± 0.22	5, 2, 0, 1, 2	1.0 ± 0.9
E-5842	200	48	5	0.72 ± 0.22	6, 10, 11, 3, 12	4.2 ± 1.9**
Chlorpromazine	100	48	5	0.91 ± 0.26	4, 7, 3, 4, 12	3.0 ± 1.8*
Bleed	–	48	5	1.89 ± 0.88	2, 7, 7, 6, 4	2.6 ± 1.1
CP	25	24	5	0.86 ± 0.13	22, 62, 46, 47, 51	22.7 ± 7.3***

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Dunnett test.

24-h sampling points. No significant variations in EPO blood levels were observed after administration of either E-5842 or chlorpromazine at any of the sampling points (8, 16 and 24 h). These results indicate that the hypothermic conditions attained after administration of E-5842 or chlorpromazine were not associated with increased EPO blood levels.

4. Discussion

The current regulatory practice of using a battery of genotoxicity assays to evaluate the genotoxic potential of pharmaceutical candidates aims at reducing the risk of genotoxic compounds not being properly detected [1]. While *in vitro* assays are generally considered more sensitive for detecting genotoxic carcinogens [24], *in vivo* assays are considered to more closely mimic the human situation, since they take into account biological processes of absorption, distribution, metabolism and excretion, all of which are not accounted for in *in vitro* assays. The rodent micronucleus assay, which assesses the induction of chromosomal damage by both clastogenic and aneugenic agents in the proliferating erythroblasts, stands out as the most commonly conducted *in vivo* test. Being perceived to show a relatively high specificity (false positives being rare in this assay), positive results are given a great regulatory weight.

The proliferation of erythrocytes (erythropoiesis) is regulated by the glycoprotein hormone EPO. Produced primarily by the kidney in response to decreased oxygen in blood, EPO regulates the proliferation and differentiation of red blood-cell precursors. Burst-forming unit erythroid (BFU-E) cells are the earliest erythrocyte precursors expressing EPO receptors and responding to its stimulation [25]. Conditions of increased EPO activity, either by exogenous administration [14,15] or by stimulation through decreased blood-oxygen levels as a consequence of bleeding or chemically induced haemolytic anaemia [5,6], have been shown to increase MN formation in rodent erythrocytes through an indirect mechanism associated with cell-proliferative stress-related events. Similarly, stimulation of EPO release as a consequence of reduced blood-oxygen tension associated with decreased body temperature, has been proposed as a possible contributing mechanism to hypothermia-induced MNPCE formation [4,21]. Induction of hypothermia has been proposed as an adaptive response to hypoxia by decreasing oxygen demand in body tissues [26]. Hypoactivity, as generally observed under conditions of marked hypothermia, has been associated in rodents with decreased arterial blood-oxygen levels [12].

Increased EPO blood concentrations in response to anaemia depend on the *de novo* synthesis of EPO [27]. EPO mRNA levels have been shown to correlate with the severity of the induced anaemia, and increased EPO mRNA levels in the kidney of mice have been reported to be first detected 1.5 h after bleed-induced anaemia, reaching a maximum between 4 and 8 h, and remaining stable for at least 24 h [28]. In our current investigation, bleed-induced anaemic mice showed a clear increase in EPO blood levels at the

sampled time points (4–24 h), differences from basal achieving statistical significance ($p < 0.001$) at the 8-h sampling and beyond. This time-dependent increase in EPO blood levels is consistent with the described kinetics of EPO-mRNA synthesis, and with the required lag-time for increased EPO-glycoprotein blood levels to occur.

Consistent with the increase in EPO blood levels, the PCE/NCE ratio was also increased in bled animals. Absence of a similar effect on PCE/NCE ratio in chlorpromazine- and E-5842-treated animals could seem, *a priori*, inconsistent with a proposed mechanism of erythropoiesis stimulation. However, the correlation between EPO stimulation of erythropoiesis and increased PCE/NCE ratio in bone-marrow has shown not to be that straightforward. In their investigations on the effects of EPO administration to mice, Suzuki et al. reported lack of a dose-response relationship between PCE/NCE ratio and administered dose of EPO [13], and a time-dependent fluctuation in PCE/NCE values, with an initial transient decrease followed by a gradual increase afterwards [29]. Mild peak increases of PCE/NCE values were observed 54 h (from 1.81 to 2.35) [13] and 48 h (from 1.6 to 2.3) [29] after EPO administration. However, no similar variations in bone-marrow PCE/NCE ratio were reported by Yajima et al. in their experiments on increased erythropoiesis and MN formation after EPO administration to mice [14,15]. Reversed replenishment with peripheral micronucleated reticulocytes derived from other haematopoietic organs [14] and/or concurrent EPO-stimulated shortened medullary transit time and increased rate of PCE release into peripheral blood [13,14] have been suggested as possible causes. No variations in PCE/NCE ratio were also reported by Snyder and Diehl when exposing mice to hypoxic conditions, where the observed associated increase in MN formation was considered consistent with a mechanism of increased erythropoiesis [12].

Bled animals showed a slight although non-statistically significant increase in MNPCE frequency 48 h after treatment. Similar weak 2- to 3-fold increases in spontaneous rate of MNPCE in mouse bone-marrow have been reported both after physiological stimulation of erythropoiesis by bleeding [6] and after exogenous EPO administration [14,15]. The response to acute erythropoietic stress, as produced by bleeding or EPO administration, is considered to be primarily splenic in adult mice [30]. Formation of MN after EPO administration has been shown to be higher in peripheral blood reticulocytes than in bone-marrow PCEs, a consequence of the contribution of extramedullary erythropoiesis to the erythrocyte pool [14,15].

Oral administration of E-5842 or chlorpromazine produced marked and long-lasting hypothermia, of similar intensity and time course to that reported in previous studies [11,18]. The observed statistically significant increase in bone-marrow MNPCE (48 h) confirmed that MN-inducing hypothermic conditions had been effectively achieved. However, no significant variation in EPO blood levels was observed at the various sampling points (8, 16 and 24 h). Considering the previously described kinetics of EPO synthesis and the time-dependent increase in EPO blood levels

observed after acute stimulation of erythropoiesis, as induced in our bleeding experiment, the possibility of increased EPO blood levels as a consequence of compound-induced hypothermia, going undetected because occurring outside the current sampling time interval (i.e. <8 h or >24 h) is most unlikely. Our results with E-5842 and chlorpromazine show that stimulation of erythropoiesis does not take place when hypothermic conditions associated with increased MNPCE formation are induced, suggesting that under these conditions, MN formation is not increased as consequence of erythroblast-proliferative stress-associated events.

Alternatively, marked deviation in physiological temperature conditions has been suggested to increase MNPCE formation through interference with microtubule assembly and disturbance of the mitotic spindle [8,10]. The increased MN size reported for hypothermia-inducing compounds such as reserpine, chlorpromazine and E-5842 [10,11,18] supports an aneugenic origin, because induction of large MN is generally considered indicative of an aneugenic effect [23,31–33]. Besides their role in the mitotic spindle, microtubules also have an important function in the maintenance of the cytoskeleton structure and in intracellular movements, and they have been proposed to play an essential role in erythroid enucleation [34,35]. While myosin and actin filaments are considered responsible for the cell splitting that occurs during the enucleation process [35–37], microtubules have been proposed to contribute to the correct positioning of the nucleus [35,36]. There are several lines of *in vivo* experimental evidence suggesting that interference with microtubule polymerization can affect the erythroblast enucleation process. Administration of the spindle poison colchicine has been reported to inhibit erythroid enucleation in rats [34] and to induce extrusion of chromosomal masses in erythroblasts at metaphase and enucleation in mouse embryonic liver immature erythroblasts [38]. Parton et al. showed that both spontaneous and chemical treatment-induced MN were susceptible to being eliminated from maturing erythroblasts, a process suggested to occur during or around the time of main nucleus extrusion [39]. Further, they reported extruded MN to be predominantly large as compared to those retained inside the cell, and spindle poison-induced MN being susceptible to extrusion while clastogen-induced MN were not. These observations suggest that interference with extrusion of spontaneously formed MN through inhibition of microtubule assembly or function could contribute to MN induction by hypothermia. Whether hypothermia induces MN by interfering with chromosomal segregation and/or with nuclear/MN extrusion processes could even be of certain relevance in terms of genotoxic risk assessment. While interference with chromosomal segregation has the potential to adversely affect any proliferating cell population, the enucleation process is considered a rare feature in mammalian tissue differentiation, with a limited number of cell types known to undergo this process: erythroblasts, lens epithelial cells and keratinocytes [40], all of them representing a final stage of cell differentiation, lacking proliferative potential.

In summary, the results obtained after oral administration of the antipsychotic compounds E-5842 and chlorpromazine show that increased MNPCE formation in mouse bone-marrow occurring as consequence of chemically induced hypothermia is not associated with increased EPO blood levels. Our results suggest that increased MNPCE formation under conditions of marked and sustained hypothermia is not mediated by stimulation of erythropoiesis.

Conflicts of interest

This research work was sponsored by ESTEVE.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Jesús Giraldo (Institut de Neurociències i Unitat de Bioestadística, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain) for his assistance in the statistical analysis of the data.

References

- [1] ICH. Topic S2B. Genotoxicity: a standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Step 4 Guideline. 16 July 1997.
- [2] Committee on Mutagenicity Testing (COM). Statement on guidance on considering high dose positive *in vivo* mutagenicity data in the bone marrow assays that may not be biologically significant with regard to considering a chemical to be an *in vivo* mutagen. COM/03/55-2003. <http://www.advisorybodies.doh.gov.uk/com/index.htm>.
- [3] European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use. 28 June 2006. Guideline on the limits of genotoxic impurities.
- [4] D.J. Tweats, D. Blakey, R.H. Heflich, A. Jacobs, S.D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M.R. O'donovan, Y.F. Sasaki, T. Sofuni, R. Tice. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests 1. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. *Mutat. Res.* 627 (2007) 78–91.
- [5] G. Steinheider, R. Neth, H. Marquardt. Evaluation of nongenotoxic and genotoxic factors modulating the frequency of micronucleated erythrocytes in the peripheral blood of mice. *Cell Biol. Toxicol.* 1 (1985) 197–211.
- [6] O. Hirai, Y. Miyamae, Y. Fujino, H. Izumi, A. Miyamoto, H. Noguchi. Prior bleeding enhances the sensitivity of the *in vivo* micronucleus test. *Mutat. Res.* 264 (1991) 109–114.
- [7] M.T. King, D. Wild. The mutagenic potential of hyperthermia and fever in mice. *Mutat. Res.* 111 (1983) 219–226.
- [8] C.L. Chrisman, A.P. Baumgartner. Micronuclei in bone-marrow cells of mice subjected to hyperthermia. *Mutat. Res.* 77 (1980) 95–97.
- [9] S. Asanami, K. Shimono. High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow. *Mutat. Res.* 390 (1997) 79–83.
- [10] S. Asanami, K. Shimono. Hypothermia induces micronuclei in mouse bone marrow cells. *Mutat. Res.* 393 (1997) 91–98.
- [11] S. Asanami, K. Shimono, S. Kaneda. Transient hypothermia induces micronuclei in mice. *Mutat. Res.* 413 (1998) 7–14.
- [12] R.D. Snyder, M.S. Diehl. Hypoxia-induced micronucleus formation in mice. *Drug Chem. Toxicol.* 28 (2005) 373–378.
- [13] Y. Suzuki, Y. Nagae, T. Ishikawa, Y. Watanabe, T. Nagahima, K. Matsukubo, H. Shimizu. Effect of erythropoietin on the micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 13 (1989) 314–318.
- [14] N. Yajima, Y. Kurata, T. Sawai, Y. Takeshita. Induction of micronucleated erythrocytes by recombinant human erythropoietin. *Mutagenesis* 8 (1993) 221–229.
- [15] N. Yajima, Y. Kurata, T. Sawai, Y. Takeshita. Comparative studies in induction of micronuclei by three genetically recombinant and urinary human erythropoietins. *Mutagenesis* 8 (1993) 237–241.
- [16] D. Kirkland. Selection of mutagenicity and cell transformation tests—interpretation of results. In: *Preclinical Evaluation of Peptides and Recombinant Proteins*. Association of the Swedish Pharmaceutical Industry and the Swedish National board of Health and Welfare. 1991, pp. 49–56.
- [17] Y. Suzuki, H. Shimizu, Y. Nagae, M. Fukumoto, H. Okonogi, M. Kadokura. Micronucleus test and erythropoiesis: effect of cobalt on the induction of micronuclei by mutagens. *Environ. Mol. Mutagen.* 22 (1993) 101–106.
- [18] A. Guzmán, C. García, A.P. Marín, M.T. Ruiz, A. Tortajada, A.R. Fernández de Henestrosa. Induction of micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes in association with hypothermia after administration of the sigma receptor ligand E-5842. *Mutat. Res.* 565 (2004) 11–22.
- [19] S. Asanami, K. Shimono, S. Kaneda. Effect of temperature on the frequency of chromosome aberrations and micronuclei in cultured Chinese hamster cells. *J. Toxicol. Sci.* 26 (2001) 323–326.
- [20] P.J. Spenser, J.C. Grundy, J.M. Waechter, B. Gollapudi. The contribution of non-chemically induced hypothermia in the formation of micronuclei (MN) in the mouse bone marrow micronucleus test (MNT). (2005) US Society of Toxicology meeting.
- [21] L. Bundy, J. Whitwell, C. Beevers. Effect of hypothermia and erythrocyte proliferation on induction of micronucleated polychromatic erythrocytes in rat bone marrow. In: *Abstracts of the United Kingdom Environmental Mutagen Society 77th Annual Meeting, 4–7 July 2004, University of Loughborough, UK*. *Mutagenesis* 19 (2004) 499–520.
- [22] EEC. Council Directive 86/609/EEC. 24 November 1986.
- [23] W. Schmid. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31 (1975) 9–15.
- [24] L. Müller, Y. Kikuchi, G. Probst, L. Schechtman, H. Shimada, T. Sofuni, D. Tweats. ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutat. Res.* 436 (1999) 195–225.
- [25] K.R. Jones, D.W. Anderson, C.D. Longmire. Effects of recombinant hematopoietins on blood-loss anemia in mice. *Iowa Orthop. J.* 25 (2005) 129–134.

- [26] S.C. Wood, Interactions between hypoxia and hypothermia, *Annu. Rev. Physiol.* 53 (1991) 71–85.
- [27] W. Jelkmann, Erythropoietin: structure, control of production, and function, *Physiol. Rev.* 72 (1992) 449–489.
- [28] M.C. Bondurant, M.J. Koury, Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver, *Mol. Cell Biol.* 6 (1986) 2731–2733.
- [29] Y. Suzuki, Y. Nagae, J. Li, H. Sakaba, K. Mozawa, A. Takahashi, H. Shimizu, The micronucleus test and erythropoiesis. Effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio), *Mutagenesis* 4 (1989) 420–424.
- [30] C.E. Bozzini, M.E. Barrio Rendo, F.C. Devoto, C.E. Egger, Studies on medullary and extramedullary erythropoiesis in the adult mouse, *Am. J. Physiol.* 219 (1970) 724–728.
- [31] H. Tinsvell, J. Ashby, Micronucleus morphology as a means to distinguish aneuploids and clastogens in the mouse bone marrow micronucleus assay, *Mutagenesis* 6 (1991) 193–198.
- [32] K.I. Yamamoto, Y. Kikuchi, A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons, *Mutat. Res.* 71 (1980) 127–131.
- [33] P. Van Hummelen, A. Deleener, P. Vamparys, M. Kirsch-Volders, Discrimination of aneuploidogens from clastogens by C-banding, DNA and area measurements of micronuclei from mouse bone marrow, *Mutat. Res.* 271 (1992) 13–28.
- [34] J.A. Chasis, M. Prenant, A. Leung, N. Mohandas, Membrane assembly and remodeling during reticulocyte maturation, *Blood* 74 (1989) 1112–1120.
- [35] H. Takano-Ohturo, M. Mukaida, K. Morioka, Distribution of actin, myosin, and spectrin during enucleation in erythroid cells of hamster embryo, *Cell Motil. Cytoskeleton* 34 (1996) 96–107.
- [36] S.T. Koury, M.J. Koury, M.C. Bondurant, Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts, *J. Cell Biol.* 109 (1989) 3005–3013.
- [37] A. Wickrema, S.T. Koury, C.H. Dai, S.B. Krantz, Changes in cytoskeletal proteins and their mRNAs during maturation of human erythroid progenitor cells, *J. Cell Physiol.* 160 (1994) 417–426.
- [38] Y. Sonoda, K. Sasaki, M. Suda, C. Itano, H. Iwatsuki, Effects of colchicine on the enucleation of erythroid cells and macrophages in the liver of mouse embryos: ultrastructural and three-dimensional studies, *Anat. Rec.* 251 (1998) 290–296.
- [39] J.W. Parton, M.J. Garratt, J.E. Beyers, Expulsion of demecolcine-induced micronuclei from mouse bone marrow polychromatic erythrocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* 17 (1991) 79–83.
- [40] S.W. Krauss, A.J. Lo, S.A. Short, M.J. Koury, N. Mohandas, J.A. Chasis, Nuclear substructure reorganization during late-stage erythropoiesis is selective and does not involve caspase cleavage of major nuclear substructural proteins, *Blood* 106 (2005) 2200–2206.

4.6. Discusión general de los resultados

4.6.1. Valoración del potencial genotóxico del E-5842 y de los compuestos A, B y C

La inducción de daño genotóxico se considera un suceso implicado en la inducción de cáncer y defectos hereditarios, así como en la de toda una serie de enfermedades humanas de origen genético. Los ensayos de genotoxicidad desempeñan un papel fundamental en la determinación del potencial genotóxico de las sustancias químicas, y en el caso particular de los productos farmacéuticos, esta valoración adquiere una especial relevancia por cuanto implica la exposición intencionada de seres humanos. De acuerdo con la normativa vigente, la valoración del potencial genotóxico de un fármaco requiere la realización de una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo*. Este requerimiento se fundamenta sobre el concepto de que ningún ensayo, de forma aislada, puede detectar todos los agentes genotóxicos dado los diferentes niveles estructurales y múltiples mecanismos de interacción con el DNA que existen, por lo que la utilización de una batería de ensayos reduce el riesgo de que sustancias con capacidad genotóxica no sean detectadas (ICH S2B, 1997).

De acuerdo con los actuales requerimientos normativos, los fármacos experimentales E-5842, A, B y C, todos ellos derivados de la estructura común de la FTHPB y con afinidad por el receptor σ_1 , fueron evaluados mediante una serie de ensayos *in vivo* e *in vitro* que forman parte de la denominada batería estándar (ICH S2B, 1997). En el caso particular del E-5842, éste fue evaluado, además, en una serie de estudios *in vivo* e *in vitro* complementarios con el objetivo de clarificar la relevancia biológica de los resultados obtenidos en algunos de los ensayos de la batería estándar.

