

# Efectos farmacológicos de un análogo de adenosina-3',5'-monofosfato cíclico sobre útero de ratones

## Consideraciones terapéuticas

► Andrea Actis<sup>1\*</sup>, Máximo Croci<sup>2</sup>, Rosa Bergoc<sup>3\*</sup>

- 
1. (PhD) Dra. de UBA. Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.
  2. (MD) Médico Patólogo, Instituto de Inmunooncología, Buenos Aires, Argentina.
  3. (PhD) Dra. de UBA, Prof. Titular del Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

\* Facultad de Medicina, Instituto Universitario de Ciencias de la Salud, Fundación Barceló, Buenos Aires, Argentina.

### Resumen

La búsqueda de alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer de mama se ha extendido a distintas combinaciones de drogas, entre ellas, análogos de adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). De la amplia variedad existente, el 8-cloro-adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (8-Cl-AMPc) es el más empleado, hallándose en fase de estudios clínicos. En este trabajo se analiza a nivel experimental, el efecto del compuesto, solo o combinado con otros agentes, sobre útero de ratón. Para ello, se administró a ratones BALB/c: 8-Cl-AMPc, tamoxifeno (Tam), y acetato de medroxiprogesterona (MPA), solos o combinados. Se halló que el peso del útero disminuyó por efecto del tratamiento con el 8-Cl-AMPc, sin modificación histológica importante de la mucosa uterina ni cambios significativos en el ciclo estral. El Tam disminuyó el peso del útero provocando hiperplasia quística y detención del ciclo estral en diestro. La MPA aumentó el peso del útero provocando edema del endometrio y ciclo estral de pseudopreñez. En combinación con el 8-Cl-AMPc, tanto Tam como MPA tuvieron efectos predominantes. Se resalta la importancia de estudiar los efectos de combinaciones de drogas antineoplásicas sobre tejidos sanos blanco de hormonas sexuales, aun cuando las vías transduccionales de acción sean diferentes.

**Palabras clave:** 8-cloro-adenosina-3',5'-monofosfato cíclico \* ratón \* útero \* tamoxifeno \* acetato de medroxiprogesterona \* histopatología

### Summary

**PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF cAMP ANALOGUE ON MICE UTERI. THERAPEUTICAL CONSIDERATIONS.**

*The use of different combinations of drugs, among them adenosine-3',5'-monophosphate cyclic analogues, has expanded the search for therapeutical alternatives to treat breast cancer. From a current existing wide variety, the 8-chloro-adenosine-3',5'-monophosphate (8-Cl-cAMP) is the most employed and at present, it is in phase II of clinical studies. This paper analyzes the effect of this compound alone or in combination with other agents on mouse uterus. From a current at experimental stage. In order to achieve this 8-Cl-cAMP, tamoxifen (Tam) and medroxyprogesterone acetate (MPA),*

**Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

alone or combined were administered to Balb/c mice. It was found that 8-Cl-cAMP diminished uterus weight but did not modify significantly its histopathology or the estral cycle; Tam diminished uterus weight showing cystic hyperplasia and estral cycle arrested at diestrus; MPA treatment produced the increase of uteri weight, caused an endometrium edematization and a pseudopregnancy estral cycle. When combined with 8-Cl-cAMP, Tam or MPA always had the predominant effect. The importance studying the effect of the combination of antineoplastic drugs on non-transformed target-tissues, is highlighted even if transductional pathways of action are different.

**Key words:** 8-chloro-adenosine-3',5'-monophosphate \* mouse \* uterus \* tamoxifen \* medroxy-progesterone acetate \* histopathology

## Introducción

Los nucleótidos cíclicos como adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) y guanosina-3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) representan segundos mensajeros que se encuentran involucrados en la regulación de una multiplicidad de eventos celulares (1)(2). El AMPC, en particular, es un punto clave en el control de la diferenciación y proliferación celular (3), que ejerce su acción al unirse a la proteína quinasa AMPC dependiente (PKA). Esta serina-treonina quinasa está formada por una subunidad dimérica regulatoria (R) y dos subunidades catalíticas (C). Hasta el presente se han descrito dos tipos de subunidades R diferentes denominadas R<sub>I</sub> y R<sub>II</sub> con dos isoformas cada una, es decir: R<sub>Iα</sub>, R<sub>Iβ</sub>, R<sub>IIα</sub> y R<sub>IIβ</sub>. Además, cada subunidad C presenta tres isoformas C<sub>α</sub>, C<sub>β</sub> y C<sub>γ</sub> (4) (5). Se acepta que la subunidad R<sub>I</sub> de la PKA se asocia con los fenómenos proliferativos en tanto que la subunidad R<sub>II</sub> controla los mecanismos de diferenciación (6) (7).

