

Diagnóstico y seguimiento de cáncer de piel no-melanoma utilizando ^{99m}Tc -MIBI; estudios en un modelo animal

María Jimena Salgueiro, Fiorella Tesán, Mónica Palmieri, Hebe Durán, Vanina Medina, Natalia Leonardi, Cinthia Goldman, José Boccio, Marcela Zubillaga.

Resumen / Abstract

Resumen

El objetivo consistió en evaluar la utilidad del ^{99m}Tc -MIBI como marcador para diagnóstico y seguimiento de la progresión tumoral del NMSC en un modelo de carcinogénesis completa en ratones. Los animales en estudio fueron inyectados con ^{99m}Tc -MIBI a diferentes tiempos y eutanasiados. Se disecaron muestras de tumor y piel sana para evaluar la captación del radiofármaco y realizar el diagnóstico histológico. En animales con 22 semanas de progresión tumoral se observó una diferencia significativa en la captación del ^{99m}Tc -MIBI entre piel sana y MSC. El protocolo que mejor se adapta al uso del ^{99m}Tc -MIBI como marcador para el diagnóstico y seguimiento de la progresión tumoral en ratones portadores de NMSC inducidos es la administración i.v de 1 mCi de ^{99m}Tc -MIBI con adquisición de datos a los 30 minutos post inyección. Se observó que a medida que los tumores progresan, la captación de ^{99m}Tc -MIBI disminuye respecto a la piel normal.

Abstract

The aim of the work was to evaluate the usefulness of ^{99m}Tc -MIBI as a tracer for the tumor diagnosis and progression of NMSC in a chemically induced model in mice. After administration of ^{99m}Tc -MIBI animals were sacrificed at different times. Samples of tumor and healthy skin were dissected in order to perform histological analysis and to evaluate ^{99m}Tc -MIBI uptake. Animals under 22 weeks of tumor evolution showed a statistically difference in ^{99m}Tc -MIBI uptake between healthy skin and NMSC. Our results showed that the better protocol for the study of the tumor diagnosis and progression of NMSC in mice is the administration of 1 mCi of ^{99m}Tc -MIBI and acquisition of images 30 minutes post injection. Results showed that, as tumor progresses, the uptake of ^{99m}Tc -MIBI is significantly lower than healthy skin.

Introducción

La evaluación centellográfica de procesos celulares complejos como la proliferación, apoptosis, interacciones ligando receptor, transporte de sustratos y metabolismo de nutrientes en modelos de cáncer y aún en cáncer humano continúa siendo un área de investigación continua en radiofarmacia y medicina nuclear ^(1,2). El objetivo principal radica en la detección mediante técnicas no-invasivas, de marcadores de agresividad, invasividad y resistencia a la terapia tumoral de manera de proveer criterios racionales para la individualización de las terapias.

El ^{99m}Tc -metoxiisobutilisonitrilo (^{99m}Tc -MIBI) pertenece a la familia de cationes lipofílicos originalmente desarrollados para estudios de perfusión cardíaca y que subsecuentemente fueron empleados como agentes rastreadores de tumores en una gran variedad de neoplasias humanas. Estos cationes lipofílicos, entre los cuales también se encuentran el ^{99m}Tc -tetrofosmin y el ^{99m}Tc -furfosmin, comparten tanto propiedades químicas, biofísicas y farmacocinéticas como así también los mecanismos de captación en células normales y malignas ⁽³⁻⁵⁾. En particular, numerosos estudios han demostrado el influjo pasivo del ^{99m}Tc -MIBI en respuesta a los potenciales negativos de la membrana celular y de la membrana mitocondrial. Asimismo, el ^{99m}Tc -MIBI se acumula reversiblemente dentro de la mitocondria de células normales y malignas ^(4,5).

Otra propiedad del ^{99m}Tc -MIBI es su habilidad de interactuar con la glicoproteína-P (Pgp), la cual es responsable del eflujo activo de este catión hacia el medio extracelular ⁽⁶⁾. Por esta razón, el ^{99m}Tc -MIBI ha sido utilizado en numerosos estudios de visualización de resistencia a multidrogas realizados *in vivo* e *in vitro* ⁽⁶⁻⁹⁾.

En base a lo anteriormente explicado, tanto la captación del ^{99m}Tc -MIBI como la depuración del mismo han sido parámetros utilizados para el diagnóstico y pronóstico en cuanto a respuesta al tratamiento, de diversas neoplasias.

