

03.67.08

~~621.039.85(043)~~

C22

C.N.E.A. Biblioteca	
ARCHIVO PUBLICACIONES	
Nº 1	AÑO 1967

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DEL ORO COLCICAL RADIATIVO

Tesis para optar al Grado de Doctor
de la Universidad de Buenos Aires

AUTOR : Ricardo Alfredo CARO.-

CONSEJERO DE ESTUDIOS

Y DIRECTOR DE TESIS : Profesor Doctor Pablo Adolfo VERDIER.-



- AÑO 1967 -

DEPARTAMENTO DE FISICOQUIMICA
ORIENTACION FISICA

- o - o - o -

A la memoria de mi abuelo

Doctor Alfred CARO

a mis padres

a mi esposa LUCY

al Profesor Doctor Pablo A. VERDIER

al Profesor Doctor Renato RANICELLA

con toda mi gratitud

- AGRADECIMIENTOS -

Al Gobierno Francés, que al concederme una beca me facilitó el acceso a los laboratorios del Comisariado de Energía Atómica de Francia.

Al Grupo de Control Farmacéutico del Departamento de Radioelementos del Centro de Estudios Nucleares de Saclay, Francia, y particularmente al Profesor Doctor Yves COHEN y al Doctor Jacques INGBRAND, bajo cuya supervisión se realizó parte de nuestra labor.

A la Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires, Argentina, que puso a nuestra disposición el material necesario para la ejecución de este trabajo y al Departamento de Producción de la Gerencia de Energía de la misma Comisión, por su contribución en la realización y discusión de algunos de sus capítulos.

Al Bioquímico Jorge O. NICOLINI, por su generosa y constante colaboración.

Al Personal de la Orientación Física del Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, y especialmente a los Bioquímicos Tomás DE PAOLI y Alfredo HAGER.

A todos ellos, sin cuyo aporte no hubiera sido posible la realización de esta tesis, expreso mi más íntimo agradecimiento.

INTRODUCCION GENERAL

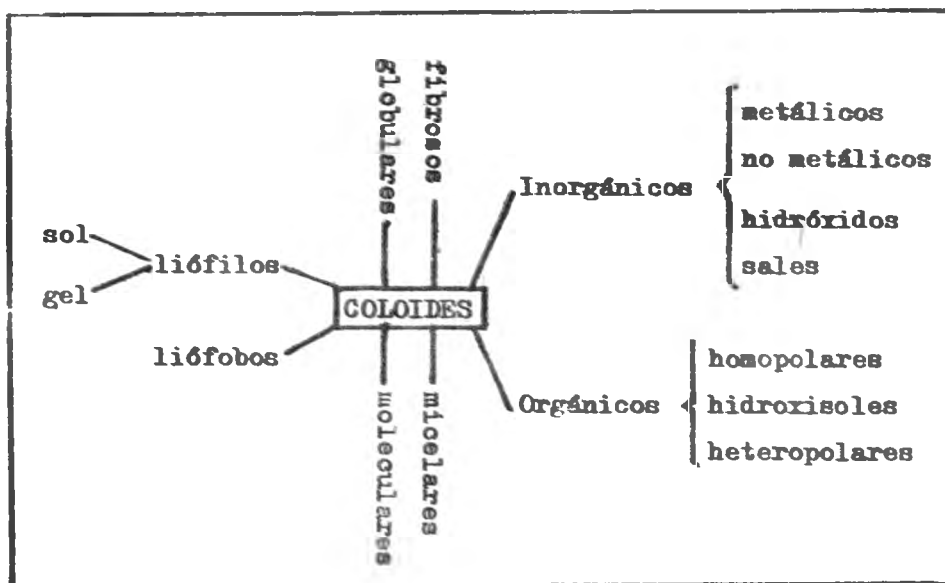
El término "coloide" fue utilizado por primera vez hace más de 100 años por GRAHAM, 1861, (1), quién clasificó las sustancias disueltas en cristaloides y coloides, según su mayor o menor velocidad de difusión a través de una membrana de pergamino. A pesar de múltiples objeciones, el segundo de estos términos se ha seguido empleando, consagrado por el uso, para diferenciar un grupo de sustancias con propiedades fisicoquímicas y biológicas particulares, que tiene importancia científica y práctica.

Un criterio más moderno para definir el estado coloidal, surge de los trabajos de OSTWALD, 1921, (2), donde se demuestra que las propiedades de los sistemas coloidales están relacionadas fundamentalmente con el tamaño y la superficie libre de sus partículas. Generalmente se acepta que cuando la fase dispersa está constituida por partículas mayores que 100 μ , se obtienen suspensiones groseras: entre 1 y 100 μ , se originan dispersiones coloidales, y menores a 1 μ , se producen soluciones verdaderas.

Debido a la posibilidad de que una partícula no posea forma esférica, es conveniente adoptar el criterio sugerido por STAUDINGER, 1950, (3). Según este autor, aquellas partículas que están formadas por 10^3 a 10^9 átomos, dan lugar a dispersiones coloidales. Cuando cada partícula contiene más que 10^9 átomos permite obtener suspensiones y cuando posea menos que 10^3 átomos origina soluciones verdaderas.

Ninguno de estos puntos de vista puede ser aceptado en forma estricta y la transición es gradual.

Cuando se estudian los sistemas coloidales se acostumbra a dividirlos según distintos criterios. En el esquema siguiente se presenta una clasificación aceptada generalmente. Creemos innecesario insistir en la definición de cada tipo de coloide, por cuanto ellos son bien conocidos.



En el caso del coloide de oro radiactivo (^{198}Au) utilizado en medicina y en biología, nos encontramos en presencia de un sol, inorgánico, metálico y liófilo.

Debido a sus características liófilas y a la presencia de electrolitos en el medio dispersante, es necesaria la protección de las partículas de oro, para asegurar su estabilidad. Esto se logra agregando un exceso de algún coloide liófilo, que recubre las partículas coloidales con una capa de sus moléculas. El poder estabilizante de un coloide protector se expresa por su número de oro, tal como ha sido definido por ZSIGMONDY, 1901, (4).

Usos del coloide de oro radiactivo (^{198}Au)

Antes de exponer nuestro plan de trabajo, hemos creído oportuno incluir aquí un breve resumen acerca de los múltiples usos del coloide ^{198}Au en medicina, como agente diagnóstico o terapéutico. SCHNEIDER, 1963, (5), ha publicado una revisión bibliográfica (hasta 1962), de los usos del coloide de ^{198}Au en biología y medicina, de la cual transcribiremos los puntos más importantes.

A) Usos terapéuticos.

Junto con la irradiación externa, por ejemplo con ^{60}Co , y algunos otros métodos aislados, la terapia con radiocoloides es una de las for-

mas más usadas en el tratamiento de tumores malignos.

a) Infiltración de tumores.- Un material en dispersión coloidal inyectado en un tejido vivo, es eliminado lentamente por drenaje linfático. Si el material utilizado es un coloide radiactivo, se logra una irradiación importante en la zona de infiltración, sin afectar otras regiones de organismo. Por esta razón se emplea el coloide de ^{198}Au para infiltrar e irradiar los restos de tumores que quedan después de una intervención quirúrgica. Dicha terapia se usa principalmente en casos de carcinomas de próstata y mama.

b) Administración intracavitaria.- Uno de los usos más comunes del coloide de ^{198}Au , es el tratamiento de metástasis en la cavidad pleural o peritoneal. Si se inyectan en los líquidos cavitarios, las partículas coloidales tienden a depositarse sobre las serosas, irradiando así los depósitos carcinomatosos. Si bien la prolongación de la vida de los pacientes no es muy grande, los efectos paliativos son notables, obteniéndose en más de un 50% de los casos una considerable y definida disminución de la velocidad de acumulación de líquidos. Se utiliza también el coloide de oro radiactivo, para irradiar carcinomas de vejiga, ofreciendo ventajas sobre aquellos métodos que emplean soluciones radiactivas.

c) Administración endovenosa.- Una dispersión coloidal, introducida en la circulación sanguínea, es eliminada de la misma casi exclusivamente por medio de la células reticuloendoteliales hepáticas y esplénicas. De esta forma, inyectando por vía endovenosa coloides radiactivos, como el de ^{198}Au , se obtendrá una irradiación altamente selectiva del hígado y del bazo. Dicho procedimiento se ha mostrado de gran utilidad para la terapia de pacientes con distintas afecciones carcinomatosas.

d) Terapia con grandes partículas.- Para irradiar selectivamente algunas zonas del pulmón, se puede emplear el coloide de ^{198}Au adsorbido sobre partículas de carbón de 30 μ aproximadamente. Debido a múltiples efectos secundarios, este tratamiento ha sido prácticamente abandonado.

También es posible irradiar carcinomas de los bronquios, administrando partículas coloidales de oro radiactivo, recubiertas con plata. Con este procedimiento se logra una rápida concentración del compuesto radiactivo en los ganglios linfáticos locales.

B) Usos diagnósticos.

En el campo diagnóstico el coloide de ^{198}Au está adquiriendo una

importancia cada vez mayor. Su propiedad de coloide particularmente estable, y el hecho de que emita radiación gamma, lo que hace factible su fácil detección "in vivo", lo definen como excepcionalmente apropiado para uso diagnóstico, localización de tumores y estudios funcionales.

a) Centellograffa.- Para el diagnóstico no quirúrgico de metástasis hepáticas se utiliza el coloide de ^{198}Au , debido a que las células cancerosas no fagocitan las partículas coloidales, diferenciándose así del tejido reticuloendotelial hepático sano. De esta forma, administrando el material por vía endovenosa y practicando un barrido de la actividad (centellograffa) en la zona hepática, con un detector adecuado, se puede determinar la existencia de zonas que no han fijado el compuesto radiactivo, lo que indica una posible infiltración carcinomatosa.

Se han utilizado las partículas de carbón cubiertas con oro coloidal radiactivo, para efectuar centellogramas de pulmón. Actualmente este procedimiento ha sido reemplazado con ventaja gracias al uso de macroagregados de albúmina humana marcados con ^{131}I o ^{125}I , (TAPLIN y col., 1964,(6)) o con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, (DE PAOLI y col., 1966,(7)).

b) Flujo sanguíneo hepático.- La determinación del flujo sanguíneo hepático, o sea el volumen de sangre que irriga el hígado en la unidad de tiempo, se basa en la propiedad de las células reticuloendoteliales hepáticas de retener las partículas coloidales circulantes en la sangre por fagocitosis. Esta determinación es de particular importancia en el diagnóstico de ciertas enfermedades hepáticas. Se inyecta el coloide de ^{198}Au por vía endovenosa y se mide "in vivo" la actividad del compuesto radiactivo en sangre en función del tiempo. Es posible elegir la geometría más conveniente para cada caso. A partir de la curva de desaparición de la actividad en sangre, se puede calcular fácilmente el flujo sanguíneo hepático. En esta determinación se deben utilizar coloides cuyas características fisicoquímicas estén perfectamente definidas; se deben cumplir además otras condiciones, que hemos logrado precisar en el presente trabajo.

El incremento en el uso de este tipo de técnicas es debido principalmente a la facilidad con que ellas pueden ser aplicadas, sin necesidad de disponer de personal altamente especializado, o de intervenir quirúrgicamente al paciente. Es interesante mencionar que la determina-

ción del flujo sanguíneo hepático, según las técnicas convencionales, obliga a la canulación de la vena hepática.

Exposición del plan de trabajo.

Como puede apreciarse, los usos médicos de los coloides de $^{198}\text{-Au}$ son múltiples; por otra parte la cantidad de trabajos publicados al respecto es elevada.

Sin embargo, este campo de aplicación se ha visto restringido muchas veces, debido al escaso conocimiento que se posee sobre el estado fisicoquímico de los preparados y a la relativamente escasa reproducibilidad de los métodos de obtención conocidos. Por otro lado, estos mismos factores hacen que sea muy difícil e inseguro un estudio completo de la distribución del coloide de $^{198}\text{-Au}$ en el organismo. Es tanta la importancia que se atribuye a estos problemas, que, desde hace algunos años funciona un comité permanente de expertos, cuya tarea es coordinar y orientar las investigaciones en el campo de los coloides radiactivos, en distintos países europeos.

La meta de nuestro trabajo es la de contribuir a una mejor información básica sobre este tipo de preparados, a los fines de una utilización más racional de los mismos. Para lograrlo hemos debido abordar el estudio de un conjunto de problemas, que obligaron a introducirnos en diversas disciplinas. Por esto creemos que, a los fines de una mejor comprensión de cada una de las etapas de esta labor, es conveniente realizar en forma separada, su actualización bibliográfica, su consideración experimental y su discusión.

Por otra parte, es necesario señalar que el tema que hemos elegido es novedoso en nuestro medio; por lo tanto consideramos oportuno realizar una prolija investigación bibliográfica previa al tratamiento de cada uno de los capítulos.

En cuanto a la parte experimental se refiere, fue realizada en el Laboratorio de Radioisótopos de la Orientación Física del Departamento de Fisicoquímica, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, durante los años 1963 y 1964. Fue continuada en los laboratorios del Grupo de Control Farmacéutico del Departamento de Radioelementos del Centro de Estudios Nucleares de Saclay, Francia, durante el período de octubre de 1964 a octubre de 1965, para ser concluí-

da en los laboratorios de la Cátedra de Física, antes mencionados, y en los de la Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires, Argentina, durante el año 1966.

Esquemáticamente, podemos dividir nuestro trabajo en las siguientes partes:

Capítulo I: Determinación experimental del tamaño de las partículas y de la concentración en oro de los coloides.

Capítulo II: Preparación de coloides de ^{198}Au protegidos con gelatina o con polivinilpirrolidona (PVP).

Capítulo III: Distribución biológica de estos compuestos.

Capítulo IV: Cinética de la desaparición de los coloides del caudal sanguíneo.

Capítulo V: Bloqueo del Sistema Reticuloendotelial.

Es necesario destacar que, en algunos de estos capítulos, se han resuelto no solamente problemas de tipo experimental, sino algunos de naturaleza teórica, lo que nos ha permitido aportar métodos o criterios, que pueden resultar interesantes para una mejor caracterización fisicoquímica y biológica de estos radiocoloides.

Esperamos que la labor realizada, signifique un aporte que contribuya a una utilización más segura de los coloides de ^{198}Au .

Es de desear que lo mucho que queda aun por hacer, constituya el motivo de futuras investigaciones.

CAPITULO I

DETERMINACION DEL TAMAÑO DE PARTICULAS COLOIDALES

I-1.- INTRODUCCION.-

La determinación del tamaño de las partículas ocupa un lugar importante entre las determinaciones fisicoquímicas necesarias para la caracterización de un coloide. Si bien hay otros valores que pueden ofrecer cierto interés, como por ejemplo pH, contenido en electrolitos, cantidad de material no coloidal, movilidad electroforética, etc., el tamaño de las partículas constituye el parámetro fundamental y necesario para cualquier estudio fisicoquímico o biológico del coloide.

En el caso de las dispersiones estudiadas por nosotros, la problemática experimental se complica, debido a las características radiactivas de las mismas, que dificultan su manipulación.

Los métodos empleados en la determinación del tamaño de las partículas son múltiples, pero en principio pueden dividirse en dos categorías principales. En la primera, representada fundamentalmente por la microscopía electrónica, se mide el diámetro de una serie, lo más grande posible, de partículas, y se determina el diámetro medio según diversos criterios. En la segunda, que aplica difracción, coeficiente de extinción, velocidad de sedimentación, etc., se estudia una propiedad fisicoquímica del material, de la cual se puede deducir el tamaño de las partículas si se conocen una serie de otros parámetros.

I-2.- ESTUDIO CRITICO DE LOS PRINCIPALES METODOS.-

A los efectos de un mejor ordenamiento, haremos primeramente una revisión de los métodos más importantes aplicables a la determinación del tamaño de las partículas coloidales, mencionando especialmente los que han sido usados en el caso del oro coloidal radiactivo.

I-2-1.- Ultramicroscopía.-

Históricamente es el primer método que ha permitido la determinación del diámetro medio de partículas coloidales con relativo éxito. El primer ultramicroscopio fue construido por SIEDENTOPF y ZSIGMONDY, 1903,

(8). El aparato se fundamenta en la difracción que sufre un haz luminoso de incidencia lateral al chocar con las partículas coloidales, lo que facilita su visualización y contaje. Se determina el tamaño de las partículas conociendo su número, masa y densidad en un volumen dado. Así:

$$v = \frac{m}{n \cdot \delta} \quad \text{I-1}$$

donde: v es el volumen de cada partícula

m es la masa total de las partículas contadas

n es el número de partículas contadas

δ es la densidad de las partículas

Si las partículas son cúbicas, su volumen será igual a L^3 , donde L es la arista del cubo. Si las partículas son esféricas, v será igual a $\pi D^3/6$, donde D es el diámetro de las esferas.

No se obtienen buenos resultados con todo tipo de coloides, aunque con el de oro pueden considerarse satisfactorios.

Posteriormente se han introducido modificaciones en el instrumental, que han permitido una mejor realización del método; a pesar de ello no se lo aplica actualmente, debido a las dificultades técnicas que presenta la determinación.

I-2-2.- Ultrafiltración y Diálisis.-

Es posible determinar el tamaño de las partículas coloidales utilizando ultrafiltros apropiados, cuyos poros tienen un tamaño conocido. El método ha sido aplicado para coloides con partículas pequeñas, pero es necesario señalar que los valores obtenidos deben manejarse cuidadosamente. GENIN, 1928, (9), ha revisado los distintos problemas de esta técnica, que fue muy utilizada en las primeras investigaciones. Para cierto tipo de sustancias se suele recurrir aun a ella, según JIRGENSONS y STRAUMANIS, 1964, (10, pag. 21-26).

La diálisis también puede utilizarse para medir el tamaño de las partículas coloidales, ya que la velocidad de diálisis es inversamente proporcional al diámetro de aquellas. En el caso del oro coloidal, HOLLIDAY, 1947, (11) ha observado que se producen fenómenos de agregación, que probablemente están relacionados con la carga de las partículas.

De todas formas, ambos métodos presentan serios inconvenientes ex-

perimentales, por lo cual han sido abandonados.

I-2-3.- Métodos Osmóticos.-

A partir de las investigaciones de van't HOFF, 1887, (12) nació la posibilidad de aplicar leyes cuantitativas a los fenómenos osmóticos. En principio se puede aceptar que la ley descubierta por este autor:

$$\pi = \frac{R T}{M} c \quad \text{I-2}$$

sigue siendo válida. En esta ecuación, π es la presión osmótica, R la constante general de los gases, T la temperatura absoluta, M el peso molecular de la sustancia y c su concentración. Si las soluciones estudiadas son diluidas y las partículas poseen geometría esférica, esta ley se cumple dentro de ciertos límites. En coloides con partículas no esféricas, deben efectuarse correcciones debido a la interacción de aquellas con la fase dispersante; según OSTWALD y MUENDLER, 1919, (13), hay que considerar la presión de hinchamiento, cuando se trabaja con soluciones más concentradas.

El método osmótico, ha sido empleado principalmente para coloides orgánicos, pero en el caso del coloide de oro ha encontrado aplicación cuando las partículas son muy pequeñas. Por ejemplo, ZSIGMONDY, 1927, (14, pag. 31) encontró a 8 °C, una presión osmótica de 3.1 cm de agua, para una dispersión de 0.562 g de oro en 100 ml de agua, de lo que pudo deducir un diámetro medio de las partículas coloidales de aproximadamente 16 Å. Es posible, según ZSIGMONDY y THIESSEN, 1925, (15), que cuando se trabaja con coloides protegidos, la gelatina se elimine por lavado en los pasos preliminares, o que la membrana del osmómetro sea permeable a esta sustancia.

Debe señalarse que cuando se estudian coloides ordinarios, la presión osmótica es muy pequeña, difícil de determinar y sujeta a grandes errores. El tema fue tratado por FINDLAY, 1914, (16) y en fecha más reciente por Jirgensons y Straumanis, (10, pag. 200-206).

El método no se utiliza corrientemente para coloides de oro por los inconvenientes señalados.

I-2-4.- Difracción de Rayos-X.-

La idea de usar rayos-X monocromáticos, en la determinación del tamaño de las partículas de un coloide, fue elaborada por SCHERRER, 1918, (17). Este autor demostró, que, por medio de las ecuaciones de Bragg, es

posible obtener información sobre el tamaño de las partículas de la dispersión, tomando como referencia el ancho de las líneas de difracción. Si se define el ancho medio, B, como la distancia que separa a dos puntos en los cuales la intensidad de la banda es igual a la mitad de su valor máximo, a φ como el ángulo de incidencia de los rayos-X y a λ como su longitud de onda, se puede demostrar que para partículas cúbicas de arista L, se cumple la siguiente ecuación:

$$L = \frac{0.9 \cdot \lambda}{B \cdot \cos \varphi} \quad \text{I-3}$$

Esta técnica fue utilizada por Scherrer para medir el tamaño de las partículas de los coloides preparados por Zsigmondy, encontrándose en acuerdo con otras determinaciones, por ejemplo osmóticas. Posteriormente el método fue utilizado por JONES, 1938, (18) y por MILLIGAN y MORRIS, 1964, (19). SPROULL, 1946, (20, pag. 438-467) revisó diversos aspectos relacionados con esta técnica.

Una solución diferente al problema, fue propuesta por DEBYE y MENCKE, 1931, (21), quienes demostraron que el tamaño de las partículas de un coloide puede calcularse a partir de las intensidades de difracción a ángulos pequeños. Para partículas esféricas, se puede establecer que:

$$I = K \cdot I_0 \left[\frac{3}{U^3} (\text{sen } U - U \cdot \cos U) \right]^2 \quad \text{I-4}$$

donde U es igual a $\frac{4\pi R \cdot \text{sen } \varphi}{\lambda}$; ya que φ es pequeño, U será igual a $\frac{4\pi R \varphi}{\lambda}$. En la ecuación I-4, los distintos parámetros tienen la siguiente significación:

I : intensidad de radiación difractada.

I_0 : intensidad de radiación incidente.

K : una constante, que depende de la geometría utilizada.

R : radio de las partículas.

φ : ángulo de incidencia de los rayos-X.

λ : longitud de onda de los rayos-X.

Las ecuaciones se complican cuando las partículas no son esféricas, como fue demostrado por SHULL y ROESS, 1947, (22). Es necesario también es-

tudiar factores técnicos, a los fines de evaluar correctamente la constante K.

TURKEVICH y col., 1950, (23) y TURKEVICH y HUBBELL, 1951, (24), han estudiado diversos coloides de oro aplicando este método y han encontrado una buena correlación con los datos provistos por la microscopía electrónica. Es necesario destacar que esta técnica ha sido desarrollada también para efectuar un análisis de la distribución de tamaños de las partículas, en sistemas heterodispersos.

Si bien la difracción de rayos-X presenta posibilidades de aplicación, su empleo no se ha difundido, probablemente debido al costo del equipo necesario.

I-2-5.- Velocidad de Sedimentación.-

Cuando una partícula esférica de radio a , se encuentra suspendida en un medio líquido, tiende a caer con una velocidad constante, μ , llamada velocidad límite de sedimentación, que se puede calcular por medio de la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{2 a^2 (\delta - \delta') g}{9 \eta} \quad \text{I-5}$$

derivada de la ley de Stokes. En la misma δ y δ' son las densidades de la partícula y del medio de suspensión, respectivamente, g es la aceleración de la gravedad, η es la viscosidad del medio, a es el radio de la partícula y μ su velocidad límite de sedimentación.

Cuando las partículas son muy pequeñas, su sedimentación no es espontánea y para lograrla se las debe someter a un campo gravitacional intenso. Experimentalmente se realiza esto, haciendo actuar sobre ellas una fuerza centrípeta apropiada en un equipo de centrifugación. En este caso la aceleración de la gravedad se reemplaza por la aceleración centrípeta, que es igual a $\omega^2 \cdot r$, donde ω es la velocidad angular de la centrifuga y r es la distancia de la partícula al eje de rotación. La ecuación I-5 se transformará entonces en la siguiente:

$$\mu = \frac{2 a^2 (\delta - \delta') \omega^2 r}{9 \eta} \quad \text{I-6}$$

Esta ecuación es la base para la determinación de los pesos molecu-

lares de proteínas u otras sustancias por ultracentrifugación. Dicho método ha sido utilizado por SUIITO y col.,1958,(25), para la determinación de los diámetros de las partículas de coloides de oro, cuando las dimensiones de aquellas son muy pequeñas.

En el caso de las dispersiones coloidales formadas por partículas más o menos grandes y densas, se puede recurrir al empleo de una centrifuga común, aplicando entonces un criterio teórico y experimental diferente. BECHHOLD y SCHLESINGER,1931,(26), estudiaron la posibilidad de determinar el tamaño de distintos virus por centrifugación y elaboraron un tratamiento matemático que puede aplicarse al caso de las dispersiones coloidales. En el mismo se supone que los movimientos de vibración, que siempre están presentes en una centrifuga común, son suficientes para homogeneizar la dispersión sobrenadante, pero que son débiles como para remover el fondo, es decir para hacer que las partículas ya precipitadas pasen nuevamente a la dispersión. Se pudo demostrar experimentalmente que no hay variación de concentraciones en el sobrenadante y que las partículas precipitadas no vuelven a aquel. Por otra parte los tubos de centrifuga deben girar en forma horizontal.

Para estudiar el fenómeno desde el punto de vista cuantitativo, es necesario elaborar una fórmula a partir de la ley de Stokes, que contemple las nuevas condiciones. Para ello definiremos los siguientes parámetros, que están esquematizados en la figura I-1.

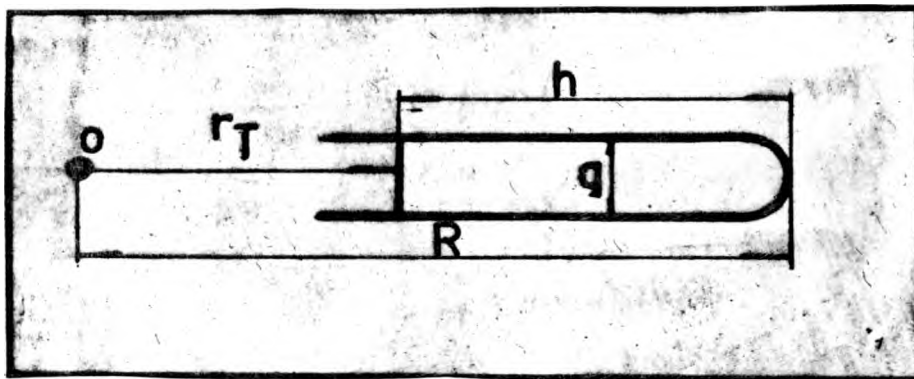


Fig. I-1.- Esquema de las condiciones geométricas en una determinación del tamaño de partículas por centrifugación.

En este esquema la significación de los parámetros es la siguiente:

- h : altura del líquido en el tubo de centrifugación.
- q : sección transversal del tubo de centrifugación.
- R : distancia desde el eje de rotación hasta el fondo del

del tubo de centrifugación.

r_T : distancia desde el eje de rotación hasta una partícula, al tiempo T.

O : eje de rotación.

Si en la ecuación I-6, la expresión $\frac{2 a^2 (\delta - \delta') \omega^2}{9 \eta}$

se hace igual a una constante K, la velocidad límite de sedimentación, μ , de una partícula que se encuentra en r_T al tiempo T es igual a $K \cdot r_T$.

Por otra parte se puede demostrar que el número de partículas que llega al fondo del tubo, dn , estando muy cerca de él, en una diferencial de tiempo, dt , es igual a:

$$dn = q \cdot c \cdot R \cdot K \cdot dt \quad I-7$$

donde K es la constante definida anteriormente, r_T se hace sensiblemente igual a R y c es la concentración expresada en número de partículas en 1 mililitro. La disminución de la concentración, en una diferencial de tiempo dt , es igual a:

$$-dc = \frac{c \cdot q \cdot R \cdot K \cdot dt}{q \cdot h} = \frac{c \cdot R \cdot K \cdot dt}{h} \quad I-8$$

donde el producto $q \cdot h$ representa el volumen de líquido en el tubo. Si reordenamos la ecuación anterior, tenemos:

$$-\frac{dc}{c} = \frac{R}{h} \cdot K \cdot dt \quad I-9$$

En un sistema homodisperso, K es constante en función del tiempo, por lo tanto la integración de la fórmula anterior entre los límites c_0 y c, y t_0 y t, es igual a:

$$\ln \frac{c}{c_0} = -\frac{R}{h} \cdot K \cdot T \quad I-10$$

donde T es el tiempo total de centrifugación.

La fórmula completa es:

$$\ln \frac{c}{c_0} = -\frac{R}{h} \cdot \frac{2 a^2 (\delta - \delta') \omega^2 T}{9 \eta} \quad I-11$$

A partir de la misma, se puede calcular el diámetro de las particu-

las, 2a, expresado en Å, que es igual a:

$$2 a = \frac{6.44 \times 10^8}{\omega} \sqrt{\frac{h}{R (\delta - \delta') \cdot T} \log \frac{c_0}{c}} \quad \text{I-12}$$

De las dos fórmulas anteriores, se puede concluir, que, si se conocen todos los parámetros que intervienen en el segundo miembro, es posible calcular fácilmente el diámetro de las partículas coloidales.

En el caso de los coloides de oro, esto es válido solamente si las partículas no están protegidas, ya que entonces su densidad es igual a la del oro metálico. Cuando se estudia el coloide de 198-Au protegido con gelatina, la densidad de las partículas es menor, como fue observado por ZILVERSMIT y col., 1952, (27), si bien se desconoce su valor.