Dentro de la amplia variedad de análogos de los nucleótidos cíclicos, el 8-cloro-adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (8-Cl-AMPC) ha resultado el más ampliamente analizado, encontrándose en estudio en distintos tipos de tumores (8-10).

Los mecanismos propuestos por los cuales el 8-Cl-AMPC ejerce su efecto antitumoral son diversos: a) disminución de la expresión de la subunidad R<sub>I</sub> y aumento de la subunidad R<sub>II</sub> llevando a la célula a un fenotipo más diferenciado; b) inhibición de la expresión de oncogenes que incluyen ras, myc, erb-B2, TGF<sub>α</sub>, VEGF y FGF-2; c) inducción de la apoptosis por aumento de Bcl-2; d) formación de 8-Cl-ATP con disminución de las concentraciones intracelulares de ATP, disminuyendo así la síntesis de proteínas (11-17).

Aún se encuentra en discusión si estos efectos se ejercen directamente por el 8-Cl-AMPC o por su metabolito la 8-Cl-adenosina, que se forma por acción de la fosfodiesterasa sobre el AMPC. Muchas enfermedades están asociadas a un desbalance en los niveles de AMPC o GMPc, por ejemplo, asma, diabetes, enfermedades cardiovasculares y el cáncer. En particular, la acción antitumoral del 8-Cl-AMPC ha sido investigada en nume-

rosos sistemas *in vitro* tales como líneas de ovario (8), glioblastoma (9), colon y mama (12), células de leucemia mieloide crónica (10), modelos *in vivo* como células inoculadas en ratones *nude* (11) y otros. Estas investigaciones demostraron que el 8-Cl-AMPC inhibe la producción autocrina de factores de crecimiento en las células cancerosas colo-rectales y mamarias humanas. Scala y col (18) y otros investigadores (19) estudiaron profundamente los mecanismos de acción de estas drogas; como resultado de todas esas investigaciones el 8-Cl-AMPC está siendo empleado como droga anticancerígena en distintos protocolos de tratamiento (20).

En cuanto a la medroxiprogesterona (MPA), este compuesto es un análogo sintético de la progesterona y, como tal, se une al receptor de progesterona (RP). Como informaran Panutti y col (21), esta droga se emplea en el tratamiento de cánceres mamarios humanos para contrarrestar la acción de los estrógenos. En ratones, Lanari y col (22) y Molinolo y col (23), demostraron que la MPA es capaz de inducir carcinogénesis mamaria y que acelera el crecimiento tumoral en los tumores que son MPA-dependientes.

El tamoxifeno (Tam) es uno de los moduladores selectivos del receptor a estrógenos (SERMs) más ampliamente empleado en los tratamientos de cánceres mamarios humanos como antiestrógeno; se sabe que sus mecanismos de acción son diversos aún cuando el más importante es debido al bloqueo de la unión del estrógeno en sus respectivos receptores (RE) (24).

En trabajos previos se ha estudiado el efecto del 8-Cl-AMPC, del Tam y de la MPA sobre los receptores a estrógeno (RE), y de progesterona (RP), en el útero de ratones BALB/c (25). También se demostró que el 8-Cl-AMPC y su asociación con MPA tenían un efecto distinto sobre dos sublíneas de tumor mamario inducido en ratones BALB/c por inyección de MPA (26).

Sobre la base de las investigaciones reseñadas, es de interés conocer los posibles efectos del 8-Cl-AMPC, solo y en combinación con otras drogas antineoplásicas, sobre un tejido no transformado sensible a hormonas sexuales y al AMPC, como es el útero. El estudio de estos efectos tuvo por objetivo explorar el modo en que estos agentes farmacológicos afectan el desarrollo celular

de un tejido que es, en este caso, blanco de los estrógenos. En base a los resultados obtenidos se sugieren posibles hipótesis sobre las interacciones proteína-proteína según los diferentes caminos transduccionales que activan cada uno de estos compuestos. En particular en este trabajo se estudia el efecto del 8-Cl-AMPc, solo y en combinación con Tam o MPA, sobre la histopatología y el tamaño del útero de ratones BALB/c.