Los cuatro fármacos evaluados demostraron carecer de potencial genotóxico *in vitro* en el ensayo del test de Ames (Artículo 1, tabla 1; Artículo 3, tabla 2), que evalúa la inducción de mutación génica en células procariontas, y en el ensayo del ML (Artículo 1, tabla 3; Artículo 3, tabla 3), que evalúa la inducción de mutación génica y aberraciones cromosómicas en células de mamífero. En ambos ensayos, los compuestos A, B y C presentaron un mayor grado de citotoxicidad en los tratamientos en ausencia de activación metabólica exógena (fracción S9), presentando el E-5842 una tendencia similar sólo en el ensayo del ML. Aunque esto podría sugerir una posible mayor toxicidad de los compuestos ensayados respecto a los posibles metabolitos generados, no se puede descartar la posible unión inespecífica de los compuestos, o posibles elementos reactivos, a los componentes del S9, principalmente proteínas (Kirkland

et al., 2007a). Los compuestos A y B, que tienen en el extremo de la cadena butílica un anillo de pirazol e imidazol, respectivamente, presentaron un mayor grado de toxicidad en bacterias y en células L5178Y de linfoma de ratón respecto a los dos compuestos portadores de un anillo de triazol, como son los compuestos C y E-5842. Este último, presentó un nivel de toxicidad claramente inferior al resto de los compuestos en ambos sistemas experimentales.

El fármaco E-5842 también se evaluó en el ensayo *in vitro* de AbCr en linfocitos humanos, observándose en este ensayo un claro efecto clastogénico tanto en ausencia como en presencia de fracción microsomal S9 (Artículo 1, tabla 2). El ensayo de AbCr se considera especialmente susceptible a la inducción, bajo condiciones de citotoxicidad elevada o alteración de condiciones fisiológicas, de positivos carentes de significación biológica (Müller y Sofuni, 2000b; Kirkland, 1992). En nuestro ensayo, el incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas se observa aparentemente a concentraciones de moderada toxicidad (valorada a partir del índice mitótico) y en ausencia de variaciones significativas en los valores de pH y osmolaridad del medio de tratamiento por lo que, *a priori*, no parecería poder ser atribuido a efectos indirectos de genotoxicidad (Scott *et al.*, 1991; Kirkland, 1992; Galloway *et al.*, 1998; Müller y Sofuni, 2000b).

Varias observaciones experimentales sugieren, no obstante, que los valores de índice mitótico podrían estar subestimando el grado real de toxicidad inducido por el E-5842 sobre los linfocitos humanos. En primer lugar, el patrón atípico observado en el índice mitótico (descenso inicial de los valores seguido de un posterior incremento al aumentar la concentración ensayada), sugiere la presencia de un proceso de acumulación mitótica (Artículo 1, figura 2). En este sentido, la concentración más alta ensayada carente de efecto clastogénico (300,7 µg/mL; 20 h en ausencia de S9) presentó un valor de índice mitótico del 38% respecto al control vehículo, mientras que concentraciones superiores a éstas presentaron valores de índice mitótico mayores. Al ser un factor dependiente del tiempo de valoración, el valor de índice mitótico obtenido en un tiempo concreto puede no ser indicativo del crecimiento general de un cultivo, y pasa a ser un parámetro inexacto de valoración de citotoxicidad cuando existe un incremento en la actividad mitótica (Kirsch-Volders *et al.*, 2003a; Kirkland *et al.*, 2007a). En segundo lugar, la presencia de células poliploides en los cultivos de linfocitos humanos tratados con E-5842 indica un posible efecto de acumulación mitótica, en cuanto que la alteración del ciclo celular es reconocida como una de las posibles

causas que pueden dar lugar a la formación de endorreduplicaciones y poliplodías (Galloway, 2000).

Asimismo, la relevancia biológica del resultado positivo obtenido con el E-5842 en el ensayo *in vitro* de AbCr queda cuestionada por el resultado negativo obtenido en el ensayo del ML, que es capaz de detectar sustancias que inducen mutación génica y/o efectos clastogénicos (Moore *et al.*, 1985; Applegate *et al.*, 1990; Combes *et al.*, 1995; Mitchell *et al.*, 1997). Como se discute más adelante, el efecto positivo en el ensayo *in vitro* de AbCr tampoco tuvo una correlación en los ensayos *in vivo* que valoraban la inducción de AbCr (en la forma de MN) en roedor.

Aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual el E-5842 induce el efecto de acumulación mitótica, varias evidencias experimentales hacen que no se pueda descartar la posible implicación del receptor σ . El receptor σ (tanto el σ_1 como el σ_2) se expresa en leucocitos humanos, sobre todo en linfocitos T y B, atribuyéndose a los ligandos σ un papel modulador de la función inmunitaria (Su *et al.*, 1988; Wolfe, Jr. *et al.*, 1988; Carr *et al.*, 1991; Casellas *et al.*, 1994). En condiciones *in vitro*, los agonistas σ inhiben la proliferación de linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina, revertiendo los antagonistas σ esta inhibición (Carr *et al.*, 1991). La capacidad de los ligandos σ de inhibir la proliferación de ciertas líneas tumorales se ha atribuido a la inducción de apoptosis y bloqueo del ciclo celular (Colabufo *et al.*, 2004; Renaudo *et al.*, 2004). El receptor σ_1 aparentemente tiene una actividad antiapoptótica, induciendo los antagonistas σ_1 apoptosis en células tumorales (Wang *et al.*, 2005). Recientemente, se ha sugerido que los receptores σ_1 juegan un papel en la organización del citoesqueleto de actina mediante el control del funcionamiento de proteínas del citoesqueleto, tales como las ankirinas (Hayashi y Su, 2001).

En lo que se refiere a la valoración del potencial genotóxico *in vivo*, los fármacos experimentales A, B y C demostraron carecer de actividad genotóxica en el ensayo de MN en eritrocitos de médula ósea de ratón, tras administración única (Artículo 3, tabla 4). Por el contrario, la administración de E-5842 produjo un ligero incremento en la frecuencia de EPCMN (Artículo 1, tabla 4), excediendo el valor medio alcanzado (5,3‰) el límite superior del rango de valores medios del control histórico del laboratorio para la cepa de ratón en cuestión (1,1 – 3,3‰). Aunque en primera instancia este incremento puede parecer consistente con el resultado positivo obtenido en el ensayo *in vitro* de AbCr, el efecto

observado no se corresponde con el de un genotóxico clásico, ya que se produce a una dosis intermedia (200 mg/Kg), a un tiempo de muestreo tardío (48 h) y bajo condiciones asociadas a signos clínicos severos y mortalidad.

Los ensayos *in vivo* complementarios realizados para valorar la relevancia biológica de este aparente resultado positivo indican que el E-5842 carece de actividad genotóxica *in vivo*. En el ensayo de MN en médula ósea de ratón tras la administración repetida de dosis no asociadas a toxicidad elevada, no se observaron incrementos en la frecuencia de EPCMN (Artículo 1, tabla 5). Tras la administración oral en rata de E-5842 tampoco se observaron incrementos en la formación de MN en hepatocitos, un tipo celular diferente a los eritroblastos y perteneciente a un órgano bien perfundido (Artículo 1, tabla 6).

Nuestros estudios del efecto de la administración de E-5842 (200 mg/Kg) sobre la temperatura corporal en ratón han puesto de manifiesto que la formación de EPCMN se produce bajo condiciones de hipotermia intensa y prolongada (Anexo 1, figuras 2 y 3). Al evitar el efecto hipotérmico producido por la administración de E-5842 mediante la exposición de los animales a condiciones de temperatura ambiental aumentada (30 °C, 24 h) la frecuencia de EPCMN revertía a valores basales (Anexo 1, figura 3 y tabla 2). Estos resultados indican que el incremento en la frecuencia de EPCMN tras la administración de E-5842 es atribuible a la hipotermia y no a una actividad genotóxica intrínseca del E-5842. Efectos similares se han descrito para un número reducido de compuestos psicoactivos como la reserpina, la clorpromazina y el compuesto identificado con el código “Covance compound No. 4” (Asanami y Shimono, 1997b; Asanami *et al.*, 1998; Tweats *et al.*, 2007a).

A pesar de los resultados positivos obtenidos con el E-5842 en los ensayos de AbCr *in vitro* y de MN en médula ósea de ratón tras administración única, el peso de la evidencia experimental acumulada indica que el E-5842 carece de potencial genotóxico real. El resultado positivo obtenido de forma aislada en el ensayo *in vitro* de AbCr es considerado atribuible a condiciones de toxicidad excesiva, y por lo tanto, carente de relevancia biológica (Kirkland, 1992). La no relevancia biológica de este resultado queda reforzada por el amplio margen de seguridad existente entre las concentraciones sin efectos genotóxicos alcanzadas en los diferentes ensayos, y los niveles plasmáticos máximos alcanzables en humanos bajo condiciones clínicas de uso (tabla 4.1). En el caso particular del ensayo de MN en ratón, cabe presuponer que los niveles plasmáticos alcanzados en los animales tras la administración de

dosis de hasta 400 mg/Kg (Anexo 1) exceden, en mayor o menor medida, del valor indicado para este ensayo en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Niveles de exposición a E-5842 en las condiciones experimentales indicadas.

Ensayo	Concentración máxima con resultado negativo	Múltiplo respecto a C_{max} humana (19,1 ng/mL)
AbCr	300,7 µg/mL (-S9)	15700
	173,2 µg/mL (+S9)	9000
ML	535,1 µg/mL (-S9)	28100
	891,8 µg/mL (+S9)	46900
Rata, MN en hígado (100 mg/Kg)	424,5 ng/mL	20
Ratón, MN en médula ósea (40 mg/Kg)	2026,8 ng/mL	100

C_{max} humana: concentración máxima bajo condiciones de equilibrio tras administración repetida a la dosis máxima tolerada (10 mg/día).

Los estudios *in vivo* realizados confirman que el incremento en los valores de EPCMN en médula ósea de ratón, tras la administración de una dosis única de E-5842 (200 mg/Kg), se produce como consecuencia secundaria a la inducción de hipotermia. El incremento en la formación de MN, por lo tanto, no se produce como consecuencia de una actividad genotóxica intrínseca del E-5842 sino mediante un mecanismo indirecto susceptible de presentar un umbral de efecto y de cuestionable extrapolación a condiciones clínicas en humanos.

En resumen, los resultados obtenidos en la batería de estudios *in vitro* e *in vivo* realizados indican que los fármacos experimentales A, B, C y E-5842 carecen de potencial genotóxico, e indican que la exposición de pacientes a estas sustancias bajo condiciones clínicas de uso no representa riesgo genotóxico. Manteniendo presente la necesidad de evaluar el potencial genotóxico de cualquier nuevo fármaco, nuestros resultados sugieren que para la serie química de ligandos σ_1 derivados de FTHPB, la posible presencia de potencial genotóxico no parece ser, *a priori*, un tema de especial preocupación.

4.6.2. Investigación del potencial de los ligandos σ_1 derivados de FTHPB de inducir micronúcleos por hipotermia

El descenso de la temperatura corporal es reconocido como un factor de confusión en la realización del ensayo de MN en eritrocitos de roedor (EMEA, 2006; Tweats *et al.*, 2007a), en cuanto que la inducción de hipotermia intensa y prolongada está asociada a incrementos en la frecuencia de EPCMN en médula ósea en rata y ratón (Asanami y Shimono, 1997b; 2000; Asanami *et al.*, 1998).

Nuestros resultados ponen de manifiesto la capacidad de los cuatro fármacos experimentales evaluados de inducir condiciones de hipotermia tras su administración oral en ratón, lo que sugiere un efecto común a esta serie química de derivados de FTHPB con afinidad por el receptor σ_1 . No obstante, a pesar de la similitud en estructura química y afinidad hacia el receptor σ_1 (tabla 1.3), el E-5842 se diferencia claramente del resto de derivados de FTHPB en su capacidad de producir hipotermia en ratón, presentando una mayor intensidad y duración de efecto (tabla 4.2). Destaca a este respecto el compuesto C, cuya única diferencia estructural respecto al E-5842 corresponde a la sustitución, en el grupo halógeno del anillo de benceno, de un átomo de flúor por uno de cloro.

Tabla 4.2. Inducción de hipotermia en ratón tras administración oral.

Sustancia	Dosis (mg/Kg)	Hipotermia		Referencia
		Intensidad (°C) (temperatura corporal)	Duración aproximada (h)	
E-5842	50	10,4 - 7,5 (26,2 - 28,7)	10 - 7	Anexo 1 (Exp. 1 y 2)
	100	11,6 - 10,0 (24,3 - 26,2)	12 - 8	Anexo 1 (Exp. 1 y 2)
	200	12,3 - 12,0 (23,9 - 24,2)	15 - 13	Anexo 1 (Exp. 1 y 2)
		13,5/12,2 (25,1/25,4)	≥ 12 h	Artículo 4 (WT/KO)
		14,8 (22,9)	≥ 15 h	Artículo 5
400	12,9 (23,3)	≥ 72 h	Anexo 1 (Exp. 1)	
A	150	3,1 (35,2)	0	Artículo 3
B	177	4,8 (33,5)	0	Artículo 3
C	120	4,6 (33,7)	0	Artículo 3
Clorpromazina	100	12,8 (24,9)	≥ 48	Artículo 5

Intensidad: descenso máximo por debajo de la temperatura corporal basal.

Duración: tiempo aproximado por debajo de 33 °C.

Las diferencias en actividad hipotérmica no pueden ser atribuidas *per se* a las diferencias en las dosis administradas, ya que el E-5842 a niveles de dosificación inferiores a la DMT de los fármacos A, B y C, ha demostrado inducir hipotermia de mayor intensidad y duración (tabla 4.2). Aparentemente, esta observación parece cuestionar una implicación relevante del receptor σ_1 en la inducción de condiciones de hipotermia como las observadas tras la administración de E-5842. No obstante, la ausencia de datos experimentales comparativos sobre los niveles plasmáticos de exposición a los productos ensayados, o posibles metabolitos con actividad farmacológica, hace que no se pueda excluir la contribución de factores cinéticos, metabólicos o de distribución de tejidos sobre los diferentes potenciales hipotérmicos.

Sólo en el caso del E-5842 el efecto hipotérmico ha estado acompañado de un incremento en la frecuencia de EPCMN en médula ósea. El efecto inducido tras la administración de la dosis de 200 mg/Kg (48 h), ha demostrado ser reproducible en diferentes ensayos y cepas de ratón (Albino Swiss CFLP, CD-1 y σ_1 R-KO). En los diferentes ensayos realizados, los valores medios de EPCMN alcanzados tras la administración de E-5842 (200 mg/Kg) han excedido el rango superior de valores históricos basales, con un factor de inducción de entre x1,9 y x4,2 respecto al correspondiente control vehículo y alcanzando, en la mayoría de las ocasiones, significación estadística ($p < 0,05$; ANOVA, test de Dunnett) (Artículo 1, tabla 4; Artículo 4, tabla I; Artículo 5, tabla 1; Anexo 1, tablas 1 y 2). Al evitar el efecto hipotérmico en los animales tratados con E-5842 (200 mg/Kg), mediante la exposición a condiciones de temperatura ambiental aumentada (30 °C, 24 h), se induce la reversión de la frecuencia de EPCMN a valores basales (Anexo 1, figura 3 y tabla 2). Estos resultados indican que el incremento en la frecuencia de EPCMN es atribuible al fuerte y prolongado efecto hipotérmico inducido y no a una actividad genotóxica intrínseca al E-5842.

Si bien es de aceptación general que sustancias con actividad hipotérmica pueden inducir incrementos en la frecuencia de MN mediante un mecanismo indirecto derivado de la baja temperatura (EMEA, 2006), son escasas las referencias sobre este tipo de compuestos en la literatura científica. Tras los trabajos realizados por Asanami y colaboradores con los fármacos antipsicóticos reserpina (Asanami y Shimono, 1997b) y clorpromazina (Asanami *et al.*, 1998), el E-5842 constituye el tercer ejemplo, citado en la literatura científica, de una sustancia capaz de inducir incrementos en la frecuencia de MN como efecto secundario a la inducción de hipotermia. De forma reciente, esta escueta lista se ha visto ampliada con un

cuarto compuesto químico identificado como “Covance compound No. 4” (Tweats *et al.*, 2007a). El patrón de inducción de EPCMN tras la administración de E-5842 (200 mg/Kg), con un incremento moderado por encima del valor basal y a un tiempo de muestreo tardío (≥ 48 h), es similar al observado para la reserpina, la clorpromazina y la sustancia “Covance compound No. 4” (Asanami y Shimono, 1997b; Asanami *et al.*, 1998; Tweats *et al.*, 2007a).

La ausencia de efectos sobre la frecuencia de EPCMN tras la administración de los fármacos A, B y C, es consistente con la moderada intensidad y duración del efecto hipotérmico inducido por estos fármacos a su DMT. Para ninguno de ellos, los valores de temperatura corporal se han aproximado al umbral de efecto para la inducción de MN propuesto por Asanami y colaboradores tras sus experimentos con clorpromazina: una temperatura corporal inferior a 33 °C durante un mínimo de 11 h (Asanami *et al.*, 1998). En los diferentes experimentos realizados con E-5842, el efecto hipotérmico inducido tras la administración de la dosis 200 mg/Kg ha excedido el umbral de intensidad y duración propuesto por Asanami y colaboradores. Un patrón similar en cuanto a intensidad y duración de efecto hipotérmico, e inducción de MN, se ha encontrado para la reserpina (Asanami y Shimono, 1997b), la sustancia “Covance compound No. 4” (Tweats, *et al.*, 2007a) y la clorpromazina (Asanami *et al.*, 1998), siendo reproducida para esta última en nuestro ensayo (Artículo 5).

Por otro lado, nuestros resultados ponen en contexto el concepto de umbral de efecto propuesto por Asanami y colaboradores, en cuanto que su superación no ha de estar necesariamente asociada a incrementos en la frecuencia de EPCMN. Cabe recordar la naturaleza empírica del valor propuesto por Asanami y colaboradores, al cual difícilmente se le puede asignar un valor absoluto debido a la existencia de factores contributivos tales como la variabilidad individual en la respuesta, las diferencias de susceptibilidad entre cepas, y la variabilidad inherente al recuento de un número relativamente reducido de eritrocitos. En este sentido, en uno de nuestros experimentos, la inducción de una temperatura corporal inferior a 33 °C durante aproximadamente 12 h, tras la administración de una dosis de 100 mg/Kg, no estuvo asociada a un incremento en la frecuencia de EPCMN (Anexo 1, Primer Ensayo). Por otro lado, cabe la posibilidad de que el efecto inductor de la hipotermia sobre la frecuencia de EPCMN pueda quedar enmascarado por otros efectos como la toxicidad. En este sentido, los indicios de toxicidad medular (descenso de la relación EPC/ENC) observados tras la administración de la dosis de 400 mg/Kg de E-5842 podrían explicar la ausencia de incrementos claros en la frecuencia de EPCMN, a pesar de darse condiciones de hipotermia

de mayor intensidad y duración a la producida tras la administración de la dosis de 200 mg/Kg (Artículo 1, tabla 4; Anexo 1, tabla 1).

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que la inducción de condiciones de hipotermia tras administración oral en ratón, parece ser un efecto de clase de esta serie química de ligandos para el receptor σ_1 derivados de la FTHPB. Esta actividad podría estar relacionada bien con su actividad farmacológica (unión al receptor σ_1) o con alguna otra propiedad inherente a la estructura química común. No obstante, el incremento en la formación de EPCMN en médula ósea de ratón como consecuencia de la inducción de condiciones de hipotermia intensa y prolongada ha resultado ser un efecto exclusivo del fármaco experimental E-5842, no extensible al resto de derivados de la FTHPB con afinidad por el receptor σ_1 evaluados.