La utilización de modelos animales ha sido parte integral de las investigaciones biomédicas en el estudio de procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Este tipo de metodología de investigación involucra, la puesta a punto de la generación de dicho modelo y en algunos casos de la cuantificación de diferentes parámetros que aseguren la obtención y seguimiento del mismo. La ausencia de métodos para estudiar repetidamente el mismo animal antes, durante y luego de una intervención ha sido una significativa limitación de estos métodos de investigación tradicionales. En algunos casos, los modelos animales pueden ser evaluados por parámetros bioquímicos (Hb para anemia, T_3 , T_4 y TSH para patología tiroidea), clínicos (evaluación del comportamiento en daño cerebral) y visuales o táctiles (aparición de tumores) entre otros, que son de fácil diagnóstico y permiten la exclusión del protocolo de animales que no cumplen con los valores esperados para la patología a inducir. Sin embargo, en algunos modelos animales químicamente inducidos, la cantidad o proporción de los individuos que desarrollan la patología es variable, por lo cual su caracterización involucra datos estadísticos que reflejan la probabilidad de obtención de los mismos. Nuestro grupo ha venido trabajando en un modelo de cáncer de piel químicamente inducido en ratones (NMSC), que por sus características no tiene ningún parámetro específico que permita la selección de individuos que desarrollan carcinomas o papilomas para incluirlos en el protocolo o hacer su seguimiento. En estos casos, hemos trabajado a ciegas, conociendo el resultado al final del experimento, una vez sacrificados los animales.

El objetivo general del presente trabajo, consistió en evaluar la utilidad del ^{99m}Tc -MIBI como marcador para el diagnóstico y seguimiento de la progresión tumoral del cáncer de piel no-melanoma utilizando un modelo químicamente inducido en ratones. Los objetivos específicos consistieron en la puesta a punto del ensayo de captación de ^{99m}Tc -MIBI determinando la vía de administración y el tiempo de captación en el blanco de interés (piel normal y tumor), la biodistribución del ^{99m}Tc -MIBI y la evaluación de su captación para tumores de distinto tiempo de progresión.

Materiales y métodos

Animales y modelo tumoral.

Todos los estudios que involucran animales se realizaron según los principios y guías de la "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, U.S. National Research Council, 1996".

El modelo tumoral utilizado fue el de carcinogénesis completa ^(10,11). Para ello, 38 ratones hembra de la cepa Sencar (CNEA, Argentina) de 7 a 9 semanas de vida fueron cuidadosamente afeitados en el área dorsal. Luego de un período de reposo de 2 días y sólo en aquellos animales que no presentaron crecimiento piloso, se comenzó el esquema de carcinogénesis. Las espaldas de los animales fueron topicadas con 7, 12-dimetilbenz(a)antraceno DMBA (25 μg en 0.2 mL acetona/ratón, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) dos veces por semana durante 16 semanas. El peso y el consumo de agua y alimento fueron registrados semanalmente a lo largo del esquema de inducción.

Preparación y administración del radiofármaco.

El ^{99m}Tc -MIBI se obtuvo por marcación del metoxiisobutilisonitrilo (sestamibi 0,5 mg, Laboratorios Bacon S.A.I.C., Argentina) con 30 mCi de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ provenientes de un eluido fresco de un generador ^{99}Mo - ^{99m}Tc (Laboratorios Bacon S.A.I.C., Argentina). La pureza radioquímica del radiofármaco elaborado fue determinada de acuerdo a la monografía correspondiente ⁽¹²⁾.

La administración del ^{99m}Tc -MIBI se realizó por vía endovenosa o subcutánea, según corresponda, inyectando 1 mCi del radiofármaco en un volumen máximo de 0.1 mL.

Puesta a punto del ensayo de captación de ^{99m}Tc -MIBI.