## Materiales y Métodos

**Animales:** Se emplearon ratones hembras BALB/c de 50-60 días de vida. Los animales se mantuvieron en jaulas de acero inoxidable, en grupos de 5 animales por jaula, con agua y alimento *ad libitum*, temperatura de 22-23 °C, humedad aproximada del 56% y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. En todos los casos los animales estuvieron bajo las condiciones recomendadas por la Guide of Care and Use of Laboratory Animals, USA.

**Tratamientos *in vivo*:** Los animales fueron separados al azar en seis lotes de cinco ratones cada uno. Uno de los lotes fue considerado control y tratado con vehículo; los ratones de los otros cinco lotes recibieron diferentes tratamientos iniciados simultáneamente: al lote tratado con 8-Cl-AMPc se le implantó un *pellet* sub-cutáneo equivalente a 15 mg/Kg/día; cada *pellet* tenía una duración de 10 días y se los cambió sucesivamente. El lote MPA recibió un *depot* sub-cutáneo de MPA equivalente a 0,25 mg/Kg/día. El lote Tam fue tratado con un *pellet* sub-cutáneo de 0,25 mg/Kg/día; la droga liberada de los *pellets* de Tam y del *depot* de MPA duraba dos meses con una cinética de liberación lineal. En los tratamientos combinados las dosis de la combinación de drogas fueron las mismas que en los tratamientos monodroga.

**Ciclo estral y determinación del peso uterino:** A lo largo del tratamiento, el ciclo estral de todos los animales fue determinado diariamente por observación microscópica directa de extendidos vaginales. Luego de 30 días de tratamiento, los úteros de todos los animales fueron removidos, limpiados y pesados.

**Histopatología:** Muestras representativas de todos los úteros fueron recogidas para su examen histológico. Fragmentos de 3-4 mm fueron fijados con *buffer*-formaldehído 10% e incluidos en parafina. Cortes de tres a cuatro micrómetros fueron teñidos con hematoxilina-eosina (HE) y examinados microscópicamente.

**Reactivos:** El laboratorio Gador S.A., Buenos Aires, Argentina, gentilmente proveyó el Tam y MPA. El 8-Cl-AMPc fue amablemente donado por la doctora Y. S. Cho Chung, M.D., National Cancer Institute, USA.

**Estadística:** Los pesos uterinos se expresaron como valor medio  $\pm$  desvío estándar y se compararon me-

dante el *test* de ANOVA de dos vías y el *test* de Tukey *a posteriori*.

## Resultados

### PESO DE LOS ÚTEROS

Los resultados mostraron que las drogas ensayadas en este estudio actuaron de modo diverso sobre este parámetro. Como se muestra en la Figura 1, el 8-Cl-AMPc provocó una disminución significativa en el peso de los úteros, desde  $111,6 \pm 11,1$  mg hasta  $84,2 \pm 14,0$  mg ( $p < 0,05$ ). Asimismo, el Tam produjo una disminución altamente significativa del peso de los úteros, desde  $111,6 \pm 11,1$  hasta  $62,6 \pm 10,1$  mg ( $p < 0,001$ ). La combinación de 8-Cl-AMPc + Tam produjo los mismos resultados que el Tam solo, como se muestra también en la Figura 1. En el caso del tratamiento con MPA, el peso del útero aumentó significativamente desde  $111,6 \pm 11,1$  mg hasta  $150,8 \pm 19,4$  mg ( $p < 0,001$ ); en cuanto a la combinación MPA + 8-Cl-AMPc, este tratamiento no mostró diferencias significativas en el parámetro analizado con respecto al valor obtenido con MPA solo ( $137,6 \pm 6,3$  mg).