4.6.3. Investigación del mecanismo de inducción de hipotermia tras administración de E-5842

La inducción de hipotermia en roedores es un efecto habitual en situaciones de intoxicación aguda, siendo considerado por algunos un efecto adaptativo que permite una mayor supervivencia de los animales (Spencer *et al.*, 2007). La hipotermia también puede producirse, en ausencia de toxicidad, como respuesta a un efecto farmacológico. En el caso concreto de los fármacos con propiedades psicoactivas, la alteración de los mecanismos de regulación de la temperatura corporal es un efecto secundario bien conocido (Asanami *et al.*, 1998; Oerther y Ahlenius, 2000). Este efecto se ha asociado a la capacidad de estos fármacos de unirse a receptores de DA, 5-HT y α_2 -adrenérgicos, que se sabe están implicados en la regulación térmica en mamíferos (Ahlenius, 1999; Cryan *et al.*, 1999; 2000; Oerther, 2000; Perachon *et al.*, 2000; Oerther y Ahlenius, 2001).

Los resultados obtenidos con los fármacos experimentales A, B, C y E-5842 confirman la capacidad de esta serie química de derivados de FTHPB con afinidad por el receptor σ_1 , de inducir condiciones de hipotermia tras su administración oral en ratón. En el caso particular del E-5842, la fuerte hipotermia inducida está asociada a la inducción de incrementos en la frecuencia de EPCMN en médula ósea. Diferentes evidencias experimentales sugieren una posible implicación del receptor σ en los mecanismos de termorregulación en mamíferos. Entre éstos destaca la alta expresión del receptor σ_1 en el núcleo hipotalámico (Bouchard y

Quirion, 1997), zona que se cree juega un papel fundamental en la regulación de la temperatura corporal (Boulant, 1981), y la capacidad de diversos ligandos σ de inducir hipotermia en animales de laboratorio (Bejanian *et al.*, 1991; Kest *et al.*, 1995; Rawls *et al.*, 2002).

La posible implicación del receptor σ_1 en la inducción por el E-5842 de condiciones de hipotermia asociadas a la formación de MN fue considerada de interés para la valoración del potencial genotóxico, mediante el ensayo de MN en roedor, de otros posibles fármacos experimentales con afinidad de unión para este receptor.

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos con ratones KO para el receptor σ_1 (σ_1 R-KO) muestran que estos animales transgénicos responden al tratamiento con E-5842 de forma similar a los ratones WT. En ambas cepas de ratón, la administración de E-5842 (200 mg/Kg) produce un claro descenso de la temperatura corporal, siendo la intensidad y duración del efecto similar en ambas cepas (Artículo 4, figura 1). De forma consistente con el grado de hipotermia inducido, en ambas cepas se ha observado un incremento similar y estadísticamente significativo ($p < 0,05$; ANOVA, test de Dunnett) de la frecuencia de EPCMN en médula ósea a las 48 h del tratamiento (Artículo 4, tabla 1). Estos resultados indican que la inducción de condiciones de hipotermia asociadas a la formación de MN tras la administración de E-5842, no precisa de la interacción de este fármaco con receptores σ_1 funcionales.

Si bien nuestros resultados descartan la implicación del receptor σ_1 en la inducción de condiciones de hipotermia intensa y prolongada tras la administración de E-5842, la hipotermia no parece atribuible a un simple efecto de toxicidad inespecífica. La rápida inducción del descenso de temperatura corporal tras la administración de E-5842, así como la respuesta dosis-dependiente observada (Anexo 1, figuras 2 y 3) presuponen la existencia de una posible alteración farmacológica en la función termoreguladora. El E-5842, junto a su alta afinidad de unión al receptor σ_1 , también ha mostrado presentar cierta afinidad hacia otros receptores del SNC como los de DA, 5-HT y α_2 -adrenérgicos (Guitart *et al.*, 1998). La interacción del E-5842 con estos receptores, debido a la pérdida de selectividad como consecuencia de condiciones farmacocinéticas de exposición asociadas a la administración de dosis altas, podría ser un posible mecanismo responsable de su particular potencial hipotérmico. En este sentido, los fármacos en los que se ha observado la inducción de MN

como efecto secundario a la inducción de hipotermia corresponden, hasta la fecha, a fármacos con actividad sobre el SNC, lo que en cierta forma refuerza la idea del requisito de un componente de actividad farmacológica en el SNC. Asimismo, junto a la posible implicación de un efecto farmacológico sobre el proceso de termoregulación, la alta intensidad y duración del efecto hipotérmico producido sugiere que la alteración del proceso de termogénesis también podría estar contribuyendo a la inducción de hipotermia (Gordon *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en nuestra investigación con ratones σ_1 R-KO también contribuyen a la caracterización del fenotipo de esta cepa de ratón transgénico. A pesar de la amplia distribución corporal de los receptores σ_1 , presentes en órganos como cerebro, corazón, pulmones, hígado, riñón, tracto intestinal y órganos reproductores (Matsumoto *et al.*, 2003), los ratones deficientes para el receptor σ_1 han mostrado ser viables reproductivamente, lo que sugiere que el receptor σ_1 no es esencial para su desarrollo (Langa *et al.*, 2003). Exceptuando la presencia de una respuesta disminuida frente a la inducción de estímulos dolorosos mediante formalina (Cendan *et al.*, 2005), hasta la fecha no se han encontrado otras diferencias fenotípicas respecto a ratones WT.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que los ratones σ_1 R-KO presentan valores basales de EPC/ENC y EPCMN en médula ósea, y de RET y RETMN en sangre, similares a los animales WT de la cepa CD-1 (CSGMT, 1992; Salamone y Mavournin., 1994; Krishna *et al.*, 2000; Torous *et al.*, 2005). Asimismo, los valores de EPCMN alcanzados en los ratones σ_1 R-KO tras la administración de ciclofosfamida (25 mg/Kg) demuestran que esta cepa de ratón es metabólicamente competente en la bioactivación de esta sustancia clastogénica. En nuestra investigación, los animales σ_1 R-KO, a diferencia de los WT, presentaron un ligero incremento en la frecuencia de RETMN (48 h) tras la administración de E-5842 (Artículo 4, tabla II). Si bien este efecto tiene un origen incierto, no se puede excluir la existencia de diferencias en la cinética de eritropoyesis en los animales σ_1 R-KO, ya sea bajo condiciones basales o de hipotermia.

En resumen, los resultados obtenidos en los experimentos realizados con ratones σ_1 R-KO indican que la inducción de condiciones de hipotermia intensa y prolongada asociadas a la formación de MN en ratón tras la administración de E-5842 (200 mg/Kg), no es atribuible a la interacción de este fármaco con el receptor σ_1 . En consecuencia, no cabe esperar que la

inducción de condiciones de hipotermia asociadas a la formación de EPCMN en ratón sea un efecto de clase de los fármacos con alta afinidad por el receptor σ_1 .

4.6.4. Investigación del mecanismo de inducción de micronúcleos bajo condiciones de hipotermia

La inducción de condiciones de hipotermia está asociada a incrementos en la frecuencia de EPCMN en el ensayo *in vivo* de MN en roedor. Para un número limitado de sustancias se ha descrito la inducción de incrementos moderados en la frecuencia de EPCMN en médula ósea de ratón, a tiempos de muestreo tardíos tras el tratamiento (≥ 48 h), como consecuencia de la inducción de condiciones de hipotermia. Estas incluyen, la reserpina (Asanami y Shimono, 1997b), la clorpromazina (Asanami *et al.*, 1998), el compuesto “Covance compound No. 4” (Tweats *et al.*, 2007a), y el fármaco experimental antipsicótico E-5842 (Anexo 1). Para todas ellas se ha demostrado que la formación de MN se revierte cuando se evitan las condiciones de hipotermia.

Se han propuesto varios posibles mecanismos responsables de la inducción de MN en eritrocitos de roedor bajo condiciones de hipotermia. La hipótesis predominante corresponde a la propuesta por Asanami y Shimono, que atribuye el incremento en la formación de EPCMN a la interferencia de la baja temperatura con el correcto funcionamiento del huso mitótico (Asanami y Shimono, 1997b). Es sabido que condiciones de temperatura baja interfieren con la polimerización de los microtúbulos y promueven su desensamblaje, produciendo el retraso de cromosomas (Detrich III *et al.*, 1989; Parton *et al.*, 1991; Wallin *et al.*, 1993; Digue *et al.*, 1999).

De forma reciente se ha propuesto que la formación de MN bajo condiciones de hipotermia podría producirse como consecuencia de una estimulación de la eritropoyesis, debido al descenso de los niveles de oxígeno en sangre ocasionados por el descenso de la temperatura corporal (Bundy *et al.*, 2004; Tweats *et al.*, 2007a). El proceso de eritropoyesis está regulado por la hormona glicoprotéica EPO. Incrementos en los niveles de EPO en sangre, bien por administración exógena (Yajima *et al.*, 1993a; 1993b) o por estimulación de su secreción mediante inducción de anemia por sangrado o hemólisis química (Steinheider *et al.*, 1985; Hirai *et al.*, 1991), están asociados a incrementos en la formación de MN en eritrocitos de roedor. Bajo estas condiciones, el incremento en la formación de MN se atribuye a la

reducción del tiempo disponible para la reparación de daños espontáneos inducidos sobre el DNA, (Suzuki *et al.*, 1989; Kirkland, 1991), la alteración de la formación del huso mitótico durante la división celular (Suzuki *et al.*, 1993), y/o errores durante el proceso de enucleación de los eritrocitos (Yajima *et al.*, 1993b).

La supuesta relación entre inducción de MN por hipotermia y estimulación de la eritropoyesis se basa, a nuestro entender, en una serie de evidencias indirectas, no existiendo hasta la fecha referencias en la literatura científica de estudios que evalúen de forma directa esta relación. Nuestros resultados muestran que el incremento en la formación de EPCMN en médula ósea producido bajo condiciones de hipotermia tras la administración oral en ratón de E-5842 (200 mg/Kg) o clorpromazina (100 mg/Kg), no está asociado a incrementos en los niveles de EPO en sangre (Artículo 5, figura 2). Esto sugiere que el incremento en la frecuencia de EPCMN bajo condiciones de hipotermia no está mediado por la estimulación de la eritropoyesis y, por lo tanto, no se produce como consecuencia de sucesos asociados a condiciones de estrés proliferativo de los eritroblastos.

La posible existencia de incrementos fuera del intervalo de tiempo muestreado (antes de 8 h o después de 24 h tras el tratamiento) y como consecuencia no detectados, resulta altamente improbable. La ausencia de un almacén intracelular de EPO, hace que el incremento de sus niveles en sangre dependa de su síntesis *de novo* (Jelkmann, 1992). La síntesis de mRNA en riñón, el número de células renales intersticiales que sintetizan EPO y los niveles de EPO en sangre de ratón aumentan con el grado de anemia inducido (Bondurant y Koury, 1986; Koury *et al.*, 1989b). Tras la inducción de anemia por sangrado en ratón, los niveles máximos de mRNA en riñón se alcanzan entre 4 y 8 h tras el tratamiento, permaneciendo estables un mínimo de 24 h (Bondurant y Koury, 1986). En ratón, el incremento en la síntesis de mRNA en riñón suele preceder en 1-2 h al de EPO en sangre (Cai *et al.*, 2003), estimándose una vida media de eliminación de 3 h para EPO exógena (Lezon *et al.*, 1995).

En este sentido, en nuestro experimento los animales a los que se indujo anemia por sangrado (0,5 mL) presentaron un claro incremento en los niveles de EPO en sangre en los muestreos comprendidos entre 4 y 24 h tras el tratamiento (Artículo 5, figura 2). El nivel de inducción alcanzado a las 4 h (x6 sobre el valor basal) es consistente con valores citados en la literatura científica: x5 una hora tras un periodo de exposición de 4 h a una atmósfera con 6% de oxígeno (Suzuki *et al.*, 2006), y x6 tras 6 h de exposición a una presión atmosférica del 50% (Lezon *et al.*, 1995).

A pesar del significativo incremento en los niveles de EPO, los animales sometidos al sangrado sólo presentaron un ligero incremento en la frecuencia de EPCMN (48 h) ($\times 2.6$ respecto al basal) (Artículo 5, tabla 1). Este efecto es consistente con el citado por otros autores tras la estimulación de la eritropoyesis mediante sangrado ($\times 2,1$) (Hirai *et al.*, 1991) o administración de EPO ($\times 3,0$) (Yajima *et al.*, 1993a; Yajima *et al.*, 1993b). En ratón, la eritropoyesis medular se considera principalmente homeostática, produciéndose la eritropoyesis de estrés mayoritariamente en el bazo (Bozzini *et al.*, 1970; Lezon *et al.*, 1995; Lenox *et al.*, 2005). En este sentido, y como consecuencia de la contribución de la eritropoyesis extramedular al conjunto eritrocitario, el grado de inducción de MN tras la estimulación de la eritropoyesis por sangrado, o administración de EPO, ha demostrado ser claramente superior en RET de sangre periférica que no en EPC de médula ósea, (Hirai *et al.*, 1991; Yajima *et al.*, 1993a; Yajima *et al.*, 1993b).

La inducción de MN de tamaño grande se considera un indicador general de efecto aneugénico (Schmid, 1975; Yamamoto y Kikuchi, 1980; Tinwell y Ashby, 1991; Van Hummelen *et al.*, 1992). En este sentido, el mayor tamaño relativo de los MN producidos bajo condiciones de hipotermia tras la administración de reserpina o de clorpromazina, sugiere un posible origen aneugénico (Asanami y Shimono, 1997b; Asanami *et al.*, 1998). El examen morfológico de los MN producidos tras la inducción de hipotermia por administración de E-5842 (200 mg/Kg, 48 h), muestra la existencia de un patrón de distribución de área relativa de MN similar al inducido por la colchicina, un inhibidor de la proliferación de microtúbulos (Anexo 1, figura 4), así como un claro incremento en la proporción de EPCMN con MN de “tamaño relativo grande”, según el criterio de clasificación de Yamamoto y Kikuchi (" $d \geq \frac{1}{4}D$ ") (Yamamoto y Kikuchi, 1980) (Anexo 1, tabla 3).

Por otro lado, parece factible que los MN inducidos bajo condiciones de hipotermia puedan tener como origen la interferencia con el proceso de enucleación eritrocitaria. Junto a su función en el huso mitótico, los microtúbulos también ejercen un importante papel en el mantenimiento de la estructura del citoesqueleto y en los movimientos intracelulares, y se les atribuye un papel esencial en el proceso de enucleación eritrocitaria, contribuyendo al correcto posicionamiento del núcleo (Chasis *et al.*, 1989; Koury *et al.*, 1989a; Takano-Ohmuro *et al.*, 1996). Diferentes evidencias experimentales indican que la interferencia con el proceso de polimerización de los microtúbulos puede afectar al proceso de enucleación de los eritroblastos (Chasis *et al.*, 1989; Sonoda *et al.*, 1998). Se ha sugerido que los MN de origen

aneunógeno podrían ser más susceptibles, que los de origen clastógeno, a su extrusión de los eritroblastos en maduración (alrededor del momento de la extrusión del núcleo principal) (Parton *et al.*, 1991). En este sentido, la interferencia con la extrusión del eritroblasto de los MN formados espontáneamente podría ser responsable o, como mínimo, contribuir al incremento en la frecuencia de EPCMN bajo condiciones de hipotermia.

Esta supuesta interferencia de la baja temperatura con la extrusión de MN espontáneos es, en cierta forma, consistente con los incrementos relativamente moderados, respecto al basal, encontrados para las diferentes sustancias inductoras de EPCMN mediante hipotermia (tabla 4.3). Aparentemente, una vez superado el teórico umbral de efecto hipotérmico para la inducción de MN propuesto por Asanami y colaboradores (Asanami *et al.*, 1998), el valor de inducción de EPCMN es similar, independientemente de la intensidad y duración de la hipotermia inducida. La única excepción a esta evidencia experimental corresponde a un único animal citado por Asanami y Shimono en su estudio con reserpina (1000 mg/Kg, 96 h) que presentó un valor de EPCMN inusualmente elevado (36 EPCMN/2000 EPC) (Asanami y Shimono, 1997b).

Tabla 4.3. Inducción de EPCMN por sustancias que producen MN por hipotermia.

Sustancia	EPCMN (48 h)		Referencia
	Valor medio (%)	Incremento respecto a basal	
Reserpina	5,6	x3,7	(Asanami y Shimono, 1997b)
Clorpromazina	4,8	x3,2	(Asanami <i>et al.</i> , 1998)
	3,0	x3,0	Artículo 5
“Convance compound No. 4”	4,5	x2,8	(Tweats <i>et al.</i> , 2007a)
E-5842	3,4 - 5,3	x1,9 - x4,2	Artículos 1, 4 y 5. Anexo 1

La posible interferencia de la hipotermia con la polimerización de los microtúbulos implicaría la existencia de un mecanismo susceptible de presentar un umbral de efecto, lo que desde el punto de vista de la valoración de riesgo es de cierta importancia. Que esta interferencia tenga como consecuencia la alteración de la segregación cromosómica o del proceso de extrusión del núcleo celular o de los MN espontáneos, es un elemento adicional a considerar en la valoración del riesgo genotóxico. Mientras la interferencia con el proceso de segregación

cromosómica puede afectar de forma adversa a cualquier tipo celular en proliferación, el proceso de enucleación ocurre en un número limitado de tipos celulares (eritroblastos, células epiteliales de la lente ocular y queratinocitos) que representan un estado final de diferenciación carente de potencial proliferativo (Krauss *et al.*, 2005).

En resumen, nuestros resultados aportan evidencias experimentales en contra de la implicación de la estimulación de la eritropoyesis en la inducción de EPCMN en médula ósea de ratón bajo condiciones de hipotermia. El mayor tamaño relativo de los MN producidos sugiere un posible origen aneugénico y dan soporte a la posible interferencia de la baja temperatura con el correcto funcionamiento del huso mitótico (Asanami y Shimono, 1997b). El patrón de inducción de EPCMN y las evidencias experimentales encontradas en la literatura científica hacen que resulte factible que la interferencia con el proceso de enucleación eritrocitaria o con la extrusión de MN espontáneos pueda ser un factor contributivo. La dilucidación del origen último de los MN inducidos por hipotermia o del grado de contribución de cada uno de los mecanismos propuestos requiere, sin duda, la realización de investigaciones adicionales.

4.6.5. Importancia en humanos de la inducción de micronúcleos por hipotermia

La obtención de un resultado positivo en el ensayo del MN en roedor se considera, *a priori*, indicativo de potencial de inducir efectos cromosómicos similares en humanos. Esto puede conducir, a largo plazo, a una variedad de efectos adversos incluyendo defectos hereditarios y efectos cancerígenos. Diversos estudios sugieren que la formación de MN constituye un proceso relevante en la cancerogénesis (Stopper y Müller, 1997).