Finalizado el esquema de inducción tumoral, transcurrieron 2 semanas hasta que los animales fueron divididos en 2 grupos ($n=10$ cada uno) según la vía de administración a ensayar: endovenosa (EV) ó subcutánea (SC). A su vez, cada grupo fue subdividido en 2 subgrupos para evaluar distintos tiempos de biodistribución del radiofármaco: 15 y 30 minutos. De esta manera, se obtuvieron 4 grupos de estudio, EV15, EV30, SC15 y SC30 que fueron inyectados con el radiofármaco y sobre los cuales se realizó la eutanasia de los animales a los tiempos establecidos para determinar la biodistribución del ^{99m}Tc -MIBI. La disección consistió en la extracción de: tumores, piel sana (tomada de un sector no expuesto al esquema de carcinogénesis), sangre, hígado, riñones, corazón, pulmones, colon y páncreas. Los órganos fueron lavados, pesados y medidos en un contador de centelleo sólido (CCS) calibrado y ajustado para la ventana de medición del ^{99m}Tc . Se registraron las tasas de conteo (TC) en cuentas por minuto (cpm) obtenidas en cada medición. La preparación y medición de un patrón de ^{99m}Tc en idénticas condiciones que las muestras, se utilizó para conocer la eficiencia de medición y convertir las TC obtenidas en valores de actividad (A) expresada en mCi, según la siguiente fórmula:

$$\text{TC (cpm)} = \text{A(mCi)} \times \text{eficiencia}$$

Los resultados fueron expresados como concentración de actividad porcentual (CA%) y porcentaje de actividad inyectada por masa de tejido expresada en gramos (%Ainy/g), según las fórmulas que se detallan a continuación:

CA% = TC (cpm) tejido de interés; 100

TC (cpm) todos los órganos extraídos

Evaluación de la captación de ^{99m}Tc -MIBI para tumores de distinto tiempo de progresión.

Finalizado el esquema de inducción tumoral, transcurrieron 2 y 6 semanas hasta que otro grupo de animales (n=20 y n=18, respectivamente) fueron sometidos al ensayo de captación de ^{99m}Tc -MIBI. Para ello se administró 1 mCi de ^{99m}Tc -MIBI en un volumen máximo de 0,1 mL por vía EV. Luego de 30 minutos de biodistribución, los animales fueron eutanasiados y se extrajeron muestras de tumor y piel sana que fueron lavadas, pesadas y medidas en un CCS calibrado y ajustado a la ventana de medición del ^{99m}Tc al igual que lo que se describió en el ensayo anterior. Los resultados de la biodistribución se expresaron como CA% y %Ainy/g como se explicó en el ensayo anterior.

Análisis histológico.

Las muestras de piel sana y tumores obtenidas de todos los ensayos de captación de ^{99m}Tc -MIBI fueron inmediatamente fijadas en formaldehído al 10% en PBS. Luego fueron procesadas de acuerdo a técnicas estándar de inclusión en parafina y corte en secciones de 3 μm . La coloración utilizada para evidenciar las estructuras histológicas fue hematoxilina-eosina (H&E). Todas las muestras fueron analizadas al microscopio óptico a diferentes aumentos para la realización del diagnóstico histopatológico y se tomaron microfotografías a modo ilustrativo.

Resultados

Modelo tumoral.

El modelo tumoral químicamente inducido mediante el protocolo de carcinogénesis completa con DMBA, produjo el desarrollo de numerosos tumores visibles en el área dorsal de los animales tratados (figura 1) a partir de la semana 4 luego de su inicio.