Por otra parte, es necesario señalar, que la integración para pasar de la fórmula I-9 a la I-10 se puede efectuar solamente en la forma indicada, cuando el sistema es homogéneo. En caso contrario, el radio de las partículas, que hay que considerar en la fórmula, varía en los diferentes tiempos de centrifugación, ya que las partículas grandes llegan al fondo del tubo antes que las pequeñas. Esto se traduce en la práctica en una curva cuyos valores de pendiente negativa decrecen, cuando se representa $\log(c/c_0) = f(T)$. ZEMLITSKII, 1965, (28) ha propuesto un tratamiento matemático, mediante el cual es posible calcular la heterodispersión del sistema a partir de datos de velocidad de sedimentación, cuando en la experiencia se eligen condiciones apropiadas.

Los problemas experimentales distan mucho de encontrarse resueltos. Para medir las actividades del sobrenadante a distintos tiempos, es necesario detener la centrifuga, causa probable de una redispersión del material precipitado. El mismo efecto puede producirse debido a vibraciones excesivas del aparato. Estos inconvenientes son subsanables en parte, colocando material adsorbente en el fondo del tubo.

El desconocimiento de la densidad de las partículas de oro coloidal protegidas con gelatina, fue solucionado parcialmente por GIRARDI y PIETRA, 1961, (29), quienes efectuaron una calibración previa, midiendo el diámetro medio de las partículas por microscopía electrónica. Se puede tener una idea acerca de la heterodispersión del sistema en base a la separación de la curva experimental del $\log(c/c_0) = f(T)$ de una recta teórica, trazada a partir de la unión de los puntos correspondientes a

la actividad inicial y al 5% de ésta.

ANGOSO-MARINA, 1964, (30), encontró una solución más lógica al problema, efectuando corridas simultáneas en varios tubos y midiendo las actividades del sobrenadante a distintos tiempos en un tubo diferente cada vez.

De lo expuesto se desprende que el método presenta un tratamiento teórico simple, pero que distintos problemas de índole experimental dificultan su difusión.

I-2-6.- Microscopía Electrónica.-

Con la aparición de la teoría de de Broglie sobre la naturaleza onda - corpúsculo del electrón y el descubrimiento de que campos magnéticos o electrostáticos pueden ser utilizados como "lentes" para un haz de electrones en movimiento, el advenimiento del microscopio electrónico solo fue cuestión de tiempo y de la resolución de distintos problemas técnicos. En la década de 1930 aparecieron los primeros microscopios electrónicos, por cierto rudimentarios si se los compara con los actuales.

La posibilidad de obtener aumentos hasta entonces inalcanzables y los conocimientos acumulados sobre la elaboración del oro coloidal, hicieron de este preparado uno de los primeros motivos de estudio con el nuevo instrumento. La primera impresión fue optimista, ya que aparentemente se logró resolver el problema midiendo simplemente el diámetro de una serie grande de partículas, estableciéndose luego el diámetro medio y la curva de distribución de tamaños. Los primeros trabajos, en los cuales se observaron muestras de oro coloidal por microscopía electrónica, fueron los de BEISCHER y KRAUSE, 1937, (31), v. BORRIES y KAUSCHE, 1940, (32) y ANDERSON, 1942, (33). Posteriormente siguieron los de TURKEVICH y HILLIER, 1949, (34) y TURKEVICH y col., 1951, (35), 1953, (36). Más tarde TAKIYAMA, 1958, (37) estudió nuevamente la cinética del crecimiento de las partículas de oro coloidal mediante la misma técnica.

En fecha más reciente, han surgido algunas dudas con respecto a la validez de los datos provistos por la microscopía electrónica, sobre todo cuando se estudia la forma de partículas pequeñas. Milligan y Morriss (19) han llamado la atención sobre este punto. Por otra parte resulta evidente que en el caso del oro coloidal radiactivo, protegido con algún agente estabilizante liófilo, se determina el diámetro de la partícula de oro solamente, ya que el material protector es transparente a los e-

lectrones.

Si bien no poseemos referencias específicas para el oro coloidal, se conocen alteraciones en otros materiales inorgánicos debidas al bombardeo electrónico, demostradas por BURTON y col., 1947, (38).

En el caso del oro coloidal radiactivo, es probable que ocurran algunas variaciones en la curva de distribución de tamaños de las partículas durante la preparación de la muestra, procedimiento que incluye una desecación suave y luego un lavado con agua destilada. Es posible que durante la etapa de desecación, las partículas más grandes sedimenten más rápidamente que las pequeñas. Esto tendría por efecto la visualización de una mayor cantidad de partículas grandes, y por ende, la obtención de un diámetro medio mayor que el real. Tampoco debe desestimarse la posibilidad de que se produzcan principios de coagulación parcial, durante la preparación de la muestra, lo que provocaría el mismo efecto.

No debe olvidarse, que la cantidad de partículas que se miden es relativamente pequeña, si se la compara con su número total, lo que puede dificultar la valoración estadística del diámetro medio. Este problema fue analizado por STOEBER, 1965, (39) y por COOPER y col., 1965, (40).

Uno de los problemas más importantes en la evaluación del diámetro medio de las partículas de un coloide por microscopía electrónica, es la definición de este parámetro y su correlación con los valores obtenidos mediante otros métodos. Este punto fué analizado por FISCHER, 1950, (41, Cap.2). En principio, se pueden distinguir varios tipos de diámetros medios, siendo los más usuales los que tienen en cuenta el diámetro o la superficie o el volumen o masa de las partículas medidas, cuando éstas son esféricas o pueden ser consideradas como tales.

MARON y col., 1952, (42) definen los siguientes diámetros medios, que hemos adoptado en nuestro trabajo:

- a) El diámetro medio numérico. Se lo simboliza con D_N y su definición es:

$$D_N = \frac{\sum n_i \cdot D_i}{\sum n_i} \quad \text{I-13}$$

donde n_i es el número de partículas con diámetro D_i .

Este diámetro se obtiene cuando se utilizan métodos osmóticos para determinar el tamaño de las partículas, ya que la presión osmótica depende solo del número de micelas presentes, como

lo han señalado Jirgensons y Straumanis, (10, pag. 212).

- b) El diámetro medio, relación volumen-superficie. Su símbolo es D_S y se lo define como:

$$D_S = \frac{\sum n_i \cdot D_i^3}{\sum n_i \cdot D_i^2} \quad \text{I-14}$$

donde n_i es el número de partículas de diámetro D_i .

Este diámetro debe emplearse cuando se trabaja con agentes tensioactivos.

- c) El diámetro medio másico. Se lo simboliza con D_W y su definición es:

$$D_W = \left[\frac{\sum n_i \cdot D_i^6}{\sum n_i \cdot D_i^3} \right]^{\frac{1}{3}} = \frac{\sum n_i \cdot M_i^2}{\sum n_i \cdot M_i} \quad \text{I-15}$$

donde n_i es el número de partículas de diámetro D_i o masa M_i .

Este diámetro medio se determina cuando se utilizan métodos de difracción luminosa, según MARON y ELDER, 1963, (43).

De acuerdo con estos autores, mediante las relaciones $R_1 = D_W / D_N$ y $R_2 = D_W / D_S$, se puede tener una idea sobre el grado de heterodispersión del sistema, siendo ésta mayor a medida que crecen las relaciones anteriormente citadas. Resulta evidente que en un sistema heterodisperso, D_N será menor que D_S y éste a su vez será menor que D_W , ya que la influencia de la superficie o del volumen se hace mayor a medida que aumenta el diámetro de una partícula.

Cuando se determina el tamaño de las partículas coloidales por microscopía electrónica, se suele representar una curva de distribución de tamaños, que indica la frecuencia con que aparecen partículas de cierto diámetro en función de éste último. El problema consiste en determinar la función de distribución adecuada. El caso más simple sería una distribución de tipo gaussiano, en la cual:

$$\frac{d n}{d D} = \frac{1}{\sqrt{2 \pi} \sigma} \cdot e^{-\frac{(D - \bar{D})^2}{2 \sigma^2}} \quad \text{I-16}$$

Las curvas de distribución de tamaños de partículas determinadas en

forma experimental, no son simétricas. Por esta razón se buscó otra función de distribución, en la cual se sustituye el diámetro por el logaritmo de este valor, llamándose la función de distribución logarítmica normal. La ecuación correspondiente es:

$$\frac{dn}{d \log D} = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma} \cdot e^{-\frac{(\log D - \log \bar{D})^2}{2\sigma^2}} \quad \text{I-17}$$

En las ecuaciones I-16 y I-17, σ es la desviación standard y \bar{D} el diámetro medio.

Posiblemente esta última fórmula sea la que rige la estadística de distribución del tamaño de las partículas de un coloide. Stoeber (39) ha deducido expresiones similares para los diámetros en superficie y en volumen.

Sin embargo ESPENSCHIED y col., 1964, (44) han encontrado un tipo de distribución logarítmica biparamétrica, de orden cero, que se ajustaría más al caso que nos ocupa. Según HONIG, 1965, (45), esta nueva función puede ser convertida en una distribución logarítmica normal, mediante artificios matemáticos.

Es conveniente determinar las consecuencias prácticas del análisis de distribución de tamaños de partículas coloidales. Si imaginamos un coloide compuesto por partículas de distintos diámetros, es fácil observar, que, cuando se realiza el estudio de su distribución según su número, su superficie o su volumen, la proporción de partículas que se encuentran en los distintos rangos de tamaños varía de acuerdo con el criterio elegido. Se comprueba una disminución en el número de partículas pequeñas y un aumento en la cantidad de partículas grandes, con la consecuente variación en los máximos correspondientes, cuando se pasa de un diámetro medio D_N a otro de tipo D_W . En el caso de los coloides radiactivos esto es importante, ya que la actividad de cada partícula está relacionada con su volumen o su masa. Por lo tanto, si bien se puede encontrar un número relativamente elevado de partículas pequeñas en una preparación determinada, éste disminuye sensiblemente cuando se hace el cálculo en base al volumen de las partículas, es decir sus actividades. De lo dicho se desprende que en el caso de los radiocoloides, el valor de D_W puede tener tanta o más importancia que el de D_N , si bien los autores han tra-

bajado en la mayoría de los casos solamente con éste último.

De lo anterior resulta evidente, que, si bien hasta épocas relativamente recientes, la microscopía electrónica se ha considerado como el método de elección para determinar el diámetro de las partículas coloidales, existen ciertos problemas teóricos y experimentales, que obligan a manejar los resultados con alguna cautela.

Por otra parte, es necesario señalar, que, entre los radiocoloides utilizados en medicina, se encuentran materiales que son muy difíciles de visualizar mediante este método, debido a su baja densidad o a problemas de volatilización.

I-2-7.- Métodos Ópticos.-

La determinación del tamaño de las partículas coloidales por interacción de la luz con aquellas, ofrece interesantes posibilidades. Debe señalarse que esta interacción no modifica en manera alguna el sistema en estudio. Además requiere un mínimo de manipulaciones, lo que la hace especialmente atractiva, particularmente en el caso de los coloides radiactivos.

Probablemente fue FARADAY, 1857, (46) quien observó por primera vez el interesante comportamiento de la luz cuando ésta pasa a través de una dispersión de oro coloidal. Posteriormente TYNDALL, 1869, (47) y STRUTT (Lord Rayleigh), 1871, (48), estudiaron el fenómeno en forma más general y completa. Las primeras investigaciones en el campo de la óptica de los sistemas coloidales, fueron revisadas por OSTWALD, 1924, (49).

En general se puede considerar que, cuando la luz atraviesa una dispersión coloidal, el campo eléctrico asociado con la onda luminosa, polariza la nube de electrones de los átomos que constituyen la partícula, sirviendo eventualmente aquéllos como fuentes secundarias de luz, la que se emite en distintas direcciones. Asimismo puede haber absorción de la onda luminosa. Cuando se trabaja en la parte visible del espectro, las ecuaciones de la teoría electromagnética clásica de la luz, debidas a Maxwell, permiten el estudio de este problema.

Conviene considerar el tratamiento cuantitativo de la difracción de un rayo luminoso que pasa a través de una dispersión coloidal, bajo tres aspectos:

a) Difracción de Rayleigh.- Se observa cuando el tamaño de las partículas es muy pequeño comparado con la longitud de onda de la luz inci-

dente. HELLER, 1965, (50) indicó la posibilidad de utilizar las ecuaciones de Rayleigh para partículas de 1.5 μ si se trabaja con luz visible, así como para cuerpos de 10 cm de diámetro, cuando se emplean longitudes de onda de 21 cm. Esto último resultaría de utilidad en problemas meteorológicos y espaciales, y su aplicación sería factible debido a la compensación de ciertos errores.

- b) Difracción de Debye o Rayleigh-Gans.- Se aplica cuando las partículas son grandes, pero sus propiedades ópticas difieren poco de las del medio que las rodea.
- c) Difracción de Mie.- Es válida para partículas de cualquier tamaño y diferentes propiedades refringentes.

Como éstas últimas son las condiciones que se observan en nuestro caso, estudiaremos el problema más detenidamente.

El tema fue revisado en forma general por van de HULST, 1957, (51), OSTER, 1948, (52), 1960, (53) y KERKER, 1963, (54).

La elaboración de una teoría que contemple la interacción de la luz con las partículas de una dispersión coloidal, representa un interesante problema teórico.

Las primeras hipótesis propuestas para explicar el color de algunas dispersiones metálicas, suponían distintos estados del metal diversamente coloreados. Luego, EHRENHAFT, 1905, (55) consideró la posibilidad de que este fenómeno pudiera explicarse con el de resonancia óptica. Por otra parte, MAXWELL-GARNETT, 1904, (56), 1906, (57), demostró que el comportamiento de la luz frente a un coloide podía predecirse a partir de la teoría de Lorentz-Lorentz.

DEBYE, 1909, (58) propuso una solución teórica al problema y GANS, 1912, (59) postuló ecuaciones válidas para partículas elipsoidales, de tamaño menor que la longitud de onda de la luz incidente.

MIE, 1907, (60), 1908, (61) elaboró una teoría que explica el comportamiento de la luz del espectro visible al atravesar una dispersión coloidal. Esta teoría, que aun sigue siendo válida en sus partes esenciales y que hemos considerado la más adecuada a la resolución de nuestro problema experimental, fue verificada prácticamente por primera vez por STEUBING, 1908, (62). Mie pudo calcular a partir de las ecuaciones de Maxwell, las ondas parciales que son emitidas por las partículas coloidales, que se comportan como emisores secundarios, cuando una radiación luminosa incide sobre ellas. Estas ondas parciales pueden ser representadas ba-

jo forma de una serie, en la que intervienen distintos términos, que corresponden a las oscilaciones magnéticas y eléctricas. Siempre es posible trabajar con un número finito de términos, siendo u el de la oscilación eléctrica y $u - 1$ el de la oscilación magnética correspondiente.

En el desarrollo cuantitativo de esta teoría es necesario hacer una serie de suposiciones previas. Las partículas deben ser esféricas, o debe ser posible considerarlas como tales. La solución analizada tiene que ser lo suficientemente diluida, como para que pueda aceptarse que un rayo de luz incide solamente sobre una partícula, es decir que no se produzca difracción múltiple. Según van de Hulst (51, pag. 397) es además conveniente que las partículas sean lióforas, a los fines de eliminar el problema de un límite poco neto entre ellas y el medio de dispersión.

En las ecuaciones correspondientes, se utilizan algunos parámetros que conviene definir previamente.

a : radio de las partículas

n_0 : índice de refracción absoluto del medio de dispersión.

λ : longitud de onda de la luz incidente, en el vacío.

λ' : longitud de onda de la luz incidente en el medio de dispersión; por lo tanto $\lambda' = \lambda / n_0$.

$\frac{2\pi a}{\lambda'}$: parámetro adimensional que relaciona el tamaño de la partícula con la longitud de onda de la luz incidente. Se lo suele simbolizar con x .

m : índice de refracción complejo absoluto del metal; $m = n - ik$, donde n es un valor relacionado con la refracción y k , otro relacionado con la absorción; i es igual a $\sqrt{-1}$.

m' : índice de refracción complejo relativo del metal respecto al medio de dispersión. Por lo tanto $m' = m / n_0$.

N : número de partículas coloidales por mililitro de dispersión.

Existen dos aproximaciones posibles para solucionar el problema mediante las ecuaciones de Mie. En una de ellas, se analizan la intensidad, polarización y distribución angular de la luz difractada, mientras que en la otra, se estudian los coeficientes de extinción.

A) Estudio de la luz difractada.-

En el primer caso, se suele expresar la intensidad de la luz difrac-

tada en un ángulo θ , formado por la dirección de la luz incidente y la del observador, estando la luz polarizada vertical u horizontalmente. Para la luz polarizada en forma vertical se puede escribir:

$$\left[S_1(\theta) \right]^2 = i_1(\theta) = \left[\sum_{n=1}^{n=\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \left[a_n \pi_n(\cos \theta) + p_n \zeta_n(\cos \theta) \right] \right]^2 \quad \text{I-18}$$

y para luz polarizada horizontalmente:

$$\left[S_2(\theta) \right]^2 = i_2(\theta) = \left[\sum_{n=1}^{n=\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \left[a_n \zeta_n(\cos \theta) + p_n \pi_n(\cos \theta) \right] \right]^2 \quad \text{I-19}$$

En estas ecuaciones a_n y p_n son funciones de x y de m , o sea que son números complejos. Las funciones son las de Bessel de orden $n + 1/2$ de x y de $m \cdot x$. La función angular π_n es la derivada primera respecto a $-\cos \theta$ del polinomio de Legendre de orden n ; ζ_n es una función algebraica de $-\cos \theta$ y de la derivada primera y segunda del polinomio de Legendre de orden n . Las intensidades de la luz son iguales al cuadrado de las amplitudes complejas.

Del estudio de estas ecuaciones se deduce que su solución formal rigurosa es prácticamente imposible. Físicamente se encuentra que ello tampoco es necesario y que basta con pocos términos de la serie. Por otra parte se ha recurrido a varios artificios que permiten determinar el tamaño de las partículas de distintos materiales en forma práctica, artificios que son válidos sobre todo cuando los preparados son homogéneos.

Uno de los más simples fue utilizado por Maron y Elder (43), donde se busca el ángulo en el cual la intensidad de luz difractada presenta el primer mínimo. Así:

$$\frac{2a}{\lambda} \sin(\theta/2) = k_1$$

donde k_1 depende del índice de refracción complejo m' y a , es el radio de las partículas.

Por otra parte MARON y col., 1964, (63), utilizaron expresiones que permiten relacionar las posiciones angulares de los mínimos y máximos de la relación de polarización, ρ_{μ} , definida ésta última como la relación existente entre las intensidades de luz difractada polarizada horizontal

y verticalmente, con los diámetros de las partículas coloidales. Se demostró que este valor, simbolizado como $2a$, puede determinarse a partir de las siguientes expresiones:

$$\frac{2a}{\lambda'} \text{ sen } (\delta_i / 2) = l_i$$

y

$$\frac{2a}{\lambda'} \text{ sen } (\omega_i / 2) = L_i$$

donde δ_i y ω_i son los ángulos en que aparecen los mínimos y máximos de ρ_μ , respectivamente, i es igual a 1, 2, 3, etc., o sea que corresponden al orden de aparición de dichos mínimos y máximos; l_i y L_i son constantes que dependen de m' .

El problema se complica cuando las dispersiones son heterogéneas. En este caso se compara la relación de polarización experimental con los valores calculados teóricamente en base a distintas distribuciones de tamaños, supuestas previamente, como fue propuesto por KERKER y col., 1963,(64),1964,(65) y ESPENSCHIED y col.,1964,(66). Los cálculos son complicados y se requiere el concurso de computadoras de gran eficiencia debidamente programadas. NAKAGAKI y SHIMOYAMA,1964,(67) han estudiado este problema en forma teórica. Por otra parte, SHIFRIN y PERELMAN,1964,(68) han propuesto una solución algo distinta, calculando la función de distribución de tamaños directamente mediante los datos experimentales. AVERINK y col.,1966,(69) establecen la curva de distribución de partículas de látex, utilizando datos obtenidos mediante una combinación de métodos ópticos y de ultracentrifugación.

El problema se complica aun más cuando las dispersiones analizadas contienen partículas protegidas con algún agente estabilizante, que al mismo tiempo son heterogéneas. BRUN,1965,(70) ha podido determinar en forma aproximada el espesor de la capa de gelatina en coloides de oro protegidos con esta sustancia, utilizando métodos de difracción relativamente laboriosos. Una solución más exacta puede lograrse, si se utilizan las ecuaciones de difracción múltiple, que son más complicadas y fueron analizadas teóricamente por MATUR y YEH,1964,(71). ESPENSCHIED y col. 1965,(72) han estudiado de esta manera una dispersión heterogénea de un aerosol de cloruro de plata, cuyas partículas estaban recubiertas con

una esfera concéntrica de ácido linolénico. Hasta el momento, creemos que este trabajo representa una de las soluciones más generales del problema tratado.

Como se puede observar en las consideraciones expuestas, el estudio de dispersiones coloidales con este tipo de métodos no está resuelto en forma completa, ofreciendo cada coloide características particulares.

El empleo de los métodos descriptos, requiere la utilización de fotómetros especiales adaptados a la medida de la intensidad y polarización de la luz difractada en distintos ángulos. El instrumento más conocido es el que ha sido puesto a punto por BRICE y col., 1950, (73)

Por otra parte se puede encontrar una ayuda importante en algunas tablas, en las que se calculan las funciones de difracción para distintos valores de x , de m y de θ . Las tablas más usadas son las de PANGONIS y col., 1957, (74), PENNDORF, 1958-9, (75) y DENMAN y col., 1963, (76).

Otra dificultad experimental en las determinaciones de luz difractada, es la naturaleza de la fuente luminosa. WOODWARD, 1963, (77) propuso el empleo de un laser de He-Ne, lo que podría resultar de interés en investigaciones futuras.

B) Estudio de los coeficientes de extinción.-

La segunda posibilidad de estudiar la interacción de la luz con partículas coloidales, aplica la determinación de los coeficientes de extinción en distintas longitudes de onda. Si bien la información que se puede extraer de dichos resultados es menos completa que con los métodos anteriores, el equipo necesario es un buen espectrofotómetro y las medidas pueden realizarse con relativa rapidez.

El método fue desarrollado en forma teórica principalmente por van de Hulst (51). Este autor, basándose en la teoría de Mie, pudo calcular coeficientes relativamente simples para los distintos términos de la serie. En general se puede formular que el coeficiente de extinción, γ es igual a:

$$\gamma = N \cdot a^2 \cdot Q_{\text{ext}} \quad \text{I-23}$$

donde Q_{ext} incluye la serie de Mie, y es igual a:

$$Q_{\text{ext}} = \frac{2\pi a}{\lambda'} F_1(m') + \left[\frac{2\pi a}{\lambda'} \right]^3 F_2(m') + \left[\frac{2\pi a}{\lambda'} \right]^4 F_3(m') \quad \text{I-24}$$

Según van de Hulst (51, pag. 270), las funciones complejas de m' , $F_1(m')$, $F_2(m')$ y $F_3(m')$, son iguales a:

$$F_1(m') = -\text{Im} \left[4 \left(\frac{m'^2 - 1}{m'^2 + 2} \right) \right] \quad \text{I-25}$$

$$F_2(m') = -\text{Im} \left[\frac{4}{15} \left(\frac{m'^2 - 1}{m'^2 + 2} \right)^2 \frac{m'^4 + 27 m'^2 + 36}{2 m'^2 + 3} \right] \quad \text{I-26}$$

$$F_3(m') = \text{Re} \left[\frac{8}{3} \left(\frac{m'^2 - 1}{m'^2 + 2} \right)^2 \right] \quad \text{I-27}$$

donde Im indica que se toma la parte imaginaria y Re , la parte real, de la expresión que sigue a estas siglas.

La fórmula I-24 fue utilizada por JEPPESEN y BARLOW, 1962, (78) para determinar el tamaño de las partículas de oro coloidal. El desarrollo de la misma, condujo a estos autores a la siguiente expresión:

$$\gamma = \frac{3\pi C}{2 D \lambda'} \left[F_1(m') + \left[\frac{2\pi a}{\lambda'} \right]^2 F_2(m') + \left[\frac{2\pi a}{\lambda'} \right]^3 F_3(m') \right] \quad \text{I-28}$$

donde C es la concentración en oro del coloide y D la densidad de sus partículas. Como resulta evidente, para utilizar esta ecuación es necesario conocer la concentración en forma muy precisa.

Posteriormente, DAUCHOT y WATILLON, 1967, (79) calcularon los coeficientes de soles de selenio a partir de las ecuaciones de Mie. Asimismo analizaron la influencia de la heterodispersión del sistema sobre las curvas de extinción.

Una solución menos exacta se puede lograr si se compara la forma de los espectros de absorción con la calculada a partir de las teorías de Mie y/o Gans. Este criterio fue seguido por TURKEVICH y col., 1954, (80) y por Milligan y Morriss (19). De esta forma se puede hallar el tamaño aproximado de las partículas a partir de la longitud de onda en la que se produce la absorbancia máxima. Cuando las partículas no son esféricas,

los picos de absorción se muestran achatados, por lo que la determinación del espectro completo de una dispersión de oro, puede proporcionar una idea sobre la forma de aquellas. MORRISS y COLLINS, 1964, (81) han calculado el máximo de absorción para partículas pequeñas y por otra parte han determinado el tamaño de micelas de oro coloidal cubiertas con plata. Para ello utilizaron el tratamiento teórico de difracción múltiple propuesto por ADEN y KERKER, 1951, (82).

CHIANG y TURKEVICH, 1963, (83) determinaron que los coloides de oro, cuyas partículas poseen la forma de placas trigonales, presentan un segundo pico de absorbancia en 675 μ aproximadamente.

La teoría de Gans fue utilizada por KRISHNAN, 1937, (84), para determinar el tamaño y la forma de partículas de oro coloidal no esféricas. Para ello realizó mediciones de la luz difractada y absorbida por estas dispersiones.

Conviene señalar, que en el tratamiento teórico propuesto por Mie, no se considera la influencia de fenómenos de tipo cuántico sobre la absorción de la luz por las partículas coloidales. Sin embargo, SERAPHIN, 1952, (85) ha comprobado que dichos efectos deben tenerse en cuenta si se trabaja con longitudes de onda menores que 450 μ y especialmente cuando se efectúan las mediciones sobre coloides de oro cuyas partículas son pequeñas. En la práctica se puede verificar un aumento de los coeficientes de extinción observados con respecto a los calculados mediante la teoría de Mie. Este fenómeno se debe probablemente a efectos plasmáticos. El incremento pudo ser calculado en forma aproximada por Seraphin (85) y por DOYLE, 1960, (86), para otros tipos de coloides.

Como puede observarse, en las dos aproximaciones a la teoría de Mie que hemos descrito anteriormente, intervienen como variables en las distintas fórmulas, la longitud de onda de la luz incidente, el radio y el índice de refracción complejo de las partículas. La principal dificultad en el estudio cuantitativo de las dispersiones coloidales empleando estas ecuaciones, radica en la necesidad de la determinación práctica de este valor. Las primeras experiencias con oro fueron realizadas por HAGENS y RUBENS, 1902, (87) y las mismas sirvieron de base para los cálculos efectuados por Mie. Posteriormente hubo un gran incremento en el número y en la calidad de las mediciones, efectuadas principalmente sobre

oro macizo y capas delgadas de este metal, en el caso que nos ocupa. Generalmente se aceptan como las determinaciones más fidedignas, las realizadas por OTTER, 1961, (88), ABELES y col., 1962, (89) y las de v. FRAGSTEIN y KAMPERMANN, 1963, (90). Por otra parte OTTER, 1961, (91) ha podido comprobar que las variaciones relativamente importantes de temperatura, afectan los valores de n y de k . Las discrepancias se hacen particularmente evidentes, cuando el metal pasa al estado líquido. Asimismo DOREMUS, 1964, (92) ha observado que las propiedades ópticas de coloides de oro incluidos en vidrio, cambian en forma manifiesta cuando se pasa de la temperatura ambiente a la de 540°C . Es interesante mencionar, que este autor utiliza las constantes dieléctricas en lugar de los índices de refracción, para caracterizar las propiedades ópticas de los coloides.

Los índices de refracción complejos varían en grado apreciable cuando se disminuye mucho el espesor del material medido. La interpretación teórica de este fenómeno ha sido elaborada principalmente por v. FRAGSTEIN y ROEMER, 1958, (93), GRARD, 1964, (94) y COOPER y col., 1965, (95).

En el caso de los coloides de oro, ROEMER y v. FRAGSTEIN, 1961, (96) han determinado sus índices de refracción para distintas longitudes de onda y tamaños de partículas, encontrando que los valores son distintos a los que corresponden a espesores similares de oro en capas delgadas.

I-3.- PARTE EXPERIMENTAL.-

Dadas las consideraciones efectuadas en el párrafo anterior, hemos dedicado atención preferente a la elaboración de un método de determinación del tamaño de las partículas de coloides de 198-Au. El hecho de que los mismos presentan una coloración característica y que sus partículas son de tamaño relativamente pequeño, nos incitó a ensayar el camino de la espectrofotometría.

I-3-1.- Fundamento teórico del método ensayado.-

I-3-1-1.- Determinación del tamaño de las partículas.-

Del estudio de las fórmulas I-24 a I-27 del párrafo I-2-7 se puede deducir que cuando el diámetro de las partículas es apreciablemente menor que la longitud de onda de la luz incidente, el segundo y el tercer

término de la serie de Mie pueden ser eliminados, ya que $2\pi a / \lambda'$ se hace mucho menor que la unidad: este valor elevado al cubo o a la cuarta potencia evidentemente incide poco en los valores del coeficiente de extinción.