La inducción de EPCMN en el ensayo de MN en ratón tras la administración de E-5842 se ha demostrado atribuible a la inducción de condiciones de hipotermia intensa y prolongada. El efecto genotóxico detectado no se considera atribuible a la interacción directa del fármaco sobre el DNA sino a un mecanismo indirecto de alteración fisiológica consistente, probablemente, en la interferencia de la baja temperatura con los procesos de segregación cromosómica o de enucleación eritrocitaria.

Sustancias capaces de inducir incrementos en la formación de MN en roedores mediante la alteración de las condiciones fisiológicas de los animales, han de ser consideradas un motivo de preocupación en el caso de que sean capaces de inducir cambios fisiológicos similares en

humanos (Tweats *et al.*, 2007a). Al igual que ocurre en roedores, la alteración de la capacidad de regular la temperatura corporal es un efecto secundario conocido de la administración de fármacos antipsicóticos en pacientes esquizofrénicos (Oerther y Ahlenius, 2000; Kudoh *et al.*, 2004). En consecuencia, *a priori*, la inducción de hipotermia en humanos por administración de E-5842 podría ser considerado un riesgo potencial.

No obstante, la inducción de descensos de la temperatura corporal de intensidad y duración similares a los asociados a la formación de MN en ratón tras la administración de E-5842, o de sustancias como la clorpromazina o la reserpina (Asanami y Shimono, 1997b; Asanami *et al.*, 1998), parece difícilmente extrapolable a humanos. El ratón, al presentar un valor relativamente alto de la relación entre superficie y masa corporal, es especialmente susceptible a la inducción de condiciones de hipotermia. Ésta es una condición difícilmente extrapolable a especies de mayor tamaño, que presentan una menor relación entre superficie y masa corporal. Así, queda de manifiesto en los experimentos realizados por Asanami y colaboradores, con administración de clorpromazina o reserpina en rata (Asanami y Shimono, 2000). En esta especie animal el efecto hipotérmico inducido resultó ser muy inferior al observado en ratón, observándose un incremento en la frecuencia de EPCMN sólo tras la administración de clorpromazina (250 mg/Kg, i.p.) (Asanami y Shimono, 1997b; 2000; Asanami *et al.*, 1998). Bundy y colaboradores, empleando una dosis ligeramente inferior de clorpromazina (100 mg/Kg, i.p.), confirmaron el moderado efecto hipotérmico en rata y la no inducción de EPCMN (Bundy *et al.*, 2004).

Desde un punto de vista alométrico, la probabilidad de inducir efectos similares en humanos parece remota. Los seres humanos presentan una relación entre superficie y masa corporal muy inferior a roedores, por lo que son mucho menos susceptibles a la inducción de episodios de hipotermia. Por otro lado, roedores y humanos alcanzan una temperatura corporal regulada mediante mecanismos diferentes. En roedores y otras especies animales de pequeño tamaño, el mantenimiento de una tasa metabólica alta juega un papel importante en la regulación de la temperatura corporal. Esto les permite compensar la pérdida relativamente alta de calor como consecuencia de su alta relación entre superficie y masa corporal. Rata y ratón poseen una tasa metabólica 5 y 10 veces superiores a la humana, respectivamente (Gordon *et al.*, 2008). Por el contrario, en los mamíferos de mayor tamaño la regulación de la temperatura corporal depende en una mayor medida de mecanismos vasomotores.

En humanos, la hipotermia se define como el descenso de la temperatura corporal del compartimiento central por debajo de los 35 °C. La hipotermia se considera como “moderada” entre 32-35 °C, “severa” entre 28-32 °C, y “mayor” por debajo de los 28 °C (McInerney *et al.*, 2002). En humanos, estados de hipotermia similares en intensidad y duración a los inducidos en ratón tras la administración de dosis de E-5842 asociadas a la formación de MN son propios de situaciones de hipotermia accidental por exposición a condiciones ambientales adversas, como las que se producen en accidentes de montaña o inmersión, o en indigentes bajo condiciones meteorológicas adversas (Vassal *et al.*, 2001). Estas condiciones están asociadas a un alto índice de mortalidad, siendo la principal causa de muerte el fallo cardíaco por inducción de arritmias y, en concreto, fibrilación ventricular (Wong, 1983; Vassal *et al.*, 2001). Se cree que la inducción de hipoxia miocárdial, reducción del flujo coronario, alteración de niveles de electrolitos, y desequilibrios en el sistema nervioso autónomo podrían ser elementos contributivos (Wong, 1983).

En resumen, el efecto hipotérmico asociado a la formación de MN observado en ratón tras la administración de E-5842 no parece, desde el punto de vista de la valoración de riesgo genotóxico, extrapolable a una situación clínica en humanos. La inducción en humanos de condiciones de hipotermia similares a las requeridas en ratón para inducir incrementos de EPCMN representa más bien una cuestión de riesgo vital.

5. CONCLUSIONES

Tomando en consideración los objetivos propuestos y los resultados obtenidos en los estudios realizados, se pueden formular las siguientes conclusiones:

1. Los resultados obtenidos con los fármacos experimentales A, B y C en la batería estándar de genotoxicidad indican que éstos carecen de potencial genotóxico, y se considera que su utilización bajo condiciones clínicas de uso no representa riesgo genotóxico.
2. En el caso particular del fármaco experimental E-5842, el peso de la evidencia experimental acumulada indica que éste carece de potencial genotóxico. Los resultados positivos obtenidos en el ensayo *in vitro* de AbCr y en el ensayo *in vivo* de MN en médula ósea de ratón, son atribuibles a mecanismos indirectos relacionados con condiciones de toxicidad excesiva e inducción de hipotermia, respectivamente. Se considera que su utilización bajo condiciones clínicas de uso no representa riesgo genotóxico.
3. Manteniendo presente la necesidad de evaluar el potencial genotóxico de cualquier nuevo fármaco, los resultados obtenidos con los fármacos A, B, C y E-5842 sugieren que la presencia de potencial genotóxico no parece ser, *a priori*, una propiedad inherente a esta clase química de ligandos σ_1 derivados de la FTHPB.
4. La capacidad de los fármacos experimentales A, B, C y E-5842 de producir hipotermia en ratón tras su administración oral indica que la inducción de hipotermia parece ser un efecto de clase de esta serie química de derivados de FTHPB con afinidad por el receptor σ_1 .
5. La capacidad de inducir condiciones de hipotermia intensa y prolongada asociada a incrementos en la frecuencia de EPCMN en médula ósea de ratón es una propiedad única del E-5842 y no corresponde a un efecto de clase del resto de derivados de FTHPB con afinidad por el receptor σ_1 evaluados.
6. La inducción de condiciones de hipotermia en ratón asociadas a la formación de MN tras la administración del fármaco experimental E-5842 no está mediada por la interacción con el receptor σ_1 , quedando descartada la posible existencia de un efecto de clase de los ligando σ_1 en este ensayo *in vivo* de genotoxicidad.

7. La inducción de condiciones de hipotermia asociadas a la formación de MN en médula ósea de ratón no está asociada a incrementos en los niveles de EPO en sangre, lo que sugiere que el incremento en la formación de MN no se produce como consecuencia de una estimulación de la eritropoyesis.
8. El nivel de inducción de EPCMN bajo condiciones de hipotermia, así como el patrón de distribución en el tamaño relativo de los MN inducidos, sugieren como posible origen de los MN la interferencia de la baja temperatura con los procesos de segregación cromosómica, enucleación eritrocitaria y/o extrusión de MN espontáneos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adams C. P., Brantner V. V. (2006). Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars? *Health Aff.* 25, 420-428.
- Ahlenius S. (1999). Clozapine: dopamine D1 receptor agonism in the prefrontal cortex as the code to decipher a Rosetta stone of antipsychotic drugs. *Pharmacol. Toxicol.* 84, 193-196.
- Allison D. B., Mentore J. L., Heo M., Chandler L. P., Cappelleri J. C., Infante M. C., Weiden P. J. (1999). Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. *Am. J. Psychiatry* 156, 1686-1696.
- Ames B. N., Mccann J., Yamasaki E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347-364.
- Andreasen N. C., Flaum M., Swayze V. W., Tyrrell G., Arndt S. (1990). Positive and negative symptoms in schizophrenia. A critical reappraisal. *Arch. Gen. Psychiatry* 47, 615-621.
- Applegate M. L., Moore M. M., Broder C. B., Burrell A., Juhn G., Kasweck K. L., Lin P. F., Wadhams A., Hozier J. C. (1990). Molecular dissection of mutations at the heterozygous thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 51-55.
- Arenaz P., Hallberg L., Mancillas F., Gutierrez G., Garcia S. (1989). Sodium azide mutagenesis in mammals: inability of mammalian cells to convert azide to a mutagenic intermediate. *Mutat. Res.* 227, 63-67.
- Artigas F. (2007). Current Status and Challenges in Schizophrenia Research. En: *Antidepressants, Antipsychotics, Anxiolytics: From Chemistry and Pharmacology to Clinical Application.* H. Buschmann, J. Holenz, A. Parraga, A. Torrens, J.M. Vela, J. L. Díaz (Eds), pp. 299-334. Wiley Interscience.
- Asanami S., Shimono K. (1997a). High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow. *Mutat. Res.* 390, 79-83.
- Asanami S., Shimono K. (1997b). Hypothermia induces micronuclei in mouse bone marrow cells. *Mutat. Res.* 393, 91-98.
- Asanami S., Shimono K. (1999). The effect of hyperthermia on micronucleus induction by mutagens in mice. *Mutat. Res.* 446, 149-154.

- Asanami S., Shimono K. (2000). Effects of chemically- and environmentally-induced hypothermia on micronucleus induction in rats. *Mutat. Res.* 471, 81-86.
- Asanami S., Shimono K., Kaneda S. (1998). Transient hypothermia induces micronuclei in mice. *Mutat. Res.* 413, 7-14.
- Asanami S., Shimono K., Kaneda S. (2001). Effect of temperature on the frequency of chromosome aberrations and micronuclei in cultured Chinese hamster cells. *J. Toxicol. Sci.* 26, 323-326.
- Ashby J., Tennant R. W. (1988). Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutat. Res.* 204, 17-115.
- Ashby J., Tennant R. W. (1991). Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. *Mutat. Res.* 257, 229-306.
- Baldrick P. (2008). Safety evaluation to support first-in-man investigations II: Toxicology studies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 51, 237-243.
- Bejanian M., Pechnick R. N., Bova M. P., George R. (1991). Effects of subcutaneous and intracerebroventricular administration of the sigma receptor ligand 1,3-Di-o-tolylguanidine on body temperature in the rat: interactions with BMY 14802 and rimcazole. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258, 88-93.
- Bergman K., Müller L., Teigen S. W. (1996). Series: current issues in mutagenesis and carcinogenesis, No. 65. The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: a regulatory (re)view. *Mutat. Res.* 349, 263-288.
- Bolon B. (2004). Genetically engineered animals in drug discovery and development: a maturing resource for toxicologic research. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 95, 154-161.
- Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., Lando C., Chang W. P., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Ban S., Barale R., Bigatti M. P., Bolognesi C., Cebulska-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Hagmar L., Joksic G., Martelli A., Migliore L., Mirkova E., Scarfi M. R., Zijno A., Norppa H., Fenech M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28, 625-631.
- Bondurant M. C., Koury M. J. (1986). Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol. Cell Biol.* 6, 2731-2733.

- Bortolozzi A., Díaz-Mataix L., Artigas F. (2007) Pharmacotherapy of Schizophrenia. En: Antidepressants, Antipsychotics, Anxiolytics: From Chemistry and Pharmacology to Clinical Application. H. Buschmann, J. Holenz, A. Parraga, A. Torrens, J.M. Vela, J. L. Díaz (Eds), pp. 389-448. Wiley Interscience.
- Bouchard P., Quirion R. (1997). [3H]1,3-di(2-tolyl)guanidine and [3H](+)pentazocine binding sites in the rat brain: autoradiographic visualization of the putative sigma1 and sigma2 receptor subtypes. *Neuroscience* 76, 467-477.
- Boulant J. A. (1981). Hypothalamic mechanisms in thermoregulation. *Fed. Proc.* 40, 2843-2850.
- Bozzini C. E., Barrio Rendo M. E., Devoto F. C., Epper C. E. (1970). Studies on medullary and extramedullary erythropoiesis in the adult mouse. *Am.J.Physiol* 219, 724-728.
- Broschinski L., Madle S., Hensel C. (1998). Genotoxicity tests for new chemicals in Germany: routine in vitro test systems. *Mutat. Res.* 418, 121-129.
- Brusick D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environ. Mutagen.* 8, 879-886.
- Bucolo C., Drago F. (2007). Neuroactive steroids protect retinal tissue through sigma1 receptors. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 100, 214-216.
- Bundy L., Whitwell J., Beevers C. (2004). Effect of hypothermia and erythrocyte proliferation on induction of micronucleated polychromatic erythrocytes in rat bone marrow. Abstracts of the United Kingdom Environmental Mutagen Society 27th Annual Meeting, 4th-7th July 2004, University of Loughborough, UK. *Mutagenesis* 19, 499-520.
- Burton S. A., Paljug W. R., Kalnicki S., Werts, E. D. (1997). Hypothermia-enhanced human tumor cell radiosensitivity. *Cryobiology* 35, 70-78.
- Cai Z., Manalo D. J., Wei G., Rodriguez E. R., Fox-Talbot K., Lu H., Zweier J. L., Semenza G. L. (2003). Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 108, 79-85.
- Calabrese E. J., Baldwin L. A. (2003). Toxicology rethinks its central belief. *Nature* 421, 691-692.
- Carlsson A. (1988). The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1, 179-186.

- Carlsson A., Lindquist M. (1963). Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* (Copenh) 20, 140-144.
- Carr D. J., De Costa B. R., Radesca L., Blalock J. E. (1991). Functional assessment and partial characterization of [3H](+)-pentazocine binding sites on cells of the immune system. *J. Neuroimmunol.* 35, 153-166.
- Casellas P., Bourrie B., Canat X., Carayon P., Buisson I., Paul R., Breliere J. C., Le Fur G. (1994). Immunopharmacological profile of SR 31747: in vitro and in vivo studies on humoral and cellular responses. *J. Neuroimmunol.* 52, 193-203.
- Casey D. E. (1993). Neuroleptic-induced acute extrapyramidal syndromes and tardive dyskinesia. *Psychiatr. Clin. North Am.* 16, 589-610.
- CE (2001). Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* (L 311, 28/11/2001), 67-128.
- Cendan C. M., Pujalte J. M., Portillo-Salido E., Montoliu L., Baeyens J. M. (2005). Formalin-induced pain is reduced in sigma(1) receptor knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* 511, 73-74.
- Chang W. P., Hwang B. F., Wang D., Wang J. D. (1997). Cytogenetic effect of chronic low-dose, low-dose-rate gamma-radiation in residents of irradiated buildings. *Lancet* 350, 330-333.
- Chasis J. A., Prenant M., Leung A., Mohandas N. (1989). Membrane assembly and remodeling during reticulocyte maturation. *Blood* 74, 1112-1120.
- Chrisman C. L., Baumgartner A. P. (1980). Micronuclei in bone-marrow cells of mice subjected to hyperthermia. *Mutat. Res.* 77, 95-97.
- Cifone M. A., Myhr B., Eiche A., Bolcsfoldi G. (1987). Effect of pH shifts on the mutant frequency at the thymidine kinase locus in mouse lymphoma L5178Y TK+/- cells. *Mutat. Res.* 189, 39-46.
- Clark W. G., Bernardini G. L., Ponder S. W. (1981). Central injection of a sigma opioid receptor agonist alters body temperature of cats. *Brain Res. Bull.* 7, 279-281.
- CMR (2005). Centre for Medicines Research International Ltd 2005/2006 Pharmaceutical R&D Fact Book.
- Colabufo N. A., Berardi F., Abate C., Contino M., Niso M., Perrone R. (2006). Is the sigma2 receptor a histone binding protein? *J. Med. Chem.* 49, 4153-4158.

- Colabufo N. A., Berardi F., Contino M., Niso M., Abate C., Perrone R., Tortorella V. (2004). Antiproliferative and cytotoxic effects of some sigma2 agonists and sigma1 antagonists in tumour cell lines. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 370, 106-113.
- Cole J., Mc Gregor D. B., Fox M., Graner R. C., Thacker J. (1990). Gene mutation assay in cultured mammalian cells. En: *Basic mutagenicity tests UKEMS recommended procedures* pp. 87-114. D.J. Kirkland (Ed), Cambridge University Press.
- COM (2003). Committee on Mutagenicity Testing. Statement on guidance on considering high dose positive in-vivo mutagenicity data in the bone marrow assays that may not be biologically significant with regard to considering a chemical to be an in-vivo mutagen. COM/03/S5. <http://www.advisorybodies.doh.gov.uk/com/index.htm>.
- Combes R. D., Stopper H., Caspary W. J. (1995). The use of L5178Y mouse lymphoma cells to assess the mutagenic, clastogenic and aneugenic properties of chemicals. *Mutagenesis* 10, 403-408.
- Corbera J., Vaño D., Martinez D., Vela J.M., Zamanillo D., Dordal A., Andreu F., Hernandez E., Perez R., Escriche M., Salgado L., Yeste S., Serafini M.T., Pascual R., Alegre J., Calvet M.C., Cano N., Carro M., Buschmann H., Holenz J. (2006). A medicinal-chemistry-guided approach to selective and druglike sigma 1 ligands. *ChemMedChem* 1, 140-154.
- Crawford K. W., Bowen W. D. (2002). Sigma-2 receptor agonists activate a novel apoptotic pathway and potentiate antineoplastic drugs in breast tumor cell lines. *Cancer Res.* 62, 313-322.
- Cryan J. F., Harkin A., Naughton M., Kelly J. P., Leonard B. E. (2000). Characterization of D-fenfluramine-induced hypothermia: evidence for multiple sites of action. *Eur. J. Pharmacol.* 390, 275-285.
- Cryan J. F., Kelliher P., Kelly J. P., Leonard B. E. (1999). Comparative effects of serotonergic agonists with varying efficacy at the 5-HT(1A) receptor on core body temperature: modification by the selective 5-HT(1A) receptor antagonist WAY 100635. *J. Psychopharmacol.* 13, 278-283.
- CGGMT (1986). The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Sex difference in the micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. *Mutat. Res.* 172, 151-163.
- CSGMT (1992). The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the

- summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. *Mutat. Res.* 278, 83-98.
- Dean B. J., Danford N. (1984). Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. En: *Mutagenicity Testing: A practical approach*. S. Venitt, J.M. Parry (Eds), pp. 187-232. IRL Press, Oxford.
- Dertinger S. D., Torous D. K., Tometsko K. R. (1996). Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutat. Res.* 371, 283-292.
- Detrich H. W. III, Johnson K. A., Marchese-Ragona S. P. (1989). Polymerization of Antarctic fish tubulins at low temperatures: energetic aspects. *Biochemistry* 28, 10085-10093.
- Digue L., Orsiere T., De Meo M., Mattei M. G., Depetris D., Duffaud F., Favre R., Botta A. (1999). Evaluation of the genotoxic activity of paclitaxel by the in vitro micronucleus test in combination with fluorescent in situ hybridization of a DNA centromeric probe and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human T-lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 34, 269-278.
- Dunnett C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Statist. Assoc.* 50, 1096-1121.
- EEC. European Economic Community Council Directive 86/609/EEC, 24 November 1986.
- EFPIA. European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations. The Innovative Medicines Initiative (IMI) Strategic Research Agenda. Creating Biomedical R&D Leadership for Europe to Benefit Patients and Society. 15 September 2006 (Versión 2.0). http://www.efpia.org/4_pos/SRA.pdf.
- Erickson R. P. (2003). Somatic gene mutation and human disease other than cancer. *Mutat. Res.* 543, 125-136.
- EMA. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 28 June 2006. Guideline on the limits of genotoxic impurities.
- Fenech M. (2002). Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov. Today* 7, 1128-1137.
- Fenech M., Holland N., Chang W. P., Zeiger E., Bonassi S. (1999). The HUMAN MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 428, 271-283.