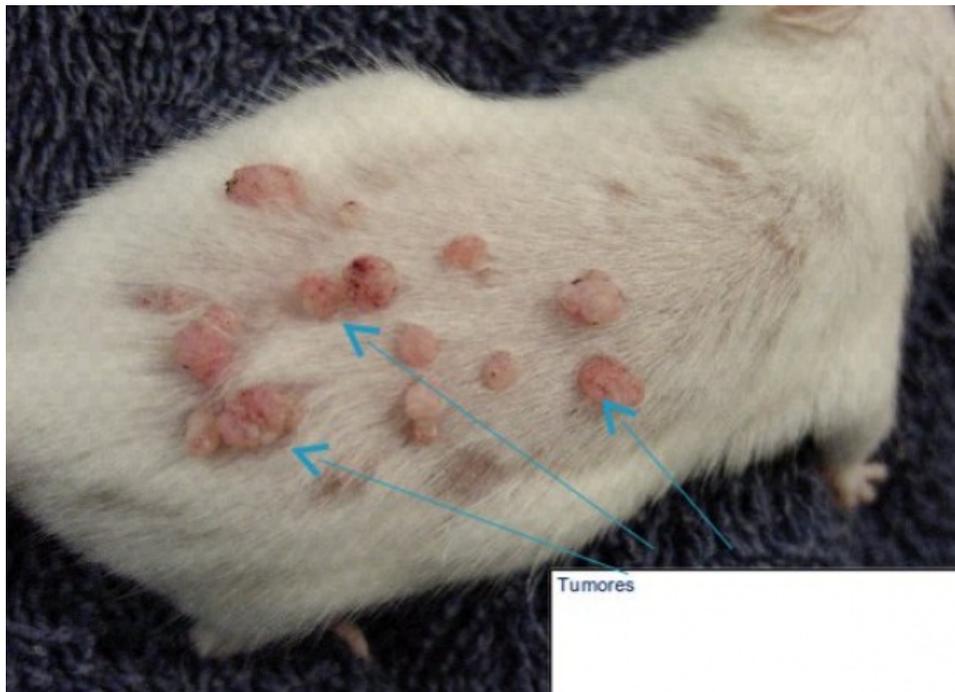


Figura 1. Ratón de la cepa Sencar sometido al protocolo de carcinogénesis completa con 14 semanas de evolución. Nótese el desarrollo de numerosos tumores en el área dorsal en la que se realizan las topicaciones con el carcinógeno.

El análisis histológico realizado sobre las muestras extraídas en los ensayos de captación de ^{99m}Tc -MIBI reveló el desarrollo tanto de papilomas como de carcinomas de células escamosas (SCC por sus siglas en inglés de Squamous Cell Carcinoma) (figura 2).

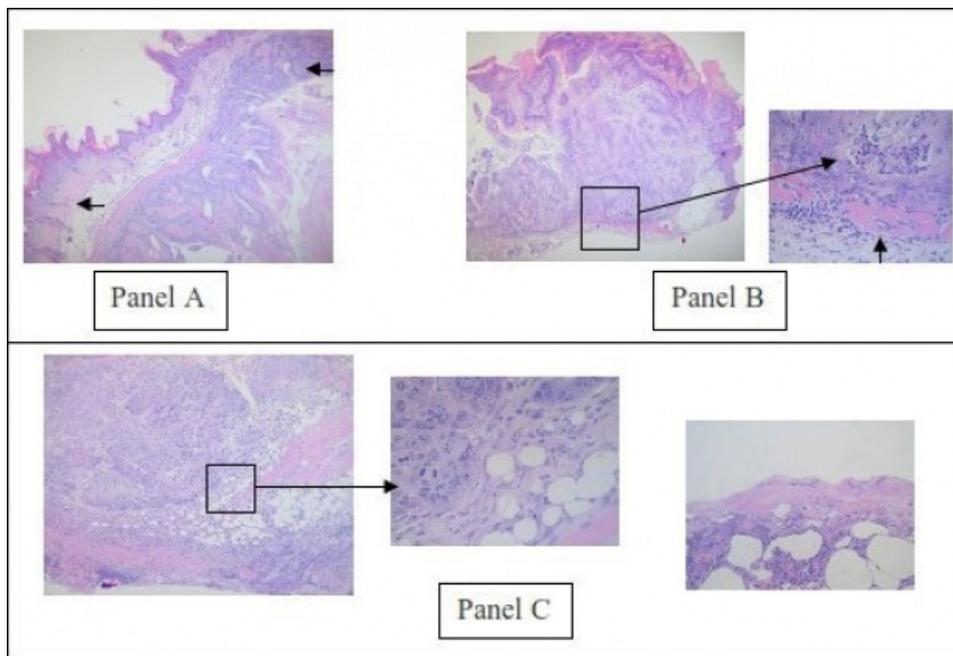


Figura 2. Panel A, Papiloma exófitico (flecha superior) y papiloma invaginado (flecha inferior) recubierto por piel normal. Se observa tejido diferenciado que no infiltra y la piel normal que recubre el papiloma no se encuentra invadida ni ulcerada. Panel B, Papiloma irregular con áreas de necrosis (zona recuadrada) y probables áreas de carcinoma infiltrante hacia la capa muscular (flecha en recuadro de mayor aumento). Panel C, Carcinoma infiltrante invasor hasta capa muscular (flecha hacia el recuadro de mayor aumento). Otra zona del preparado mostrando la piel totalmente ulcerada.

Para el caso de los tumores seleccionados en los ensayos de puesta a punto y de captación de $^{99m}\text{Tc-MIBI}$, la tabla 1 resume el diagnóstico de los mismos.