Así tenemos que, para partículas de hasta 30 μ de diámetro, γ es igual a:

$$\gamma = - N\pi a^2 \frac{2\pi a}{\lambda'} \operatorname{Im} \left[4 \frac{m'^2 - 1}{m'^2 + 2} \right] \quad \text{I-29}$$

o sea:

$$\gamma = - \frac{\pi \cdot 8\pi^2 a^3}{\lambda'} \operatorname{Im} \left[\frac{m'^2 - 1}{m'^2 + 2} \right] \quad \text{I-30}$$

Por otra parte se puede demostrar experimentalmente que, en las concentraciones utilizadas, las dispersiones coloidales cumplen con la ley de Lambert - Beer, de donde:

$$\gamma = \frac{2.30 \cdot \text{d.o.}}{l \cdot C} \quad \text{I-31}$$

donde l : espesor de dispersión atravesado por la luz.

C : concentración de la dispersión, expresada en g/ml.

d.o.: densidad óptica, o sea $\log (I_0 / I)$, donde I_0 es la intensidad de luz incidente e I la intensidad de luz transmitida.

Si se emplea la concentración volúmica, es decir, el volumen de metal por unidad de volumen de dispersión, resulta práctico introducir en la fórmula I-30 el coeficiente de extinción volúmico, que simbolizaremos con K , que es la densidad óptica por unidad de concentración volúmica para un espesor unitario. Por lo tanto K será igual a:

$$K = \frac{\gamma}{N \frac{4}{3} \pi a^3} \quad \text{I-32}$$

De donde se deduce que:

$$K = - \frac{6\pi}{\lambda'} \operatorname{Im} \left[\frac{m'^2 - 1}{m'^2 + 2} \right] \quad \text{I-33}$$

Si recordamos que $\lambda' = \lambda / n_0$, podemos escribir la expresión anterior como:

$$K = - \frac{6\pi}{\lambda} n_0 \cdot \operatorname{Im} \left[\frac{m'^2 - 1}{m'^2 + 2} \right] \quad \text{I-34}$$

Por otra parte, la ley de Lambert - Beer queda expresada de la siguiente forma:

$$K = \frac{2.30}{l \cdot c} \text{ d.o.} \quad \text{I-35}$$

donde c es la concentración volúmica.

Para desarrollar la fórmula I-33, consideramos, en primer lugar que:

$$m' = \frac{m}{n_0} = \frac{n}{n_0} - i \left[\frac{k}{n_0} \right] \quad \text{I-36}$$

Luego desarrollamos el término $(m'^2 - 1) / (m'^2 + 2)$ de la fórmula I-34, y tendremos que:

$$\frac{m'^2 - 1}{m'^2 + 2} = \frac{n^2 - k^2 - 2.i.k.n - n_0^2}{n^2 - k^2 - 2.i.k.n + 2n_0^2} \quad \text{I-37}$$

luego:

$$\begin{aligned} \operatorname{Im} \left[\frac{m'^2 - 1}{m'^2 + 2} \right] &= \operatorname{Im} \left[\frac{\left[(n^2 - k^2 - n_0^2) - 2.i.k.n \right] \left[(n^2 - k^2 + 2n_0^2) + 2.i.k.n \right]}{\left[(n^2 - k^2 + 2n_0^2) - 2.i.k.n \right] \left[(n^2 - k^2 + 2n_0^2) + 2.i.k.n \right]} \right] \\ &= - \frac{6 \cdot k \cdot n \cdot n_0^2}{(n^2 - k^2 + 2n_0^2)^2 + 4 \cdot n^2 \cdot k^2} \quad \text{I-38} \end{aligned}$$

En consecuencia:

$$K = \frac{36 \pi}{\lambda} n_o^3 \frac{n \cdot k}{(n^2 - k^2 + 2n_o^2)^2 + 4 \cdot n^2 \cdot k^2} \quad \text{I-39}$$

de donde

$$\text{d.o.} = (0.43.1.c) \left[\frac{36 \pi}{\lambda} n_o^3 \frac{n \cdot k}{(n^2 - k^2 + 2n_o^2)^2 + 4 \cdot n^2 \cdot k^2} \right] \quad \text{I-40}$$

En esta fórmula se observa que si se conocen todos los parámetros que intervienen en el segundo miembro de la ecuación, es posible calcular teóricamente la densidad óptica de un coloide.

Sin embargo, como se ha señalado también en el párrafo I-2-7, es necesario conocer la concentración en oro de los coloides, cuando se desea calcular el diámetro de sus partículas a partir de una sola lectura de densidad óptica. Ante la dificultad de una evaluación suficientemente precisa de la concentración en oro de los coloides terminados, hemos preferido adoptar un método relativo, en el cual no es necesario tener en cuenta este parámetro.

En efecto, si se realizan las lecturas de densidades ópticas sobre la misma dispersión a dos longitudes de onda diferentes λ_1 y λ_2 , la relación entre las dos lecturas de densidades ópticas, d.o.₁ y d.o.₂, será igual a:

$$\frac{\text{d.o.}_1}{\text{d.o.}_2} = \frac{(n_{o,1}^3/\lambda_1) n_1 \cdot k_1 / (n_1^2 - k_1^2 + 2n_{o,1}^2)^2 + 4 n_1^2 \cdot k_1^2}{(n_{o,2}^3/\lambda_2) n_2 \cdot k_2 / (n_2^2 - k_2^2 + 2n_{o,2}^2)^2 + 4 n_2^2 \cdot k_2^2} \quad \text{I-41}$$

En esta ecuación, no interviene la concentración del coloide. En la misma, $n_{o,1}$ es el índice de refracción del medio de dispersión a la longitud de onda λ_1 ; $n_{o,2}$, el índice de refracción del medio de dispersión a λ_2 ; n_1 y k_1 son el índice de refracción y el de absorción a λ_1 ; n_2 y k_2 el índice de refracción y el de absorción a λ_2 , respectivamente.

En la fórmula I-41 se observa que la relación entre dos densidades ópticas a diferentes frecuencias, es función de las propiedades ópticas del coloide en dichas longitudes de onda. En el caso del coloide de oro,

Roemer y v.Fragstein (96) han podido demostrar que las propiedades ópticas se apartan de las del oro macizo a medida que el tamaño de las partículas disminuye. Si se calculan los coeficientes de extinción volúmicos, expresados en mm^{-1} , en función de la longitud de onda de la luz incidente, para coloides de distinto tamaño de partículas y para una concentración volúmica en oro de 10^{-6} , se obtienen las curvas de la figura I-2.

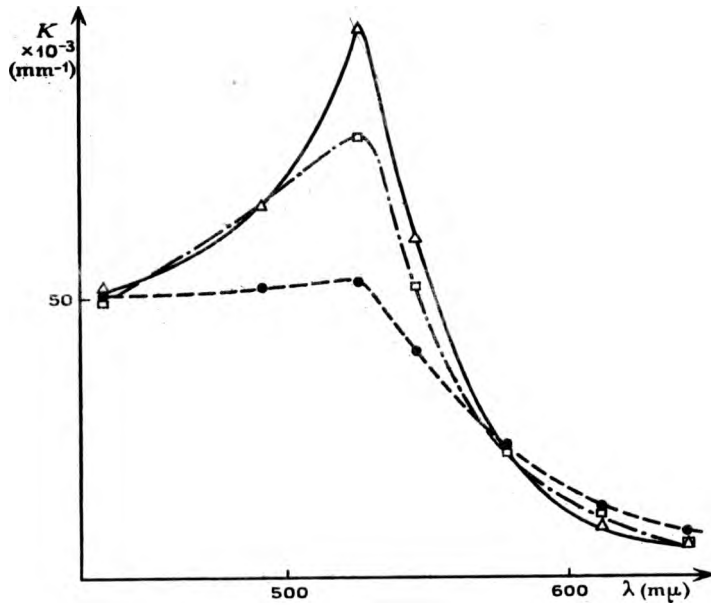


Fig. I-2.- Relación entre el coeficiente de extinción K y la longitud de onda, para tres diámetros de partículas diferentes: 35 Å (— · — · — ·), 140 Å (---), 280 Å (—).

Para el cálculo de los distintos coeficientes de extinción se utilizaron los valores de n y de k , determinados por Roemer y v.Fragstein (96) y los valores de n_0 consignados en el American Institute of Physics Handbook, 1963, (97, pag. 6-90). El cálculo teórico de los espectros de absorción de coloides de distinto tamaño de partículas, (Fig. I-2), permite comprobar que la variación de la forma de aquellos en función del diámetro de las micelas, cuando este valor es menor que 30 $\text{m}\mu$, está implícito en la fórmula I-39, y se debe a la variación de los valores de n y de k .

Para la elección de las longitudes de onda en las cuales se realizan las lecturas de densidad óptica, se deben observar una serie de condiciones. En primer lugar, los valores de n y de k , cuya medida experimental es complicada, se conocen hasta el momento para las siguientes longitudes de onda: 436, 492, 526, 546, 578, 612 y 642 $m\mu$.

Es conveniente que en la región elegida no exista la posibilidad de que se manifiesten efectos plasmáticos, lo que implica la eliminación de la lectura a 436 $m\mu$.

Por otra parte, las soluciones matemáticas de la ecuación I-41 para distintos tamaños de partículas, deben ser unívocas. Esto lleva a la eliminación de las siguientes relaciones: d.o. a 546 $m\mu$ / d.o. a 492 $m\mu$ y d.o. a 578 $m\mu$ / d.o. a 642 $m\mu$.

La variación de la luz difundida, cuando se pasa de una longitud de onda a otra, debe ser despreciable. Si bien esta condición varía con la geometría del aparato de medición utilizado, es conveniente que las dos longitudes de onda sean próximas. Este problema fue analizado por HEIRWGH, 1966, (98).

Por otra parte, es conveniente que para una variación pequeña del tamaño de las partículas, se observe una variación apreciable de la relación de densidades ópticas en las longitudes de onda elegidas.

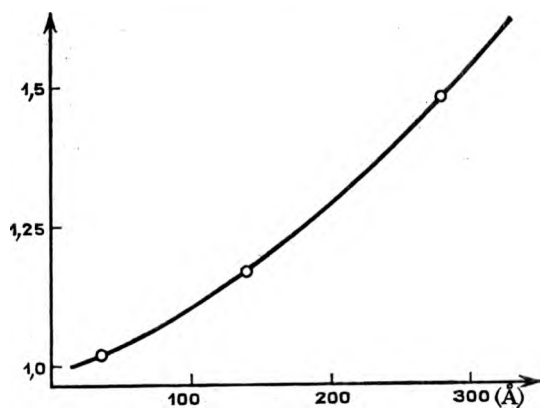


Fig. I-3.- Relación entre d.o. a 526 $m\mu$ / d.o. a 492 $m\mu$ (ordenadas) y el diámetro de las partículas de oro coloidal (abscisas).

De las posibles relaciones, que satisfacen en mayor o menor grado las condiciones expuestas anteriormente, hemos elegido la de d.o. a 526 $m\mu$ / d.o. a 492 $m\mu$, ya que es la que presenta mayor variación con el tamaño de las partículas, para dos longitudes de onda relativamente próximas.

Si se representan los valores de la relación de las densidades ópticas a 526 $m\mu$ y a 492 $m\mu$ en función del diámetro de las partículas, se obtiene la curva de la figura

I-3

En dicha curva se puede determinar el diámetro medio de las parti-

culas de oro coloidal, por interpolación.

Es posible trabajar con la relación d.o. a 546 m μ / d.o. a 612 m μ , solo cuando se dispone de un espectrofotómetro en el que la medición de luz difundida es mínima, dado que el efecto de difusión es más evidente a medida que aumenta la longitud de onda.

Otro camino para analizar el espectro de absorción de una dispersión de oro coloidal, se realiza considerando su forma y su pico de absorbancia. Si las partículas son esféricas, se obtienen máximos bastante bien delimitados y es posible lograr una información aproximada sobre su tamaño, determinando la longitud de onda en la que se observa la mayor densidad óptica. Si se representan estos valores en función del

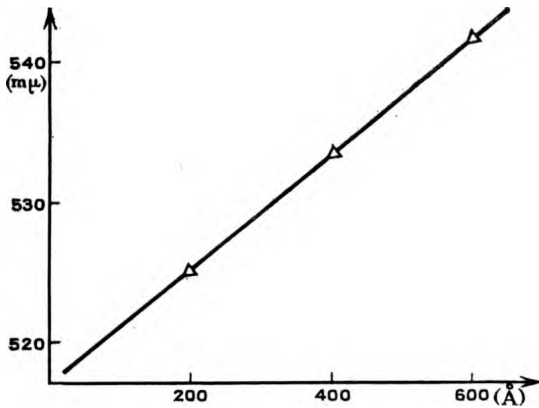


Fig.1-4.- Relación entre la longitud de onda del pico de absorbancia máxima, (ordenadas) y el diámetro de las partículas de oro coloidal, (abscisas).

diámetro medio de las partículas coloidales, se obtiene la recta indicada en la figura I-4, que permite determinar este parámetro, por interpolación. La posibilidad de extrapolar los picos para tamaños pequeños, fue comprobada por Morriss y Collins (81), quienes calcularon un máximo de absorbancia situado a 518 m μ aproximadamente, para un coloi- de cuyas partículas poseen un diámetro de 6 m μ .

Este análisis permite fijar con cierta precisión el dominio de aplicación del método fundamentado en la relación de densidades ópticas. En efecto, ya que éste concierne solamente a aquellas dispersiones que contienen partículas de un diámetro medio de hasta 30 m μ , la fórmula I-41 será válida únicamente para aquellos coloides cuyo espectro presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 529 m μ o menor. Por otra parte, es posible comparar los resultados obtenidos con ambos métodos, (relación de densidades ópticas y longitud de onda de máxima absorbancia) siendo generalmente aceptable la concordancia observada.

Es necesario señalar que una pequeña variación en los valores expe-

rimentales de la longitud de onda de absorbancia máxima, entraña un cambio importante en los diámetros hallados. Esto indica, que el error experimental que se comete con este método es elevado.

Por otra parte, si se observara una alteración significativa de la forma de los espectros, es lícito suponer que las partículas no poseen geometría esférica, según lo observado por Gans. (59). Si bien Milligan y Morriss (19) han demostrado que las partículas de los coloides de oro, normalmente son de forma cubotetraédrica, la misma puede asimilarse a la esférica desde el punto de vista óptico.

I-3-1-2.- Determinación de la concentración en oro.-

Una consecuencia importante del método estudiado, es la posibilidad de determinar experimentalmente la concentración en oro de los coloides.

Dicha determinación es engorrosa y lenta si se realiza por métodos químicos ordinarios. PIJCK, 1965, (99) ha propuesto un método para determinar la concentración en oro, en coloides de dicho metal, recurriendo al análisis por activación.

Se puede calcular la concentración c , expresada en volumen de oro por unidad de volumen de dispersión, a partir de la fórmula I-35. Luego:

$$c = \frac{d.o.}{0.43.K.l} \quad \text{I-42}$$

donde $d.o.$ es la densidad óptica, K es el coeficiente de extinción volúmico y l es el espesor de dispersión atravesado por la luz incidente.

Si descamos calcular la concentración C , expresada ahora en μg de oro / ml de dispersión, utilizando al mismo tiempo el coeficiente de extinción volúmico, debemos emplear la fórmula I-43:

$$C = \frac{d.o.}{K.l} \times 4.49 \times 10^7 \quad \text{I-43}$$

Para una longitud de onda determinada, por ejemplo $526 \mu\text{m}$, se puede calcular el valor de K mediante la fórmula I-39, suponiendo un valor de C y del diámetro medio de las partículas. La elección del valor de $526 \mu\text{m}$, se hizo considerando que se conocen las propiedades ópticas del

coloide para esa longitud de onda; además para valores menores de esta magnitud, comienza a manifestarse con más intensidad el efecto plasmático señalado por Seraphin (85). Para frecuencias menores, la determinación de la densidad óptica puede verse afectada por las condiciones experimentales, en especial por las características del espectrofotómetro utilizado, en lo que se refiere a la luz difundida. Es necesario destacar, que en este caso se analiza el problema de una sola lectura de densidad óptica, a una longitud de onda determinada.

Hemos calculado, mediante las fórmulas I-39 y I-40, la densidad óptica a 526 $m\mu$, de un sol que posee una concentración de 10 μg de oro / ml de dispersión, en función del tamaño de sus partículas, utilizando los valores de n y de k determinados por Roemer y v. Fragstein (96). Además hemos obtenido dicha función con los n y k del oro macizo, tomando como base los valores de Jeppesen y Barlow (78).

De las dos funciones calculadas, para el sol de oro y para el oro macizo, la que tiene en cuenta los valores de n y de k para coloides, debería ajustarse más a la realidad. Sin embargo, el efecto plasmático, no tenido en cuenta en nuestros cálculos, produce un aumento de la densidad óptica de los soles, cuyas partículas poseen un tamaño menor que 15 $m\mu$. La dificultad de evaluar cuantitativamente el aporte debido a este efecto, y la estimación de los errores experimentales que se cometen al adoptar uno u otro criterio, nos ha llevado a calcular una nueva función, que por compensación de errores permite obtener la densidad óptica para distintos diámetros de partículas, más ajustada a la realidad experimental. Estos valores se obtuvieron promediando para cada tamaño de partículas, los calculados según los dos criterios mencionados anteriormente.

Con el fin de facilitar la determinación experimental de la concentración en oro de los coloides, hemos elaborado, sobre la base de los cálculos descritos, un nomograma, que permite conocer la concentración del sol de oro a partir de la densidad óptica a 526 $m\mu$ y del tamaño de partículas, determinado por el método descrito anteriormente.

En el nomograma de la figura I-5, la primera columna corresponde al diámetro medio de las partículas del preparado. A la derecha de dicha columna, se han indicado los valores de la relación d.o. a 526 $m\mu$ / d.o. a 492 $m\mu$. En la segunda columna, se da la concentración del sol de oro expresada en $\mu g/ml$. Hay que destacar que dicha concentración corresponde a la de una determinada dilución del coloide, (en nuestro caso 1:100),

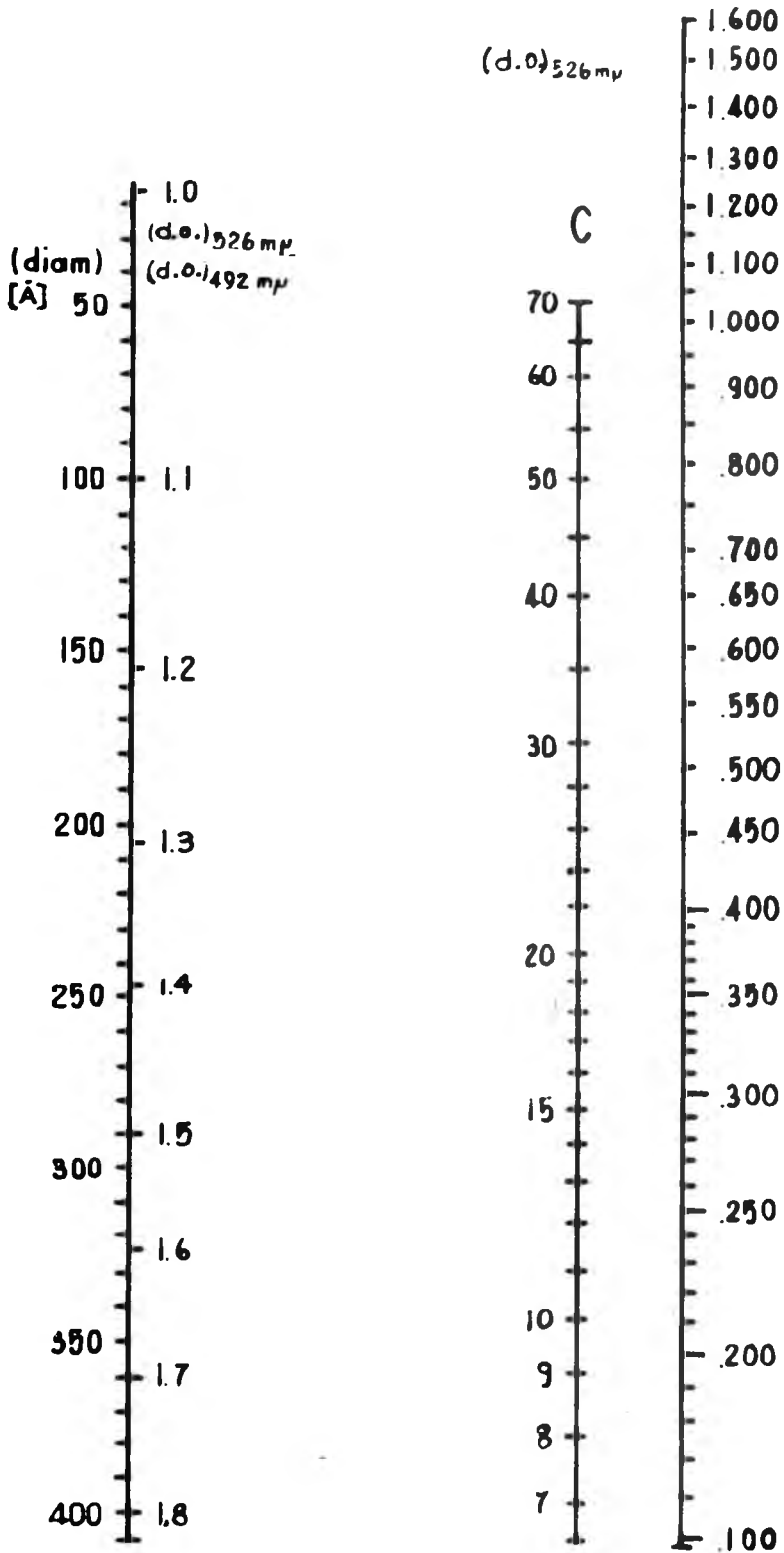


Fig. I-5.- Nomograma para el cálculo de la concentración de soles de oro.

valor que debe tenerse en cuenta para calcular la concentración real de la muestra analizada. Por último, en la tercera columna, se expresa la densidad óptica del sol a 526 mμ.

En el nomograma original, cuya dimensión es diferente al de la figura I-5, la escala en la primera columna está dada por la ecuación:

$$y_1 = 24.5 - 0.06 \cdot d \quad \text{I-44}$$

donde y_1 es la distancia en centímetros desde el extremo inferior y d es el diámetro medio de las partículas expresado en Å.

La ecuación:

$$y_2 = 20.9 \cdot \log C - 17 \quad \text{I-45}$$

define la escala de concentración en la segunda columna, que se encuentra a 7.7 cm de la primera. En esta columna y_2 es la distancia en centímetros desde el extremo inferior del segmento y C es la concentración del sol expresada en μg/ml.

La escala de la tercera columna, ubicada a 9.5 cm de la primera, sigue la ecuación:

$$y_3 = 21.30 + 25.82 \cdot \log (d.o.) \quad \text{I-46}$$

donde nuevamente y_3 es la distancia en centímetros desde el extremo inferior de la columna, mientras que $d.o.$ es la densidad óptica del sol a 526 mμ.

I-3-2.- Estudio Experimental Crítico de los Métodos.-

Haremos una descripción del material, equipos y técnicas utilizadas así como de las experiencias realizadas, a los fines de evaluar el método de determinación de tamaño de partículas y establecer la correlación existente entre los datos proporcionados por la microscopía electrónica y por la espectrofotometría de absorción. Por otra parte, se incluye una verificación experimental del método espectrofotométrico, que permite determinar la concentración en oro de los soles de este metal.

I-3-2-1.- Oro Coloidal Radiactivo.-

Se utilizaron los coloides de oro radiactivo (^{198}Au) producidos por el Departamento de Radioelementos del Centro de Estudios Nucleares de Saclay, Francia, identificados en las especificaciones del Comisariado de Energía Atómica del año 1964, (100), con las siglas S-2 y S-6.

Características de los coloides:

S-2 : Concentración en oro, 3.5 mg/ml; en gelatina, 30 mg/ml; en glucosa, 2 mg/ml; en cloruro de sodio, 5 mg/ml; en ácido ascórbico, 7 mg/ml; en oro iónico, menos que 2%.

Tamaño declarado de partículas: entre 20 y 40 μ ; pH entre 5 y 7; estéril, isotónico y carente de pirogéneos.

S-6 : Concentración en oro, 3.5 mg/ml; en gelatina, 30 mg/ml; en glucosa, 200 mg/ml; en cloruro de sodio, 5 mg/ml; en oro iónico, menos que 2%.

Tamaño declarado de partículas: entre 4 y 5 μ ; pH entre 5 y 7; estéril y carente de pirogéneos.

I-3-2-2.- Microscopía Electrónica.-

Se dispuso de un microscopio electrónico JEM modelo 6 A.

Se trabajó con una tensión de aceleración de 100.000 Voltios.

Se lograron aumentos directos de 50.000 \times , los que por ampliación fotográfica se llevaron a valores de hasta 600.000 \times .

Preparación de la muestra: se dejó secar a temperatura ambiente una microgota del coloide de oro radiactivo sobre una grilla de carbón. Producida la desecación, se lavó la grilla con agua destilada a 40 ° C hasta desaparición casi total del color sobre la misma.

Fotomicrografías Electrónicas: se obtuvieron del material desecado.

Cálculo de D_N , D_S y D_W : se midió con compás de espesor, de 200 a 400 partículas y se hizo el histograma de distribución. Para los cálculos de los distintos diámetros medios se utilizaron las fórmulas I-13, I-14 y I-15, respectivamente. Asimismo se calcularon los valores de R_1 y R_2 propuestos por Maron y Elder (43).(')

(') Agradecemos al ingeniero H. Okuzumi del Servicio de Física del Sólido y de Resonancia Magnética, del Centro de Estudios Nucleares de Saclay, Francia, la colaboración prestada en las observaciones en el microscopio electrónico

I-3-2-3.- Espectrofotometría.-

Se trabajó con un espectrofotómetro Jobin - Yvon, tipo Maroc, de una fotocélula, ventana variable y cubetas de 1 cm.

Mediciones : se efectuaron sobre una dilución al 1.00% del coloide original en agua destilada. Como blanco se utilizó una solución al 1% del medio de dispersión.

Lecturas de densidad óptica, (d.o.): se realizaron

cada 10 m μ entre 650 y 600 m μ

cada 5 m μ entre 600 y 530 m μ

cada 1 m μ entre 530 y 515 m μ

cada 5 m μ entre 515 y 480 m μ

cada 10 m μ entre 480 y 400 m μ

En el ultravioleta se realizaron cada 10 m μ hasta 240 m μ .

Además se hicieron lecturas en 642, 612, 578, 546, 526, 492 y 436 m μ , dado que se conocen las propiedades ópticas del coloide para esas longitudes de onda. Se prestó especial atención a las lecturas en 526 m μ y 492 m μ y a la determinación del pico de absorbancia máxima. Las experiencias espectrofotométricas y las de microscopía electrónica se efectuaron en el más corto plazo después de la entrega del coloide.

I-3-2-4.- Resultados cualitativos.-

En lo que concierne a los espectros obtenidos (fig. I-6), se ha podido comprobar, en general, un acuerdo satisfactorio con los logrados por Seraphin (85), Turkevich y col. (80), Doremus (92) y Milligan y Morriss (19).

No pudimos observar el pequeño pico en 630 m μ , encontrado por FABRIKANOS y col., 1963,(101). Esta pequeña diferencia podría atribuirse a métodos de preparación diferentes del coloide.

Cuando se hicieron las observaciones en las condiciones indicadas, las determinaciones coincidieron también en el ultravioleta con las de Seraphin (85), encontrándose un pico alrededor de 300 m μ , cuya altura se hizo mayor a medida que disminuyó el tamaño de las partículas del coloide analizado, lo que está de acuerdo con la teoría.

Cuando se usó agua destilada como blanco, la fuerte absorbancia de la gelatina en la región mencionada, enmascaró los resultados. Sin em-

bargo en la región del espectro visible, los valores de las densidades ópticas con los dos blancos diferentes fueron perfectamente coincidentes; ésto constituye una prueba indirecta de que las constantes ópticas del oro coloidal no varían apreciablemente, cuando éste está protegido con gelatina, en las diluciones usadas.

En lo que concierne a la comparación de los espectros obtenidos con los calculados teóricamente, (ver Fig. I-2), se observó una concordancia satisfactoria, aunque se comprobó sistemáticamente un pequeño achatamiento de los picos experimentales con respecto a los teóricos. Esta diferencia podría ser atribuida a la técnica experimental utilizada, o a factores independientes del método, como ser la presencia de partículas no esféricas o a la heterodispersión del sistema.

I-3-2-5.- Resultados Cuantitativos.-

Hemos trabajado con cinco dispersiones S-2 y cinco S-6.

En la tabla I-1 se resumen las principales características de los coloides utilizados, así como los resultados logrados con los métodos aplicados. Se indican los diámetros medios calculados a partir de la relación d.o. a 526 $m\mu$ / d.o. a 492 $m\mu$, los diámetros obtenidos con el pico de absorbancia máxima y la concentración en oro de los coloides originales, determinados espectrofotométricamente.

Los datos de microscopía electrónica se consignan como los diámetros medios D_N , D_S y D_W , así como las relaciones R_1 y R_2 .

Las muestras 1 a 5 son coloides S-6, mientras que los preparados 6 a 10 son dispersiones S-2.