- Galloway S. M. (2000). Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 191-201.
- Galloway S. M., Miller J. E., Armstrong M. J., Bean C. L., Skopek T. R., Nichols W. W. (1998). DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of DNA-reactive and non-DNA-reactive clastogens. *Mutat. Res.* 400, 169-186.
- Goldsworthy T. L., Recio L., Brown K., Donehower L. A., Mirsalis J. C., Tennant R. W., Purchase I. F. (1994). Transgenic animals in toxicology. *Fundam. Appl. Toxicol.* 22, 8-19.
- Gollapudi B., Spencer P. J., Grundy J. M., Waechter J. M. (2006). Influence of non-chemically induced hypothermia on subhypothermic doses of phenol in the formation of micronuclei (MN) in the mouse bone marrow. *Toxicological Sciences (The Toxicologist)* 90, 114, Abstract 556.
- Gollapudi B. B., Bruce R. J., Linscombe V. A., Watanabe P. G., Sinha A. K. (1986). Effect of food and water deprivation on the parameters of the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutat. Res.* 173, 121-125.
- Gordon C. J. (1991). Toxic-induced hypothermia and hypometabolism: do they increase uncertainty in the extrapolation of toxicological data from experimental animals to humans? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15, 95-98.
- Gordon C. J., Spencer P. J., Hotchkiss J., Miller D. B., Hinderliter P. M., Pauluhn J. (2008). Thermoregulation and its influence on toxicity assessment. *Toxicology* 244, 87-97.
- Gossen J. A., de Leeuw W. J., Tan C. H., Zwarthoff E. C., Berends F., Lohman P. H., Knook D. L., Vijg J. (1989). Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying mutations in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 7971-7975.
- Green A. I., Patel J. K., Goisman R. M., Allison D. B., Blackburn G. (2000). Weight gain from novel antipsychotic drugs: need for action. *Gen.Hosp.Psychiatry* 22, 224-235.
- Gudi R., Sandhu S. S., Athwal R. S. (1990). Kinetochores identification in micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes: an assay for the detection of aneuploidy-inducing agents. *Mutat. Res.* 234, 263-268.
- Guitart X., Ballarin M., Codony X., Dordal A., Farre A. J., Frigola J., Merce R. (1999). E-5842. *Drugs of the Future* 24, 386-392.

- Guitart X., Codony X., Ballarin M., Dordal A., Farre A. J. (1998). E-5842: A new potent and preferential sigma ligand. Preclinical pharmacological profile. *CNS. Drug. Rev.* 4, 201-224.
- Guitart X., Codony X., Monroy X. (2004). Sigma receptors: biology and therapeutic potential. *Psychopharmacology (Berl)* 174, 301-319.
- Hanner M., Moebius F. F., Flandorfer A., Knaus H. G., Striessnig J., Kempner E., Glossmann H. (1996). Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 8072-8077.
- Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., Ishidate M. Jr. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.* 245, 245-249.
- Hayashi M., Sofuni T., Ishidate M. Jr. (1983). An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat. Res.* 120, 241-247.
- Hayashi T., Maurice T., Su T. P. (2000). Ca(2+) signaling via sigma(1)-receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca(2+) concentration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 788-798.
- Hayashi T., Su T. P. (2001). Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 491-496.
- Hayashi T., Su T. P. (2003). Sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 718-725.
- Heddle J. A. (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat. Res.* 18, 187-190.
- Hedlund P. B., Danielson P. E., Thomas E. A., Slanina K., Carson M. J., Sutcliffe J. G. (2003). No hypothermic response to serotonin in 5-HT7 receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 1375-1380.
- Hellewell S. B., Bruce A., Feinstein G., Orringer J., Williams W., Bowen W. D. (1994). Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. *Eur. J. Pharmacol.* 268, 9-18.
- Herbold B. A., Brendler-Schwaab S. Y., Ahr H. J. (2001). Ciprofloxacin: in vivo genotoxicity studies. *Mutat. Res.* 498, 193-205.
- Hirai O., Miyamae Y., Fujino Y., Izumi H., Miyamoto A., Noguchi H. (1991). Prior bleeding enhances the sensitivity of the in vivo micronucleus test. *Mutat. Res.* 264, 109-114.

- Holden H. E. (1998). Phenolphthalein: a sheep in wolf's clothing? *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 103-104.
- Huber M. T., Gotthardt U., Schreiber W., Krieg J. C. (1999). Efficacy and safety of the sigma receptor ligand EMD 57445 (panamesine) in patients with schizophrenia: an open clinical trial. *Pharmacopsychiatry* 32, 68-72.
- Humfrey C. D. (2007). Recent developments in the risk assessment of potentially genotoxic impurities in pharmaceutical drug substances. *Toxicol. Sci.* 100, 24-28.
- Hutter K. J., Stöhr M. (1982). Rapid detection of mutagen induced micronucleated erythrocytes by flow cytometry. *Histochemistry* 75, 353-362.
- ICH, Topic M3(R1), Non-clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. November 2000.
- ICH, Topic S1B, Carcinogenicity: Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. September 1997.
- ICH, Topic S2(R1), Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intenden for Human Use. Step3 Guideline, March 2008.
- ICH, Topic S2A, Genotoxicity: Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Approved September 1995.
- ICH, Topic S2B, Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Step 4 Guideline, 16 July 1997.
- ICH, Topic S6, Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Step 5 Guideline, March 1998.
- Jackson D. M., Ryan C., Evenden J., Mohell N. (1994). Preclinical findings with new antipsychotic agents: what makes them atypical? *Acta Psychiatr. Scand. Suppl* 380, 41-48.
- Javitt D. C., Zukin S. R. (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 148, 1301-1308.

- Jelkmann W. (1992). Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol. Rev.* 72, 449-489.
- Jeste D. V., Caligiuri M. P. (1993). Tardive dyskinesia. *Schizophr. Bull.* 19, 303-315.
- Jones E., Fox V. (2003). Lack of clastogenic activity of aniline hydrochloride in the mouse bone marrow. *Mutagenesis* 18, 283-285.
- Jones K. B., Anderson D. W., Longmore G. D. (2005). Effects of recombinant hematopoietins on blood-loss anemia in mice. *Iowa Orthop. J.* 25, 129-134.
- Karasawa J., Takahashi S., Takagi K., Horikomi K. (2002). Effects of sigma(1) receptor ligand MS-377 on D(2) antagonists-induced behaviors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 505-510.
- Kasper P., Uno Y., Mauthe R., Asano N., Douglas G., Matthews E., Moore, M., Mueller L., Nakajima M., Singer T., Speit G. (2007). Follow-up testing of rodent carcinogens not positive in the standard genotoxicity testing battery: IWGT workgroup report. *Mutat. Res.* 627, 106-116.
- Kekuda R., Prasad P. D., Fei Y. J., Leibach F. H., Ganapathy V. (1996). Cloning and functional expression of the human type 1 sigma receptor (hSigmaR1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 553-558.
- Kerwin R. W. (1994). The new atypical antipsychotics. A lack of extrapyramidal side-effects and new routes in schizophrenia research. *Br. J. Psychiatry* 164, 141-148.
- Kest B., Mogil J. S., Sternberg W. F., Pechnick R. N., Liebeskind J. C. (1995). Antinociception following 1,3-di-o-tolylguanidine, a selective sigma receptor ligand. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50, 587-592.
- King M. T., Wild D. (1983). The mutagenic potential of hyperthermia and fever in mice. *Mutat. Res.* 111, 219-226.
- Kirkland D. (1991) Selection of mutagenicity and cell transformation tests - interpretation of results. En: *Preclinical Evaluation of Peptides and Recombinant Proteins*. Association of the Swedish Pharmaceutical industry and the Swedish National board of Health and Welfare, pp. 49-56.
- Kirkland D., Aardema M., Henderson L., Müller L. (2005). Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat. Res.* 584, 1-256.
- Kirkland D., Marzin D. (2003). An assessment of the genotoxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, the natural dye ingredient of Henna. *Mutat. Res.* 537, 183-199.

- Kirkland D., Pfuhler S., Tweats D., Aardema M., Corvi R., Darroudi F., Elhajouji A., Glatt H., Hastwell P., Hayashi M., Kasper P., Kirchner S., Lynch A., Marzin D., Maurici D., Meunier J. R., Müller L., Nohynek G., Parry J., Parry E., Thybaud V., Tice R., van, B. J., Vanparys P., White P. (2007a). How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutat. Res.* 628, 31-55.
- Kirkland D. J. (1992). Chromosomal aberration tests in vitro: problems with protocol design and interpretation of results. *Mutagenesis* 7, 95-106.
- Kirkland D. J., Aardema M., Banduhn N., Carmichael P., Fautz R., Meunier J. R., Pfuhler S. (2007b). In vitro approaches to develop weight of evidence (WoE) and mode of action (MoA) discussions with positive in vitro genotoxicity results. *Mutagenesis* 22, 161-175.
- Kirkland D. J., Müller L. (2000). Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. *Mutat. Res.* 464, 137-147.
- Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M. Jr., Kirchner S., Lorge E., Morita T., Norppa H., Surralles J., Vanhauwaert A., Wakata A. (2003a). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat. Res.* 540, 153-163.
- Kirsch-Volders M., Vanhauwaert A., Eichenlaub-Ritter U., Decordier I. (2003b). Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol. Lett.* 140-141, 63-74.
- Kohler S. W., Provost G. S., Fieck A., Kretz P. L., Bullock W. O., Putman D. L., Sorge J. A., Short J. M. (1991). Analysis of spontaneous and induced mutations in transgenic mice using a lambda ZAP/lacI shuttle vector. *Environ. Mol. Mutagen.* 18, 316-321.
- Kola I., Landis J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 711-715.
- Koury S. T., Koury M. J., Bondurant M. C. (1989a). Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J. Cell Biol.* 109, 3005-3013.
- Koury S. T., Koury M. J., Bondurant M. C., Caro J., Graber S. E. (1989b). Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood* 74, 645-651.
- Kramer P. J. (1998). Genetic toxicology. *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 395-405.

- Krauss S. W., Lo A. J., Short S. A., Koury M. J., Mohandas N., Chasis J. A. (2005). Nuclear substructure reorganization during late-stage erythropoiesis is selective and does not involve caspase cleavage of major nuclear substructural proteins. *Blood* 106, 2200-2205.
- Krishna G., Urda G., Paulissen J. (2000). Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mutat. Res.* 453, 45-50.
- Krystal J. H., D'Souza D. C., Mathalon D., Perry E., Belger A., Hoffman R. (2003). NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology (Berl)* 169, 215-233.
- Krystal J. H., Karper L. P., Seibyl J. P., Freeman G. K., Delaney R., Bremner J. D., Heninger G. R., Bowers M. B. Jr., Charney D. S. (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch. Gen. Psychiatry* 51, 199-214.
- Kudoh A., Takase H., Takazawa T. (2004). Chronic treatment with antipsychotics enhances intraoperative core hypothermia. *Anesth. Analg.* 98, 111-115.
- Langa F., Codony X., Tovar V., Lavado A., Gimenez E., Cozar P., Cantero M., Dordal A., Hernandez E., Perez R., Monroy X., Zamanillo D., Guitart X., Montoliu L. (2003). Generation and phenotypic analysis of sigma receptor type I (sigma 1) knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2188-2196.
- Largent B. L., Gundlach A. L., Snyder S. H. (1986). Pharmacological and autoradiographic discrimination of sigma and phencyclidine receptor binding sites in brain with (+)-[3H]SKF 10,047, (+)-[3H]-3-[3-hydroxyphenyl]-N-(1-propyl)piperidine and [3H]-1-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238, 739-748.
- Lee J. C., Gimm J. A., Lo A. J., Koury M. J., Krauss S. W., Mohandas N., Chasis J. A. (2004). Mechanism of protein sorting during erythroblast enucleation: role of cytoskeletal connectivity. *Blood* 103, 1912-1919.
- Lenox L. E., Perry J. M., Paulson R. F. (2005). BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood* 105, 2741-2748.
- Lezon C., Alippi R. M., Barcelo A. C., Martinez M. P., Conti M. I., Bozzini C. E. (1995). Depression of stimulated erythropoietin production in mice with enhanced erythropoiesis. *Haematologica* 80, 491-494.

- Lovell D. P., Anderson D., Albanese R., Amphlett G. E., Clare G., Ferguson R., Richold M., Papworth D. G., Savage J. R. K. (1989). Statistical analysis of in vivo cytogenetic assays. En: Statistical evaluation of mutagenicity test data, (UKEMS Guidelines subcommittee report, Part III), pp. 184-232. D.J. Kirkland (Ed), Cambridge University Press.
- Lundgren-Eriksson L., Palm A., Ryd W., Warnhammar E., Hultborn R. (2001). Radio-and chemotoxicity in mice during hypothermia. *Anticancer Res.* 21, 3269-3274.
- MacGregor J. T., Wehr C. M., Gould D. H. (1980). Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environ. Mutagen.* 2, 509-514.
- Maguire G. A. (2002). Prolactin elevation with antipsychotic medications: mechanisms of action and clinical consequences. *J. Clin. Psychiatry* 63 Suppl 4, 56-62.
- Maron D. M., Ames B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173-215.
- Martin W. R., Eades C. G., Thompson J. A., Huppler R. E., Gilbert P. E. (1976). The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197, 517-532.
- Matsumoto R. R., Liu Y., Lerner M., Howard E. W., Brackett D. J. (2003). Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents. *Eur. J. Pharmacol.* 469, 1-12.
- Matsumoto R. R., Pouw B. (2000). Correlation between neuroleptic binding to sigma(1) and sigma(2) receptors and acute dystonic reactions. *Eur. J. Pharmacol.* 401, 155-160.
- Matter B., Schmid W. (1971). Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. *Mutat. Res.* 12, 417-425.
- Maurice T., Martin-Fardon R., Romieu P., Matsumoto R. R. (2002). Sigma(1) (sigma(1)) receptor antagonists represent a new strategy against cocaine addiction and toxicity. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 499-527.
- Mavournin K. H., Blakey D. H., Cimino M. C., Salamone M. F., Heddle J. A. (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 239, 29-80.

- McInerney J. J., Breakell A., Madira W., Davies T. G., Evans P. A. (2002). Accidental hypothermia and active rewarming: the metabolic and inflammatory changes observed above and below 32 degrees C. *Emerg. Med. J.* 19, 219-223.
- Meintieres S., Marzin D. (2004). Apoptosis may contribute to false-positive results in the in vitro micronucleus test performed in extreme osmolality, ionic strength and pH conditions. *Mutat. Res.* 560, 101-118.
- Meltzer H. Y. (1999). The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* 21, 106S-115S.
- Miller B. M., Adler I. D. (1990). Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced in vivo. *Mutagenesis* 5, 411-415.
- Miller B. M., Zitzelsberger H. F., Weier H. U., Adler I. D. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis* 6, 297-302.
- Mitchell A. D., Auletta A. E., Clive D., Kirby P. E., Moore M. M., Myhr B. C. (1997). The L5178Y/tk[±] mouse lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay a phase III report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 394, 177-303.
- Moebius F. F., Reiter R. J., Hanner M., Glossmann H. (1997a). High affinity of sigma 1-binding sites for sterol isomerization inhibitors: evidence for a pharmacological relationship with the yeast sterol C8-C7 isomerase. *Br. J. Pharmacol.* 121, 1-6.
- Moebius F. F., Striessnig J., Glossmann H. (1997b). The mysteries of sigma receptors: new family members reveal a role in cholesterol synthesis. *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 67-70.
- Moore M. M., Clive D., Hozier J. C., Howard B. E., Batson A. G., Turner N. T., Sawyer J. (1985). Analysis of trifluorothymidine-resistant (TFTr) mutants of L5178Y/TK[±] mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.* 151, 161-174.
- Morita T., Nagaki T., Fukuda I., Okumura K. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 268, 297-305.
- Mortelmans K., Zeiger E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455, 29-60.
- Müller L., Blakey D., Dearfield K. L., Galloway S., Guzzie P., Hayashi M., Kasper P., Kirkland D., MacGregor J. T., Parry J. M., Schechtman L., Smith A., Tanaka N., Tweats D., Yamasaki H. (2003). Strategy for genotoxicity testing and stratification

- of genotoxicity test results - report on initial activities of the IWGT Expert Group. *Mutat. Res.* 540, 177-181.
- Müller L., Kasper P. (2000a). Human biological relevance and the use of threshold-arguments in regulatory genotoxicity assessment: experience with pharmaceuticals. *Mutat. Res.* 464, 19-34.
- Müller L., Kikuchi Y., Probst G., Schechtman L., Shimada H., Sofuni T., Tweats D. (1999). ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutat. Res.* 436, 195-225.
- Müller L., Sofuni T. (2000b). Appropriate levels of cytotoxicity for genotoxicity tests using mammalian cells in vitro. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 202-205.
- Nichols D. E. (2004). Hallucinogens. *Pharmacol. Ther.* 101, 131-181.
- Norppa H., Falck G. C. (2003). What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18, 221-233.
- Oerther S. (2000). Temperature set-point changes induced by DA D2/3 and 5-HT1A receptor agonists in the rat. *Neuroreport* 11, 3949-3951.
- Oerther S., Ahlenius S. (2000). Atypical antipsychotics and dopamine D(1) receptor agonism: an in vivo experimental study using core temperature measurements in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 731-736.
- Oerther S., Ahlenius S. (2001). Involvement of 5-HT1A and 5-HT1B receptors for citalopram-induced hypothermia in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 154, 429-434.
- Olson H., Betton G., Robinson D., Thomas K., Monro A., Kolaja G., Lilly P., Sanders J., Sipes G., Bracken W., Dorato M., Van Deun K., Smith P., Berger B., Heller A. (2000). Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32, 56-67.
- OECD (1983). Organization for Economic Co-operation and Development. OECD guideline for testing of chemicals, No. 473. Genetic Toxicology: *In vitro* mammalian cytogenetic test.
- OECD (1997a). Organization for Economic Co-operation and Development. OECD guideline for testing of chemicals, No. 471. Genetic Toxicology: Bacterial Reverse Mutation Test.
- OECD (1997b). Organization for Economic Co-operation and Development. OECD guideline for testing of chemicals, No. 473. Genetic Toxicology: *In vitro* mammalian chromosome aberration test.