	Diagnóstico 18 semanas ¹		Diagnóstico 22 semanas ¹	
	Papilomas (%)	Carcinomas ² (%)	Papilomas (%)	Carcinomas ² (%)
Puesta a punto de la captación de $^{99m}\text{Tc-MIBI}$	36	64	-----	-----
Captación de $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ para tumores de distinto tiempo de progresión	36	64	0	100

Tabla 1 Diagnóstico histológico de los tumores seleccionados en los ensayos de puesta a punto de la captación de $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ y de captación de $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ para tumores de distinto tiempo de progresión.

Puesta a punto del ensayo de captación de $^{99m}\text{Tc-MIBI}$.

Las tablas 2 y 3 muestran los resultados de las biodistribuciones realizadas en los 4 grupos de estudio EV15, EV30, SC15 y SC30 expresadas en CA% y Ainy/g%.

	EV15	SC15	EV30	SC30
Piel	1.13±1.15	2.07±1.31	1.61±0.43	2.52±0.28
Carcinoma	1.18±0.67	0.97±0.59	1.45±0.19	1.17±0.57
Papiloma	1.31	1.48±0.37	1.24±0.36	2.00
Sangre	1.06±0.66	1.24±0.86	0.45±0.22	0.87±0.34
Hígado	26.39±5.21	21.82±1.67	27.49±4.61	25.55±4.45
Riñones	32.68±8.18	41.54±5.18	31.23±5.23	35.88±1.56
Corazón ¹	23.22±6.54 ¹	11.3±2.63 ¹	20.52±5.70	11.65±0.83 ¹
Pulmones	4.26±1.18	4.51±0.40	3.87±0.51	3.11±0.74
Colon	7.35±0.77	7.09±2.46	9.17±0.89	7.01±1.22
Páncreas ²	3.64±1.62	3.70±0.08	4.61±0.76	7.76±2.18 ²

Tabla 2 Biodistribución de ^{99m}Tc-MIBI en ratones Sencar expresada en CA%.

¹La captación de ^{99m}Tc-MIBI en corazón es significativamente mayor (p<0.05) para EV15 que para SC15 y SC30.

²La captación de ^{99m}Tc-MIBI en páncreas es significativamente mayor (p<0.05) para SC30.

	EV15	SC15	EV30	SC30
Piel	0.81±0.23	0.59±0.31	0.49±0.19	0.62±0.15
Carcinoma	0.39±0.25	0.29±0.14	0.46±0.14	0.42±0.24
Papiloma	0.53	0.44±0.11	0.36±0.04	0.47
Sangre	0.26±0.09	0.45±0.30	0.14±0.08	0.23±0.04
Hígado	9.12±2.40	6.91±2.03	8.20±1.02	7.11±1.03
Riñones	9.38±1.41	9.44±3.98	9.55±2.49	10.43±3.57
Corazón ¹	8.04±2.90 ¹	2.34±1.02 ¹	5.54±2.06	3.36±1.07 ¹
Pulmones	1.46±0.44	1.05±0.30	1.18±0.27	0.85±0.05
Colon	2.58±0.75	3.23±2.56	3.38±1.67	2.03±0.70
Páncreas	1.23±0.79	1.52±1.47	1.40±0.81	2.29±1.06

Tabla 3 Biodistribución de ^{99m}Tc-MIBI en ratones Sencar expresada en %Ainy/g. ¹La captación de ^{99m}Tc-MIBI en corazón es significativamente mayor (p<0.05) para EV15 que para SC15 y SC30

La captación de ^{99m}Tc-MIBI no mostró diferencias significativas para ninguno de los órganos evaluados, independientemente de la vía de administración y del tiempo de biodistribución, excepto para el corazón y el páncreas. En el caso del corazón, éste muestra una captación significativamente mayor, independientemente de la forma de expresión de los resultados, cuando la vía de administración utilizada en la EV y el tiempo de biodistribución es de 15 minutos. Con respecto al páncreas, cuando los resultados se expresan como CA% puede observarse que la captación es significativamente mayor al realizar la administración por vía SC y a 30 minutos de biodistribución. Sin embargo, se observó que la menor dispersión de los datos se obtuvo para los animales del grupo EV30, por lo que se adoptó este protocolo para continuar con el trabajo.