Los valores espectrofotométricos representan el promedio de las determinaciones realizadas con por lo menos tres diluciones del mismo coloide.

Tabla I-1.- Cuadro comparativo de los resultados de las determinaciones del diámetro de las partículas de coloides de 198-Au efectuados con métodos espectrofotométricos y microscopía electrónica.

Muestra	pH	Oro Soluble %	E s p e c t r o f o t o m e t r i a				M i c r o s c o p í a E l e c t r ó n i c a						
			d.o. a 526 mμ		2 a	Pico	2 a	Conc. oro mg/ml	D _N Å	D _S Å	D _W Å	R _L	R ₂
			d.o. a 492 mμ	Å									
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	5.5	0.95	1.0811	86	519	50	3.7	58	74	99	1.71	1.34	
2	5.3	0.4	1.0898	93	519	50	3.6	65	94	120	1.85	1.28	
3	5.2	0.4	1.0983	98	519.5	65	3.7	67	82	147	2.19	1.79	
4	6.3	0.93	1.1313	119	520	80	3.6	75	99	138	1.84	1.39	
5	4.75	0.3	1.2304	172	523	148	3.8	137	240	349	2.55	1.46	
6	6.45	0.65	1.3198	214	526.5	232	4.3	163	206	238	1.46	1.15	
7	6.7	1.0	1.3345	220	526.7	237	4.0	181	227	243	1.34	1.07	
8	6.8	0.55	1.3441	225	527	245	4.7	188	222	238	1.26	1.07	
9	6.3	0.55	1.3507	228	527	245	4.1	209	239	250	1.20	1.05	
10	5.8	0.3	1.5060	291	528.5	280	4.7	235	295	317	1.35	1.08	

En la figura I-6 se presentan los espectros de absorción de las muestras 1 y 8 de la tabla I-1, determinados en un caso, con un blanco de agua destilada y en el otro, con uno del medio de dispersión diluido al 1%.

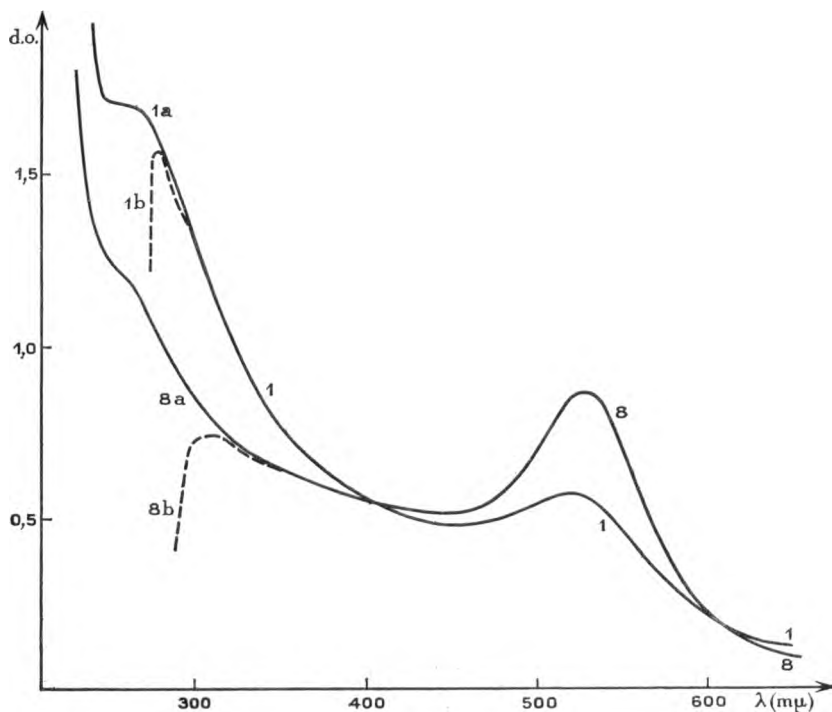


Fig. I-6.- Espectros de absorción de dos coloides de $^{198}\text{-Au}$ cuyas partículas poseen diámetros diferentes, (muestras 1 y 8 de la tabla I-1).
Curvas a: blanco, agua destilada.
Curvas b: blanco, medio de dispersión diluido al 1%.

En las figuras I-7 y I-8 se pueden observar las fotomicrografías electrónicas de estos coloides; en las figuras I-9 y I-10 se presentan los histogramas de distribución correspondientes.

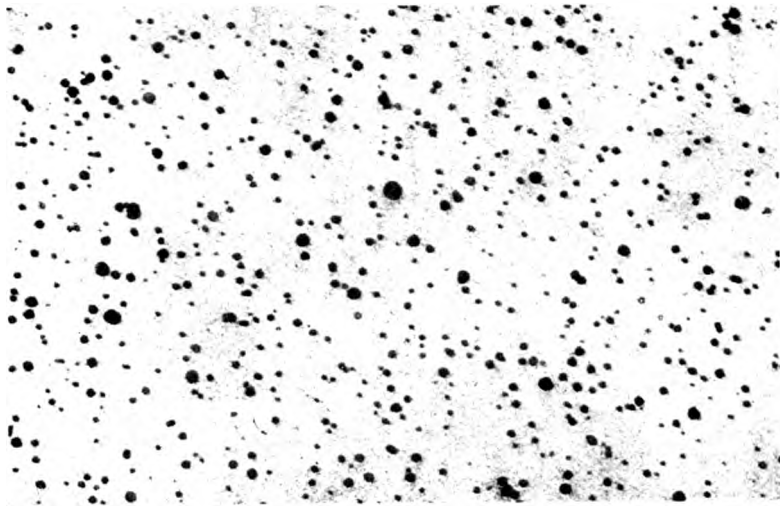


Fig. I-7.- Fotomicrografía Electrónica del coloide 1 de la
Tabla I-1.-
Aumento Total: 160.000 x.

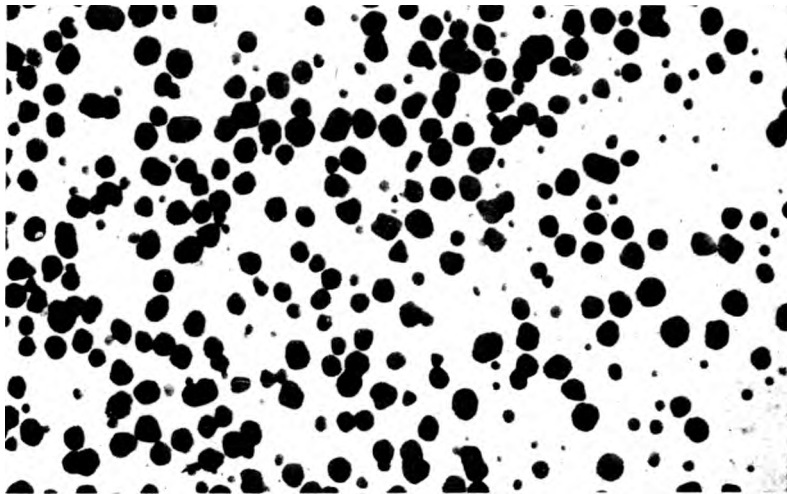


Fig. I-8.- Fotomicrografía Electrónica del coloide 8 de la
Tabla I-1.-
Aumento Total: 160.000 x.

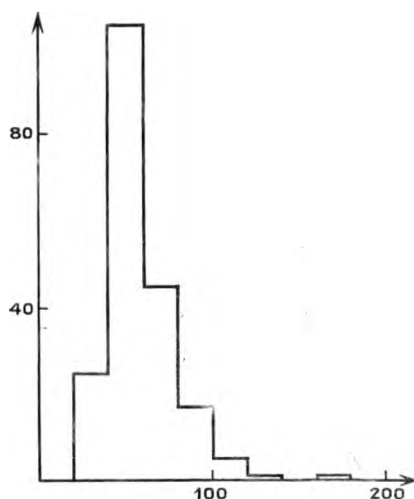


Fig. I-9.- Histograma de distribución de tamaños de las partículas del coloide 1 de la Tabla I-1.-

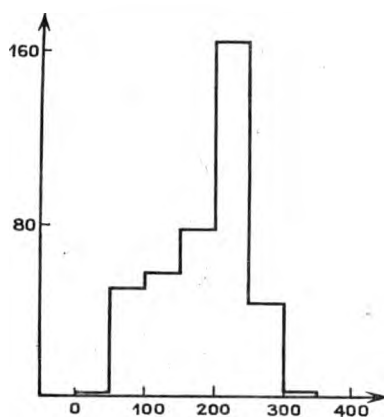


Fig. I-10.- Histograma de distribución de tamaños de las partículas del coloide 8 de la Tabla I-1.-

Puede observarse que los resultados obtenidos con la muestra número 5 de la Tabla I-1 difieren de los que podrían esperarse de un coloide de oro de tipo S-6.

En la figura I-11 se presenta su espectro de absorción.

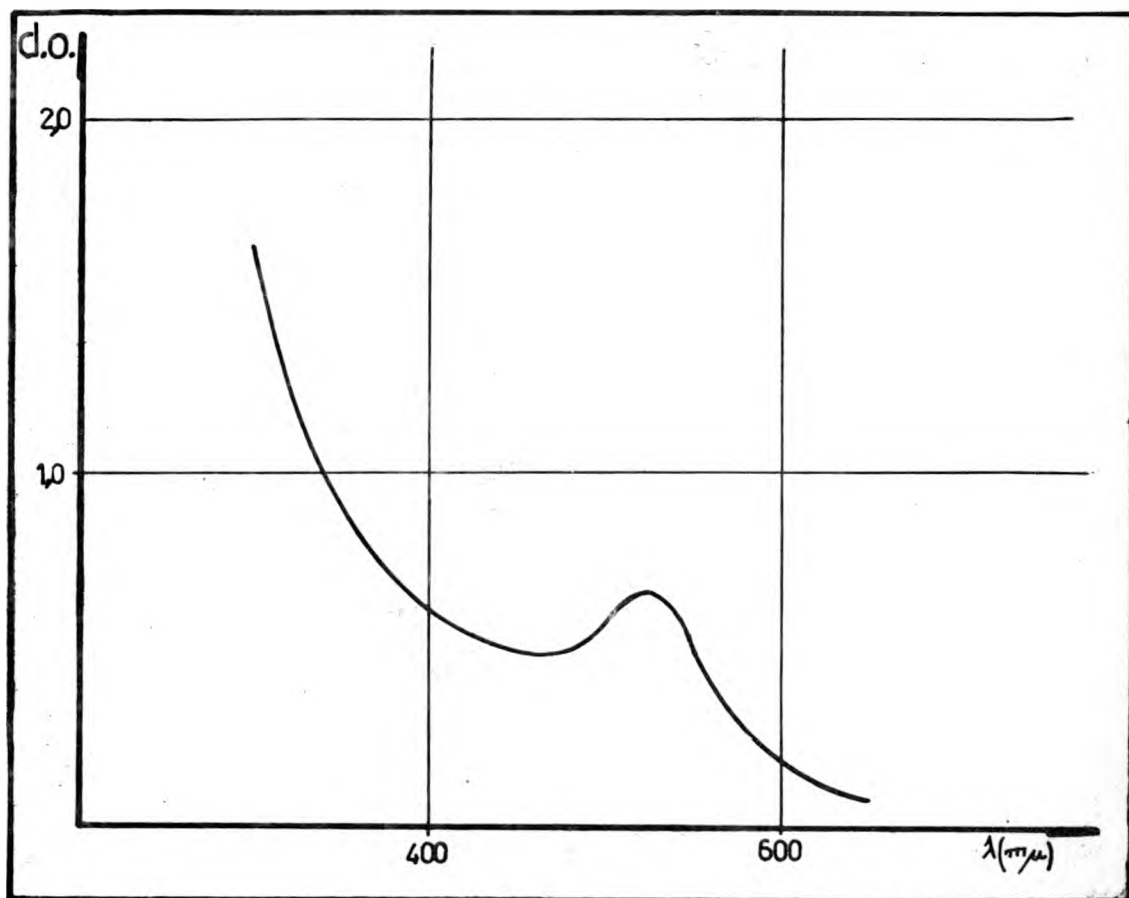


Fig. I-11.- Espectro de absorción del coloide 5 de la Tabla I-1.-

En la figura I-12 se muestra la fotomicrografía electrónica correspondiente, en la que, aun sin considerar los agregados que probablemente son artificios de preparación, es evidente la presencia de partículas de tamaño superior al normal.

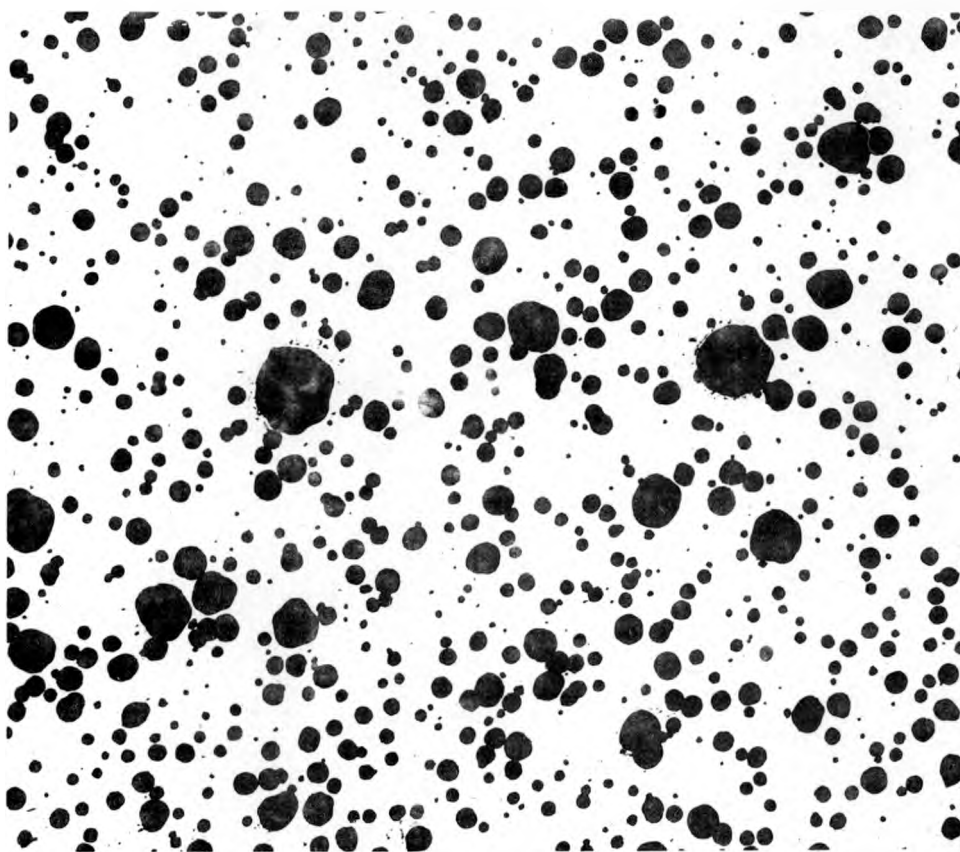


Fig. I-12.- Fotomicrografia Electrónica del coloide 5 de la Tabla I-1.- Aumento Total: 200.000 x.

En general se comprueba que los valores del diámetro medio obtenidos a partir de la relación d.o. a 526 μ / d.o. a 492 μ , son siempre superiores a D_N , superiores o inferiores a D_S e inferiores a D_W . Esta comparación con los datos provistos por la microscopía electrónica, es necesaria a fin de conocer la significación del valor obtenido por espectrofotometría. Los diámetros D_N , D_S y D_W son solo iguales si la muestra es perfectamente homogénea. Cuando existen partículas de distinto tamaño, las grandes ejercen una influencia mayor sobre la absorbancia que las pequeñas, por lo que es lógico suponer que el diámetro obtenido por espectrofotometría corresponde a D_S o a D_W . Analizando la fórmula I-30, se puede observar que los coeficientes de extinción, γ , son función de a^3 , por lo tanto es válido suponer que los diámetros medios espectrofotométricos debieran corresponder a D_W .

Hemos completado el estudio crítico del método, trabajando con mues-

tras preparadas por mezcla, en distintas proporciones, de dispersiones de partículas de tamaño conocido, para lo cual hicimos las experiencias siguientes: se determinó el diámetro de las partículas coloidales de las muestras números 1 y 8 de la Tabla I-1. Luego se mezclaron en proporciones variables, y se repitieron los análisis espectrofotométricos. Los datos correspondientes a la microscopía electrónica se calcularon tomando como base los histogramas de distribución de las muestras originales y admitiendo una distribución en diámetros, superficie y volumen. Para ello se utilizaron las fórmulas I-13 a I-15, aplicando cada función de distribución a las distintas cantidades de coloides originales utilizadas.

Los resultados están resumidos en la Tabla I-2. En la misma, $2a_1$ es el diámetro medio determinado a partir de la relación d.o. a $526 \text{ m}\mu$ / d.o. a $492 \text{ m}\mu$ y $2a_2$ corresponde al diámetro obtenido a partir de la longitud de onda de absorbancia máxima.

Tabla I-2.- Cuadro comparativo de los resultados de las determinaciones del diámetro medio de oro coloidal radiactivo, efectuados por microscopía electrónica y espectrofotometría, sobre mezclas que contienen proporciones variables de dos dispersiones diferentes.

Mezcla	Volumen de coloide 8	Volumen de coloide 1	D_N	D_S	D_W	$2 a_1$	$2 a_2$
n°	-	-	\cdot A	\cdot A	\cdot A	\cdot A	\cdot A
1(')	5	0	188	222	238	225	245
2	5	1	75	172	234	212	218
3	4	1	72	165	232	204	196
4	3	2	64	129	222	183	170
5	2	3	60	105	205	158	122
6	1	4	59	87	178	128	122
7(")	0	5	58	74	99	86	50

(') Muestra 8 de la Tabla I-1.
 (") Muestra 1 de la Tabla I-1.

Se puede observar que los valores del diámetro medio obtenido a partir de la relación de d.o. a 526 μ / d.o. a 492 μ , están nuevamente comprendidos entre D_S y D_W . Lógicamente en este caso, los errores cometidos en la determinación de los diámetros medios y de los distintos histogramas de distribución, por microscopía electrónica, afectan los resultados en forma importante.

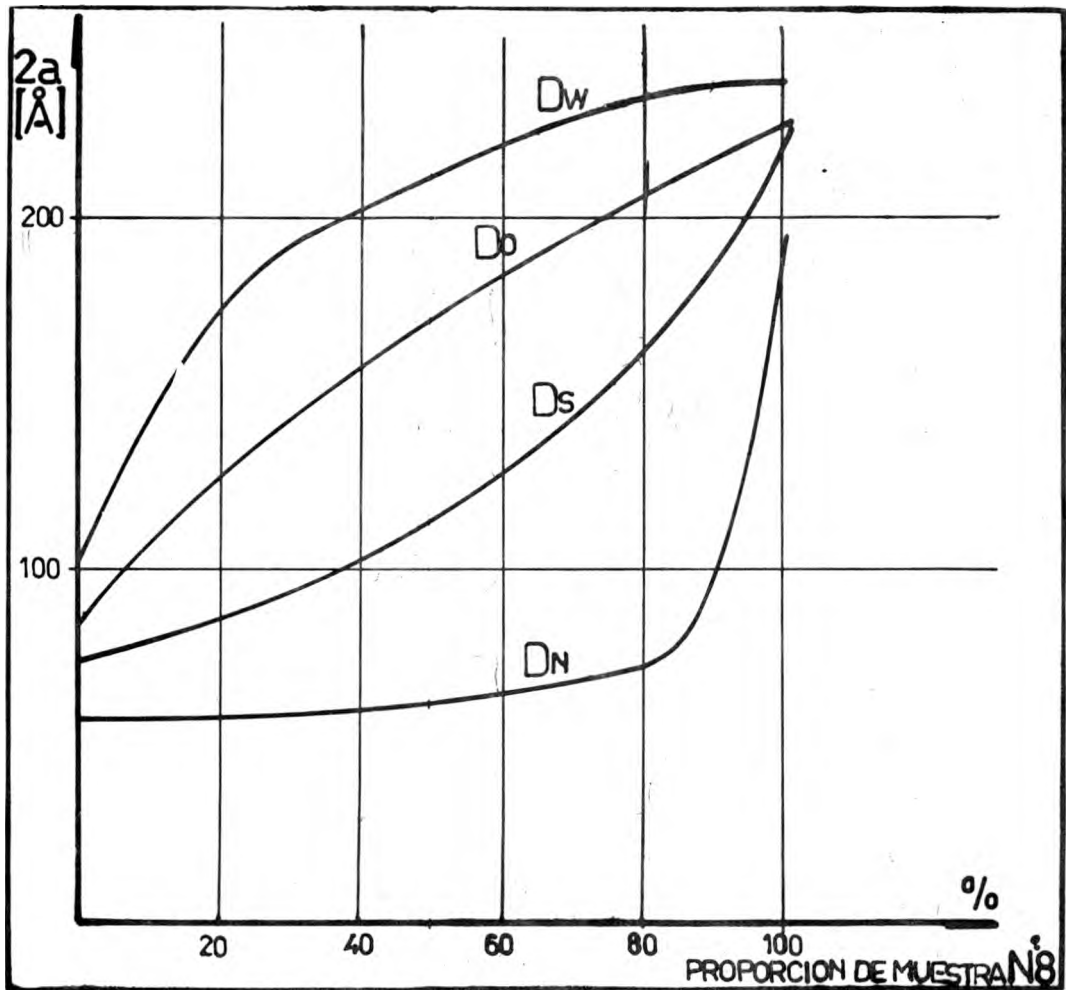


Fig. I-13.- Comparación de los diámetros medios obtenidos por microscopía electrónica y espectrofotometría, de mezclas en proporciones variables de las muestras 1 y 8 de la Tabla I-1. Diámetros medios (ordenadas) en función de la cantidad porcentual de muestra número 8 de la Tabla I-1. D_N , D_S y D_W han sido calculados mediante las fórmulas I-13 a I-15. D_0 corresponde al diámetro medio determinado a partir de la relación d.o. a 526 μ / d.o. a 492 μ .

Si se representan los distintos diámetros medios, calculados a partir de los histogramas de distribución obtenidos por microscopía electrónica, así como los diámetros medios determinados espectrofotométricamente, en función de la cantidad de muestra número 8 de la Tabla I-1 presente en las mezclas, se obtienen las curvas de la figura I-13.

De la forma de estas curvas se puede deducir que la progresión de los diámetros medios obtenidos por espectrofotometría se ajusta más a los calculados suponiendo una distribución de tamaños en volumen.

Los diámetros establecidos a partir de la longitud de onda del máximo de absorbancia son de interpretación más difícil, y solo tienen interés como guía para el trabajo.

I-3-2-6.- Concentración en oro. Verificación Experimental.-

Con el fin de proceder a la verificación experimental del método expuesto en el párrafo I-3-1-2, hemos representado los valores teóricos de la densidad óptica a 526 m μ de un coloide de oro de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, para distintos diámetros medios de partículas, calculada de acuerdo con lo mencionado en dicho párrafo. En la misma recta se han indicado además con fines comparativos, varios puntos, que corresponden a las densidades ópticas a 526 m μ , establecidas experimentalmente, divididas por 0.1 C, donde C es la concentración de la dilución ensayada, expresada en $\mu\text{g}/\text{ml}$, determinada prácticamente por análisis radiométrico.

Para realizar estas comprobaciones, hemos preparado por una parte, distintos coloides de 198-Au, tal como se detallará en el Capítulo II. Por otra parte, empleando oro metálico radiactivo (198-Au) de igual actividad específica, se preparó en cada caso una solución patrón de ácido cloroáurico, atacando el oro metálico con agua regia caliente. El volumen final de la solución de ácido cloroáurico era igual al del coloide.

Por otra parte, se han analizado los coloides mediante cromatografía sobre papel, según lo que se indicará en el Capítulo II, para garantizar la ausencia de oro iónico. En todos los casos, la concentración de 198-Au no coloidal fue inferior a 1%.

La función teórica calculada, así como los puntos experimentales obtenidos en la forma descripta, se han indicado en la figura I-14.

Se puede observar en la figura I-14, que la concordancia entre la

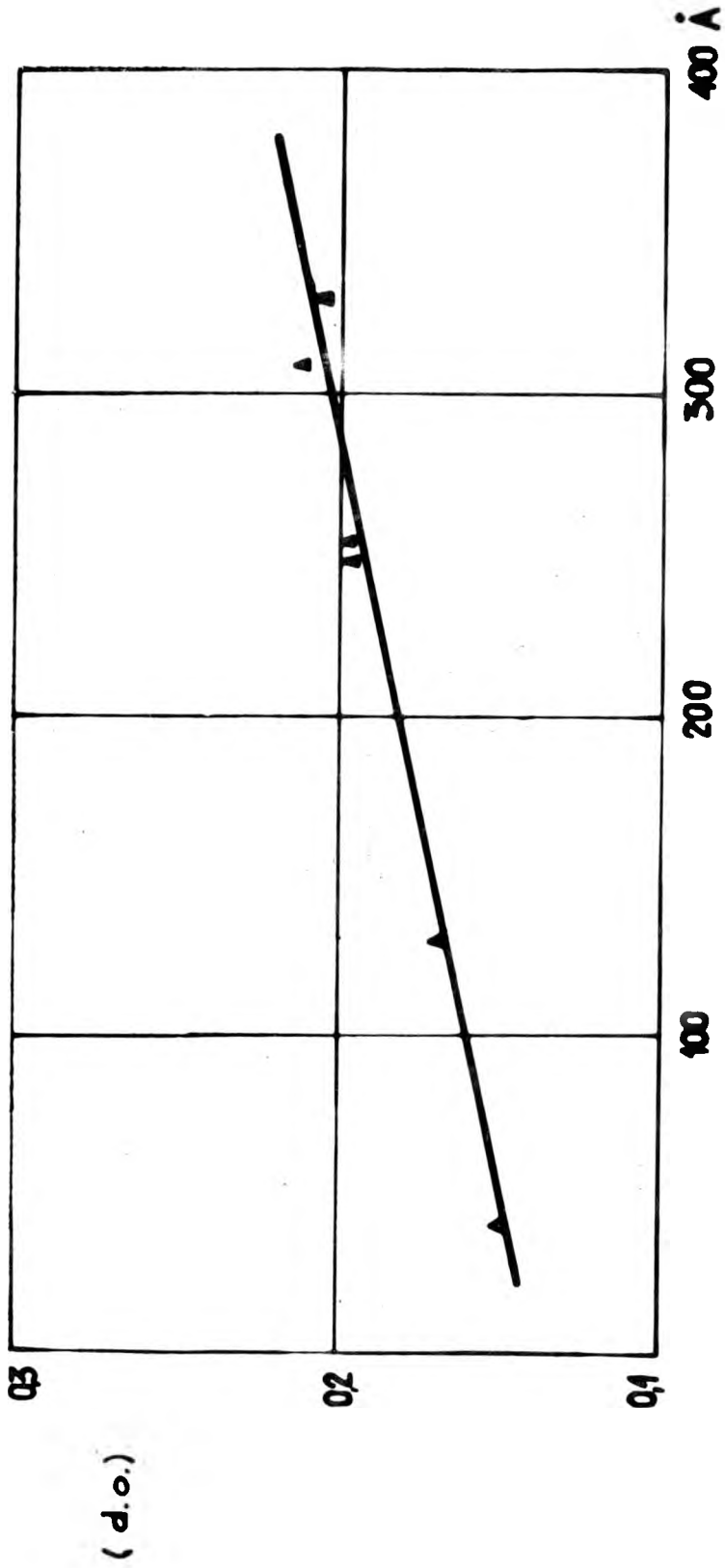


Fig. I-14.- Densidad óptica a 526 μ de un coloide de 10 μ g/ml en función del diámetro medio de las partículas. La recta, representa la función calculada teóricamente y los puntos los valores experimentales

concentración determinada por análisis radiométrico y por espectrofotometría, es mejor que el 10%. Las diferencias entre ambos valores, se discutirán más adelante, pero es necesario destacar que las mismas son pequeñas, si se tienen en cuenta los errores experimentales posibles.

I-3-3.- Estudio del oro coloidal radiactivo en diferentes condiciones.-

Una vez establecido que los métodos espectrofotométricos descriptos permiten determinar el diámetro medio de las partículas y la concentración en oro de los coloides de ^{198}Au con buena aproximación, creemos oportuno estudiar las dispersiones en distintas condiciones físicas o químicas, con el fin de determinar si se producen cambios apreciables en estos parámetros en dichas circunstancias.

I-3-3-1.- Dilución en distintos medios.-

Las primeras experiencias realizadas con dicho propósito, se efectuaron diluyendo el coloide de ^{198}Au en distintas soluciones que contenían algunos de los constituyentes del medio de dispersión.

En especial nos pareció interesante determinar si había alguna variación en el tamaño de las partículas o en su forma, al preparar una solución al 1%, usando como disolvente ClNa al 0.9%. Esta manipulación se efectúa generalmente cuando se inyectan las dispersiones coloidales de ^{198}Au a seres humanos o a animales de laboratorio.

Por otra parte, en las especificaciones del Comisariado de Energía Atómica de Francia (100), figura una dispersión identificada con la sigla S-3. La misma es una dilución del coloide S-2 en gelatina al 3%, y se utiliza como trazador con diversas finalidades diagnósticas. Por lo tanto se estudió el tamaño de las partículas de coloides de ^{198}Au disueltos en gelatina al 3%, con o sin esterilización posterior en autoclave, a 121°C , durante 30 minutos. También se estudió la influencia de la dilución al 1% en una solución comercial de gelatina, que contiene distintos electrolitos, como ser el "plasmagel".