- OECD (1997c). Organization for Economic Co-operation and Development. OECD guideline for the testing of chemicals, No. 474. Genetic Toxicology: Mammalian erythrocyte micronucleus test.
- OECD (1997d). Organization for Economic Co-operation and Development. OECD guideline for the testing of chemicals, No. 476. Genetic Toxicology: *In vitro* mammalian cell gene mutation test.
- Parton J. W., Garriott M. L., Beyers J. E. (1991). Expulsion of demecolcine-induced micronuclei from mouse bone marrow polychromatic erythrocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 17, 79-83.
- Perachon S., Betancur C., Pilon C., Rostene W., Schwartz J. C., Sokoloff P. (2000). Role of dopamine D3 receptors in thermoregulation: a reappraisal. *Neuroreport* 11, 221-225.
- Petrozzi L., Lucetti C., Scarpato R., Gambaccini G., Trippi F., Bernardini S., Del Dotto P., Migliore L., Bonuccelli U. (2002). Cytogenetic alterations in lymphocytes of Alzheimer's disease and Parkinson's disease patients. *Neurol. Sci.* 23 Suppl 2, S97-S98.
- Pfuhler S., Albertini S., Fautz R., Herbold B., Madle S., Utesch D., Poth A. (2007). Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part IV: Recommendation of a working group of the Gesellschaft fuer Umwelt-Mutationsforschung (GUM) for a simple and straightforward approach to genotoxicity testing. *Toxicol. Sci.* 97, 237-240.
- Quirion R., Bowen W. D., Itzhak Y., Junien J. L., Musacchio J. M., Rothman R. B., Su T. P., Tam S. W., Taylor D. P. (1992). A proposal for the classification of sigma binding sites. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 85-86.
- Radomsky E. D., Haas G. L., Mann J. J., Sweeney J. A. (1999). Suicidal behavior in patients with schizophrenia and other psychotic disorders. *Am. J. Psychiatry* 156, 1590-1595.
- Rawls S. M., Baron D. A., Geller E. B., Adler M. W. (2002). Sigma sites mediate DTG-evoked hypothermia in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 779-786.
- Renaudo A., Watry V., Chassot A. A., Ponzio G., Ehrenfeld J., Soriani O. (2004). Inhibition of tumor cell proliferation by sigma ligands is associated with K⁺ Channel inhibition and p27kip1 accumulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 1105-1114.
- Richardson C., Williams J. A., Allen J. A., Amphlett G., Chanter D. O., Philips B. (1989). Analysis of data from *in vitro* cytogenetic assays. En: Statistical evaluation of mutagenicity test data, (UKEMS Guidelines subcommittee report, Part III) pp. 141-154. D.J. Kirkland (Ed), Cambridge University Press.

- Ronsisvalle G., Marrazzo A., Prezzavento O., Cagnotto A., Mennini T., Parenti C., Scoto G. M. (2001). Opioid and sigma receptor studies. New developments in the design of selective sigma ligands. *Pure Appl. Chem.* 73, 1499-1509.
- Russell W. M. S., Burch R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, 1959 (Reprinted by Universities Federation for Animal Welfare, 1992).
- Salamone M. F., Mavournin K. H. (1994). Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environ. Mol. Mutagen.* 23, 239-273.
- Schmid W. (1975). The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31, 9-15.
- Scott D., Galloway S. M., Marshall R. R., Ishidate M. Jr., Brusick D., Ashby J., Myhr B. C. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutat. Res.* 257, 147-205.
- Seglen P. O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 13, 29-83.
- Shuey D. L., Gudi R., Krsmanovic L., Gerson R. J. (2007). Evidence that oxymorphone-induced increases in micronuclei occur secondary to hyperthermia. *Toxicol. Sci.* 95, 369-375.
- Sisken J. E., Morasca L., Kibby S. (1965). Effects of temperature on the kinetics of the mitotic cycle of mammalian cells in culture. *Exp. Cell Res.* 39, 103-116.
- Snyder R. D., Diehl M. S. (2005). Hypoxia-induced micronucleus formation in mice. *Drug Chem. Toxicol.* 28, 373-378.
- Snyder R. D., Green J. W. (2001). A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutat. Res.* 488, 151-169.
- Sonoda Y., Sasaki K., Suda M., Itano C., Iwatsuki H. (1998). Effects of colchicine on the enucleation of erythroid cells and macrophages in the liver of mouse embryos: ultrastructural and three-dimensional studies. *Anat. Rec.* 251, 290-296.
- Spencer P. J., Gollapudi B. B., Waechter J. M., Jr. (2007). Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia. *Toxicol. Sci.* 97, 120-127.
- Spencer P. J., Grundy J. G., Waechter J. M., Gollapudi B. (2005). The contribution of non-chemically induced hypothermia in the formation of micronuclei (MN) in the mouse bone marrow micronucleus test (MNT). *Toxicol. Sci. (The Toxicologist)* 84, 453, Abstract-2211.

- Steinheider G., Neth R., Marquardt H. (1985). Evaluation of nongenotoxic and genotoxic factors modulating the frequency of micronucleated erythrocytes in the peripheral blood of mice. *Cell Biol. Toxicol.* 1, 197-211.
- Stopper H., Müller S. O. (1997). Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. *Toxicology in Vitro* 11, 661-667.
- Su T. P., Hayashi T. (2003). Understanding the molecular mechanism of sigma-1 receptors: towards a hypothesis that sigma-1 receptors are intracellular amplifiers for signal transduction. *Curr. Med. Chem.* 10, 2073-2080.
- Su T. P., London E. D., Jaffe J. H. (1988). Steroid binding at sigma receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune systems. *Science* 240, 219-221.
- Suzuki M., Ohneda K., Hosoya-Ohmura S., Tsukamoto S., Ohneda O., Philipsen S., Yamamoto M. (2006). Real-time monitoring of stress erythropoiesis in vivo using Gata1 and beta-globin LCR luciferase transgenic mice. *Blood* 108, 726-733.
- Suzuki Y., Nagae Y., Ishikawa T., Watanabe Y., Nagashima T., Matsukubo K., Shimizu H. (1989). Effect of erythropoietin on the micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 13, 314-318.
- Suzuki Y., Shimizu H., Nagae Y., Fukumoto M., Okonogi H., Kadokura M. (1993). Micronucleus test and erythropoiesis: effect of cobalt on the induction of micronuclei by mutagens. *Environ. Mol. Mutagen.* 22, 101-106.
- Suzuki Y., Takagi R., Kawasaki I., Matsudaira T., Yanagisawa H., Shimizu H. (2008). The micronucleus test and erythropoiesis: Effects of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) on micronucleus formation. *Mutat. Res.* 655, 47-51.
- Takahashi S., Sonehara K., Takagi K., Miwa T., Horikomi K., Mita N., Nagase H., Iizuka K., Sakai K. (1999). Pharmacological profile of MS-377, a novel antipsychotic agent with selective affinity for sigma receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 145, 295-302.
- Takano-Ohmuro H., Mukaida M., Morioka K. (1996). Distribution of actin, myosin, and spectrin during enucleation in erythroid cells of hamster embryo. *Cell Motil. Cytoskeleton* 34, 95-107.
- Tinwell H., Ashby J. (1991). Micronucleus morphology as a means to distinguish aneugens and clastogens in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutagenesis* 6, 193-198.
- Torous D. K., Hall N. E., Illi-Love A. H., Diehl M. S., Cederbrant K., Sandelin K., Ponten I., Bolcsfoldi G., Ferguson L. R., Pearson A., Majeska J. B., Tarca J. P., Hynes G. M.,

- Lynch A. M., McNamee J. P., Bellier P. V., Parenteau M., Blakey D., Bayley J., van der Leede B. J., Vanparys P., Harbach P. R., Zhao S., Filipunas A. L., Johnson C. W., Tometsko C. R., Dertinger S. D. (2005). Interlaboratory validation of a CD71-based flow cytometric method (Microflow) for the scoring of micronucleated reticulocytes in mouse peripheral blood. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 44-55.
- Tsai G., Coyle J. T. (2002). Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 165-179.
- Tweats D. J., Blakey D., Heflich R. H., Jacobs A., Jacobsen S. D., Morita T., Nohmi T., O'Donovan M. R., Sasaki Y. F., Sofuni T., Tice R. (2007a). Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory in vivo tests I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. *Mutat. Res.* 627, 78-91.
- Tweats D. J., Blakey D., Heflich R. H., Jacobs A., Jacobsen S. D., Morita T., Nohmi T., O'donovan M. R., Sasaki Y. F., Sofuni T., Tice R. (2007b). Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. *Mutat. Res.* 627, 92-105.
- Van Hummelen P., Deleener A., Vanparys P., Kirsch-Volders M. (1992). Discrimination of aneuploidogens from clastogens by C-banding, DNA and area measurements of micronuclei from mouse bone marrow. *Mutat. Res.* 271, 13-28.
- Vander J. B., Harris C. A., Elli S. R. (1963). Reticulocyte counts by means of fluorescence microscopy. *J. Lab Clin. Med.* 62, 132-140.
- Vanparys P., Deknudt G., Vermeiren F., Sysmans M., Marsboom R. (1992). Sampling times in micronucleus testing. *Mutat. Res.* 282, 191-196.
- Vanparys P., Vermeiren F., Sysmans M., Temmerman R. (1990). The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat. Res.* 244, 95-103.
- Vassal T., Benoit-Gonin B., Carrat F., Guidet B., Maury E., Offenstadt G. (2001). Severe accidental hypothermia treated in an ICU: prognosis and outcome. *Chest* 120, 1998-2003.
- Wahnschaffe U., Bitsch A., Kielhorn J., Mangelsdorf I. (2005). Mutagenicity testing with transgenic mice. Part I: Comparison with the mouse bone marrow micronucleus test. *J. Carcinog.* 4, 3.
- Wallin M., Billger M., Stromberg T., Stromberg E. (1993). Assembly of Atlantic cod (*Gadus morhua*) brain microtubules at different temperatures: dependency of microtubule-

- associated proteins is relative to temperature. *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 200-205.
- Wang L., Prescott A. R., Spruce B. A., Sanderson J., Duncan G. (2005). Sigma receptor antagonists inhibit human lens cell growth and induce pigmentation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 1403-1408.
- WMA (2002). World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *Nurs. Ethics* 9, 105-109.
- Wolfe S. A. Jr., Kulsakdinun C., Battaglia G., Jaffe J. H., De Souza E. B. (1988). Initial identification and characterization of sigma receptors on human peripheral blood leukocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247, 1114-1119.
- Wong K. C. (1983). Physiology and pharmacology of hypothermia. *West J. Med.* 138, 227-232.
- Wood S. C. (1991). Interactions between hypoxia and hypothermia. *Annu. Rev. Physiol* 53, 71-85.
- Yajima N., Kurata Y., Sawai T., Takeshita Y. (1993a). Comparative studies in induction of micronuclei by three genetically recombinant and urinary human erythropoietins. *Mutagenesis* 8, 237-241.
- Yajima N., Kurata Y., Sawai T., Takeshita Y. (1993b). Induction of micronucleated erythrocytes by recombinant human erythropoietin. *Mutagenesis* 8, 221-229.
- Yamamoto K. I., Kikuchi Y. (1980). A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat. Res.* 71, 127-131.
- Zeiger E. (1998). Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 28, 85-95.

7. ANEXOS

ANEXO 1

Induction of micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes in association with hypothermia after administration of the sigma receptor ligand E-5842.

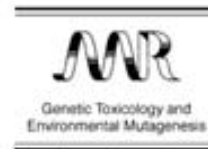
Guzmán A., García C., Marín A.P., Ruiz M.T., Tortajada A., Fernández de Henestrosa A.R.

Mutat. Res. 2004: 565 11-22.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Mutation Research 565 (2004) 11–22

www.elsevier.com/locate/genotoxCommunity address: www.elsevier.com/locate/mutres

Induction of micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes in association with hypothermia after administration of the sigma receptor ligand E-5842

Antonio Guzmán*, Concepción García, Ana-Paz Marín, Maria Teresa Ruiz, Araceli Tortajada, Antonio R. Fernández de Henestrosa

Department of Toxicology, ESTEVE, Mare de Déu de Montserrat 221, 08041 Barcelona, Spain

Received 6 May 2004; received in revised form 20 July 2004; accepted 13 August 2004

Available online 18 October 2004

Abstract

Oral administration of E-5842, a new σ_1 receptor ligand being developed as an antipsychotic drug, to male mice at single doses of 50, 100, 200 and 400 mg/kg produced marked and sustained decreases in rectal temperature. Both the intensity and the duration of the hypothermic effect increased with dose. Maximum decreases from the mean pre-administration temperature (36.2 °C) ranged from 7.5 to 12.9 °C for animals receiving 50 and 400 mg/kg doses, respectively. Examination of bone-marrow smears obtained 24, 48 and 72 h after administration revealed a slight but statistically significant ($p < 0.05$) increase in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) at the 48 h sampling for animals receiving the 200 mg/kg dose. These animals showed decreases from pre-administration temperature of approximately 12 °C, with recovery being observed 24 h after administration. When the hypothermic effect of E-5842 administration was avoided by housing treated animals under conditions of increased environmental temperature (30 °C) for 24 h, MNPCE frequency reverted to vehicle control values. Further, in E-5842-treated animals with an increased MNPCE frequency there was a shift in the distribution of the relative areas of micronuclei in MNPCE towards higher values. In addition, there was a statistically significant increase ($p < 0.001$) in the number of relatively large micronuclei (micronucleus diameter $\geq 1/4$ cytoplasm diameter) similar to that produced by administration of the mitotic spindle inhibitor colchicine (1 mg/kg), suggesting disturbance of mitotic apparatus as the possible underlying mechanism. The results suggest that the slight increase in MNPCE frequency observed 48 h after administration of a 200 mg/kg dose of E-5842 is due to a hypothermic effect and not to a direct effect of E-5842 on DNA.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Sigma receptor; Hypothermia-induced micronuclei; Micronucleus assay; Genotoxicity; Antipsychotic drug

1. Introduction

Genotoxicity studies are an important and mandatory component of the preclinical safety-assessment

* Corresponding author. Tel.: +34 93 446 6065;

fax: +34 93 450 1611.

E-mail address: aguzman@esteve.es (A. Guzmán).

program that forms part of the development process of a new pharmaceutical compound. The relevance of assessing the possible genotoxic potential of a compound relies on the fact that genotoxic activity and related events are considered to be associated with and essential for the induction of carcinogenesis and hereditary defects. The mouse micronucleus assay constitutes a pivotal component of the standard battery of genotoxicity assays [1] because it is an *in vivo* assay that takes full account of the biological processes of absorption, distribution, metabolism and excretion of a pharmaceutical.

E-5842 (4-(4-fluorophenyl)-1,2,3,6-tetrahydro-1-[4-(1,2,4-triazol-1-yl) butyl] pyridine citrate, CAS-220120-14-9) is a new compound with very high affinity for the σ_1 receptor ($K_i = 4$ nM) being actually developed as potential atypical antipsychotic drug [2].

As part of the safety-assessment program for this compound, E-5842 has been tested for genotoxic potential in a single dose mouse bone-marrow micronucleus assay (unpublished results). In this assay E-5842 was administered to mice by the oral route (gavage) at dose levels of 100, 200 and 400 mg/kg and bone-marrow smears were obtained 24, 48 and 72 h after administration. Although no statistically significant increase in mean MNPCE frequency was observed at any tested dose or sampling time, the mean MNPCE frequency value observed at the intermediate dose of 200 mg/kg at the 48 h sampling time (5.3%), in the absence of bone-marrow toxicity, was considered to slightly exceed the upper range of the historical vehicle control mean values obtained with this strain of mice at this laboratory (range: 1.1–3.3%; $n = 332$). This atypical pattern in the MNPCE frequency was considered to warrant further research.

For *in vitro* studies it has long been recognised that indirect, stress-related effects can produce positive results which are not considered representative of genotoxic potential of the substance under investigation, e.g., pH changes, increased osmolality and inhibition of DNA synthesis [3–5]. For an *in vivo* assay like the mouse micronucleus test similar indirect effects associated with physiological perturbations have also been acknowledged, with procedures like bleeding or chemically-induced hemolysis [3,6], and erythropoietin administration [7,8] causing increases in micronucleus formation. Increases in MNPCE frequency in bone marrow of CD-1 male mice have also been re-

ported after deprivation of both food and water [9]. Some of these procedures have been proposed as a means to enhance the sensitivity of this assay [10,11]. In particular, chemically and environmentally induced changes in core temperature have been reported as potential confounding factors for micronucleus formation in both mice and rats [12–16]. It has been reported by Asanami et al. [16–18] that administration of reserpine or chlorpromazine to mice caused a slight increase in MNPCE frequency in bone-marrow cells in association with a decrease in body temperature, and they proved that the increase in MNPCE frequency was absent when the hypothermic conditions were avoided.

In this paper, we describe the follow-up studies that were performed to investigate the possible mechanism by which oral administration to mice of a 200 mg/kg dose of E-5842 induced, 48 h after administration, a slight increase in MNPCE frequency in the bone marrow. We examined the hypothermia-inducing potential of E-5842 after oral administration to mice, and its relation with the observed increase in MNPCE frequency. In order to elucidate the possible mechanism causing the increase in MNPCE frequency observed in association with the hypothermic conditions, we also examined the morphology of the micronuclei.

2. Materials and methods

2.1. Test substance

E-5842 (Fig. 1) bulk powder was synthesised by Laboratorios Dr. Esteve (Barcelona, Spain). Purity was 99.4%. Test article solutions were prepared by dis-

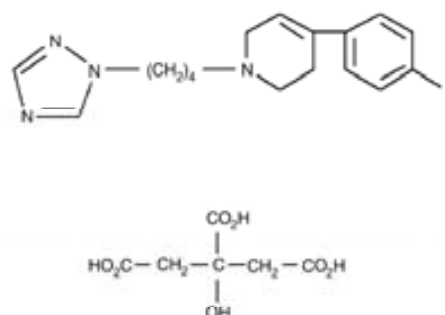


Fig. 1. Chemical structure of E-5842.

solving E-5842 in reverse-osmosis water immediately prior to administration to the animals. The vehicle (reverse-osmosis water) was used as a negative control. Cyclophosphamide (CP, Sigma) dissolved in reverse-osmosis water at a final concentration of 2.5 mg/ml (dose of 25 mg/kg bw), and colchicine (COL, Sigma) dissolved in sterile saline at a final concentration of 0.1 mg/ml (dose of 1 mg/kg bw) were used as reference controls with clastogenic and aneugenic activity, respectively. All other chemicals were of the purest grade available. All animals were given oral doses by gavage at a dose volume of 10 ml/kg bodyweight, except for colchicine, which was administered by i.p. injection at the same volume.

2.2. Animals

For the conduct of these follow-up-experiments male mice were used, because this sex is generally considered to be quantitatively the higher responder [19,20]. Male mice of the CD-1 strain (Hsd:ICR) were obtained from Harlan, UK. Animals were randomly allocated to treatment groups and caged in groups of maximum five animals. At the start of treatment the animals were 7–9 weeks of age and weighed 20.5–31.0 g. Animals were housed in air-conditioned rooms, with temperature and relative humidity set at target values of 22°C and 50%; lighting was controlled to give a 12 h light: 12 h dark cycle. Animals were allowed free access to commercial rodent diet (Panlab S.L.) and allowed to acclimatise to the conditions described for minimum 5 days before treatment. All procedures involving animals and their care were conducted in strict conformity with the European Community Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [21].