### CICLO ESTRAL

Se observó que el tratamiento con el 8-Cl-AMPc no altera significativamente la periodicidad del ciclo estral, aún cuando tiende a prolongarlo no significativamente. Por el contrario, el Tam detiene el ciclo en la fase diestro; en cuanto al tratamiento con MPA, éste provoca un aspecto permanente de pseudopreñez característico de altos niveles de progesterona. En el tratamiento combinado del 8-Cl-AMPc + Tam se observaron ciclos estrales detenidos en diestro, tal como en el tratamiento con

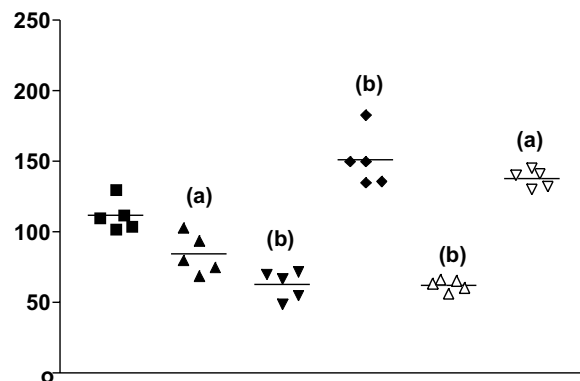


Figura 1. Peso de útero (mg). (■) útero de ratones control. Efecto del tratamiento con: (▲) 8-Cl-AMPc; (▼) Tam; (◆), MPA, (△), 8-Cl-AMPc+Tam; (△), 8-Cl-AMPc + MPA.

Los resultados se expresan como  $X \pm DE$  ( $n = 5$ ). (a)  $p < 0,05$ ; (b)  $p < 0,001$  vs control. ANOVA de dos vías y *test* de Tukey *a posteriori*.

Tam solo; el efecto de 8-Cl-AMPc + MPA fue de una seudopreñez algo menos evidente que el de MPA solo.

### HISTOPATOLOGÍA

Los úteros de los ratones control mostraron un endometrio normal, con proliferación epitelial normal, escaso estroma y ausencia de evidencias de secreción (Fig. 2a). En cuanto a los ratones que recibieron el 8-Cl-AMPc, sus úteros mostraron escasas glándulas proliferativas endometriales, con escaso estroma y una apariencia general similar al control (Fig. 2b). En el caso de los úteros de ratones bajo tratamiento con Tam, se observó en todos los casos hiperplasia quística y áreas hiperproliferativas con notoria actividad mitótica; los componentes estromales eran siempre escasos (Fig. 2c). El tratamiento con 8-Cl-AMPc combinado con Tam mostró que el 8-Cl-AMPc no era capaz de producir modificaciones a la acción del Tam; los cambios en el endometrio eran similares a los observados en el tratamiento con el antiestrógeno solo. Se observó un epitelio endometrial proliferativo quístico, con glándulas multiestratificadas y mitosis (Fig. 2d). Los ratones tra-

tados con MPA, mostraron endometrio progestacional, con numerosas glándulas de apariencia aserrada y signos secretorios, además de un estroma edematoso entre las glándulas (Figs. 2e). Cuando el 8-Cl-AMPc fue combinado con MPA fue evidente el predominio del efecto progestínico del MPA, ya que el endometrio mostró un importante aumento en el número de glándulas secretoras, con disposición aserrada y estroma edematoso (Fig. 2f).

### Discusión y Conclusiones

El 8-Cl-AMPc, como se ha indicado, es un análogo del AMPc involucrado en la inhibición del crecimiento de una variedad de tipos celulares malignos y en la diferenciación de un alto número de células cancerosas; se sabe también que produce *in vitro* la inhibición de la expresión de factores de crecimiento autocrinos y paracrinos (27). En los últimos años, se han descubierto otras tres proteínas que son reguladas por el AMPc, independientemente de la PKA. Se denominan Epac (*exchange protein directly activated by AMPc*) y AMPc-GEF-I y