Los resultados de todas estas experiencias están resumidas en la Tabla I-3 para el caso de un coloide S-2. El blanco utilizado fue siempre igual a la solución con la que se efectuaron las diluciones.

Las mismas experiencias realizadas con un coloide de tipo S-6, arrojan los resultados que se consignan en la Tabla I-4.

Tabla I-3.- Efecto del diluyente sobre el tamaño de partículas.
Coloide de 198-Au S-2.

Experiencia	Diluyente	$\frac{\text{d.o. a } 526 \text{ m}\mu}{\text{d.o. a } 492 \text{ m}\mu}$	2 a	Pico	2 a	Observaciones
-	-	-	Å	m μ	Å	-
1	Agua Destilada	1.3915	245	527	245	-
2	Cl Na al 0.9%	1.3553	230	528	268	-
3	Gelatina al 3%	1.3510	228	530	316	-
4	Gelatina al 3% con esterilización posterior en autoclave a 121 °C	1.3663	235	534	414	pico chato
5	Plasmagel	1.3448	225	527	245	-
6	Medio de dispersión	1.3111	210	526	218	-

Tabla I-4.- Efecto del diluyente sobre el tamaño de partículas.
Coloide de 198-Au S-6.

Experiencia	Diluyente	$\frac{\text{d.o. a } 526 \text{ m}\mu}{\text{d.o. a } 492 \text{ m}\mu}$	2 a	Pico	2 a	Observaciones
-	-	-	A	m μ	A	-
1	Agua Destilada	1.1313	119	520	80	-
2	Cl Na al 0.9%	1.1275	116	520	80	-
3	Gelatina al 3%	1.0994	100	519	50	-
4	Gelatina al 3% con esterilización posterior en auto-clave a 121 °C	1.1206	113	528	268	pico chato
5	Plasmagel	1.1208	113	519	80	-
6	Medio de dispersión	1.1182	112	523	148	-

En todos los casos las diluciones fueron efectuadas al 1%.

Los valores consignados representan el promedio de por lo menos tres determinaciones efectuadas en iguales condiciones.

De los resultados obtenidos se puede concluir que el tamaño de las

partículas de oro coloidal radiactivo, solo varía en forma apreciable, cuando se lo diluye en una solución de gelatina, y se procede a una esterilización en autoclave a 121° C durante 30 minutos, de dicha dilución. En las figuras I-15 y I-16 se ha efectuado una comparación de los espectros obtenidos en las experiencias número 3 y 4 de las tablas I-3 v I-4.

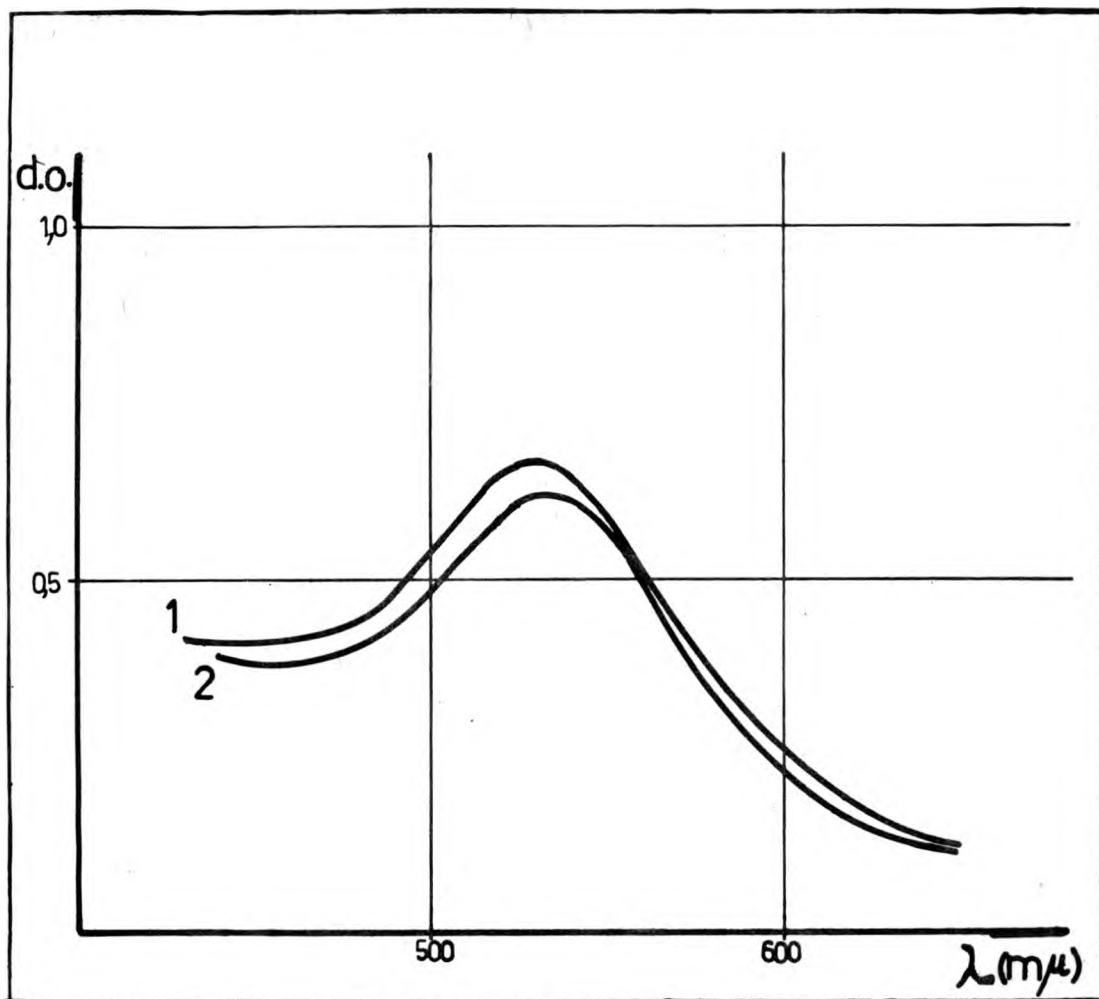


Fig. I-15.- Comparación de los espectros de absorción obtenidos en las experiencias 3 y 4 de la Tabla I-3.

Curva 1: Dilución en Gelatina al 3% sin esterilización posterior.

Curva 2: Dilución en Gelatina al 3% con esterilización posterior.

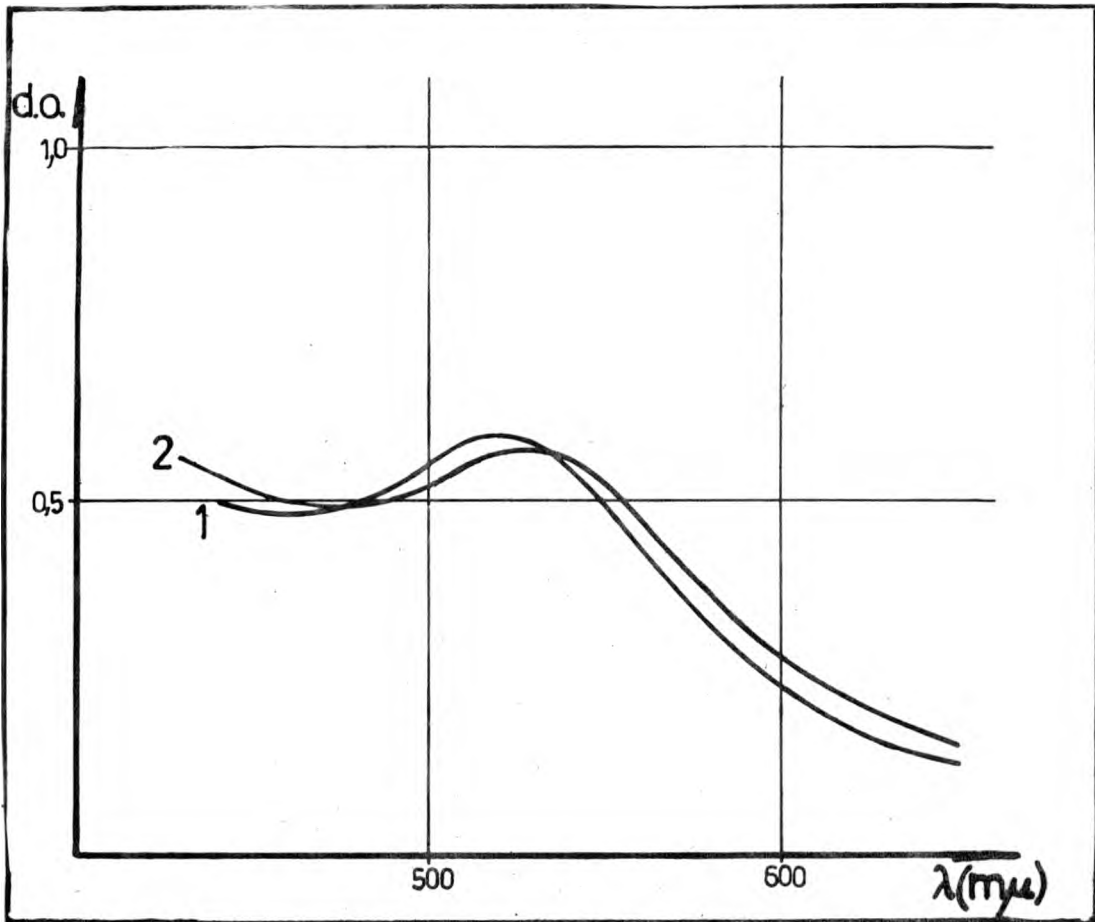


Fig. I-16.- Comparación de los espectros de absorción obtenidos en las experiencias 3 y 4 de la Tabla I-4.

Curva 1: Dilución en Gelatina al 3% sin esterilización posterior.

Curva 2: Dilución en Gelatina al 3% con esterilización posterior.

Los espectros obtenidos con las diluciones esterilizadas posteriormente, permiten suponer que estamos en presencia de una alteración de la forma de las partículas o de un principio de aglomeración de las mismas, si bien esto último es difícil de admitir en presencia de un exceso de gelatina. Es importante observar que los valores de los diámetros medios obtenidos a partir de las relaciones d.o. a 526 $m\mu$ / d.o. a 492 $m\mu$, en las experiencias número 4 de las tablas I-3 y I-4, demuestran que no se puede aplicar dicho método en estos casos.

Cabe señalar, que se observa un efecto semejante, aunque no tan pronunciado, cuando se esteriliza una dilución al 1% del coloide en agua destilada.

I-3-3-2.- Influencia de la temperatura.-

Se ha determinado la influencia de diversas condiciones térmicas sobre el tamaño de las partículas coloidales. Esto puede ser útil, ya que cuando se envían estos preparados por vía aérea a los centros de consumo, se los suele mantener en una cámara fría a -4°C . Por otra parte, en muchos casos, antes de inyectar el radiocoloide en seres humanos, se lo lleva a 37°C .

Para estudiar esta cuestión se sometió la muestra número 9 de la tabla I-1 a la influencia de distintas condiciones térmicas. Para ello se la dividió en tres porciones. La primera se mantuvo durante 24 horas a 37°C y la segunda a -4°C por igual lapso. La tercera fue sometida a una temperatura de -4°C durante 7 horas, luego fue dejada a temperatura ambiente (25°C) durante una hora, y por último se la mantuvo a 37°C durante 16 horas.

En la tabla I-5 se resumen los resultados obtenidos. Las muestras tratadas en la forma indicada anteriormente, se consignan como 9-a, 9-b y 9-c, respectivamente.

Tabla I-5.- Influencia de distintas condiciones térmicas sobre el diámetro medio de las partículas de un coloide de 198-Au.

Muestra	$\frac{\text{d.o. a } 526 \text{ m}\mu}{\text{d.o. a } 492 \text{ m}\mu}$	Diámetro medio	Pico	Diámetro medio
-	-	Å	mμ	Å
9	1.3507	228	527	245
9-a	1.3600	232	528	268
9-b	1.3655	234	528	268
9-c	1.3558	230	527	245

Como se puede observar, el tamaño de las partículas no sufrió ninguna variación debido a las condiciones térmicas a las que fue sometido el coloide. El estudio de los espectros no permite suponer tampoco una alteración de la forma de las partículas.

Cabe señalar, que en este caso se han confirmado los resultados con observaciones en el microscopio electrónico, las cuales permitieron establecer que los histogramas de distribución de tamaños no varían en forma apreciable.

I-3-3-3.- Influencia de la Dilución.-

El efecto del grado de dilución sobre el tamaño de las partículas del coloide de 198-Au, presenta interés por cuanto estos radiocoloides se inyectan en seres humanos o en animales de laboratorio, diluidos en distinta proporción, según la actividad de la muestra.

Por otra parte, creímos oportuno investigar, si la dilución elegida para determinar el tamaño de las partículas según el método propuesto; era lo suficientemente elevada como para que no se observen fenómenos de difracción múltiple. Si éste fuera el caso, los diámetros determinados sobre diluciones diversas hubieran diferido.

Para estudiar el problema, hemos preparado diluciones crecientes de distintas muestras de oro coloidal radiactivo, con agua destilada. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla I-6.

Asimismo hemos comparado la concentración final, calculada a partir de la dilución efectuada, tomando como real la más concentrada, (conc. calc., en la Tabla I-6), con la determinada espectrofotométricamente a partir de la absorbancia a 526 m μ , (conc. exp., en la Tabla I-6).

Los resultados obtenidos indican que el tamaño de las partículas de oro coloidal radiactivo no varía apreciablemente, en los rangos de concentración estudiados, hecho que conviene tener en cuenta cuando se estudian las propiedades biológicas de estos preparados.

Por otra parte, las concentraciones establecidas a partir de las absorbancias a 526 m μ , son coincidentes dentro del 10%, con las calculadas a partir de las diluciones efectuadas.

Tabla I-6.- Influencia del grado de dilución sobre el tamaño medio de las partículas de coloides de 198-Au.

Preparación	Dilución	Conc. Calo.	Conc. Exp.	$\frac{d.o. \text{ a } 526 \text{ m}\mu}{d.o. \text{ a } 492 \text{ m}\mu}$	2 a	Pico	2 a
-	-	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	-	$\overset{\circ}{\text{A}}$	$\text{m}\mu$	$\overset{\circ}{\text{A}}$
1	1 : 100	48	48	1.3349	221	525	196
1	1 : 200	24	23	1.3377	222	525	196
1	1 : 300	16	15	1.3399	223	525	196
2	1 : 50	76	76	1.0277	45	519	50
2	1 : 100	38	38	1.0246	42	519	50
2	1 : 200	19	19	1.0258	43	519	50

La determinación de las densidades ópticas a distintas longitudes de onda, en función de la concentración, permitió comprobar que en las condiciones experimentales consignadas, los preparados cumplen con la ley de Lambert - Beer.

La constancia de los diámetros de las partículas en distintas concentraciones, indican indirectamente la ausencia de difracción múltiple.

I-3-3-4.- Influencia del pH.-

La influencia de variaciones de pH es importante durante el proceso de preparación de los coloides: pero cuando las mismas se producen en la dilución al 1% de las dispersiones terminadas, no afectan en forma inmediata y apreciable, el diámetro medio de las partículas.

Se experimentó con diluciones al 1% (pH = 6.4), de un coloide cuyas partículas poseían un diámetro medio de 221 $\overset{\circ}{\text{A}}$, y que fueron llevadas a pH 7.6 y 3.5. En el primer caso, el diámetro medio observado fue

nuevamente 221 Å, y la dilución se mantuvo estable durante un tiempo prolongado.

Cuando la dilución se llevó a pH 3.5, el diámetro medio calculado a partir de su espectro, cuya forma no había sufrido mayores alteraciones, era de 222 Å. Sin embargo debe mencionarse el hecho de que, parte del coloide precipitó al cabo de una semana, presentando el sobrenadante un color azul violeta y un espectro muy achatado.

I-4.- DISCUSION.-

El estudio de los distintos métodos que han sido considerados en el párrafo I-2, con el fin de evaluarlos como técnicas de análisis rutinario de los coloides de $^{198}\text{-Au}$, permite desestimar la ultramicroscopía, la ultrafiltración, la diálisis, los métodos osmóticos y aquellos que emplean la difracción de rayos-X, dadas las apreciaciones efectuadas en oportunidad de su tratamiento.

La aplicación de la velocidad de sedimentación puede considerarse poco probable, hasta tanto no se hayan logrado resolver los diversos problemas experimentales que involucra.

Puede afirmarse que hasta el momento, la microscopía electrónica ha sido prácticamente el camino de elección para determinar el diámetro de las partículas de estos radiocoloides. Sin embargo conviene recordar las limitaciones del método, señaladas en el párrafo I-2-6. Además debe tenerse en cuenta que esta técnica es demasiado larga y engorrosa, como para ser adaptada a determinaciones corrientes de aquel valor.

En este sentido nos pareció útil disponer de un procedimiento más simple y que facilitara efectuar la determinación en plazo breve. Al propio tiempo, la técnica elegida debería ser lo suficientemente exacta como para permitir la correcta evaluación del parámetro en estudio.

La coloración de la dispersión, así como el hecho de que el tamaño de sus partículas es más pequeño que la longitud de onda de la luz visible, nos impulsó a utilizar la espectrofotometría de absorción.

Para interpretar correctamente los resultados obtenidos por este camino, conviene tener en cuenta algunas consideraciones adicionales.

Sería interesante obtener un conocimiento acerca del diámetro global de la partícula de oro envuelta en su capa protectora de gelatina o

de FVP y, eventualmente, del espesor de la envoltura. La resolución de este problema hace necesaria una serie de aproximaciones, ya que se desconocen las propiedades ópticas de estos agentes estabilizantes, cuando recubren una partícula de oro coloidal. Por otra parte, los cálculos necesarios serían más engorrosos y los datos que eventualmente se podrían establecer en forma aproximada, no justifican esta complicación. En nuestro caso, se obtiene el diámetro de la partícula coloidal sin su capa protectora, y, en las diluciones utilizadas, el efecto de la misma sobre el coeficiente de extinción es prácticamente despreciable. El diámetro de las partículas obtenido de esta manera, junto con el conocimiento del valor de la concentración en oro del coloide, es suficiente para calcular el número de partículas contenidas en la unidad de volumen de la dispersión, dato que conviene conocer para interpretar ciertas propiedades biológicas de estos preparados.

Por otra parte, el diámetro de las partículas coloidales calculado a partir de la relación de las densidades ópticas determinadas a dos longitudes de onda diferentes, es el que se obtendría si todas las partículas tuvieran teóricamente el mismo tamaño. En la práctica, las dispersiones analizadas contienen partículas de distintos diámetros, que pueden ser ordenadas en un número restringido de grupos relativamente homogéneos.

En estas condiciones, los coeficientes de extinción medidos representan la suma de los coeficientes de extinción que se obtendrían separadamente con cada grupo de partículas, supuestamente distribuidas en el mismo volumen de fase dispersante.

Según van de Hulst (51, pag. 16 y 129), si las partículas poseen un radio diferente, existiendo $N(a)$ da partículas, cuyo radio está comprendido entre a y $a + da$, el coeficiente de extinción, γ , será igual a:

$$\gamma = \int_0^{\infty} Q_{\text{ext}} \cdot N(a) \cdot a^2 \cdot da \quad \text{I-47}$$

En esta ecuación hay que indicar que Q_{ext} no solamente varía en función de $2\pi a / \lambda$, sino también según los distintos valores de n y de k .

El análisis de una dispersión coloidal heterogénea, y la obtención de los resultados bajo la forma de la función de distribución correspon-

diente, requiere el empleo de computadoras electrónicas, dada la complejidad de los cálculos a realizar. Para efectuarlos, es necesario introducir en los programas los valores de a , de λ , de n y de k , supuestos teóricamente o determinados en forma experimental. Debe señalarse, que, como lo han observado Morriss y Collins (81), las computadoras no diferencian entre números reales e imaginarios; por lo tanto este problema debe ser resuelto por el programador.

En el caso de los coloides estudiados por nosotros, se conocen solamente los valores de n y de k para las longitudes de onda señaladas en el párrafo I-3-1-1, y para tres diámetros de partículas: 35, 140 y 280 Å. Si bien podrían eventualmente obtenerse valores intermedios por interpolación, estimamos suficiente limitar nuestro estudio al cálculo de los distintos coeficientes de extinción y utilizar la relación de las densidades ópticas a 526 m μ y a 492 m μ , para determinar el diámetro de las partículas. Ello teniendo en cuenta el desconocimiento de la concentración en oro de los coloides analizados, así como las consideraciones teóricas y experimentales ya formuladas, pag. 32, concernientes a la elección de dichas longitudes de onda. Es interesante destacar que la comparación entre un espectro práctico y otro calculado teóricamente para la misma concentración y tamaño de partículas, permite verificar que la coincidencia entre ambos es máxima en la región comprendida entre las longitudes de onda anteriormente mencionadas. Esto constituye una prueba indirecta de que la relación de densidades ópticas elegida, es la que permite conocer el diámetro medio de las partículas con mayor aproximación.

Es interesante mencionar, que la determinación de este parámetro a partir de la relación de dos densidades ópticas, constituye una forma original de analizar las propiedades espectrofotométricas de una dispersión coloidal. CHIOTAN y col., 1966, (102), han realizado intentos preliminares para relacionar las absorbancias máximas y mínimas del espectro de absorción de coloides de 198-Au, con el diámetro de sus partículas determinado por microscopía electrónica, con resultados negativos. Debe señalarse que en la metodología por nosotros propuesta, se determina este valor a partir de datos teóricos, siendo innecesaria una calibración previa mediante otras técnicas. La microscopía electrónica fue utilizada solamente con el fin de verificar la exactitud de los datos obtenidos por espectrofotometría.

Cabe destacar que la comparación de los valores obtenidos espectro-

fotométricamente, con los distintos diámetros medios determinados por microscopía electrónica, así como las consideraciones teóricas ya formuladas, pag. 46, permiten suponer que el tamaño medio calculado a partir de la relación de las densidades ópticas a 526 m μ y a 492 m μ , es comparable al valor de D_w .

De acuerdo con todas estas consideraciones, puede apreciarse que el método que proponemos posee una serie de ventajas que creemos conveniente resumir:

- a) se requiere una manipulación experimental muy sencilla y rápida, siendo mínimos los riesgos de contaminación. Los resultados pueden obtenerse en el mismo día de la preparación del coloide.
- b) las medidas no modifican en manera alguna el sistema en estudio.
- c) a partir de los valores logrados, es posible calcular la concentración en oro del coloide. Debe señalarse que algunas apreciaciones más arriba formuladas, pag. 60 - 61, son válidas también para esta determinación. Los factores allí expuestos podrían ser la causa de las diferencias observadas con respecto a las concentraciones determinadas por análisis radiométrico. Creemos sin embargo, que, siendo las mismas menores que el 10%, pueden imputarse asimismo a errores aleatorios cometidos en uno u otro método. La exactitud del camino propuesto es compatible con la requerida en este tipo de análisis.
- d) la correlación entre los diámetros de partículas calculados a partir de datos espectrofotométricos, coincide satisfactoriamente con los obtenidos por microscopía electrónica. Por lo tanto la precisión del método elegido es suficiente para las determinaciones rutinarias del parámetro en estudio.

Este procedimiento constituye una técnica útil para el análisis corriente de los coloides de 198-Au. Al respecto cabe señalar que se lo utiliza desde principios de 1965 en el Departamento de Radioelementos del Centro de Estudios Nucleares de Saclay, Francia, y desde comienzos de 1966 en nuestra Comisión Nacional de Energía Atómica, con buen éxito.

Quando se adopta esta técnica de control como análisis rutinario de los coloides de 198-Au, conviene tener presente que los procesos de obtención de estos radiocoloides se desarrollan en condiciones similares en cada centro de producción. Consecuentemente es dable esperar una cier-

ta regularidad en el tamaño de las partículas formadas, y, por lo tanto, en el espectro de absorción de las dispersiones. Este último se modifica en mayor o menor grado, ante cualquier variación importante de las propiedades de la preparación terminada: el achatamiento o corrimiento de los picos de absorbancia máxima hacia longitudes de onda más elevadas, son las alteraciones más frecuentes.

Una vez analizada detalladamente la forma de los espectros de absorción, es posible proceder a la eliminación de las preparaciones cuyas características ópticas se alejan marcadamente de las normales. En este sentido conviene recordar también, que el método propuesto es válido solamente para los coloides cuyas partículas poseen un diámetro igual o menor que 30 μ , o sea aquellos cuyo pico de absorbancia máxima se presenta a longitudes de onda de hasta 529 μ .

CAPITULO II

PREPARACION DE ORO COLOIDAL RADIOACTIVO (198-Au).-

II-1.- INTRODUCCION.-

Para preparar una dispersión de 198-Au de uso médico o biológico es importante disponer de un método que permita obtenerla en condiciones debidamente normalizadas y con la pureza radiactiva y radioquímica conveniente.

Dadas las altas actividades que intervienen, el método a utilizar debe posibilitar el empleo de un dispositivo manejado mediante control remoto. Se requiere que el coloide terminado responda a ciertas características: prolongada estabilidad, ausencia de sustancias tóxicas o pirogénicas, esterilidad, pH entre 5 y 7, escasa proporción de partículas pequeñas y ausencia de compuestos radiactivos solubles. Para obtener el producto en estas condiciones, es necesario utilizar sustancias reductoras que no sean nocivas para el organismo. Asimismo, durante la reacción no deben originarse compuestos de esas características.

En cuanto a los métodos de preparación conocidos, de los coloides de 198-Au, pueden clasificarse en dos categorías. En la primera, la reducción de las sales de oro se completa en una sola etapa; cuando se sigue este camino, se obtienen coloides muy heterogéneos, en cuanto se refiere al tamaño de sus partículas. En la segunda, se prepara en primer lugar un coloide con partículas muy pequeñas, llamado coloide germen; luego éstas se hacen crecer de modo conveniente y se obtienen dispersiones homogéneas. En la actualidad, los coloides de 198-Au destinados a uso médico, se preparan casi siempre por este último método.

II-2.- ANTECEDENTES.-

Los estudios modernos sobre la preparación de coloides de 198-Au, se fundamentan en las experiencias realizadas por diversos autores con coloides de oro inactivo. Por ello creemos conveniente incluir en este capítulo, un breve estudio, en el cual se analizan los principales métodos de elaboración de estos preparados. Por otra parte, se referirán los trabajos que posibilitaron la preparación de oro radiactivo (198-Au),

así como los procedimientos aplicados a la obtención de los coloides de este radioisótopo.

II-2-1.- Oro Coloidal no Radiactivo.-

Según Zsigmondy y Thiessen (15), probablemente fue Paracelso quien preparó por primera vez una dispersión de oro coloidal, por reducción de cloruro de oro con distintos extractos vegetales, a los que a veces agregaba azúcar.

De acuerdo con SVEDBERG,1920,(103), Andreas Cassius preparó oro coloidal en 1663, por reducción de sales áuricas con cloruro estannoso; Kunkel, en 1679, describió por primera vez en forma completa la preparación de coloides de oro incluidos en vidrio, (vidrio rubí). En lo que concierne a esta preparación, ya se encuentran referencias previas debidas al alquimista Andreas Libavius, según DURANT y DURANT,1961,(104).

JUNCKER,1749,(105) notó que aparecía una coloración rojiza cuando se agregaba cloruro estannoso sobre una solución muy diluida de una sal de oro. FULHAME,1794,(106) observó el cambio del color de amarillo a violeta en tejidos de seda impregnados con sales de oro, cuando eran sometidos a la acción de una corriente de hidrógeno, o de fosfina, o de fósforo disuelto en éter o de dióxido de azufre. Observó el mismo efecto, cuando exponía los tejidos a los rayos solares.

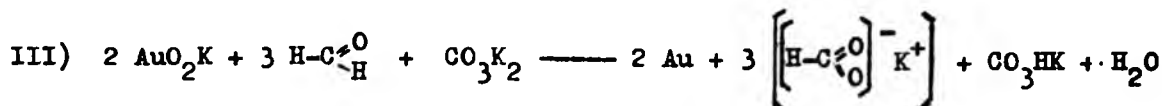
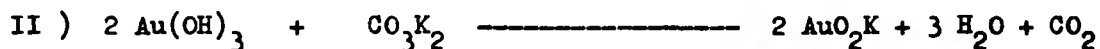
Con la llegada del siglo XIX, la cantidad de trabajos aumenta. OBERKAMPF,1811,(107) redujo sales de oro mediante hidrógeno gaseoso o fosfina, formándose soluciones purpúreas bastante estables. KRUEGER,1821,(108) investigó la acción de la ovoalbúmina coagulada sobre sales de oro. PFAFF,1822,(109) estudió la acción de distintos reductores, por ejemplo: hidrógeno, sulfuro de hidrógeno, ácido oxálico y otras sustancias, algunas de las cuales fueron estudiadas también por PELLETIER,1820,(110). WACKENROEDER,1839,(111) verificó la acción reductora de cloruro estannoso, ácido oxálico y sulfato ferroso sobre sales de oro. A pesar de éstos y de otros trabajos aparecidos durante la primera mitad del siglo XIX, estas preparaciones no despertaron mayor interés, hallándose en muy pocos casos una referencia a la naturaleza metálica del oro reducido.