2.3. Mouse bone marrow micronucleus assays

In a first experiment, groups of male mice received, orally by gavage, single doses of 50, 100, 200 or 400 mg/kg of E-5842. Rectal temperature measurements were performed (at the stated times) in order to investigate the possible hypothermia-inducing potential of E-5842. In order to check for effects on MN-PCE frequency, bone-marrow smears were obtained 24, 48 and 72 h after E-5842 administration from a minimum of three animals/dose/sampling time, except when the numbers were reduced by mortality. Bone-

marrow smears from vehicle (reverse-osmosis water) control animals were obtained 24 h after administration.

In a second experiment, E-5842 was administered at doses of 50, 100 or 200 mg/kg to groups of male mice. For this assay, the 400 mg/kg dose was omitted due to the excessive mortality observed at this dose in the first experiment. Control animals received reverse-osmosis water. For each of these treatments, a first sub-group of animals was housed under normal room-temperature conditions while a second similar sub-group was housed under conditions of increased environmental temperature (30°C) for 24 h. By this means, we tried to avoid the hypothermic effect produced by E-5842 administration, thus isolating the possible effect of this compound on bone-marrow cells from that of hypothermia. Rectal temperature was recorded (at the stated times), and bone-marrow samples were obtained from all treatment groups 48 h after administration. Samples were also obtained 24 h after administration from vehicle control and 200 mg/kg treated animals in order to check for possible changes in kinetics of micronucleus formation due to the increased environmental temperature. Bone-marrow smears were obtained from a minimum of five animals/treatment group/sampling time, except when the numbers were reduced by mortality.

Two additional groups of male animals were given CP (25 mg/kg bw) or COL (1 mg/kg bw) by the oral and intraperitoneal route, respectively. Bone-marrow smears from these animals were obtained 24 h after administration. Cyclophosphamide and colchicine acted as positive controls for the micronucleus test, and, for the assessment of micronucleus size, as reference compounds with clastogenic and aneugenic effects, respectively.

For preparation of bone-marrow smears, test animals were sacrificed by cervical dislocation at the scheduled sampling times. For each animal, the femurs were dissected and a direct bone-marrow smear was prepared on a slide containing a drop of foetal calf serum (two slides per animal). The smears were fixed with methanol and stained with 5% Giemsa. Slides were coded and examined by light microscopy. For each animal, the relative proportion of polychromatic erythrocytes (PCE) and normochromatic erythrocytes (NCE) was determined by counting a total of 1000 erythrocytes. The number of micronucleated polychro-

matic erythrocytes (MNPCE) among 2000 PCE was determined. The number of micronucleated PCE in the different treatment groups was compared with the corresponding value in the vehicle control group by means of an ANOVA followed by the Dunnett's test [22] after rank transformation of the data.

2.4. Increased environmental temperature

Animals housed under conditions of increased environmental temperature were placed in Makrolon® cages and housed in a hot-air heater (Model 381, Selecta), with an internal environmental temperature of 30 °C and approximately 30% relative humidity. We used this system because convective warming has shown to be a superior method for attenuating body temperature reduction [23]. The heater was kept in the same experimental room in which the remaining animals were housed. Animals were housed under increased environmental temperature immediately after E-5842 or vehicle administration and kept under these conditions for 24 h. Afterwards, all animals were kept under normal animal room conditions until sacrifice to obtain bone-marrow smears.

2.5. Rectal temperature measurements

The rectal temperature of the animals was recorded by means of a digital thermometer (Pb 0331, Panlab) connected to a thermal probe (Model 443, Selecta). At the scheduled time points, the probe was carefully inserted rectally in the mouse (about 18 mm), which was gently restrained with one hand. The temperature was recorded 5 s after readout stabilisation. Measurements were performed on all control and E-5842-treated animals just before dosing (basal temperature) and at 1, 2, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 16, 24, 48 and 72 h after administration in the first experiment, and at 1, 4, 8, 10, 12 and 24 h after dosing in the second experiment.

2.6. Micronucleus size determination

Bone-marrow samples from five animals each receiving reverse-osmosis water or 200 mg/kg of E-5842 (48 h sampling; normal room temperature conditions), and from animals receiving COL (1 mg/kg) or CP (25 mg/kg) were examined by light microscopy, and digital pictures from a total of 30 MNPCE/animal were

captured with a digital camera (Olympus DP11) connected to the microscope. The diameter (d) and area (a) of each micronucleus and that of its corresponding polychromatic erythrocyte (D and A , respectively) were determined by means of a computer programme (SigmaScan Pro 5.0.0, SPSS Inc.), and relative sizes were established. Relative diameter and area values were expressed in arbitrary units. The pattern of area distribution of the micronuclei for each treatment group was assessed by drawing histograms with individual relative area values grouped into arbitrary classes (class 1, 1–5; 2, 6–10; 3, 11–15; 4, 16–20; 5, 21–25; 6, 26–30; 7, 31–35; 8, >35), as suggested by Vanparys et al. [24]. According to the criteria of Yamamoto and Kikuchi [25], a micronucleus was classified as 'large' when its diameter was equal to or larger than 25% of the diameter of its corresponding polychromatic erythrocyte (i.e., " $d \geq 1/4D$ "). The number of large micronuclei in different treatment groups was compared with the vehicle-control group by means of an ANOVA followed by the Dunnett's test [22] after rank transformation of the data.

3. Results

3.1. First experiment

The death of one animal receiving a 200 mg/kg dose of E-5842 and of two animals receiving a 400 mg/kg dose was recorded. High-dose animals that were moribund were replaced by satellite animals that had been given the same dose. Oral administration of E-5842 at doses ranging from 50 to 400 mg/kg caused marked and sustained decreases in mean rectal temperature (Fig. 2). Both intensity and duration of the hypothermic effect increased with the administered dose. No significant changes in mean rectal temperature values in vehicle-control animals were observed. While the mean rectal temperature before administration was 36.2 ± 1.19 °C ($n=94$), 1 h after administration decreases in mean rectal temperature of 6.1–7.6 °C compared with pre-administration values were already observed in animals receiving E-5842 at dose levels of 50 and 400 mg/kg, respectively. Maximum decreases in mean rectal temperature values were reached 6 and 9 h after administration in animals receiving a dose of 50 and 100 mg/kg, respectively, and 11 h after administration in those receiving doses of 200 or 400 mg/kg. Mean

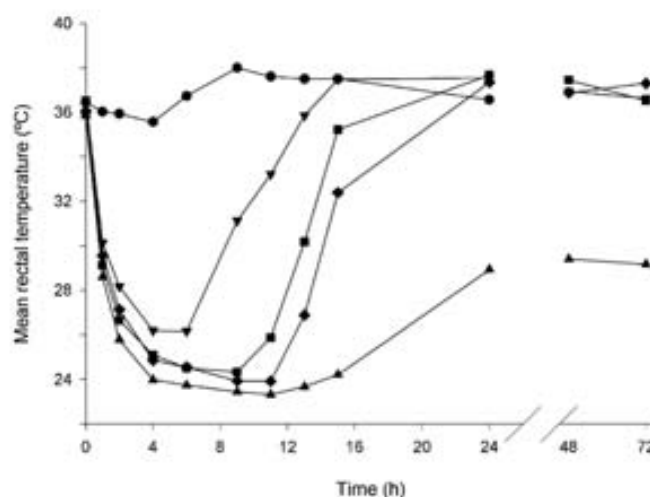


Fig. 2. Effect of E-5842 on mouse rectal temperature. Rectal temperature was registered with a digital thermometer as mentioned in Section 2 at 12 time points during 48 h after administration of either, vehicle (●) or E-5842 at different doses: 50 mg/kg (▼), 100 mg/kg (■), 200 mg/kg (◆) or 400 mg/kg (▲). Results indicated that administration of E-5842 to CD-1 mice induced a marked dose-dependent decrease in body temperature as compared with the vehicle control.

rectal temperature values attained at these time points were as low as 23.9 and 23.3 °C for animals receiving doses of 200 and 400 mg/kg, respectively, thus representing decreases of 12.3 and 12.9 °C from mean pre-administration value. Recovery of mean rectal temperature to pre-administration values was observed 15 h after administration in animals receiving the 50 mg/kg dose, and 24 h after administration in those receiving 100 or 200 mg/kg. In animals receiving the 400 mg/kg dose no recovery was observed even 72 h after administration.

Examination of bone-marrow smears revealed a slight but statistically significant ($p < 0.05$) increase in MNPCE frequency at the 48 h sampling in animals receiving the 200 mg/kg dose (Table 1). No such effect was observed in the other treatment groups or at other sampling times. A very marginal increase in mean and individual MNPCE values seemed to be apparent at the 72 h sampling in animals receiving the 400 mg/kg dose. The marked decrease in mean PCE/NCE ratio observed at the 72 h sampling in animals receiving 400 mg/kg was considered indicative of bone-marrow toxicity, and may have accounted for the absence of an effect on MNPCE frequency at the 48 h sampling, as observed for the 200 mg/kg dose, and the marginal increase observed at 72 h. There was no evidence of

bone-marrow toxicity in the remaining E-5842-treated groups.

3.2. Second experiment

Among animals that received E-5842 and were housed under increased environmental temperature conditions the death of 1 animal receiving the 100 mg/kg dose and of three animals receiving the 200 mg/kg dose was recorded. No deaths were recorded among animals housed under normal room temperature conditions. This difference in mortality incidence was considered most probably related to background noise inside the heater. Mice receiving these high doses of E-5842 were in a state of marked CNS excitation, with convulsions and, as a consequence, death being provoked by slight increases in background noise. This is a common effect observed when dosing rodents with high dosages of CNS-active compounds. High-dose animals that were moribund were replaced with satellite animals that had been given the same dose.

Animals that received E-5842 and were housed under normal room temperature conditions (22 °C) experienced, as observed in the first experiment, marked and sustained decreases in rectal temperature (Fig. 3). Both intensity and duration of the

Table 1
First mouse bone marrow micronucleus assay with E-5842

Sampling time (h)	Treatment	Dose (mg/kg)	N	PCE/NCE (mean \pm S.D.)	MNPCE	
					Individual data/2000 PCEs	Group mean/1000 PCEs (mean \pm S.D.)
24	Vehicle	–	3	0.94 \pm 0.58	4, 0, 5	1.5 \pm 1.32
	E-5842	50	3	1.09 \pm 0.29	8, 4, 6	3.0 \pm 1.00
		100	3	0.77 \pm 0.24	4, 5, 4	2.2 \pm 0.29
		200	3	0.88 \pm 0.50	5, 3, 5	2.2 \pm 0.58
		400	3	1.42 \pm 0.98	0, 3, 3	1.0 \pm 0.87
48	E-5842	50	3	1.02 \pm 0.56	2, 4, 5	1.8 \pm 0.76
		100	3	0.77 \pm 0.29	4, 5, 3	2.0 \pm 0.50
		200	3	0.88 \pm 0.07	10, 10, 12	5.3 \pm 0.58 ^b
		400	3	1.06 \pm 0.35	5, 4, 8	2.8 \pm 1.04
			3	1.25 \pm 0.78	2, 6, 2	1.7 \pm 1.15
72	E-5842	100	3	1.57 \pm 0.21	3, 2, 3	1.3 \pm 0.29
		200	2 ^a	1.92 \pm 0.73	4, 5	2.3 \pm 0.35
		400	3	0.43 \pm 0.21	7, 7, 5	3.2 \pm 0.58
			3			

^a Group size reduced because of mortality.

^b $p < 0.05$ ANOVA; Dunnett test.

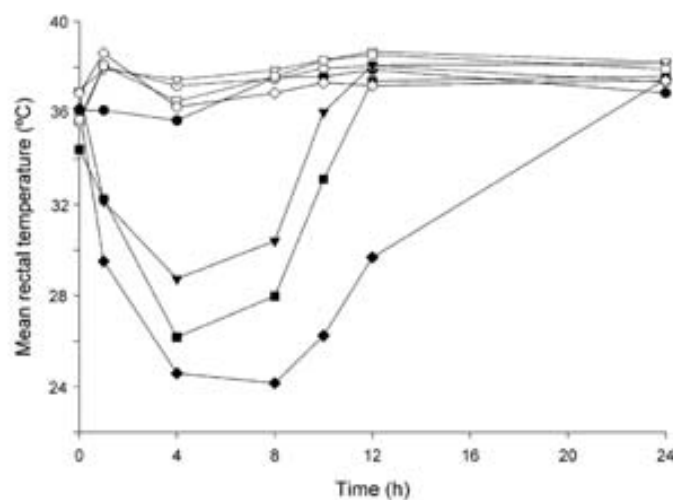


Fig. 3. Effect of E-5842 administration on mouse rectal temperature. Rectal temperature was registered with a digital thermometer at seven time points during a 24 h period as detailed in Section 2. Animals were housed either under normal room temperature conditions (closed symbols) or increased environmental temperature conditions (open symbols). Animals receiving 50 mg/kg (▼), 100 mg/kg (■) or 200 mg/kg (◆) of E-5842, and kept at normal room temperature showed as observed previously, a marked dose-dependent decrease of body temperature compared with the vehicle control (●). However, animals receiving 50 mg/kg (▽), 100 mg/kg (□) or 200 mg/kg (◇) of E-5842 but housed under conditions of increased environmental temperature did not show any significant variation of body temperature as compare to vehicle control (○).

Table 2
Second mouse bone marrow micronucleus assay with E-5842

Environmental condition	Treatment	Dose (mg/kg)	Sampling time (h)	N	PCE/NCE (mean \pm S.D.)	MNPCE	
						Individual data/2000 PCEs	Group mean/1000
RT	Vehicle	–	24	5	1.53 \pm 0.09	2, 4, 1, 4, 1	1.2 \pm 0.76
		–	48	5	0.99 \pm 0.36	2, 2, 3, 8, 2	1.7 \pm 1.30
	E-5842	50	48	5	1.08 \pm 0.56	2, 6, 4, 6, 3	2.1 \pm 0.89
		100	48	5	1.28 \pm 0.63	5, 2, 4, 4, 4	1.9 \pm 0.55
		200	24	5	1.50 \pm 0.30	4, 3, 7, 2, 5	1.9 \pm 0.96
		200	48	5	1.25 \pm 0.33	6, 5, 9, 6, 8	3.4 \pm 0.82 ^a
Heater	Vehicle	–	48	5	1.08 \pm 0.25	4, 4, 5, 2, 3	1.8 \pm 0.57
		E-5842	50	48	5	1.30 \pm 0.91	1, 3, 3, 3, 4
	100		48	4	0.98 \pm 0.71	4, 4, 2, 1, –	1.4 \pm 0.75
	200		24	5	1.07 \pm 0.43	0, 3, 0, 2, 1	1.3 \pm 0.65
	200		48	5	1.05 \pm 0.30	2, 1, 0, 5, 3	1.1 \pm 0.96

^a $p < 0.05$ ANOVA; Dunnett test.

hypothermic effect increased with the dose. No changes in rectal temperature were observed in the matching vehicle-control animals. Already, 1 h after administration, decreases that ranged from 4 to 6.7 °C from the mean pre-administration rectal temperature value (36.2 °C), were measured in animals receiving 50 and 200 mg/kg, respectively. Maximum decreases in mean rectal temperatures were attained 4 h after administration in animals receiving doses of 50 or 100 mg/kg, and 8 h after administration in those receiving 200 mg/kg. At these time points, mean rectal temperature values of 28.7, 26.2 and 24.2 °C were attained in animals receiving 50, 100 and 200 mg/kg, respectively, thus representing decreases of 7.5, 10 and 12.0 °C from the mean pre-administration value. Recovery of rectal temperature to pre-administration values was observed 10, 12 and 24 h after administration in animals receiving 50, 100 and 200 mg/kg, respectively. In contrast, animals that received E-5842 and were housed under increased environmental temperature conditions (30 °C) for 24 h experienced no decrease in rectal temperature values. In these animals, the rectal temperature was similar, all throughout the observation period, both to pre-administration values and to those of the matching vehicle-control group animals.

Examination of bone-marrow smears revealed a slight but statistically significant ($p < 0.05$) increase in MNPCE frequency at the 48 h sampling time in animals that received the 200 mg/kg dose and were

housed under normal room temperature conditions (Table 2).

In animals that received this same dose of 200 mg/kg, but in which the hypothermic effect of E-5842 was avoided by housing them under increased environmental temperature conditions, no increase in MNPCE frequency was observed at any sampling time. The absence of an effect on MNPCE frequency at the 24 h sampling time in animals that received 200 mg/kg and were housed under increased environmental temperature conditions would indicate that the absence of an effect at 48 h was not due to a change in kinetics of MNPCE formation due to hypothermia avoidance. No effect on MNPCE frequency was observed in animals receiving the 50 and 100 mg/kg doses, irrespective of their housing conditions. No evidence of bone-marrow toxicity was observed at any of the treatment groups or sampling times.

3.3. Micronucleus size assessment

Bone-marrow examination confirmed that the reference compounds CP and COL induced marked and statistically significant increases ($p < 0.01$) in MNPCE frequency (Table 3).

Assessment of micronucleus size in animals receiving E-5842 or COL showed a shift in the distribution of relative areas of micronuclei in MNPCE towards high relative area values, as compared to vehicle controls or CP-treated animals (Fig. 4). Relative area values of

Table 3
MNPCEs containing relative large micronuclei ($d \geq 1/4D$)

Treatment	Dose (mg/kg)	N	PCE/NCE (mean \pm S.D.)	MNPCE/1000 PCE (mean \pm S.D.)	Large MN/30 MNPCE	
					Individual data	Group (mean \pm S.D. (%))
Vehicle	–	5	0.99 \pm 0.36	1.7 \pm 1.30	0, 0, 0, 0, 0	0 \pm 0
E-5842	200	5	1.25 \pm 0.33	3.4 \pm 0.82 ^a	3, 8, 3, 2, 3	12.7 \pm 7.12 ^c
CP	25	5	1.05 \pm 0.09	18.6 \pm 3.80 ^b	0, 0, 0, 0, 0	0 \pm 0
Colchicine	1	5	0.74 \pm 0.25	16.8 \pm 8.70 ^b	1, 1, 4, 5, 3	9.3 \pm 5.33 ^c

^a $p < 0.05$.

^b $p < 0.01$.

^c $p < 0.001$ ANOVA; Dunnett test.