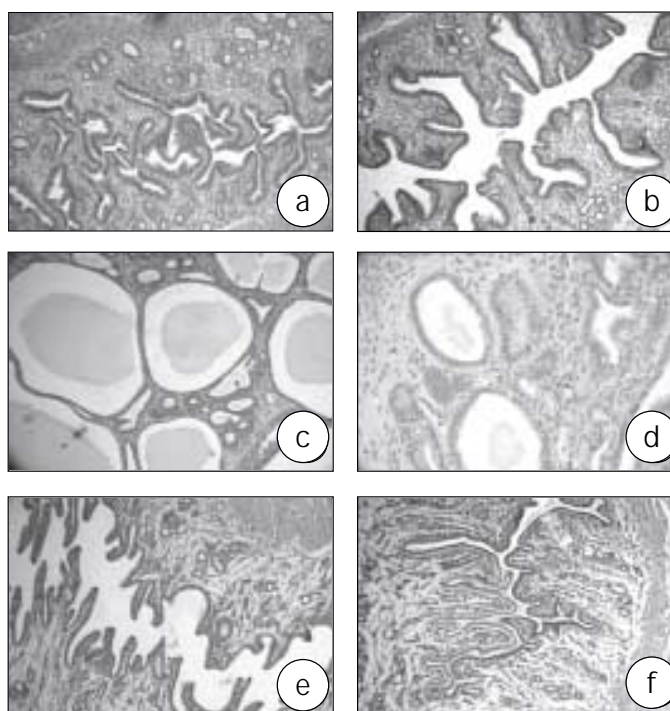


Figura 2. Cortes de endometrio de ratón bajo diferentes tratamientos. En todos los casos, coloración con hematoxilina-eosina y aumento 100X.

**2a:** Control; glándulas endometriales proliferativas, con mitosis y ausencia de secreción. Estroma denso. **2b:** 8-Cl-AMPc; glándulas endometriales proliferativas, con escaso estroma levemente edematoso. **2c:** Tam; endometrio con hiperplasia quística, con secreción apical y mucosa con sectores multiestratificados; figuras mitóticas. **2d:** 8-Cl-AMPc + Tam; mucosa endometrial proliferativa con multiestratificación, mitosis (hiperplasia adenomatosa). **2e:** MPA; glándulas endometriales indentadas con apariencia marcadamente aserrada; vacuolas secretorias alojadas en la porción basal del epitelio cilíndrico. Edema y escaso estroma entre las glándulas. **2f:** 8-Cl-AMPc + MPA; importante número de glándulas secretorias con apariencia aserrada.

AMPc-GEF-II (*guanine nucleotide exchange factors I y II*). Epac y AMPc-GEF-I son proteínas ubicuas, en tanto que AMPc-GEF-II se halla restringida a las glándulas adrenales y al cerebro. La unión del AMPc a estas proteínas activa a la proteína Pap1, que pertenece a la cascada de señalización intracelular del ras. Estos hallazgos implican que se deberá revisar la idea generalizada de que el AMPc actúa exclusivamente por vía de la PKA. El 8-Cl-AMPc ha sido evaluado en combinaciones con la batería de fármacos comúnmente usada en la terapia antitumoral ya que tiene la capacidad de disminuir la expresión de la glicoproteína-P. Esta proteína es el producto de expresión del gen MDR, causante de la resistencia a multidroga y por ende de la falla de esquemas quimioterápicos establecidos.

Previamente se ha demostrado que el 8-Cl-AMPc tiene efectos diferentes sobre dos sublíneas de tumores mamarios inducidos en ratones por MPA; en una sublínea, MPA-autónoma, el 8-Cl-AMPc tuvo una acción inhibitoria sobre el crecimiento tumoral; en otra sublínea, MPA-dependiente, el 8-Cl-AMPc produjo un efecto estimulador sobre el crecimiento tumoral. En ese modelo experimental de tumor mamario en ratón, las diferentes acciones del 8-Cl-AMPc se atribuyen a la distinta conformación de los receptores a progesterona, blancos de la acción del MPA en ambas sublíneas tumorales (28). También se analizó el efecto del contenido de receptores a estrógeno en los úteros de los ratones BALB/c por la acción del 8-Cl-AMPc, del Tam y de la MPA, solos o combinados; se notó que el 8-Cl-AMPc y la MPA no modificaron significativamente el contenido de los receptores a estrógeno.

En el presente estudio se halló que el efecto del 8-Cl-AMPc no contrarresta los efectos del tratamiento con Tam (pérdida de peso uterino, detención del ciclo estral en la fase diestro, hiperplasia quística y acción mitogénica) en el tejido uterino. Cuando fue combinado con MPA, el aspecto progestínico del endometrio producido por MPA tampoco fue contrarrestado por el 8-Cl-AMPc.

Previamente también se demostró que la combinación de 8-Cl-AMPc + MPA modificaba el perfil de isoformas por SE-HPLC, posiblemente a través de interacciones proteína-proteína (28). Se sabe que las interrelaciones o *cross-talk* entre diferentes caminos transduccionales que regulan la expresión de un gen pueden verse afectadas por el empleo de drogas que actúen sobre alguno de los componentes de esos caminos; de modo que, como resultado del *cross-talk*, es posible que se presenten efectos inesperados. El 8-Cl-AMPc, así como el Tam y la MPA, actúan sobre diferentes vías transduccionales. La administración combinada de estas drogas permite estudiar el modo por el cual las interacciones entre proteínas se modifican cuando se suministran drogas que actúan solamente a través de un camino (26).