Se llega así a la primera contribución verdaderamente científica al conocimiento del coloide de oro. FARADAY,1857,(112) preparó oro coloidal reduciendo sales áuricas con fósforo, disuelto o no en éter o sulfuro de

carbono. Asimismo utilizó sulfato ferroso, cloruro estannoso, ácido cítrico y azúcar. Es notable la clarividencia de su trabajo cuando llama la atención sobre la limpieza del material de vidrio a utilizar y acerca de la naturaleza metálica de las partículas de oro. Investigó además la influencia de soluciones salinas o ácidas, sobre las propiedades del coloide formado. Lamentablemente su trabajo cayó en el olvido, hasta ser redescubierto por Zsigmondy.

Se conocen algunos experimentos posteriores al de Faraday, como ser el de LIVERSIDGE, 1890, (113), en el que se estudia la influencia del crecimiento de hongos sobre soluciones de sales áuricas, con o sin agregado de otros agentes reductores. La historia del oro coloidal, anterior al siglo XX, fue analizada por ZSIGMONDY, 1905, (114), OSTWALD, 1909, (115) y LOESNER, 1910, (116).

Las investigaciones modernas sobre la química del oro coloidal comienzan con el trabajo de ZSIGMONDY, 1898, (117). Este autor preparó coloides de oro muy estables, reduciendo sales áuricas con formol y carbonato de potasio. El proceso fue interpretado químicamente por NAUMOFF, 1914, (118), de la siguiente manera.



Posteriormente PAULI, 1949, (119) sugirió que la reacción sería más complicada, siendo el complejo $(\text{AuCl}_2)_2\text{H}$, que se disocia en $(\text{AuCl}_2)^-$ y H^+ , el responsable de la carga de las partículas.

ZSIGMONDY, 1906, (120), preparó soles de oro con partículas extremadamente finas, modificando el método de Faraday; empleó una solución etérea de fósforo y carbonato de potasio como agentes reductores. Las partículas de los coloides así preparados, son muy pequeñas, presentando un diámetro de 2 a 3 m μ . En nuestro medio, este método fue estudiado por WERNICKE y LOSSOM, 1930, (121).

Es interesante mencionar que estas pequeñas partículas, que llamaremos gérmenes, pueden ser utilizadas en ciertas condiciones como núcleos de crecimiento, para la formación de otras más grandes. En efecto, si se

agrega un coloide de aquellas características, mezclado con carbonato de potasio y formol, a una solución de sales áuricas, se obtienen soles de gran estabilidad, aun en presencia de impurezas. Las partículas formadas son homogéneas.

A principios del siglo actual, se estudiaron preparaciones de oro coloidal obtenidas por medio de otras sustancias reductoras. PAAL, 1902, (122) estudió la acción de las sales alcalinas de ácido lisalbinico y protalbinico; KUESPERT, 1902, (123) utilizó la formalina como agente reductor y estabilizó los coloides formados con ácido silícico. Posteriormente GARBOWSKI, 1903, (124) redujo sales áuricas con distintas sustancias con función fenólica, incluyendo ácido tánico y BLAKE, 1903, (125) estudió la acción reductora de una solución etérea de acetileno. Otros agentes estudiados fueron, la acroleína y el alcohol alílico, (CASTORO, 1904, (126)), el monóxido de carbono, (DONAU, 1905, (127)), el peróxido de hidrógeno, (DOERINGKEL, 1909, (128)), y la hidroxilamina e hidracina, (REITSTOEFER, 1918, (129)).

Creemos innecesario enumerar todos los métodos ensayados, que se pueden consultar en las obras de Svedberg (103), Zsigmondy (14) y Zsigmondy y Thiessen (15). Todos estos métodos adicionales no ofrecen mayor interés para el desarrollo posterior de la química del oro coloidal. Esto se debe probablemente a la falta de una exhaustiva caracterización fisicoquímica de los preparados obtenidos. El método de Zsigmondy, fue el más utilizado en la primera mitad del siglo XX, y con los coloides así obtenidos se han efectuado la mayor parte de las experiencias fisicoquímicas y biológicas, que han sido revisadas en el libro de JOEL, 1925, (130).

HAUSER y LYNN, 1940, (131, pag. 18), propusieron el empleo del citrato de sodio como agente reductor. Turkevich y col. (35)(36), estudiaron exhaustivamente el mecanismo de acción de esta sustancia. Según estos autores, aparecen en primer término núcleos de oro coloidal, formándose luego las partículas crecidas, que son muy homogéneas y poseen un diámetro medio de 20 m μ . Los coloides así formados presentan un color rojo - violáceo, y su concentración es de 50 μ g/ml. Los autores estudiaron la cinética del proceso de nucleamiento y de crecimiento, por ultramicroscopía, nefelometría y microscopía electrónica. Mediante este último método analizaron igualmente distintos coloides preparados con algunos de los agentes reductores mencionados precedentemente. La acción del citra-

to de sodio se realiza por su oxidación a ácido acetona-dicarboxílico, como primer paso. Para explicar la aparición de núcleos, esbozaron la teoría de los "organizadores". Según la misma, en primer lugar se formaría una macromolécula por agrupación de numerosas moléculas del agente nucleante y de iones de oro. En cierto momento, cuando aquella resulta inestable, se produciría un reordenamiento en el cual se genera una partícula de oro metálico y el producto de oxidación del agente nucleante. Es significativo que todos los reductores empleados en la preparación del oro coloidal, tienen capacidad complejante.

Aceptando como premisa que en el método de crecimiento no se forman germenos nuevos, el número de partículas se mantiene constante.

Si Au_g es la masa de oro bajo forma de germenos y Au_a la masa de oro agregada posteriormente, el número de núcleos de oro será:

$$n_1 = \frac{Au_g}{4/3 \pi a_1^3 \delta} \quad \text{II-1}$$

y el número de partículas crecidas:

$$n_2 = \frac{Au_g + Au_a}{4/3 \pi a_2^3 \delta} \quad \text{II-2}$$

donde a_1 y a_2 son los radios de los núcleos y de las partículas crecidas respectivamente y δ su densidad, que es la del oro metálico en ambos casos. Dado que, en las condiciones más arriba indicadas, n_1 y n_2 son iguales:

$$a_2 = a_1 \left[\frac{Au_g + Au_a}{Au_g} \right]^{1/3} \quad \text{II-3}$$

Mediante esta fórmula se puede calcular el radio de las partículas crecidas. Otra aplicación de la misma es el cálculo del radio de los germenos, si se puede determinar el tamaño de las partículas crecidas en forma experimental.

A los fines de completar nuestro estudio, debemos referirnos brevemente a los métodos mediante los cuales se pueden obtener coloides de o-

ro por acción de ciertos agentes físicos. Las primeras contribuciones al respecto fueron probablemente las incluidas en el trabajo ya citado de Fulhame (106): el estudio de la obtención de oro coloidal por acción de rayos solares sobre una solución de sacarosa y sales de oro, realizado por VANINO, 1907, (132), siguió esta misma línea de investigación.

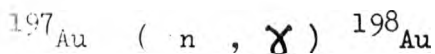
BREING, 1898, (133) obtuvo coloides de oro y de otros metales, estableciendo un arco entre electrodos del metal a dispersar, sumergidos en una solución acuosa, con corriente continua. Resultados análogos fueron logrados por SVEIBERG, 1905, (134) 1906, (135).

En fecha más reciente se ha comenzado a estudiar la influencia de otros agentes físicos sobre soluciones de oro. FUJITA y col., 1962, (136), obtuvieron soles de oro a partir de una solución de ácido cloroáurico en la cual se hacía burbujear oxígeno, irradiándola con radiaciones gamma provenientes de una fuente de ^{60}Co ; la dosis total era de 6.51×10^5 r. y las partículas formadas tenían un diámetro de alrededor de 80 μ . ENGELHARDT y FROBEN, 1962, (137) consiguieron resultados análogos utilizando rayos-X. Fabrikanos y col. (101) lograron obtener coloides de oro y de plata con EDTA e irradiación con partículas beta, fotones gamma o rayos ultravioletas. KRAMACHI, 1963, (138) observó la formación de iones complejos subcoloidales, al exponer una solución de cloruro áurico a la acción de luz roja, en presencia de una superficie sólida, donde el producto formado podía adsorberse. El mecanismo por el cual se producen estas reacciones no está aun suficientemente aclarado.

II-2-2.- Oro Radiactivo (^{198}Au).-

La preparación de oro radiactivo (^{198}Au) fue lograda por primera vez por AMALDI y SWIRE, 1934, (139), utilizando el método elaborado previamente por FERMI, 1934, (140).

El mismo consiste esencialmente en bombardear oro metálico con neutrones térmicos. La reacción nuclear producida es la siguiente:



Las características del núclido formado están representadas en su esquema de desintegración, Fig. II-1, extraído de las tablas de STROMIN-

GER y col., 1958, (141).

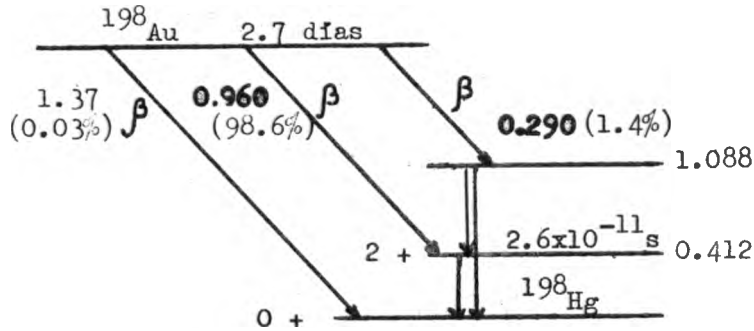


Fig. II-1.- Esquema de desintegración del ^{198}Au .

Es necesario mencionar que pueden obtenerse otros radioisótopos, especialmente ^{199}Au , según las condiciones del reactor, la duración de la irradiación y el lugar donde se lleva a cabo la misma.

La actividad de la muestra irradiada durante un tiempo t , se puede calcular a partir de la fórmula general:

$$A = N \sigma \bar{\Phi} \left(1 - e^{-0.693 \cdot \frac{t}{T}} \right) \quad \text{II-4}$$

donde A : actividad absoluta expresada en desintegraciones por segundo.

σ : sección eficaz para neutrones térmicos, del elemento a irradiar, en cm^2 . Para el oro, dicho valor es de $98 \times 10^{-24} \text{cm}^2$, que equivale a 98 barns.

$\bar{\Phi}$: flujo de neutrones térmicos en el lugar de la irradiación del reactor utilizado, en neutrones/ cm^2 . segundo.

t : tiempo de irradiación.

T : período de semidesintegración del elemento formado, expresado en las mismas unidades que t . El ^{198}Au posee un T de 2.7 días.

Cuando se irradia oro metálico durante mucho tiempo, hay que tener en cuenta la formación de ^{199}Au , con lo cual la fórmula se complica.

Igualmente es necesario estudiar la autoabsorción de neutrones térmicos, cuando la muestra no es muy delgada. BARRACHINA y RADICELLA, 1967, (142), han estudiado este efecto en muestras cilíndricas de oro y elaborado las ecuaciones a utilizar para su evaluación cuantitativa.

Generalmente resulta más práctico realizar un cálculo aproximado del tiempo de irradiación necesario para obtener una actividad determinada y luego proceder a la calibración absoluta de la muestra obtenida.

II-2-3.- Coloide de 198-Au.-

SHEPPARD y col., 1947, (143) obtuvieron por primera vez un preparado heterogéneo de oro coloidal radiactivo, mezclando una solución de cloroaurato de sodio con gelatina, empleando como reductor ácido ascórbico. Posteriormente Zilversmit y col. (27), prepararon coloides de 198-Au por reducción de sales áuricas con peróxido de hidrógeno. Este método también fue utilizado aplicando la técnica de Turkevich y col., obteniéndose preparados homogéneos.

La primera producción de coloides de 198-Au que fue aplicada rutinariamente en medicina, se debe a HUDSWELL y col., 1954, (144). Estos autores, utilizaron un método en una etapa, reduciendo cloroaurato de sodio con una solución concentrada y caliente de glucosa. Durante la reacción se forma ácido láctico y aldehído pirúvico, cuyos potenciales de reducción son mayores que el de la glucosa. Estos coloides son marcadamente heterogéneos, a pesar de lo cual se siguen utilizando en algunos centros de aplicación médica.

HENRY y col., 1957, (145) han propuesto un método en dos etapas, que puede considerarse como el de mayor difusión hasta el presente. Se prepara un coloide germen, reduciendo ácido cloroáurico en medio alcalino con una solución concentrada de glucosa a 90 ° C. Luego se reduce en forma lenta, una solución de cloroaurato sódico en presencia del coloide germen y de gelatina, a 70 ° C; esta última sustancia actúa como agente reductor y estabilizante. Según DAVIS, 1957, (146) este último efecto puede deberse a la presencia de grupos guanidino; Henry y col. (145) han indicado que la acción reductora se debe a los mismos grupos.

Con posterioridad CONSTANT y col., 1960, (147) observaron que el agregado de ascorbato de sodio una vez completada la reacción, disminuye la cantidad de oro iónico remanente. Del TURCQO y PIMTRA, 1960, (148) emplean

50 - 100 mg de ácido ascórbico por cada 100 mg de oro, mientras que DOUIS, 1963,(149), en una modificación al método de Henry y col., agrega 200 mg de ácido ascórbico por cada 100 mg de oro.

Puede afirmarse que el método de Henry y col., se ha impuesto en la mayoría de los centros de producción. Métodos similares, fueron puestos a punto por CELLINI y col.,1961,(150), JIMENO de OSSO,1965,(151), IYA y col., 1965,(152) y DAVILA y col.,1965,(153).

Por otra parte KARAIVANOV,1965,(154) ha elaborado un método diferente, que puede resultar práctico.

Debe señalarse sin embargo, que en muchos trabajos se ha objetado el difícil comportamiento de la gelatina, durante la etapa del crecimiento de las partículas. SEREBRYAKOV,1958,(155) ha utilizado como agente estabilizante una fracción soluble de gelatina, obtenida por irradiación de esta sustancia con una fuente de ^{60}Co , con buenos resultados. LEVIN y SEREBRYAKOV,1960,(156), han elaborado asimismo un coloide de oro radiactivo cuyas partículas están recubiertas con plata.

BURK,1961,(157) ha estudiado la capacidad protectora de distintos agentes estabilizantes y KNOLL y LEUSCHKE,1961,(158) prepararon oro coloidal radiactivo, extrayendo mediante éter etílico el ácido cloroáurico formado por ataque del oro metálico con agua regia. Posteriormente redujeron el cloroaurato sódico con ácido ascórbico, en presencia de Peristan N como coloide protector.

THIELE y v.LEUERN,1965,(159) han investigado la utilización de coloides estabilizantes derivados de la polietilenimina y de la hidrazida del ácido poliacrílico, que poseen un número de oro superior al de la gelatina, y algunas otras ventajas con respecto a esta sustancia.

II-3.- PARTE EXPERIMENTAL.-

II-3-1.- Consideraciones preliminares.-

La finalidad de esta etapa de nuestro trabajo, fue lograr un método de preparación del coloide de ^{198}Au , que permitiera obtener un producto de características constantes y que respondiera a las especificaciones mencionadas en el párrafo II-1.-

Para ello, primeramente pusimos en práctica diversos métodos de preparación de oro coloidal inactivo, analizando sus ventajas e inconvenien-

tes.

Abordamos luego el estudio de los problemas de la irradiación del oro metálico.

Por último consideramos la construcción de un aparato que permite la preparación de coloides de ^{198}Au mediante control remoto.

Hemos elaborado así un método de obtención de oro coloidal radiactivo, y además hemos puesto a punto otro, que sigue esencialmente el de Henry y col., con algunas modificaciones que a nuestro entender le confieren ciertas ventajas con respecto al original.

En el método adoptado y por reducción enérgica de ácido cloroáurico, se prepara un coloide germen, que luego es utilizado como núcleo de crecimiento para la formación de partículas más grandes; éstas se obtienen por reducción suave de cloroaurato sódico en presencia del coloide protector y de partículas tipo germen.

En la realización práctica de los métodos de preparación conocidos, observamos ciertas dificultades que hemos tratado de subsanar, introduciendo algunas modificaciones basadas en experiencias que señalamos a continuación.

a) Una de las etapas más engorrosas es la preparación del ácido cloroáurico. Generalmente se lo obtiene atacando oro metálico, irradiado o no, con agua regia en caliente, procediéndose luego a la desecación de la solución, a presión reducida, con el fin de eliminar el excedente de ácidos. El desecado debe hacerse con muy especial cuidado, por cuanto puede entrañar la descomposición del ácido cloroáurico formado. Para evitar esa operación, intentamos preparar dicho ácido disolviendo óxido áurico en la cantidad estequiométrica de ClH 1 N. El óxido áurico se preparó atacando oro metálico con agua regia en ebullición y agregando luego un exceso de HONa 10 N, en caliente. El precipitado rojo anaranjado formado, se lavó tres veces con agua bidestilada para eliminar el exceso de hidróxido.

Al efectuar las reacciones indicadas con oro inactivo, los resultados obtenidos fueron satisfactorios.

Luego se trató de adaptar el procedimiento a la obtención de ácido cloroáurico radiactivo; para ello es necesaria la irradiación del óxido áurico. Pero se comprobó que durante esta etapa, se produce la descomposición de esta sustancia, que se transforma parcialmente en un producto oscuro, insoluble en ácido clorhídrico.

Esta circunstancia nos obligó retornar al método anterior, pese a la objeción más arriba formulada.

b) Los métodos generalmente aplicados requieren utilizar dispositivos relativamente complicados.

Serebryakov, (155), logró el crecimiento de las partículas agregando el agente reductor sobre una dispersión formada por clorocaurato de sodio, el agente estabilizante y una cantidad de partículas germen. Este procedimiento simplifica el instrumental necesario. Pero hemos intentado ponerlo en marcha, sin obtener resultados satisfactorios.

c) Otro inconveniente hallado en el método original de Henry y col., radica en las dificultades que trae aparejado el empleo de la gelatina. En primer lugar, se observan variaciones marcadas en las características de productos de distinta procedencia. Por otra parte, la abundante formación de espuma durante la etapa del crecimiento de las partículas, dificulta la agitación del líquido y la mezcla de los reactivos. Una vez finalizada la preparación se observa que la limpieza de los recipientes de vidrio es engorrosa.

Debido a la naturaleza proteica de la gelatina, no se puede excluir la posibilidad de que se produzcan fenómenos inmunológicos, ya sean de tipo alérgico o anafiláctico, especialmente cuando es necesario administrar el producto más de una vez. DRILL, 1958, (160), ha llamado la atención sobre este punto.

Por estas razones hemos ensayado el empleo, como agente estabilizante, de una solución al 20% de polivinilpirrolidona (PVP). Elegimos esta sustancia por sus propiedades fisicoquímicas, por no presentar los inconvenientes que señalamos en el caso de la gelatina y por ser biológicamente inocua, como lo demostrara RAVDIN, 1952, (161).

En lo que concierne al poder protector de la PVP, MEIDINGER, 1947, (162) había observado que lo posee en grado semejante al de la gelatina con respecto a coloides de plata. En experiencias preliminares, verificamos que esta similitud se mantiene para los coloides de oro.

II-3-2.- Material y Reactivos.-

Material de vidrio: el utilizado en todo nuestro trabajo fue de la marca "Pyrex" o equivalente. Se lo empleó cuidando en todo momento su esmerulosa limpieza. Para ello, después de cada experiencia, fue enjuaga-

do primeramente con abundante agua corriente, luego tratado con mezcla sulfocrómica caliente y por último enjuagado varias veces con agua bidestilada.

Reactivos: se utilizaron los siguientes:

- a) Oro metálico de 24 quilates, de pureza 99.9%.
- b) Acido Clorhídrico concentrado de pureza para análisis, de densidad 1.19, marca "Merck".
- c) Acido Nítrico concentrado, de pureza para análisis, de densidad 1.40, marca "Merck".
- d) Hidróxido de Sodio de pureza para análisis, bajo forma de pastillas, marca "Merck", con el cual se prepararon soluciones valoradas 1 N y 5 N, usando agua bidestilada como disolvente.
- e) Glucosa anhidra, de pureza para análisis, marca "Baker". Con la misma se prepararon soluciones al 56%.
- f) Gelatina de tipo "Grenetine", en placas translúcidas, provista por los laboratorios Prolabo de Paris, Francia. Su punto isoeléctrico era de 4.7 ± 0.1 . Se prepararon soluciones al 20%, las cuales se fraccionaron en porciones de 4 ml, que fueron esterilizadas durante 30 minutos a $121^{\circ}C$ en autoclave. Comprobamos que este paso es imprescindible para obtener buenos resultados en la preparación.
- g) Polivinilpirrolidona, (PVP), de la Badische-Anylin und Soda Fabrik, de Ludwigshafen am Rhein, Alemania Occidental, identificada con la marca registrada "Kollidon - 25". Su peso molecular era de 25.000 ± 5.000 , su proporción en cenizas de 0.02% y su contenido máximo en monómeros de 0.8%. La preparación era inyectable por vía endovenosa: la viscosidad en agua de una solución al 5% a $25^{\circ}C$ era de 1.8 centipoise.
- h) Acido ascórbico de marca "Erba", de pureza para análisis. Las soluciones fueron preparadas al 10%, inmediatamente antes de ser utilizadas. La sustancia fue mantenida en todo momento al abrigo de la luz.

Todas las soluciones fueron preparadas usando agua bidestilada como disolvente y empleando material de vidrio cuya limpieza se realizó como se indicara más arriba.

II-3-3.- Aparato para la preparación, con manejo a distancia.-

A los fines de trabajar con la debida radioprotección, se encaró la

construcción de un sistema que permitiera la obtención de los coloides de ^{198}Au íntegramente por control remoto. Para ello diseñamos un aparato adecuado a la realización de las distintas etapas, que necesariamente deben afrontarse en preparaciones de este tipo y que fue construido en los talleres de la Comisión Nacional de Energía Atómica. Las mencionadas etapas fueron establecidas en una serie de experiencias preliminares.

Para el cálculo de las dimensiones del mismo, se tomó como base una producción de oro coloidal a partir de 100 a 500 mg de oro metálico irradiado por partida. En las condiciones actuales del reactor RA-1 de la CNEA, se obtienen actividades comprendidas entre 0.5 y 2.5 Curies, para dichas masas, respectivamente.

El aparato fue ubicado tras el blindaje de plomo necesario. Todos los pasos de la técnica de preparación pueden ser realizados desde el exterior.

En la figura II-2, pag. 77, se presenta un esquema del dispositivo construido, que permite explicar su funcionamiento.

El balón A es el recipiente de ataque. Una vez introducido el oro metálico en el mismo, se disuelve el metal agregando agua regia; para ello el baño de agua que rodea el recipiente A debe estar en ebullición.

P es una placa filtrante de vidrio poroso, desmontable y cuyo fin es filtrar las soluciones obtenidas en A.

R es el balón en el cual se efectúa la reducción; está rodeado por un manguito calefactor. La temperatura de la solución reductora se verifica desde el exterior con un microamperímetro, cuya escala llega a 50 μA , y que está conectado con un termistor, no esquematizado en la Figura II-2, que se introduce por (T) y que se encuentra en el interior de un tubo de vidrio delgado ubicado en el seno de la solución. La calibración del termistor se efectuó de forma tal que se determina la temperatura real de la solución reductora.

Durante la preparación se debe hacer llegar gota a gota la solución de ácido cloroáurico o de cloroaurato sódico, sobre la solución reductora colocada en el balón R. Para ello, se regula la velocidad de goteo con una llave de teflón de paso variable, L, accionada desde el exterior mediante una manivela, solidaria a un eje con rótula cardánica. Una vez finalizada la preparación, se pasa el coloide al vaso madre, VM, y de allí a la bureta de llenado, B, en la cual se fracciona la muestra.

Las pinzas a, b y c, son pinzas de Mohr, de control remoto.

Para facilitar el traslado de los líquidos es posible aplicar presiones y vacíos en los lugares correspondientes, (1, 2, 3 y 4), mediante un juego de llaves de doble vía manejadas desde el exterior. Para introducir líquidos en A y desecar la solución de ácido cloroáurico, se debe aplicar vacío en 1 y para pasar las soluciones obtenidas en dicho recipiente por la placa filtrante, se hace vacío en 2. Se puede acelerar la introducción de líquidos en el balón R, haciendo vacío en 3; para pasar el coloide formado al vaso madre, se aplica vacío en 4. La agitación de la solución reductora durante la formación del coloide, se logra con una pera de goma, conectada con la llave 4.

Se puede desmontar la placa filtrante para proceder a su limpieza, sumergiéndola en agua regia caliente.

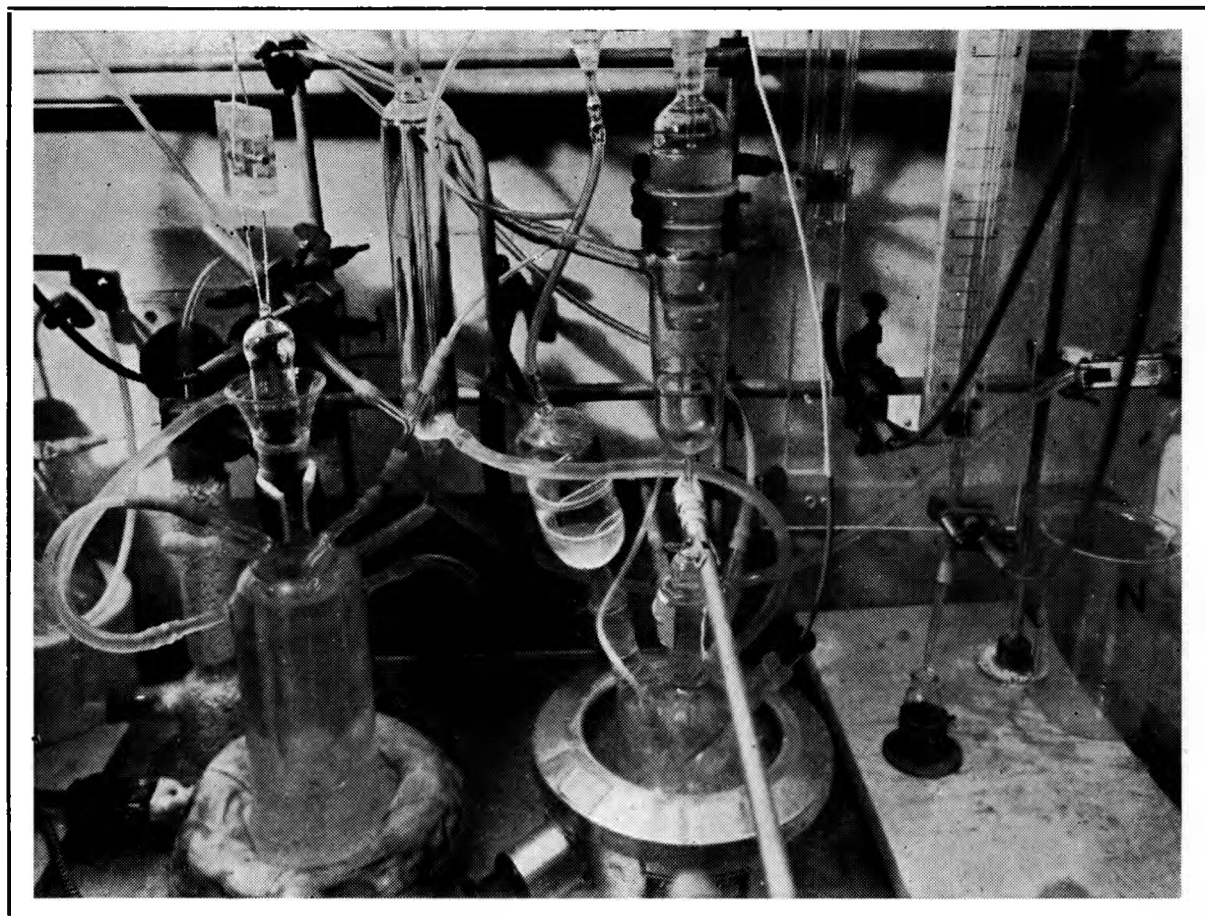


Fig. II-3.- Fotografía del dispositivo para producción de coloides de ^{198}Au con control remoto. Parte interna.

La figura II-3 muestra una fotografía del dispositivo, en la cual se pueden apreciar sus partes constituyentes; la figura II-4 es una fotografía de la parte exterior del aparato.