Los resultados de la captación de ^{99m}Tc-MIBI en tumores de distinto tiempo de progresión se muestran en la figura 3. Luego de 18 semanas de iniciado el esquema de carcinogénesis, la captación de ^{99m}Tc-MIBI no difiere significativamente entre piel normal, papilomas o carcinomas de células escamosas, a pesar de observarse cierta tendencia a la menor captación en el orden antedicho. Sin embargo, luego de 22 semanas de evolución tumoral se verifica diferencia estadísticamente significativa en la captación del ^{99m}Tc-MIBI entre piel sana y carcinomas de células escamosas

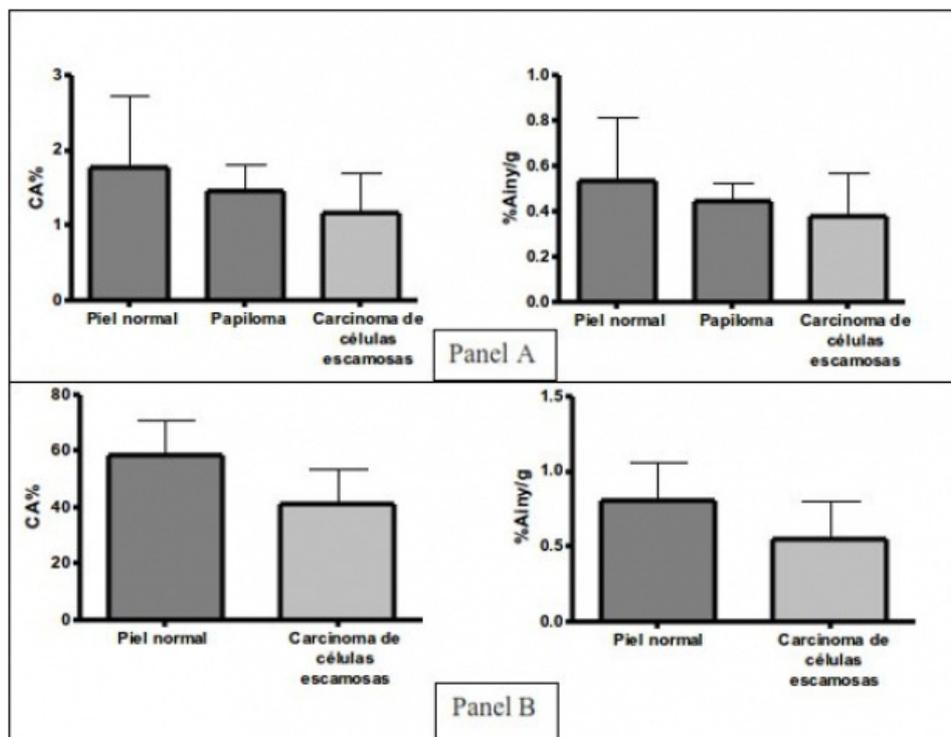


Figura 3. Panel A, Gráficos de captación de ^{99m}Tc -MIBI luego de 18 semanas de iniciación del esquema de carcinogénesis expresados en CA% y Ainy/g%. No hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Panel B, Gráficos de captación de ^{99m}Tc -MIBI luego de 22 semanas de iniciación del esquema de carcinogénesis expresados en CA% y Ainy/g%. La captación en piel normal es significativamente mayor.

Una vez seleccionado este protocolo, realizamos el ensayo de captación del ^{99m}Tc -MIBI para tumores de distinto tiempo de progresión. A priori, se podría pensar que dado que la diferencia en el gradiente eléctrico entre el exterior de la célula y la mitocondria entre las células epiteliales normales y las cancerosas es de por lo menos 60 mV, esto conduciría en todos los casos al incremento en la acumulación de ^{99m}Tc -MIBI en dichas células. Esta es la razón por la cual el ^{99m}Tc -MIBI fue postulado como rastreador tumoral de utilidad diagnóstica ⁽¹⁵⁾. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo plantearon otro escenario, justificado con datos específicos relacionados a las características particulares del cáncer de piel no-melanoma (NMSC).