La selección de las dosis empleadas en este trabajo se basó en los resultados obtenidos previamente de tumores mamarios murinos (29). En los mismos, el 8-Cl-AMPc estimuló el crecimiento de la sublínea MPA-dependiente (C4-HD) e inhibió el crecimiento en la sublínea MPA-autónoma (BET-HA). En los úteros de los ratones se determinó que el 8-Cl-AMPc causó modificaciones en el contenido subcelular y en la distribución de receptores a estrógenos.

Los efectos observados en el presente trabajo sobre el peso y la histología del útero de ratón, podrían estar señalando que el 8-Cl-AMPc tiene la capacidad de favorecer la diferenciación y de disminuir la proliferación en un tejido normal blanco de hormonas esteroideas y del AMPc y son un llamado de atención hacia una más completa revisión no sólo de la vía metabólica blanco de drogas farmacológicas sino sobre la red metabólica sistémica, sobre todo teniendo en cuenta que la mayoría de los pacientes oncológicos se hallan bajo una batería terapéutica o polifarmacia.

Estos resultados merecen continuarse con protocolos de estudios más completos, a fin de establecer la posibilidad del empleo de la combinación Tam + 8-Cl-AMPc en pacientes con cáncer de mama, para contribuir a la disminución de la proliferación celular por un lado y evitar el desarrollo de resistencia al Tam por el otro.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó con el aporte económico de la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (BID-OC-AR-PICT 04656) y de la Fundación Barceló. Asimismo, los autores agradecen la asistencia técnica de Ines Nievas (CONICET).

#### CORRESPONDENCIA

PROF. DRA. ROSA M. BERGOC  
Laboratorio de Radioisótopos  
Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA  
Junín 956 - CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES -  
Argentina  
Tel: +54 11 4964 8277 / +54 11 4964 8202  
E-mail: rbergoc@ffyb.uba.ar / rbergoc@arnet.com.ar

#### Referencias bibliográficas

1. Ryan WL, Heidrik ML. Role of cyclic nucleotides in cancer. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1974; 4: 81-115.
2. Boynton AL, Whitfield JF. The role of cyclic AMP in cell proliferation: a critical assessment of the evidence. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1983; 15: 193-294.
3. Schwede F, Maronde E, Genieser HG, Jastorff B. Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 2000; 87:199-226.
4. Cho-Chung YS, Clair T. The regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase as a target for