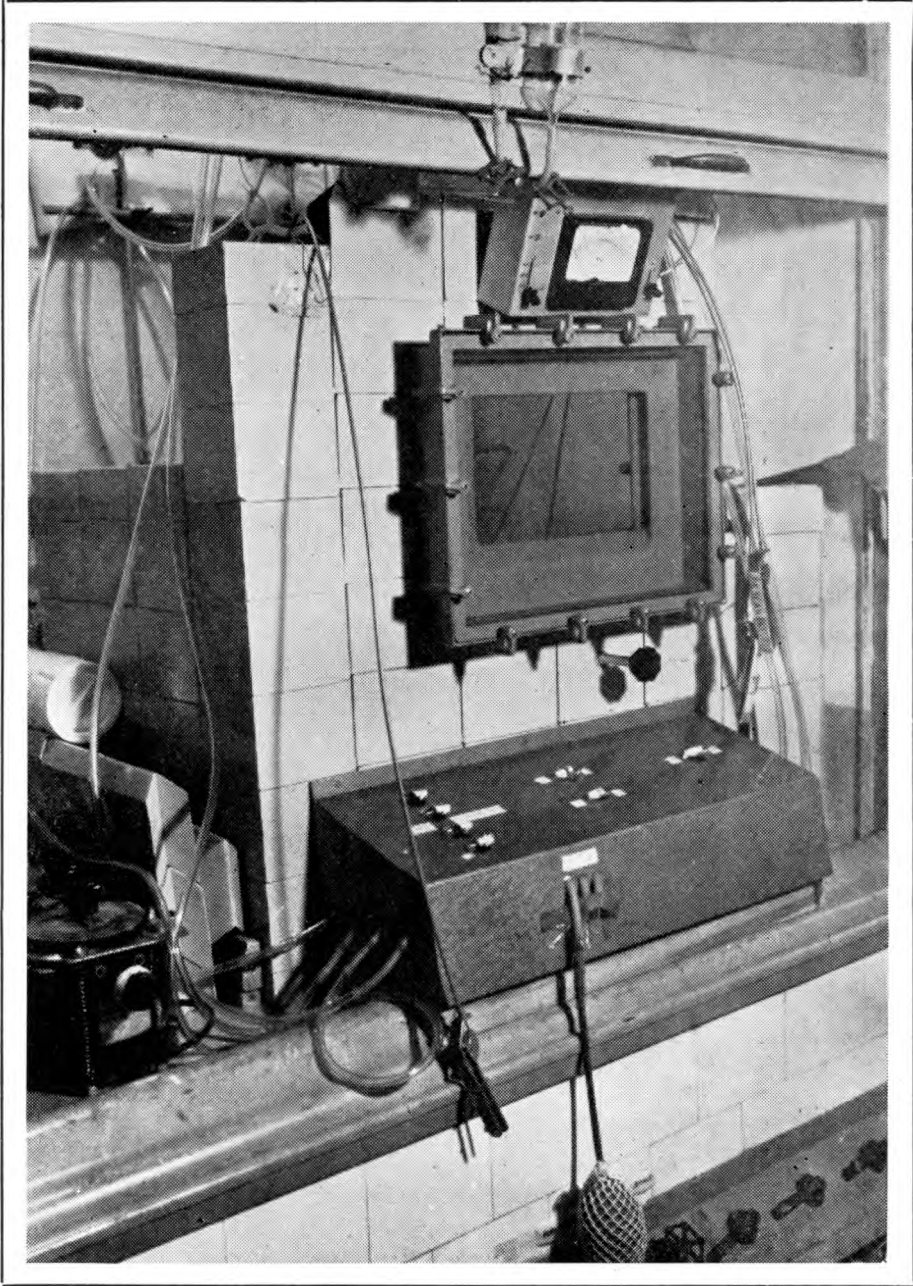


Fig. II-4.- Fotografía de la parte externa del aparato para producción de coloides de ^{198}Au mediante control remoto

II-3-4.- Métodos.-

Los métodos de preparación de los coloides de ^{198}Au que se indican a continuación, se experimentaron previamente con material inactivo. Durante estos ensayos investigamos las cantidades y concentraciones de los reactivos intervinientes, a los fines de obtener productos que respondan a las especificaciones establecidas en el párrafo II-1. Fue necesario determinar las proporciones de agente protector a utilizar y fijar con toda exactitud la cantidad de hidróxido de sodio a agregar en las distintas etapas, para obtener preparados cuyo pH no fuese menor que 5. Así mismo se han ensayado distintas temperaturas de reducción, lo que permitió determinar que las que se proponen son las óptimas. Los métodos que indicaremos a continuación permiten obtener los radiocoloides de oro en las condiciones deseadas, con la máxima seguridad. Las cantidades se consiguan para 100 mg de oro metálico; la preparación insume una hora, aproximadamente.

II-3-4-1.- Irradiación de oro metálico.-

Se pesan exactamente alrededor de 100 mg de oro metálico cuya pureza no sea inferior a la indicada en el párrafo II-3-2. Conviene utilizar alambres de oro, a los cuales se les da la forma de un resorte, para facilitar su introducción en el recipiente A.

Se dispone el metal en un reservorio pequeño que puede ser de material plástico o de aluminio, el cual se coloca a su vez en una "bala" de este metal, la que se sella. El oro así preparado se somete a la acción de neutrones térmicos, en un orificio conveniente del reactor, durante tres a seis días. En nuestro caso se utilizó el reactor RA-1 de la CNEA, cuyo flujo de neutrones térmicos se estimó en 1×10^{12} neutrones/cm².seg., aproximadamente. Utilizando la fórmula II-4 se calculó que irradiando el oro a saturación, la concentración radiactiva de los coloides obtenidos sería de 30 mCi/ml, aproximadamente. En la práctica hemos obtenido concentraciones de actividad de 10 mCi/ml o algo superiores.

II-3-4-2.- Preparación de coloides de oro germen.-

Pueden ser preparados empleando oro metálico inactivo cuando se los utilice como núcleos de crecimiento para la formación de los coloides crecidos, o con oro radiactivo (^{198}Au) si se les desea dar una aplica-

ción biológica.

a) Con coloide protector gelatina.

Se atacan 100 mg de oro metálico con 1 ml de agua regia, en caliente. Esta se prepara en el momento de usar, mezclando una parte de ácido nítrico con tres partes de ácido clorhídrico, ambos concentrados.

Concluido el ataque, se evapora la solución formada hasta consistencia siruposa, para lo cual se aplica vacío por la llave 1. El ácido clorúrico originado se disuelve en 3 ml de agua bidestilada, la que se hace llegar al recipiente A abriendo la pinza a; la solución obtenida, se vuelve a evaporar hasta consistencia siruposa. Se repite dos veces este proceso, con el fin de eliminar el ácido excedente.

Debe evitarse una concentración excesiva de la solución de ácido clorúrico, por cuanto esta sustancia puede descomponerse fácilmente en este caso. Consideramos que el grado de evaporación es correcto, en el momento en que la solución vira de amarillo claro a anaranjado cobrizo.

Finalizada la última evaporación se agregan 5 ml de agua bidestilada y se agita la solución en forma enérgica, haciendo llegar vacío por la llave 1. Se pasa la solución a través de la placa filtrante aplicando vacío en el punto 2 con la llave correspondiente. Se agregan nuevamente 5 ml de agua bidestilada en el recipiente de ataque, se agita la solución, con lo cual se arrastran los últimos vestigios de ácido clorúrico. Esta solución se pasa igualmente por la placa filtrante.

Mientras tanto, en el balón R, se lleva a 75 - 80 °C una solución reductora compuesta por: 4 ml de gelatina "Grenetine" al 20%, 10 ml de glucosa al 56%, 1.1 ml de HONa 5 N y 4 ml de agua bidestilada. Cuando el líquido llega a la temperatura más arriba indicada, se dejan transcurrir 5 minutos y luego se hace gotear en forma lenta pero ininterrumpida, el ácido clorúrico.

Se forma un coloide de color rojo, cuyas partículas poseen un diámetro medio de 4 a 6 μ . Debe agitarse el líquido en forma intermitente durante la reducción.

Una vez terminada la reacción, se envasa el coloide en frascos adecuados que se cierran herméticamente; se lo esteriliza 30 minutos a 121 °C, en autoclave.

El aparato de vidrio debe limpiarse inmediatamente como fue indicado en el párrafo II-3-2.

b) Con coloide protector PVP.

Se preparan 10 ml de solución de ácido cloroáurico a partir de 100 mg de oro metálico, como fue indicado en el párrafo anterior.

En el balón de reducción se lleva a 75 - 80 °C una solución reductora, que está compuesta por: 5 ml de PVP al 20%, 1.1 ml de HONa 5 N, 10 ml de glucosa al 56% y 3 ml de agua bidestilada. Puede aparecer una pequeña turbiedad en el momento de agregar el hidróxido de sodio, pero la misma desaparece fácilmente por agitación.

Cuando la solución reductora ha alcanzado la temperatura indicada y luego de transcurridos 5 minutos, se deja gotear lenta pero ininterrumpidamente la solución de ácido cloroáurico, debiéndose mantener una agitación intermitente. Se obtienen coloides de color rojo, cuyas partículas poseen un diámetro medio que oscila entre 4 y 6 μ .

El envasado y la esterilización se realizan en la misma forma que para el coloide protegido con gelatina.

La limpieza del aparato de vidrio puede llevarse a cabo como fue señalado en el párrafo II-3-2. Debe señalarse sin embargo, que, dadas las características del agente protector utilizado, estas manipulaciones pueden ser reemplazadas simplemente por un abundante lavado con agua bidestilada caliente.

II-3-4-3.- Preparación del coloide de 198-Au.-

a) Con coloide protector gelatina.

Una vez obtenido el oro radiactivo (198-Au) se deja transcurrir un periodo de 1 a 2 horas, tiempo que permite la desintegración del 28-Al y del 27-Mg formados en el proceso de irradiación del envase.

Se extrae con cuidado la muestra de oro irradiado del frasquito. Luego se introduce el 198-Au con las debidas precauciones, en el balón de ataque A, donde se encuentra 1 ml de agua regia, preparada en la forma indicada anteriormente. El baño maría debe encontrarse en ebullición.

El ácido cloroáurico obtenido se purifica como fue especificado en el párrafo II-3-4-2-a. Una vez efectuada la última evaporación, se introducen 5 ml de agua bidestilada y se agita vigorosamente la solución. Inmediatamente se refrigera el recipiente de ataque, haciendo circular agua fría por el baño, durante 2 o 3 minutos. Se añaden entonces 2.4 ml de HONa 1 N exactamente medidos y por último 2.6 ml de agua bidestilada. Obtenida esta solución, se la agita enérgicamente y se la pasa por la pla-

ca filtrante. Estas manipulaciones deben realizarse en la forma más rápida posible, ya que el cloroaurato sódico es relativamente inestable. Se puede lavar el balón de ataque con 2 a 3 ml de agua bidestilada, si se observa la presencia de vestigios de cloroaurato de sodio.

En el balón R se ha llevado mientras tanto a 70 a 75 °C, una solución reductora compuesta por: 4 ml de gelatina "Grenetine" al 20%, 9 ml de agua bidestilada y 0.17 ml del coloide germen no radiactivo protegido con gelatina, preparado según las indicaciones referidas en el párrafo II-3-4-2-a. Una vez que la solución ha alcanzado la temperatura mencionada, se le adiciona gota a gota la de cloroaurato sódico. Debe agitarse en forma intermitente, por ejemplo después de la caída de cada gota. La formación del coloide crecido debe lograrse en un plazo no menor de 15 minutos, cuando se trabaja con 100 mg de oro. Se obtiene un coloide de color violáceo. Suele originarse abundante espuma durante esta etapa, lo que generalmente no impide la formación del producto, si bien dificulta notablemente la visibilidad y la mezcla de los reactivos. Este efecto no se observa en la preparación del coloide germen protegido con gelatina.

Finalizada la reducción, se agrega 1 ml de una solución compuesta por 200 mg de ácido ascórbico, 1 ml de agua bidestilada y 1 ml de HONa 1 N. Con ello se logra la eliminación de los restos de oro iónico que no han sido reducidos anteriormente. La solución toma un intenso color violeta azulado.

Colocada la dispersión en envases apropiados, se los cierra herméticamente; se la esteriliza en autoclave durante 30 minutos a 121 °C. Se obtiene un sol de oro radiactivo (198-Au), de color rojo violáceo, cuyas partículas poseen un diámetro medio comprendido entre 20 y 30 μ .

El aparato de vidrio debe limpiarse como fue señalado en el párrafo II-3-2.

b) Con coloide protector PVP.

Se prepara una solución de ácido cloroáurico (198-Au) como se indicó en el párrafo anterior. Terminado el proceso de evaporación, se añaden 5 ml de agua bidestilada. Se agita la solución enérgicamente, haciendo circular agua fría por la camisa del balón de ataque; se añaden 2.0 ml de HONa 1 N y 3.0 ml de agua bidestilada. Se agita la solución vigorosamente y se la pasa por la placa filtrante.

La solución reductora, introducida en el balón R y llevada a 70 - 75

°C, está compuesta en este caso por: 13 ml de PVP al 20%, 0.17 ml del coloide germen no radiactivo protegido con PVP, preparado según las especificaciones consignadas en el párrafo II-3-4-2-b, 2 ml de ácido ascórbico al 10% y 2 ml de HONa 1 N. Se agrega gota a gota la solución de cloroaurato sódico sobre la solución reductora, debiéndose emplear en esta operación no menos de 15 minutos. Se agita después de la caída de cada gota. No se observa la formación de espuma. Se produce así un coloide de color rojo violáceo, cuyas partículas poseen un diámetro medio comprendido entre 20 y 30 mμ. Se esteriliza el preparado durante 30 minutos a 121 °C en autoclave. Debe señalarse que durante este proceso, no se observa ninguna alteración aparente del coloide, manteniéndose el tamaño de sus partículas esencialmente constante.

El aparato de vidrio puede lavarse con agua bidestilada caliente.

II-3-5.- Métodos de análisis.-

Preparado así el coloide de 198-Au, deben realizarse los ensayos físicoquímicos y biológicos, que permiten verificar si el preparado responde a las características señaladas en el párrafo II-1.

Las determinaciones practicadas regularmente en nuestro caso, fueron las requeridas por la Farmacopea Francesa, VIII Edición, 1965, (163, pag. 1074 y sig.) y las elaboradas por COHEN, 1959, (164). Dadas las apreciaciones formuladas en el Capítulo I, hemos incluido en nuestro protocolo de control, la determinación del espectro de absorción de los coloides.

Sobre todas las muestras preparadas se hicieron los siguientes ensayos analíticos: a) pH; b) contenido en oro iónico (198-Au) por cromatografía sobre papel; c) espectro de absorción; medición del tamaño de las partículas y determinación de la concentración en oro del coloide; d) ensayo de sustancias piretogénicas; e) determinación de la concentración radiactiva absoluta.

Por otra parte se hicieron, en algunos casos, las siguientes determinaciones: f) ensayos de esterilidad; g) microscopía electrónica; h) pureza radiactiva; i) estabilidad frente a electrolitos.

A continuación detallaremos brevemente los métodos empleados para efectuar las determinaciones citadas precedentemente.

a) El pH se determinó sobre aproximadamente 7 ml del coloide concentrado. Se empleó un pH-metro de marca "Beckmann", de escala expandida, tipo 76001, previamente calibrado.

- b) La determinación del contenido en oro iónico (^{198}Au), cuyo máximo aceptado es de 1%, es importante para una correcta evaluación fisicoquímica del coloide de ^{198}Au destinado a uso médico, ya que el oro iónico, al no comportarse biológicamente como un coloide, puede falsear los ensayos diagnósticos. Por otra parte, si en las dispersiones utilizadas con fines terapéuticos aquel valor es elevado, se corre el riesgo de provocar una irradiación generalizada del paciente.

La proporción de oro iónico en los radiocoloides, fue determinada mediante cromatografía de partición sobre papel Whatman n° 1, empleando la técnica ascendente. Para el caso de las dispersiones estabilizadas con gelatina, se utilizó el solvente propuesto por MAJUMDAR y CHAKRABARTTY, 1958, (165), cuya composición es: acetona : 7 partes; agua bidestilada : 2 partes y ácido clorhídrico concentrado (densidad 1.19) : 1 parte. El solvente debe ser preparado extemporáneamente y las corridas se realizan al abrigo de la luz y en un recinto donde las variaciones de temperatura sean mínimas. En estas condiciones, el coloide de ^{198}Au posee un R_f igual a cero, mientras que el oro iónico corre con el frente del solvente.

Cuando se analiza una dispersión de ^{198}Au protegida con PVP, el solvente indicado no puede utilizarse, ya que el coloide corre con el frente del mismo y no se separa del oro iónico. Por lo tanto hemos debido ensayar otros, de los cuales hemos elegido el constituido por 3 partes de acetona y 1 parte de agua bidestilada, que no necesita prepararse extemporáneamente, dada su excelente conservación y con el cual hemos obtenido resultados satisfactorios.

La evaluación cuantitativa se realizó, midiendo la actividad del cromatograma en función de la distancia al punto de siembra, con un radiocromatógrafo apropiado.

BEEN y HØYE, 1965, (166) han elaborado un método electroforético que permite determinar el contenido en oro iónico de coloides estabilizados con gelatina en forma más rápida.

- c) Los espectros de absorción de los radiocoloides fueron determinados con un espectrofotómetro marca "Beckmann", tipo DB, o con un espectrofotómetro registrador marca "Beckmann", tipo DK2. (')

(') Agradecemos a la Orientación Fisicoquímica del Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, el habernos facilitado el uso de estos espectrofotómetros.

Los detalles experimentales del método espectrofotométrico para la determinación del diámetro medio de las partículas y la concentración en oro de los radiocoloides, así como su fundamentación teórica, fueron considerados en el Capítulo I.

- d) La determinación de la presencia de sustancias piretogénicas se realizó según las especificaciones de la Farmacopea Argentina, IV Edición, 1956, (167, pag. 696 y sig.) y de RECCHI, 1963, (168). Se inyectan alrededor de 3 mCi de oro coloidal radiactivo en la vena marginal de la oreja de cada uno de 3 conejos sometidos a ayuno de 4 horas y cuya temperatura rectal debe estar comprendida entre 38.9 y 39.8 °C, sin acusar variaciones superiores a 0.2 °C durante 20 minutos. Se toma la temperatura rectal a los 60, 90, 120 y 180 minutos de inyectada la muestra. Se considera que el producto no contiene sustancias piretogénicas, si la suma de los incrementos de la temperatura en los tres conejos es menor que 1.4 °C.
- e) La determinación de la concentración radiactiva absoluta del coloide, se realizó sobre una alícuota exactamente medida del mismo, mediante una cámara de ionización de pozo, calibrada en milicurios de ¹⁹⁸Au, o en un contador proporcional con geometría 4π. La coincidencia entre ambas determinaciones fue siempre mejor que el 5%.
- f) En los centros de producción se considera generalmente que las preparaciones con radioisótopos cuyo período de semidesintegración es relativamente corto y que han sido sometidas a un proceso de calentamiento en autoclave durante no menos de 30 minutos a una atmósfera, no necesitan una determinación rutinaria de su esterilidad. Aceptamos este temperamento, a pesar de lo cual creímos oportuno ensayar la esterilidad de algunas muestras, para determinar si efectivamente esta suposición era correcta.
- Para ello hicimos las determinaciones en tres medios: caldo simple, caldo tioglicolato y medio de Sabouraud para hongos. Las verificaciones se efectuaron a las 24 horas y a los 7 días de sembrada la muestra. En todos los casos los resultados fueron negativos.
- g) Realizamos observaciones de dos de las dispersiones obtenidas, al microscopio electrónico. Para ello se contó con un instrumento Philips-200, con el cual se hicieron las determinaciones siguiendo la técnica descrita en el Capítulo I.

Los aumentos totales logrados, fueron de 200.000 x y de 130.000 x. (1)

- h) Comparamos la pureza radiactiva de un coloide de tipo S-2, provisto por el Departamento de Radioelementos del Centro de Estudios Nucleares de Saclay, Francia, con la de un coloide de 198-Au elaborado por nosotros.

Para ello hicimos mediciones seriadas de la actividad de la muestra, con el fin de evaluar experimentalmente su periodo de semidesintegración, cuidando mantener una geometria constante. Por otra parte, determinamos los espectros gamma a distintos tiempos, utilizando un espectrómetro gamma monocanal para el control del coloide S-2 y uno multicanal para el caso de la dispersión preparada por nosotros. Los experimentos fueron seguidos durante por lo menos dos meses, empleándose cantidades crecientes de los coloides.

En el caso del coloide de 198-Au S-2, detectamos una impureza de periodo de semidesintegración largo, cuyo valor y espectro gamma correspondía a los del 192-Ir. Su proporción fue menor que 0.01% en la muestra analizada. El espectro del coloide elaborado por nosotros, coincidía con el del 198-Au, aun 3 meses después de preparado, sin poder observar ningún pico correspondiente a una eventual impureza. Esto indica una pureza radiactiva de por lo menos 99.99%.

En ninguno de los dos casos comprobamos la presencia de 199-Au.

- i) Para comparar la estabilidad de las dispersiones protegidas con gelatina o con PVP, frente a soluciones de electrolitos de elevada fuerza iónica, efectuamos diluciones de ambos soles con soluciones de concentración creciente de Cl Na. Para ello, a 0.1 ml de coloide agregamos 4.9 ml de soluciones de cloruro de sodio al 5, 10, 15, 20 y 25%. También efectuamos una prueba en blanco realizando la dilución con agua bidestilada. En ninguna de las diluciones observamos un cambio de coloración, un principio de floculación o cualquier otra alteración fisicoquímica, durante un periodo de varios meses. Esto indica

(1) Agradecemos a la Dra. M.J. de Abeledo y a la Dra. L.S. de Wainer, del Grupo de Cristalografía de la CNEA, la colaboración prestada en las observaciones en el microscopio electrónico.

que ambos productos poseen una elevada estabilidad frente a electrolitos.

Los estudios realizados con los coloides no tratados, permitieron determinar que su estabilidad es elevada, no observándose en la mayoría de los casos, ninguna alteración, aun varios meses después de haber sido preparados.

II-3-6.- Resultados.-

En la tabla II-1 se exponen los resultados obtenidos con veinte preparaciones de coloides de ^{198}Au , empleando los métodos descritos en el párrafo II-3-4.

En la columna 1 se indica el número de la preparación y en la columna 2, su concentración radiactiva expresada en mCi / ml , determinada el día de su obtención. En las columnas 3 y 4 se consignan los diámetros medios de las partículas y la concentración en oro de las dispersiones, respectivamente. Estos valores fueron obtenidos con los métodos espectrofotométricos detallados en el Capítulo I. En la columna 5 figura el pH de cada preparación.

Todos los coloides presentaban concentraciones de oro iónico (^{198}Au) no detectables, es decir inferiores a 1% , eran estériles y apiretogénicos.

Los coloides crecidos eran isotónicos con el medio interno.

Todas las preparaciones evidenciaban una perfecta estabilidad, que excedía ampliamente su tiempo de empleo útil.

Los rendimientos en ^{198}Au alcanzados en todas las producciones, estaban comprendidos entre 80 y 90%.

La pureza radiactiva de todas las dispersiones era mayor que el 99.9%.

Los coloides 1 a 5 son de tipo germen, protegidos con gelatina, mientras que las dispersiones 6 a 10, son de la misma categoría, pero estabilizados con PVP. Los preparados 11 a 15, son coloides crecidos, protegidos con gelatina, mientras que los 16 a 20 son del mismo tipo, pero estabilizados con PVP.

Tabla II-1.- Resultados obtenidos en veinte preparaciones de coloides de 198-Au.

Preparación	Concentración Radiactiva	Diámetro medio de partículas	Concentración en oro	p H
-	mCi / ml	m μ	mg / ml	-
1	10.0	4.2	3.7	5.3
2	22.0	7.4	4.3	5.1
3	11.5	4.4	3.8	5.7
4	12.5	5.2	3.9	5.4
5	10.5	4.8	4.0	5.2
6	10.0	4.4	3.2	5.2
7	9.6	5.5	2.6	5.5
8	9.8	3.5	3.0	5.8
9	10.0	3.0	3.2	5.6
10	10.5	4.0	3.3	5.2
11	11.0	29.0	3.0	5.0
12	11.5	25.3	3.8	5.9
13	9.4	29.2	3.4	6.0
14	11.0	25.6	3.5	6.4
15	16.0	29.2	3.8	5.1
16	10.5	21.4	3.3	5.4
17	9.5	21.5	3.0	5.6
18	9.5	23.0	3.0	5.7
19	11.0	25.3	3.2	5.1
20	10.5	25.2	3.8	6.4

Como puede observarse, el tamaño de las partículas del coloide germen varía entre 3 y 6 m μ , debiéndose señalar una excepción en el caso de un coloide germen protegido con gelatina. Los soles crecidos, estabilizados con PVP o con gelatina, contienen partículas cuyo diámetro medio oscila entre 20 y 30 m μ .

La concentración radiactiva lograda en estas preparaciones es igual o mayor que 10 mCi/ml, lo que equivale a una actividad específica igual o mayor que 3 mCi/mg de oro. El pH de todas las dispersiones está comprendido entre 5 y 7.

En las figuras II-4 y II-5, se pueden observar los histogramas de los coloides números 15 y 20 de la tabla II-1. Las muestras para la microscopía electrónica fueron preparadas tal como se indicó en el párrafo I-3-2-2. Se indican asimismo, los diámetros medios D_N , D_S y D_W , obtenidos para cada caso mediante las fórmulas I-13 a I-15, así como las relaciones R_1 y R_2 , definidas por Maron y Elder (43).

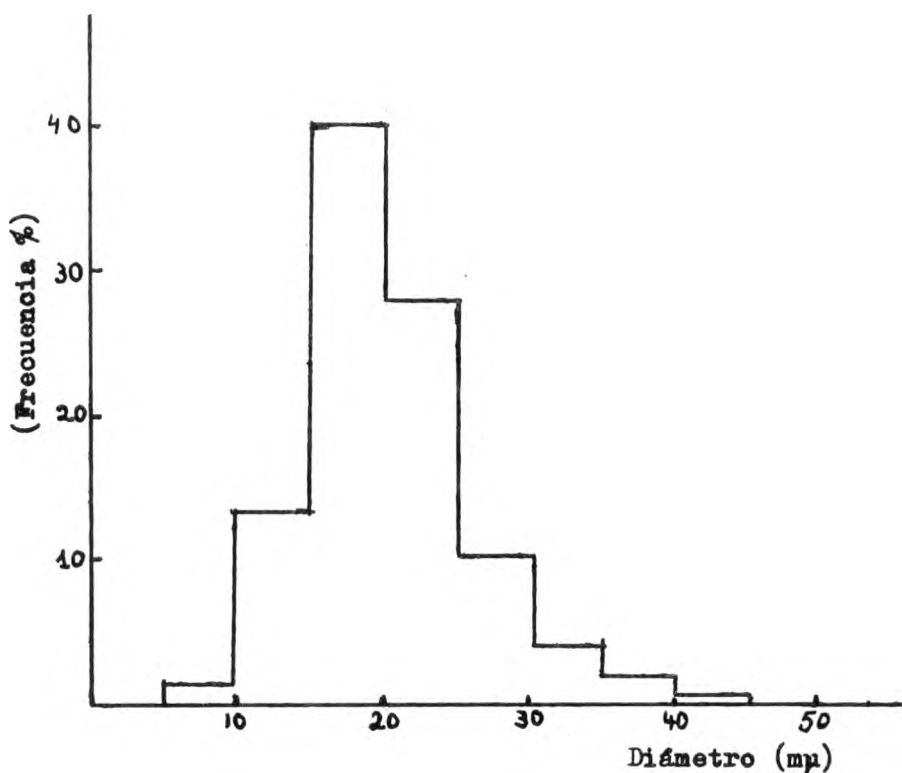


Fig. II-4.- Histograma de distribución de tamaños de partículas del coloide número 15 de la Tabla II-1.-

D_N : 20.2 mμ. D_S : 23.7 mμ. D_W : 27.7 mμ.

R_1 : 1.37.

R_2 : 1.17.

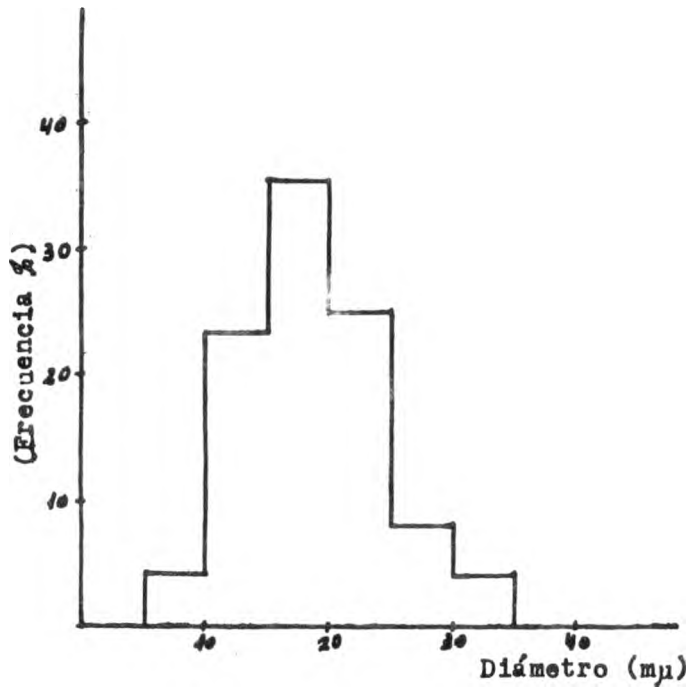


Fig. II-5.- Histograma de distribución de tamaños de partículas del coloide número 20 de la Tabla II-1.-

$$D_N : 18.5 \mu. \quad D_S : 22.0 \mu. \quad D_W : 24.8 \mu.$$
$$R_1 : 1.34 \quad R_2 : 1.19$$

En las tablas II-2 a II-5, se consignan las concentraciones medias de los distintos componentes que intervienen en la composición de los diferentes preparados.

Tabla II-2.- Composición de los coloides tipo germen, protegidos con gelatina.

Oro	3.0 - 3.5	mg
Glucosa	200	mg
Cloruro de Sodio	5	mg
Gelatina	30	mg
Agua bidestilada	c.s.p.	1 ml

Tabla II-3.- Composición de los coloides tipo germen, protegidos con PVP.

Oro	3.0 - 3.5	mg
Glucosa	200	mg
Cloruro de Sodio	5	mg
P . V . P .	37	mg
Agua bidestilada	c.s.p. 1	ml

Tabla II-4.- Composición de los coloides tipo crecido, protegidos con gelatina.