Esto es que, paradójicamente, no hubo captación diferencial de ^{99m}Tc -MIBI en tumores de 18 semanas de evolución con respecto a la piel sana, independientemente de su naturaleza benigna o maligna, dado por el diagnóstico histológico. Es más, los datos muestran que aunque las diferencias en los porcentajes de captación obtenidos no son estadísticamente significativas existe una tendencia a la menor captación del radiofármaco en el orden piel sana, papilomas y carcinomas de células escamosas. Esto supondría, en primera instancia, la existencia de cambios temporales en las características de la piel a medida que el modelo progresa, con posible influencia en la captación del trazador. Es decir, que teniendo en cuenta las características del modelo utilizado, la evolución tumoral progresiva desde lesiones benignas hacia tumores malignos de tipo SCC permitiría presuponer que la captación se vería aún más reducida en tumores de mayor tiempo de evolución. Así, en concordancia con este razonamiento, los resultados mostraron que para tumores de 22 semanas de evolución la captación de ^{99m}Tc -MIBI fue significativamente menor que para la piel normal. Como dato confirmatorio, el análisis histológico arrojó diagnósticos de 100% de SCC con características de malignidad superiores a las observadas en los tumores desarrollados en el primer grupo de animales. Esto sustentaría, al menos desde el análisis histológico, la repercusión en la captación diferencial y gradual en el tiempo de ^{99m}Tc -MIBI. Adicionalmente otros datos respaldatorios a los resultados hallados en el presente trabajo provienen de bibliografía relacionada a la patogénesis de los NMSCs y que puede cruzarse con aquella que describe los factores que influyen la captación de ^{99m}Tc -MIBI. Esto permitiría hipotetizar sobre los mecanismos que gobiernan la captación diferencial observada. A este respecto es conocido que la apoptosis en células de mamíferos puede darse por dos vías diferentes pero relacionadas. La vía extrínseca es caspasa-8 dependiente y está mediada por binomios formados por ligandos de muerte (FasL o TRAIL) y sus correspondientes receptores (Fas o TRAIL-Rs), estos últimos pertenecientes a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). La vía intrínseca es principalmente mitocondria-dependiente y se activa en respuesta a daños al DNA. La ejecución de esta vía se encuentra a cargo de los miembros de la familia de bcl-2 cuya función puede ser pro-apoptótica (bak y bax) o anti-apoptótica (bcl-2 y bcl-x)⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Una característica saliente de los NMSCs es su resistencia a la muerte celular programada. Así, la apoptosis juega un rol crucial en la formación y crecimiento de los NMSCs puesto que, las células que estaban destinadas a morir escapan de la apoptosis y se dividen descontroladamente ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. En este sentido, ambas vías de apoptosis pueden verse afectadas hasta el punto en el que varios integrantes de las mismas pueden hasta llegar a actuar como "protectores" de las células tumorales ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Como ejemplo puede citarse, la sobreexpresión de bcl-2 (anti-apoptótica) en tumores con programa apoptótico alterado como los NMSCs la cual ejercería un efecto inhibitorio sobre la permeabilidad de

las membranas celular y mitocondrial previniendo la acumulación de ^{99m}Tc -MIBI en las células tumorales ^(15,19,20) La relevancia de este ensayo de captación para el diagnóstico de NMSCs queda así demostrada, puesto que se trataría de lesiones negativas para este trazador. Las perspectivas futuras podrían orientar no solo a profundizar el estudio de los mecanismos y factores que gobiernan la acumulación de ^{99m}Tc -MIBI en NMSCs sino también a establecer el valor pronóstico o de seguimiento de respuesta al tratamiento implementado de este ensayo. Debido a que muchos tratamientos quimioterapéuticos e incluso radioterapéuticos conducen a la esterilización del tumor por mecanismos apoptóticos ⁽¹⁶⁾, los cambios en la acumulación de ^{99m}Tc -MIBI podrían aportar información acerca del avance de la terapéutica. En este sentido, la combinación con estudios utilizando ^{99m}Tc -anexina V sería un aporte interesante en esta evaluación.

Conclusiones

Tanto la captación como el flujo de ^{99m}Tc -MIBI están relacionados con procesos celulares de importancia en la progresión tumoral y por tanto en la respuesta tumoral al tratamiento. La captación de ^{99m}Tc -MIBI a tiempos cortos refleja el estado mitocondrial en términos de permeabilidad y preservación de la membrana mitocondrial y su potencial. Mutaciones o alteraciones en la expresión de moléculas clave del proceso de apoptosis pueden afectar profundamente el estado mitocondrial y por tanto también la captación de este y otros cationes lipofílicos.