- chemotherapy of cancer and other cellular dysfunction-related diseases. *Pharmacol Ther* 1993; 60: 265-88.
5. Cho-Chung YS, Pepe S, Clair T, Budillon A, Nesterova M. cAMP-dependent protein kinase: role in normal and malignant growth. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 21: 33-61.
  6. Srivastava RK, Lee YN, Noguchoi K, Park YG, Ellis MJ, Jeong JS, *et al.* The RII $\beta$  regulatory subunit of protein kinase A binds to AMPc response element: an alternative cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6687-92.
  7. Barradeau S, Imaizumi-Scherr T, Weiss MC, Faust DM. Intracellular targeting type-I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2002; 12: 235-41.
  8. McDaid HM, Johnston PG. Synergistic interaction between paclitaxel and 8-Chloro-adenosine 3'-5' monophosphate in human ovarian carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 215-20.
  9. Drabek K, Pestic M, Piperski V, Ruzdijic S, Medic-Mijacevic L, Pietrzkowski Z, *et al.* 8-Cl-cAMP and thiazofurin affect vascular endothelial growth factor production and glial fibrillary acidic protein expression in human glioblastoma cells. *Anticancer Drugs* 2000; 11: 765-70.
  10. Weissinger EM, Oettrich K, Evans C, Genieser HG, Schwede F, Dangers M, *et al.* Activation of protein kinase A (PKA) by 8-Cl-cAMP as a novel approach for antileukaemic therapy. *Br J Cancer* 2004; 91: 186-92.
  11. Cummings J, Langdon SP, Ritchie AA, Burns DJ, Mackay J, Stockman P, *et al.* Pharmacokinetics, metabolism and tumour disposition of 8-chloro-adenosine 3',5'-monophosphate in breast cancer patients and xenograft bearing mice. *Ann Oncol* 1996; 7: 291-6.
  12. Bianco C, Tortora G, Baldassarre G, Caputo R, Fontanini G, Chine S, *et al.* 8-Chloro-cAMP inhibits autocrine and angiogenic growth factors production in human colorectal and breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 439-48.
  13. Normanno N, Tortora G, De Luca A, Pomatico G, Casamassimi A, Agrawal S, *et al.* Synergistic growth inhibition and induction of apoptosis by a novel mixed backbone antisense oligonucleotide targeting CRIPTO in combination with C225 anti-EGFR monoclonal antibody and 8-Cl-cAMP in human GEO colon cancer cells. *Oncol Rep* 1999; 6: 1105-9.
  14. Kim SN, Kim SG, Park JH, Lee MA, Park SD, Cho-Chung YS, *et al.* Dual anticancer activity of 8-Cl-cAMP: inhibition of cell proliferation and induction of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 404-10.
  15. Carlson CC, Chinery R, Burnham LL, Dramsfield DT. 8-Cl-adenosine-induced inhibition of colorectal cancer growth *in vitro* and *in vivo*. *Neoplasia* 2000; 2: 441-8.
  16. Gandhi V, Ayres M, Halgren RG, Krett NL, Neuman RA, Rosen ST. 8-Chloro-cAMP and 8-chloro-adenosine act by the same mechanism in multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 5474-9.
  17. Ahn YH, Jung JM, Hong SH. 8-Cl-cAMP and its metabolite, 8-Cl-adenosine induce growth inhibition in mouse fibroblast DT cells through the same pathways: protein kinase C activation and cyclin B down-regulation. *J Cell Physiol* 2004; 201: 277-85.
  18. Scala S, Budillon A, Zhan Z, Cho-Chung YS, Jefferson J, Tsokos M, *et al.* Down-regulation of *mdr-1* expression by 8-Cl-cAMP in multidrug resistant MCF-7 human breast cancer cells. *J Clin Invest* 1995; 96: 1026-34.
  19. Ciardello F, Dixit M, Di Isernia G, Damiano V, Bianco R, Bianco AR, *et al.* Down-regulation of type I protein kinase A by transfection of human breast cancer cells with an epidermal growth receptor antisense expression vector. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 47: 57-62.
  20. Propper DJ, Saunders MP, Salisbury AJ, Long LO, Byrne KJ, Braybrooke JP, *et al.* Phase I study of the novel cyclic AMP (cAMP) analogue 8-Chloro-cAMP in patients with cancer: toxicity, hormonal and immunological effects. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1682-9.
  21. Panutti F, Martoni A, Zaniagni C, Melotti B. Progestins I: medroxyprogesterone acetate. In: *Medical Management of Breast Cancer*. TJ Powles and IE Smith. I E Eds Cambridge: University Press; 1993. pp. 95-103.
  22. Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD. Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett* 1986; 33: 215-23.
  23. Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, Sanjuan N, Pasqualini CD. Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J Nat Cancer Inst* 1987; 79: 1341-50.
  24. Jordan V. Tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer. V.C. Jordan Ed, New York: Publishers of Oncology; 1999.
  25. Actis AM, Rilo C, Croci M, Rivera E, Bergoc R. Effect of treatment with different SERMs on uterus of mice bearing mammary experimental tumors. *Medicina* 2000; 60: 778.
  26. Actis AM, Dorfman VB, Caruso SP, Levin E. Effects on mouse uterus of three antitumoral drugs acting upon estrogen and progesterone receptors directly and through other transductional pathways. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 273-8.
  27. Drabek K, Pesi M, Piperski V, Ruzdiji S, Medi-Mijacevi L, Pietrzkowski Z, *et al.* 8-Cl-cAMP and thiazopurin affect vascular endothelial growth factor production and glial fibrillary acidic protein expression in human glioblastoma cells. *Anticancer Drugs* 2000; 11: 765-70.
  28. Actis AM, Caruso SP, Levin E. Opposite effect of a cAMP analogue on tumoral growth related to hormone dependence of a murine mammary tumor. *Cancer Lett* 1995; 96: 81-5.
  29. Actis AM, Rilo C, Cocca C, Rivera E, Bergoc RM. Opposed effects in treatment with different SERMs in a mouse mammary tumor model. *Cancer Detection and Prevention* 2000; 24: S255-6.

Acceptedo para su publicación el 14 de mayo de 2005