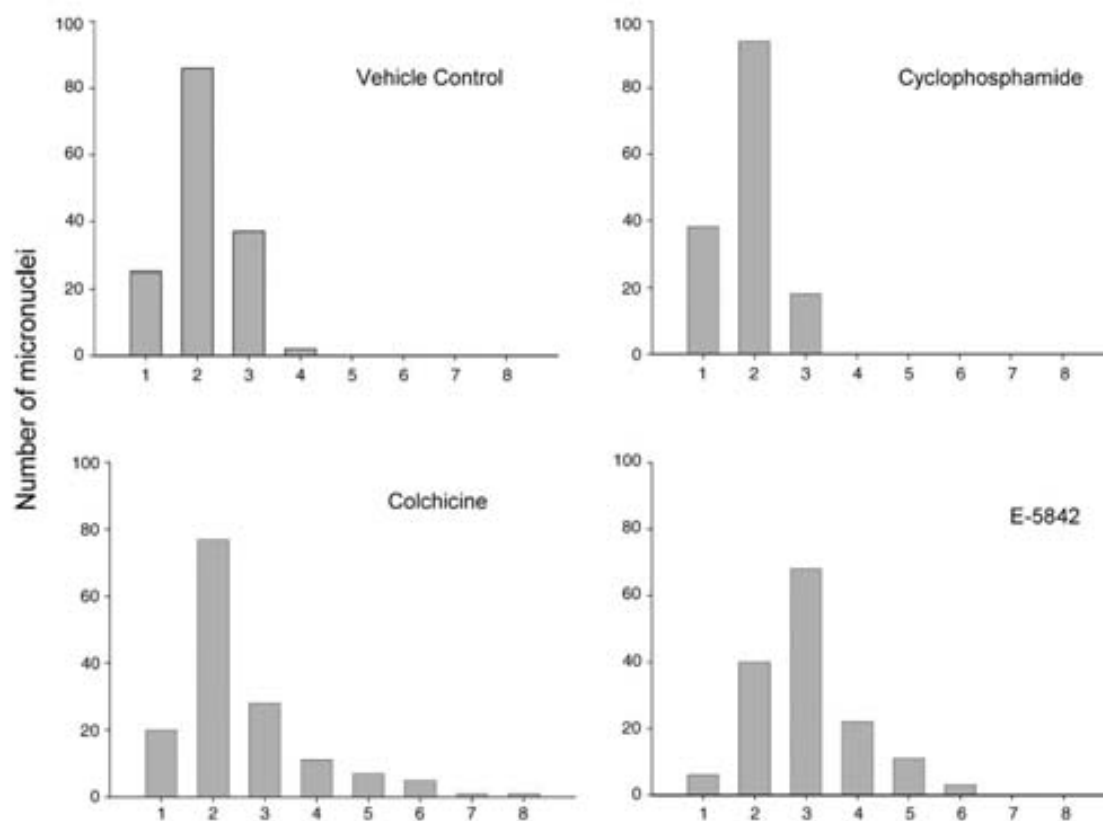


Fig. 4. Assessment of micronucleus size by E-5842-induced hypothermia. Distribution of relative areas of 150 micronuclei per treatment with either vehicle, cyclophosphamide, colchicine or E-5842, was performed and divided into eight arbitrary size classes as suggested by Vanparys et al. [24]. The distribution pattern of micronuclei in the presence of E-5842 resembles that shown by colchicine, suggesting that the hypothermia induced by E-5842 may cause disturbance of the mitotic apparatus.

m micronuclei in vehicle control and CP-treated groups ranged from area classes 1–4 and 3, respectively, with the highest number of MN being found in area class 2. In groups receiving E-5842 or COL, MN relative area classes ranged from 1 to 6 and 8, respectively. The highest number of MN was found in area classes 3 and 2 for E-5842 and COL, respectively. Despite CP having been reported to have weak aneugenic activity [24], no MN were found in relative area classes ≥ 4 .

When the classification criteria of Yamamoto and Kikuchi [25] based on relative diameter size were applied, a statistically significant increase ($p < 0.001$) in the frequency of MNPCE containing relatively large micronuclei (i.e., $d \geq 1/4D$) was observed in animals receiving 200 mg/kg of E-5842 (48 h sampling) (Table 3), compared with the vehicle control. A similar increase in frequency of MNPCE containing relatively large micronuclei was observed in animals receiving the microtubule inhibitor COL. Animals receiving CP showed no increase in the frequency of MNPCE containing relatively large micronuclei.

4. Discussion

E-5842 is a new σ_1 receptor ligand being developed as a potential atypical antipsychotic drug. During the safety-assessment program for this compound, E-5842 was tested for genotoxic potential, proving negative for both the Ames test and the mouse lymphoma assay (unpublished results). However, in a single-dose mouse bone-marrow micronucleus assay, oral administration of E-5842 induced a slight increase in MNPCE frequency at an intermediate dose (200 mg/kg) at the 48-sampling time, in the absence of bone-marrow toxicity. This increase slightly exceeded the upper range of the historical vehicle-control mean values and was considered to warrant further research.

It was shown here that oral administration of E-5842 to mice at dose levels ranging from 50 to 400 mg/kg produced marked and sustained decreases in rectal temperature. Maximum decreases from the mean pre-administration temperature (36.2 °C) ranged from 7.5 to 12.9 °C for animals receiving the 50 and 400 mg/kg doses, respectively.

Slight but statistically significant increases in MNPCE frequency were repeatedly observed in bone-marrow samples obtained 48 h after oral administration

of a 200 mg/kg dose of E-5842. However, when the hypothermic effect of E-5842 administration was avoided by housing treated animals under conditions of increased environmental temperature (30 °C) for 24 h, no increase in MNPCE frequency was observed. These results suggest that in animals receiving the 200 mg/kg dose the marked and sustained hypothermic effect of E-5842 administration, and not E-5842 itself, was responsible for the increase in MNPCE frequency observed at the 48-sampling time.

The absence of an increase in MNPCE frequency at the 24 h sampling time in animals receiving the 200 mg/kg dose and in which the hypothermic effect was avoided, indicates that the absence of effect at the 48 sampling time was not attributable to a change in MNPCE formation kinetics.

Similar effects on MNPCE frequency in mouse bone marrow attributed to hypothermia have been reported for other antipsychotic drugs compounds like reserpine [17,25] or chlorpromazine [18]. Both these compounds induced slight increases in MNPCE frequency at late sampling times in the absence of bone-marrow suppression, with kinetics similar to that observed for E-5842, but different from that of typical mutagens [26].

Poikilothermia is a well known side effect of neuroleptic drugs [18,27], and hypothermic effects have been linked to binding properties on dopamine, serotonin and α_2 -adrenergic receptors, which are known to be involved in mammalian temperature regulation [28–33].

The hypothermic effect induced by E-5842 is consistent with its sigma ligand properties: other sigma receptor ligands like the sigma agonist 1,3-di-*o*-tolylguanidine (DTG) have been reported to produce hypothermia in mice and rats [34–36]. The hypothalamus is thought to play a major role in thermoregulation [37], and autoradiographic binding studies have shown dense sigma site expression [38], with sigma-1 binding sites being particularly abundant in hypothalamic nuclei [39]. However, interaction of E-5842 with other thermo-regulatory systems due to loss of selectivity for sigma receptors at the high dose levels tested in our experiments cannot be ruled out. Temperature changes can profoundly influence cellular function and thus the physiology of an organism [40] and mice are especially susceptible to induction of hypothermia because of their high surface area to body weight ratio. Decreases in temperature below physiological levels

can induce marked changes in an organism's intermediate metabolism, with effects on such processes as cell cycle kinetics [41] and DNA repair [42]. Assembly of microtubules and the consequent formation of a functional mitotic spindle, has shown to be a temperature-dependent process in several species [43,44], and low temperature is a condition known to promote microtubule disassembly [45]. It has been described that compounds inducing hypothermia and hyperthermia interfere with the polymerization of subunits that form microtubules [46], and also produce lagging whole chromosomes, which can lead to the formation of micronuclei.

It has generally been considered that MN induced by spindle poisons are considerably larger than those induced by clastogens [47], and large relative size of MN has been considered indicative of aneugenic effects [25,48]. MN area and diameter measurements have been shown to be valid methods for distinguishing aneugens from clastogens [24,25,49], allowing the use of the same bone-marrow preparations used to determine MNPCE frequency and avoiding the use of additional animals.

In this study, a statistically significant increase ($p < 0.001$) in the proportion of relative large micronuclei ($d \geq 1/4D$) was observed in animals receiving the microtubule inhibitor colchicine. In animals receiving E-5842 (200 mg/kg, 48 h sampling) a similar increase in the proportion of relative large micronuclei was observed in association with strong hypothermia, suggesting a disturbance of the mitotic apparatus by hypothermia.

As already suggested by Asanami et al. [18] it seems reasonable that, when considering the effect of hypothermia on MNPCE frequency, both duration and intensity of the hypothermic effect are contributing factors that must be considered. Based on their findings on chlorpromazine [18] they suggested a temperature-duration threshold for micronucleus induction below 33 °C for at least 11 h. In general, our results with E-5842 are in agreement with this empirical value suggested by Asanami. Administration of a 200 mg/kg dose, which induced MNPCE, produced rectal temperature values well below 33 °C and in excess of 11 h. Animals receiving the 100 mg/kg dose, which did not induce MNPCE, showed temperatures below 33 °C for approximately 8 h in Experiment 2, but for approximately 13 h in Experiment 1. Although it seems

reasonable to assume the existence of a threshold of temperature-duration of hypothermia that must be overcome in order to induce MNPCE, it seems questionable whether it can be assigned an absolute value, as other contributing factors may exist, such as individual variability, strain differences in susceptibility, or the variability imposed by counting a relatively small number of erythrocytes.

In conclusion, oral administration of E-5842 to mice causes a marked and sustained hypothermic effect. The slight increase in MNPCE frequency observed in bone-marrow samples obtained 48 h after administration of a 200 mg/kg dose of E-5842 is not attributed to a direct effect of this compound on DNA, but to the marked hypothermic effect produced by E-5842 administration, one probable mechanism being the disturbance of the mitotic apparatus.

References

- [1] ICH-S2B, ICH Topic S2B Genotoxicity: a Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals. Step 4, 1-9-1997.
- [2] X. Guitart, X. Codony, M. Ballarín, A. Dordal, A.J. Farré, E-5842: a new potent and preferential sigma ligand. Preclinical pharmacological profile. CNS, Drug. Rev. 4 (1998) 201–224.
- [3] ICH-S2A, ICH Topic S2A Genotoxicity: Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals. Step 5, 1-9-1995.
- [4] S.M. Galloway, J.E. Miller, M.J. Armstrong, C.L. Bean, T.R. Skopek, W.W. Nichols, DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of DNA-reactive and non-DNA-reactive clastogens. *Mutat. Res.* 400 (1998) 169–186.
- [5] D. Scott, S.M. Galloway, R.R. Marshall, M. Ishidate Jr., D. Brusick, J. Ashby, B.C. Myhr, International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutat. Res.* 257 (1991) 147–205.
- [6] G. Steinheidler, R. Neth, H. Marquardt, Evaluation of nongenotoxic and genotoxic factors modulating the frequency of micronucleated erythrocytes in the peripheral blood of mice. *Cell Biol. Toxicol.* 1 (1985) 197–211.
- [7] CPMP Position paper on the limits of genotoxic impurities. CPMP/SWP/5199/02/draft2, 1-12-2002.
- [8] N. Yajima, Y. Kurita, T. Sawai, Y. Takeshita, Induction of micronucleated erythrocytes by recombinant human erythropoietin. *Mutagenesis* 8 (1993) 221–229.
- [9] B.B. Gollapudi, R.J. Bruce, V.A. Linscombe, P.G. Watanabe, A.K. Sinha, Effect of food and water deprivation on the parameters of the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutat. Res.* 173 (1986) 121–125.

- [10] O. Hirai, Y. Miyamae, Y. Fujino, H. Izumi, A. Miyamoto, H. Noguchi, Prior bleeding enhances the sensitivity of the *in vivo* micronucleus test, *Mutat. Res.* 264 (1991) 109–114.
- [11] E. Gocke, S. Albertini, S. Brendler-Schwaab, L. Müller, W. Suter, F.E. Wurgler, Genotoxicity testing of biotechnology-derived products. Report of a GUM task force. Gesellschaft für Umweltmutationsforschung, *Mutat. Res.* 436 (1999) 137–156.
- [12] M.T. King, D. Wild, The mutagenic potential of hyperthermia and fever in mice, *Mutat. Res.* 111 (1983) 219–226.
- [13] C.L. Chrisman, A.P. Baumgartner, Micronuclei in bone-marrow cells of mice subjected to hyperthermia, *Mutat. Res.* 77 (1980) 95–97.
- [14] S. Asanami, K. Shimono, High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, *Mutat. Res.* 390 (1997) 79–83.
- [15] S. Asanami, K. Shimono, The effect of hyperthermia on micronucleus induction by mutagens in mice, *Mutat. Res.* 446 (1999) 149–154.
- [16] S. Asanami, K. Shimono, Effects of chemically- and environmentally-induced hyperthermia on micronucleus induction in rats, *Mutat. Res.* 471 (2000) 81–86.
- [17] S. Asanami, K. Shimono, Hypothermia induces micronuclei in mouse bone marrow cells, *Mutat. Res.* 393 (1997) 91–98.
- [18] S. Asanami, K. Shimono, S. Kaneda, Transient hypothermia induces micronuclei in mice, *Mutat. Res.* 413 (1998) 7–14.
- [19] The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test, Sex difference in the micronucleus test, *Mutat. Res.* 172 (1986) 151–163.
- [20] P. Vanparys, G. Deknudt, F. Vermeiren, M. Sysmans, R. Marsboom, Sampling times in micronucleus testing, *Mutat. Res.* 282 (1992) 191–196.
- [21] EEC Council Directive 86/609, OJ L 358, 1, 12-12-1987.
- [22] C.W. Dunnett, A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, *J. Am. Statist. Assoc.* 50 (1955) 1096–1121.
- [23] M.S. Rembert, J.A. Smith, G. Hosgood, A comparison of a forced-air warming system to traditional thermal support for rodent microenvironments, *Lab. Anim.* 38 (2003) 55–63.
- [24] P. Vanparys, F. Vermeiren, M. Sysmans, R. Temmerman, The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity, *Mutat. Res.* 244 (1990) 95–103.
- [25] K.I. Yamamoto, Y. Kikuchi, A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons, *Mutat. Res.* 71 (1980) 127–131.
- [26] M. Hayashi, T. Sofuni, M. Ishidate Jr., Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow, *Mutat. Res.* 127 (1984) 129–137.
- [27] S. Oerther, S. Ahlenius, Atypical antipsychotics and dopamine D(1) receptor agonism: an *in vivo* experimental study using core temperature measurements in the rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292 (2000) 731–736.
- [28] S. Ahlenius, Clozapine: dopamine D1 receptor agonism in the prefrontal cortex as the code to decipher a Rosetta stone of antipsychotic drugs, *Pharmacol. Toxicol.* 84 (1999) 193–196.
- [29] J.F. Cryan, P. Kellihér, J.P. Kelly, B.E. Leonard, Comparative effects of serotonergic agonists with varying efficacy at the 5-HT(1A) receptor on core body temperature: modification by the selective 5-HT(1A) receptor antagonist WAY 100635, *J. Psychopharmacol.* 13 (1999) 278–283.
- [30] J.F. Cryan, A. Harkin, M. Naughton, J.P. Kelly, B.E. Leonard, Characterization of D-fenfluramine-induced hypothermia: evidence for multiple sites of action, *Eur. J. Pharmacol.* 390 (2000) 275–285.
- [31] S. Oerther, Temperature set-point changes induced by DA D2/3 and 5-HT1A receptor agonists in the rat, *Neuroreport* 11 (2000) 3949–3951.
- [32] S. Oerther, S. Ahlenius, Involvement of 5-HT1A and 5-HT1B receptors for citalopram-induced hypothermia in the rat, *Psychopharmacology (Berlin)* 154 (2001) 429–434.
- [33] S. Perachon, C. Betancur, C. Pilon, W. Rostene, J.C. Schwartz, P. Sokoloff, Role of dopamine D3 receptors in thermoregulation: a reappraisal, *Neuroreport* 11 (2000) 221–225.
- [34] M. Bejani, R.N. Pechnick, M.P. Bova, R. George, Effects of subcutaneous and intracerebroventricular administration of the sigma receptor ligand 1,3-di-*o*-tolylguanidine on body temperature in the rat: interactions with BMY 14802 and rimcazole, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258 (1991) 88–93.
- [35] B. Kest, J.S. Mogil, W.F. Sternberg, R.N. Pechnick, J.C. Liebeskind, Antinociception following 1,3-di-*o*-tolylguanidine, a selective sigma receptor ligand, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50 (1995) 587–592.
- [36] S.M. Rawls, D.A. Baron, E.B. Geller, M.W. Adler, Sigma sites mediate DTG-evoked hypothermia in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73 (2002) 779–786.
- [37] J.A. Boulant, Hypothalamic mechanisms in thermoregulation, *Fed. Proc.* 40 (1981) 2843–2850.
- [38] B.L. Largent, A.L. Gundlach, S.H. Snyder, Pharmacological and autoradiographic discrimination of sigma and phenylcyclidine receptor binding sites in brain with (+)-[3H]SKF 10047, (+)-[3H]-3-[3-hydroxyphenyl]-N-(1-propyl)piperidine and [3H]-1-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperidine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238 (1986) 739–748.
- [39] P. Bouchard, R. Quirion, [3H]1,3-Di(2-tolyl)guanidine and [3H](+)pentazocine binding sites in the rat brain: autoradiographic visualization of the putative sigma1 and sigma2 receptor subtypes, *Neuroscience* 76 (1997) 467–477.
- [40] L. Lundgren-Eriksson, A. Palm, W. Ryd, E. Wärnhammar, R. Hultborn, Radio- and chemotoxicity in mice during hypothermia, *Anticancer Res.* 21 (2001) 3269–3274.
- [41] J.E. Siskin, L. Morasca, S. Kibby, Effects of temperature on the kinetics of the mitotic cycle of mammalian cells in culture, *Exp. Cell Res.* 39 (1965) 103–116.
- [42] S.A. Burton, W.R. Paljug, S. Kalnicki, E.D. Werts, Hypothermia-enhanced human tumor cell radiosensitivity, *Cryobiology* 35 (1997) 70–78.
- [43] H.W. Detrich III, K.A. Johnson, S.P. Marchese-Ragona, Polymerization of Antarctic fish tubulins at low temperatures: energetic aspects, *Biochemistry* 28 (1989) 10085–10093.
- [44] M. Wallin, M. Billger, T. Stromberg, E. Stromberg, Assembly of Atlantic cod (*Gadus morhua*) brain microtubules at different temperatures: dependency of microtubule-associated proteins is relative to temperature, *Arch. Biochem. Biophys.* 307 (1993) 200–205.

- [45] L. Digue, T. Orsiere, M. De Meo, M.G. Mattei, D. Depetris, F. Duffaud, R. Favre, A. Botta, Evaluation of the genotoxic activity of paclitaxel by the in vitro micronucleus test in combination with fluorescent in situ hybridization of a DNA centromeric probe and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human T-lymphocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* 34 (1999) 269–278.
- [46] J.W. Parton, M.L. Garriott, J.E. Beyers, Expulsion of demecolcine-induced micronuclei from mouse bone marrow polychromatic erythrocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* 17 (1991) 79–83.
- [47] W. Schmid, The micronucleus test, *Mutat. Res.* 31 (1975) 9–15.
- [48] H. Tinwell, J. Ashby, Micronucleus morphology as a means to distinguish aneugens and clastogens in the mouse bone marrow micronucleus assay, *Mutagenesis* 6 (1991) 193–198.
- [49] P. Van Hummelen, A. Deleener, P. Vanparys, M. Kirsch-Volders, Discrimination of aneuploidogens from clastogens by C-banding, DNA and area measurements of micronuclei from mouse bone marrow, *Mutat. Res.* 271 (1992) 13–28.