Los estudios realizados en este modelo de NMSC muestran que a medida que los tumores progresan, la captación de ^{99m}Tc -MIBI se ve significativamente disminuida respecto a la piel normal, poniendo en evidencia la malignización de la lesión. Esto se debería probablemente a las alteraciones en el programa apoptótico de los NMSC, resultando de utilidad para el diagnóstico de este tipo de neoplasias. Las perspectivas futuras se orientarán al estudio de la relevancia de este ensayo en el seguimiento post-tratamiento.

Agradecimientos

Este proyecto fue realizado en el marco del proyecto UBACYT B092, financiado por la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires.

Referencias

01. Blankenberg FG, Strauss HW. Nuclear medicine applications in molecular imaging. *J Magn Reson Imaging* 2002;16:352-61.
02. Sharma V, et al. Molecular imaging of gene expression and protein function in vivo with PET and SPECT. *J Magn Reson Imaging* 2002;16:336-51
03. Mariani G. Unexpected keys in cell biochemistry imaging: some lessons from technetium-99m-sestamibi. *J Nucl Med* 1996;37:536-8.
04. Piwnica-Worms D, et al. Uptake and retention of hexakis (2-methoxyisobutyl isonitrile) technetium(I) in cultured chick myocardial cells. Mitochondrial and plasma membrana potential dependence. *Circulation* 1990;82:1826-38.
05. Delmon-Moingeon LI, et al. Uptake of the cation hexakis(2-methoxyisobutylisonitrile)-technetium-99m by human carcinoma cell lines in vitro. *Cancer Res* 1990;50:2198-202.
06. Piwnica-Worms D, et al. Functional imaging of multidrug-resistant P-glycoprotein with an organotechnetium complex. *Cancer Res* 1993;53:977-84.
07. Gottesman MM, et al. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48-58.
08. Piwnica-Worms D, et al. Characterization of multidrug resistance P-glycoprotein transport function with an organotechnetium cation. *Biochemistry* 1995;34:12210-20.
09. Ballinger JR, et al. Technetium-99m-tetrofosmin as a substrate for Pglycoprotein: in vitro studies in multidrug-resistant breast tumor cells. *J Nucl Med* 1996;37:1578-82.
10. Hanausek M, et al. Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth), suppress H-ras mutations and aneuploidy in a murine skin carcinogenesis model. *PNAS* 2001;98:11551-6.
11. Roomi MW, et al. Inhibition of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced skin tumors by a nutrient mixture. *Med Oncol* 2008;25:333-40.
12. USP 32 NF 27. Official monographs. Technetium Tc 99m Sestamibi Injection. 2009;pp. 3671-2.
13. Belhaj-Tayeb H, et al. In vitro and in vivo study of ^{99m}Tc -MIBI encapsulated in PEG-liposomes: a promising

- radiotracer for tumor imaging. *Eur J Nucl Mol Imaging* 2003;30: 502-9.
14. Liu Z, et al. Imaging recognition of inhibition of multidrug resistance in human breast cancer xenografts using ^{99m}Tc -labeled sestamibi and tetrofosmin. *Nucl Med Biol* 2005; 32:573-83.
 15. Moretti JL, et al. To use MIBI or not to use MIBI? That is the question when assessing tumour cells. *Eur J Nucl Mol Imaging* 2005;32:836-42.
 16. Erb P, et al. Role of apoptosis in basal cell and squamous cell carcinoma formation. *Immunol Lett* 2005;100:68-72.
 17. Blažić TM, et al. Apoptosis and immune response are responsible for the site-specific incidence of non-melanoma skin cancer. *Med Hypotheses* 2007;68:853-5.
 18. Erb P, et al. Capítulo 22: Apoptosis and patogénesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. En: Sunlight, vitamin D and Skin cancer. Ed. Jörg Reichrath. 2008:283-295. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. Boston, MA, USA.
 19. Aloj L, et al. Bcl-2 overexpression prevents ^{99m}Tc -MIBI uptake in breast cancer cell lines. *Eur J Nucl Mol Imaging* 2004;31:521-7.
 20. Del Vecchio S, Salvatore M. ^{99m}Tc -MIBI in the evaluation of breast cancer biology. *Eur J Nucl Mol Imaging* 2004;31(Suppl. 1):S88-S96.