Oro	3.0 - 3.5	mg
Glucosa	1.2	mg
Acido Ascórbico	3.5	mg
Cloruro de Sodio	5	mg
Gelatina	30	mg
Agua bidestilada	c.s.p. 1	ml

Tabla II-5.- Composición de los coloides tipo crecido, protegidos con P.V.P.

Oro	3.0 - 3.5	mg
Glucosa	1.2	mg
Acido Ascórbico	7	mg
Cloruro de Sodio	5	mg
P . V . P .	96	mg
Agua bidestilada	c.s.p. 1	ml

Como puede observarse, la composición de los coloides protegidos con gelatina es sensiblemente igual a la de los soles S-2 y S-6 provistos por el Centro de Estudios Nucleares de Saclay, Francia, salvo muy pequeñas diferencias que no modifican sus propiedades biológicas. En el caso de las dispersiones protegidas con PVP, hemos considerado conveniente la incorporación de una mayor cantidad de este producto, con el fin de garantizar su estabilidad ante una mayor proporción de electrolitos. Como se

demostrará posteriormente, este hecho no altera las propiedades biológicas del preparado.

II-3-7.- Estudio del mecanismo de formación del coloide de 198-Au, crecido, estabilizado con gelatina.-

Al hacer mención al método de obtención de este coloide, destacamos que su color rojo violáceo característico aparece solamente durante la etapa de la esterilización. Este hecho nos indujo a pensar que el mecanismo de formación de la micela sería más complicado de lo generalmente admitido. Por lo tanto realizamos algunos estudios tendientes a aclarar dicho mecanismo.

Para ello analizamos algunas preparaciones en cada una de las etapas de su elaboración, determinando su espectro de absorción, su contenido en oro iónico y su pH.

Finalizada la reducción del cloroaurato sódico con gelatina, pero antes del agregado de ascorbato de sodio, las preparaciones presentan un color violáceo, no evidenciando sus espectros de absorción, la banda de absorbancia máxima en la zona de 525 μ , que es característica de estos coloides. El pH oscila entre 6.8 y 7.4. Por cromatografía sobre papel, determinamos que el contenido en oro iónico está comprendido entre 30 y 40 %.

Al agregar el ascorbato de sodio, se observa un viraje inmediato de la coloración a azul violáceo. El pico de absorbancia máxima de los espectros de absorción, se muestra completamente achatado y desplazado a altas longitudes de onda. El contenido en oro iónico oscila alrededor de 1 %.

Esterilizado el coloide 30 minutos a 121° C en autoclave, se encontró un contenido en oro iónico menor que 1%, un pH comprendido entre 5 y 6, así como los espectros de absorción característicos.

Cuando se analizaron coloides esterilizados, a los cuales no se les había agregado previamente ascorbato de sodio, se pudo observar que los mismos poseían las propiedades fisicoquímicas habituales, si bien en algunos casos, el contenido en oro iónico era ligeramente superior al normal.

Por otra parte, caben consignar algunos resultados obtenidos duran-

te el ensayo previo de los solventes cromatográficos, utilizados para determinar el contenido en oro iónico de los coloides protegidos con PVP. Para verificar la correcta separación del oro iónico de los coloides, se sembraron en el mismo punto, cantidades determinadas de ambos productos marcados con ^{198}Au ; la separación fue neta cuando se ensayó el solvente propuesto. Debe destacarse el hecho de que cuando se mezclan el coloide y el cloroaurato sódico en el lugar de la siembra, aparece de inmediato una coloración azul violácea, que es muy similar a la anteriormente mencionada. El coloide vuelve a tomar su coloración normal, cuando el oro iónico se ha separado de él.

II-4.- DISCUSION.-

Es dable observar que las propiedades fisicoquímicas de los coloides de ^{198}Au protegidos con gelatina o con PVP, son semejantes, principalmente en lo que concierne al tamaño medio y homogeneidad de sus partículas. No se demostró la presencia de micelas menores de 5 μ en los soles crecidos.

Las experiencias de dilución de las dispersiones, en soluciones de fuerza iónica creciente, permitieron demostrar que su estabilidad es semejante y elevada.

Como hemos indicado en el párrafo II-3-1, los inconvenientes que presenta el uso de la gelatina como agente estabilizante, son múltiples. Por otra parte, las experiencias descritas en el párrafo II-3-7, indican que el mecanismo de formación de los coloides crecidos, estabilizados con aquella sustancia, es más complejo de lo que generalmente suele admitirse; resulta evidente que en la primera etapa de la reducción con gelatina aislada, solamente se produce, parcialmente, la del cloroaurato sódico.

La aparición de una coloración azul violácea, en el momento de agregar ascorbato de sodio, puede interpretarse fácilmente en base a las experiencias detalladas en la segunda parte del párrafo II-3-7 y a las determinaciones efectuadas por Pauli (119). Este autor demostró que cuando sobre las partículas de oro coloidal se encuentran adsorbidos iones complejos de oro, las dispersiones toman aquella coloración. Este efecto pudo ser demostrado igualmente en forma teórica.

Aceptando la teoría de los "organizadores", propuesta por Turkevich

y col.,(35), es posible suponer, que, aun después del agregado de ascorbato de sodio, (que provoca una reducción practicamente total del oro iónico libre remanente), las particulas de oro coloidal formadas poseen una cierta proporción de iones complejos de oro adsorbidos en su superficie; ésto explicaría la coloración de la dispersión. Estas micelas estarían unidas todavía al ión ascorbato y/o a la gelatina.

Puede postularse que el proceso de calentamiento en autoclave es necesario para la separación de la particula de oro coloidal aislada, de este complejo. Creemos interesante mencionar que cuando se deja una preparación del coloide no esterilizado, pero a la que se le ha agregado ascorbato sódico, a la temperatura ambiente, se puede observar que el color rojo violáceo característico aparece muy lentamente.

Por otra parte, la disminución del pH, que experimenta el coloide en el proceso de esterilización, demostraría igualmente que durante esta etapa se produce una reducción adicional, ya que en la misma hay liberación de hidrogeniones.

Estas observaciones demuestran que la formación del coloide crecido de 198-Au, cuyas particulas están protegidas con gelatina, transcurre en varias etapas y que el agregado de ascorbato sódico es conveniente. La esterilización final es imprescindible para la correcta formación del producto y no solamente para garantizar su esterilidad. Iya y col.,(152), han observado problemas análogos durante la preparación de estos coloides.

El uso de la PVP como agente estabilizante de coloides crecidos de 198-Au se justifica por lo expresado en el párrafo II-3-1. Se puede comprobar que estas dispersiones se forman definitivamente en la primera etapa de la reducción, debido a la incorporación de ascorbato sódico como agente reductor. Posteriormente no evidencian cambio alguno al ser esterilizadas.

El estudio de los procesos de obtención de los coloides de tipo germen protegidos con gelatina o con PVP, permitió establecer que ambos se producen durante la primera etapa, sin observarse variaciones posteriores o diferencias en su mecanismo de formación. El análisis de los productos terminados, no permite apreciar ninguna ventaja derivada del uso de uno u otro agente estabilizante.

Finalmente, creemos importante reiterar, que los estudios efectuados sobre ambos coloides crecidos, indican que el protegido con PVP ofre-

ce ventajas evidentes con respecto al estabilizado con gelatina. Las mismas, son especialmente marcadas en lo que concierne a la sencillez del proceso técnico de obtención y a la mayor seguridad de elaboración, derivada ésta, de un mecanismo de formación más directo.

Además, como se demostrará en capítulos siguientes, el preparado con PVP también presenta propiedades biológicas ventajosas, con respecto al estabilizado con gelatina.

CAPITULO III

DISTRIBUCION BIOLOGICA DE COLOIDES DE ORO RADIOACTIVO (198-Au)

III-1.- INTRODUCCION.-

Debido al uso médico y biológico a que están destinados los coloides de 198-Au, es necesario estudiar su distribución en un organismo animal, antes de administrarlos a seres humanos.

En este capítulo se compara el comportamiento biológico de los coloides de oro radioactivo protegidos con gelatina o con polivinilpirrolidona (PVP).

III-2.- ANTECEDENTES.-

III-2-1.- Estudios de distribución biológica : técnicas generales y resultados obtenidos.-

Con el fin de estudiar la distribución del coloide de 198-Au en el organismo de animales de experimentación, se puede recurrir a diferentes métodos. Los mismos son aplicables, en general, al estudio de cualquier material radioactivo.

En la mayor parte de las técnicas, se inyecta la sustancia en el animal en estudio, se extraen luego sus diferentes órganos y se miden sus actividades. Este proceder, que es uno de los empleados por nosotros en el presente trabajo, permite obtener una buena cuantificación de los resultados.

Realizando experiencias de este tipo, Sheppard y col.,(143) estudiaron el comportamiento biológico de coloides de oro radioactivo en perros y en seres humanos, concluyendo que, cuando estos preparados se inyectan por vía endovenosa, se localizan rápidamente en las células reticuloendoteliales del hígado en una proporción generalmente igual o mayor que 90%. JONES y col.,1944,(169) habían efectuado observaciones similares con un coloide de fosfato de cromo marcado con 32-P.

SHEPPARD y col.,1947,(170) demostraron asimismo la posibilidad de lograr irradiaciones internas selectivas en algunas enfermedades del sistema linfático, mediante aplicación de dispersiones de 198-Au. HAHN

y col., 1947, (171) establecieron que los radiocoloides en estudio, se mantienen en forma apreciable en las cavidades del organismo en las cuales han sido infiltradas, depositándose en las serosas e irradiando zonas pre-determinadas.

Analogamente, ZILVERSMIT y col., 1952, (172) estudiaron coloides de $^{198}\text{-Au}$ cuyas partículas poseían diferentes diámetros medios. ROOT y col., 1954, (173) realizaron estas determinaciones en seres humanos, investigando también el efecto biológico de las radiaciones emitidas por el $^{198}\text{-Au}$. Por otra parte, SPODE y BURK, 1953, (174) analizaron la distribución de coloides de oro radiactivo, cuyas partículas poseían distintos tamaños o estaban recubiertas con plata.

KATAKURA, 1965, (175) efectuó un estudio comparativo de la distribución biológica de coloides de oro radiactivo y no radiactivo. Estos últimos fueron determinados cuantitativamente por análisis de activación. Se verificó que las propiedades fisiológicas de ambos son esencialmente similares.

MIGITA y col., 1966, (176) han establecido que el Rosa de Bengala - $^{125}\text{-I}$ y el coloide de $^{198}\text{-Au}$, sustancias ambas utilizadas con análoga finalidad diagnóstica, se localizan en tejidos diferentes de la masa hepática.

BELLION y col., 1962, (177) han elaborado una técnica experimental que permite estudiar la movilización linfática de los radiocoloides introducidos en cavidades del organismo. Esto puede resultar interesante para verificar si las dispersiones así inyectadas, quedan retenidas en las cavidades, lo que es necesario si se desea lograr una correcta irradiación cuando se efectúa la terapia de tumores por este camino. El método consiste en inyectar las dispersiones en la cavidad aponeurótica o en el tejido subcutáneo del espacio interdígital de la pata posterior del animal de experimentación. La movilización linfática se determina midiendo la actividad del sistema ganglionar satélite y la acumulación hepática del producto. Este proceder fue utilizado por COHEN y col., 1964, (178) para el estudio de un coloide de fosfato de cromo ($^{32}\text{-P}$) y por KURCBART y RADICELLA, 1965, (179), quienes lo aplicaron para la caracterización biológica de un coloide de hidróxido férrico marcado con $^{32}\text{-P}$. Es de destacar, que el estudio de la migración linfática de un radiocoloide alojado en la cavidad peritoneal es mucho más dificultoso. Sin embargo, BELLION y col., 1964, (180) han podido establecer que un co-

loide de $^{198}\text{-Au}$ protegido con gelatina, inyectado en dicha región, se encuentra en proporción importante, al cabo de algún tiempo, en hígado.

Cuando se utilizan técnicas del tipo hasta ahora mencionado, generalmente no es posible determinar la distribución del material activo en distintas zonas de un cierto órgano. Para lograr información de esta naturaleza es necesario emplear métodos autorradiográficos.

Una de las técnicas aplicable consiste en obtener cortes sagitales del animal entero por microtomía de congelación. Una vez desecados los cortes por volatilización a -30°C , se los pone en contacto con una película radiográfica durante un tiempo predeterminado. Las zonas activas del animal ennegrecen la placa en los lugares correspondientes.

Este método fue utilizado por primera vez por ULLBERG, 1954, (181) para estudiar la distribución biológicas de la penicilina- $^{35}\text{-S}$. SCHMITTERLOEW y COHEN, 1957, (182) han aplicado una técnica semejante para investigar la fijación de sustancias antimicrobianas en el sistema nervioso central. Posteriormente ULLBERG, 1958, (183) ha propuesto modificaciones a su metodología original; COHEN y DELASSUE, 1959, (184) han elaborado igualmente mejoras en el método primitivo, adaptándolo al estudio de sustancias marcadas volátiles.

Es interesante mencionar que FRIES y WALINDER, 1957, (185) han demostrado mediante autorradiografías de este tipo, que la absorción del coloide de $^{198}\text{-Au}$ de la cavidad peritoneal es inhibida cuando se lo inyecta junto con fosfato de polifloretilina. La movilización de un coloide de $^{198}\text{-Au}$ crecido, protegido con gelatina, administrado por vía intraperitoneal, fue confirmada posteriormente por el mismo camino por Cohen y col., (178). Estos autores verificaron una radiactividad importante en el hígado, ya una hora después de la inyección. Con el transcurso del tiempo, la actividad hepática aumenta, disminuyendo en forma concomitante y marcada la presente en el peritoneo.

Utilizando métodos autorradiográficos y de conteo de los huesos, GREENBERG y col., 1966, (186) comprobaron que las zonas reticuloendotelial y eritropoyética de la médula de los huesos largos, son coincidentes. Para ello utilizaron $^{59}\text{-Fe}$ y un coloide marcado con $^{99\text{m}}\text{-Tc}$ como agentes trazadores.

Otro método interesante para determinar la distribución de coloi-

des de oro, especialmente en una cierta célula o tejido, es la observación de las zonas a estudiar mediante microscopía electrónica. Dado el contraste de las partículas de oro, las mismas pueden diferenciarse con facilidad de otros elementos cito o histológicos. De esta manera FELDHERR y MARSHALL, 1962, (187) investigaron la distribución intracelular de un coloide de oro no radiactivo en la ameba "chaos - chaos". Aplicando el mismo método, FELDHERR, 1965, (188) estudió en dicho microorganismo la distribución intranuclear del preparado mencionado. Demostró que la localización de las dispersiones en el nucleoplasma es mayor que en el nucleolo y que las partículas cuyo diámetro sobrepasa los 11 μ , no son capaces de penetrar en el núcleo de la ameba estudiada.

Asimismo THOMAS y KERR, 1965, (189) lograron determinar la absorción de coloides de $^{198}\text{-Au}$ del espacio subaracnoideo mediante microscopía electrónica

Es necesario referirse además, a los estudios realizados con el fin de investigar los posibles efectos de la aplicación de coloides radiactivos.

KELLY y JONES, 1950, (190) observaron una disminución en la formación de ácidos nucleicos de tumores hepáticos, cuando se administra un coloide de Ytrio radiactivo ($^{90}\text{-Y}$), por vía endovenosa.

GOLDIE y HAHN, 1950, (191) inocularon ratones con alrededor de 10^4 células del Sarcoma-37, demostrando que, cuando de 2 a 5 días antes de este tratamiento se administra oro coloidal radiactivo, no se encuentran células tumorales en los extendidos de fluido peritoneal. Las células cancerosas remanentes no se multiplican cuando son inyectadas en otro animal. En todos los casos se estableció que el coloide de $^{198}\text{-Au}$ se localiza en el citoplasma de los macrófagos.

WHEELER y col., 1951, (192) estudiaron la hematología de perros tratados con oro coloidal radiactivo por vía endovenosa, verificando un cuadro hemático y una función hepática normales, con solo una ligera disminución del número de leucocitos. UPTON y col., 1956, (193) observaron que, solo cuando se suministran dosis muy elevadas de dispersiones de $^{198}\text{-Au}$ a ratones, se producen hepatomas.

KERR y col., 1954, (194) investigaron los efectos clínicos del tratamiento de tumores cerebrales, cuando se inyectan coloides de $^{198}\text{-Au}$ en el espacio subaracnoideo. Mc-CLURE y col., 1955, (195) estudiaron los re-

sultados de la administración intracerebral e intraventricular de diversos tipos de coloides de oro radiactivo, pudiendo observar su concentración en el plexo coroideo sin cambios histológicos aparentes.

ROSSOTTO y col., 1964, (196) evidenciaron una potencialización de la actividad ionizante del coloide de ^{198}Au , cuando se lo inocula junto con peróxido de hidrógeno.

Todas estas investigaciones permiten comprobar la eficacia de la administración del coloide de oro radiactivo a los fines de irradiar localmente distintas zonas tumorales. MUELLER, 1962, (197), en una revisión general de estos temas, demostró que los efectos secundarios son mínimos si se los compara con los paliativos.

III-2-2.- Centellografía.-

El comportamiento biológico de una sustancia radiactiva se investiga primeramente en animales de laboratorio, empleando alguna de las técnicas ya referidas. Es evidente que ninguna de ellas es aplicable al análisis de la distribución en seres humanos. Para esto, debería ser posible localizar el compuesto activo desde el exterior, sin perjudicar al organismo en estudio.

En el caso del coloide de oro radiactivo, uno de los primeros órganos estudiados fue el hígado, dados los resultados analizados en el párrafo anterior.

La visualización hepática mediante rayos-X presenta múltiples problemas debido al poco contraste de este órgano. RADT, 1929, (198) intentó solucionar este inconveniente administrando dióxido de torio coloidal ("Thorotrast") por vía endovenosa. Sin embargo este método debe desecharse en el ser humano, debido a sus efectos perniciosos, como fue demostrado por LANARI y col., 1937, (199).

Una solución práctica e inocua fue utilizada por DOERING, 1957, (200), quien inyectó oro coloidal radiactivo por vía endovenosa para visualizar desde el exterior el hígado de conejos y de ratas. La localización selectiva del producto en dicho órgano permitió aplicar el denominado método centellográfico; éste consiste en barrer mediante un detector móvil adecuado, que generalmente es un cristal de centelleo para radiaciones gamma, el cuerpo entero o una de sus regiones, de un ser vivo inyectado con la sustancia radiactiva. Por distintos mecanismos se inscribe la ac-

tividad de cada punto explorado sobre un plano, determinándose de esta manera su ubicación en el órgano en el que se ha concentrado.

La centellograffa se utiliza en diversas aplicaciones clínicas, habiéndose resumido las principales técnicas en "Scintigraphie Médicale", 1965,(201) y en algunos de los capítulos del libro editado por HINE,1967,(202).

Casi simultáneamente con Doering, FRIEDEL y col.,1957,(203) aplicaron igualmente este procedimiento, para determinar la forma y la estructura del hígado. BENDER,1957,(204) elaboró un fotocentelleador con el cual es posible la visualización prácticamente inmediata de las zonas radiactivas.

Con posterioridad se han introducido distintas modificaciones y mejoras en los equipos de detección y de procesamiento de datos.

ANGER,1958,(205) utilizó por primera vez una cámara de centelleo, que actualmente lleva su nombre y se encuentra muy difundida. Mediante su empleo se reduce en diez veces el tiempo requerido para una centellograffa normal.

FLEMING y col.,1962,(206) perfeccionaron un sistema en el que se utiliza un circuito cerrado de televisión; ésto permite eliminar el fondo de manera prácticamente total.

KAKEHI y col.,1962,(207) introdujeron la centellograffa en colores. Mediante esta técnica se diferencian las regiones con distintos rangos de actividad, inscribiendo cada una de ellas con un color diferente. De esta manera, la evaluación de la actividad en zonas diversas es más objetiva.

KELLERSOHN y col.,1964,(208) ha propuesto el empleo de una cámara de chispas, con el fin de reducir el tiempo necesario para la determinación.

BENDER y BLAU,1962,(209) aplicaron un sistema denominado "autofluoroscopia", que permite la visualización muy rápida y segura de las distintas zonas activas. SPERGEL,1966,(210) combinó este dispositivo con una computadora digital, lo que posibilita un análisis de las actividades distribuidas en el organismo entero, en forma cuantitativa. Asimismo, si se retienen los datos en la memoria de la computadora, es posible utilizarlos en posteriores determinaciones.

Todas estas modificaciones han permitido el estudio de las distribuciones de diversas sustancias en seres humanos, en función del tiempo.

En el aspecto clínico, la administración del oro coloidal radiactivo por vía endovenosa, permite la visualización del hígado de manera inocua. Además, su imagen centellográfica es también fisiológica, ya que, las zonas no funcionantes o no irrigadas, debido a la presencia de quistes o de tumores primarios o secundarios, aparecen en el centellograma como regiones menos activas, conocidas con el nombre de "nódulos o zonas frías". Frecuentemente no es posible detectar estas alteraciones mediante rayos-X.

La centellografía hepática, obtenida mediante administración endovenosa de coloides de $^{198}\text{-Au}$, ha sido estudiada por múltiples autores, entre los cuales se destacan DONATO y col., 1959, (211), CHRISTIE y McINTRYE, 1962, (212) y CZERNIAK, 1964, (213). Todos ellos han obtenido excelentes resultados, sin aparición de efectos secundarios, en la detección de tumores hepáticos. CZERNIAK y col., 1963, (214) han utilizado este método con éxito para localizar y diagnosticar quistes hidatídicos en ese órgano; asimismo han logrado seguir los resultados de la terapéutica aplicada en cada caso.

Para efectuar la centellografía hepática se suelen administrar 100 a 150 μCi del coloide de $^{198}\text{-Au}$. QUIMBY, 1960, (215) calculó que para 150 μCi de dicho producto, el hígado absorbe una dosis de 5.7 Rads. GOTT - SCHALK y ANGER, 1965, (216) compararon las ventajas e inconvenientes derivados de la utilización de este radiocoloide y del Rosa de Bengala - 131-I como agentes trazadores. El último compuesto se concentra en las células del parénquima hepático, de las cuales es eliminado por vía biliar y duodenal. Esto provoca la pérdida de nitidez de la imagen centellográfica. La principal ventaja del coloide de $^{198}\text{-Au}$ radica en su permanencia definitiva en el sistema reticuloendotelial hepático.

LARSSON y JONSSON, 1964, (217) han logrado visualizar la médula ósea, administrando cantidades elevadas del coloide de $^{198}\text{-Au}$ por vía endovenosa, que corresponden a 2.5 mCi aproximadamente. Si bien la dosis absorbida en este caso es apreciable, EDWARDS y col., 1964, (218) han utilizado este método para diagnosticar casos de la enfermedad de Hodgkin. KNISELEY y col., 1966, (219) han comparado la utilidad de distintos radiocoloides en este tipo de diagnóstico.

DELALOYE y MAGENANT, 1964, (220) han empleado los coloides de ^{198}Au de tipo germen, para visualizar los ganglios linfáticos de las extremidades inferiores, por linfografía indirecta. Para ello se inyecta el coloide en la zona tributaria a la región linfática a estudiar, sin necesidad de aislar el vaso correspondiente. Suele agregarse xilocaína con el fin de atenuar el posible efecto doloroso de la administración. ROSSI y FERRI, 1966, (221) han estudiado de esta manera la cadena linfática mamaria interna.

Por otra parte, GEORGI y col., 1966, (222) determinaron mediante una cámara de centelleo, el tiempo de pasaje de una sustancia del estómago al intestino delgado, administrando 100 a 120 μCi de ^{198}Au coloidal por vía bucal. Los datos obtenidos no permiten una evaluación exacta del parámetro estudiado.

III-3.- PARTE EXPERIMENTAL.-

Se encoaró el estudio comparativo del comportamiento biológico de los cuatro tipos de coloide de oro radiactivo (^{198}Au) mencionados en el Capítulo II. Para ello se eligió como animal de experimentación el ratón albino. Se efectuaron mediciones de cuerpo entero en función del tiempo, para estudiar una posible eliminación metabólica. Por otra parte, se determinaron las distribuciones en distintos órganos para diferentes períodos, después de la administración endovenosa o intracavitaria de los productos.

Posteriormente se hicieron determinaciones centellográficas en seres humanos.

III-3-1.- Material.-

Se utilizaron los coloides de ^{198}Au números 2, 9, 15 y 20 de la Tabla II-1.

Los preparados fueron inyectados un día después de haber sido elaborados. Durante ese lapso, se los mantuvo en los recipientes en que habían sido esterilizados.

III-3-2.- Animales.-

Se utilizaron 360 ratones blancos, hembras, de cepa standard, cuya masa oscilaba entre 25 y 30 gramos; recibieron alimentación sintética y agua "ad-libitum" y fueron mantenidos en jaulas apropiadas, a temperatura ambiente, hasta el momento de realizarse las experiencias.

III-3-3.- Técnicas utilizadas.-

Los animales fueron divididos en cuatro grupos, cada uno de los cuales fue subdividido en dos subgrupos. En uno de éstos, se estudió la distribución biológica después de la inyección de uno de los radiocoloides mencionados, en la vena dorsal de la cola. En el otro subgrupo, se analizó el comportamiento del mismo radiocoloide, con posterioridad a su administración en la cavidad aponeurótica de la pata trasera.

A su vez, cada subgrupo fue distribuido en varios lotes de 6 y de 7 animales cada uno, para los coloides números 9 y 20 y para los preparados números 2 y 15, respectivamente.

Cada ratón recibió, por una de las vías mencionadas, 0.1 ml de una dilución al 10% del coloide original, en una solución de cloruro de sodio al 0.9%. Esta cantidad corresponde a 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1.5×10^{11} y 2.3×10^{11} partículas y a 170, 80, 130 y 80 μCi para las preparaciones números 2, 9, 15 y 20, respectivamente.

Todos los animales toleraron perfectamente la administración de los productos, sin manifestar ningún síntoma de anormalidad. Es de destacar que el volumen inyectado, corresponde a la administración de 20 a 30 ml de las dispersiones concentradas, a un ser humano de aproximadamente 70 Kg.

Suministrados los productos, uno de los lotes de cada subgrupo fué reservado para las mediciones de cuerpo entero. Estas determinaciones fueron efectuadas midiendo la actividad de cada animal con geometría constante, mediante un cristal de centelleo para radiaciones gamma, de INa (ITL) de 2" x 2", conectado a un espectrómetro gamma monoanal, en el pico fotoeléctrico del 198-Au (411 KeV), por duplicado. Al mismo tiempo, y en idénticas condiciones de geometría y medición, se efectuaron las determinaciones de la actividad de un patrón de 198-Au.

Los ratones restantes fueron sacrificados a tiempos prefijados,

comprendidos entre 1 hora y 8 días después de la inyección. Para ello se anestesió primeramente cada animal con éter etílico y se le extrajo sangre por punción cardíaca, previa apertura de la caja torácica. Se separaron los órganos más importantes, los que fueron lavados con el fin de eliminar los posibles restos de sangre, y luego pesados.

Posteriormente, manteniendo una geometría constante, se midieron las actividades de los órganos enteros, con un equipo similar al mencionado más arriba. Las condiciones electrónicas fueron variadas de acuerdo con las actividades presentes, pero cuidando mantenerlas constantes para cada lote de animales, lo que fue verificado por medición del patrón de 198-Au correspondiente. En la misma forma se midieron las actividades de los restos de los animales, previo corte de la cola, en el caso de los inyectados por vía endovenosa.

La actividad total para cada animal se obtuvo mediante la suma de las correspondientes a cada uno de los órganos y la del resto del animal. Con aquel valor se calcularon las actividades porcentuales de cada órgano; la sanguínea, consignada en el caso de las distribuciones del coloide administrado por vía endovenosa, fué calculada para la sangre total tomando como base la masa de los ratones utilizados.

De esta manera se determinó la localización porcentual del material en estudio en hígado, bazo, sangre, riñones, pulmones, esternón y lo remanente. Cuando se administró el coloide en la cavidad aponeurótica de la pata trasera, se midió además la actividad de ésta y la del sistema ganglionar satélite, (S . G . S .)

En todos los animales se calculó la relación entre las actividades específicas del hígado y del bazo.

Con todos estos datos se establecieron los valores medios y la desviación standard correspondiente a cada uno de ellos. Este último valor se define mediante la fórmula III-1:

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{III-1}$$

donde \bar{x} es el promedio de n determinaciones y x el valor de una de ellas.

III-3-4.- Resultados.-

En las figuras III-1 y III-2 se encuentran esquematizados los resultados obtenidos a partir de las mediciones de la actividad remanente en el cuerpo entero de los distintos animales. En la primera de ellas se indican los resultados obtenidos con los coloides protegidos con gelatina y en la segunda los logrados con las dispersiones estabilizadas con FVP. Todas las determinaciones se efectuaron frente a un patrón de ^{198}Au medido en las mismas condiciones. Los resultados fueron normalizados, tomando como 100% las actividades iniciales de cada animal, así como la de los patrones de ^{198}Au respectivos.

Se calcularon luego los porcentajes de actividad remanente en cada ratón, con los cuales se obtuvieron los promedios y las desviaciones standard correspondientes a cada día de medición.

En los gráficos de las figuras III-1 y III-2 se puede observar que el período de semidesintegración efectivo de los coloides de ^{198}Au en todos los casos, es igual al T físico del ^{198}Au . Esto indica la ausencia de una eliminación metabólica significativa.

En las tablas III-1 a III-4 figuran los resultados obtenidos en el estudio de la distribución biológica de los cuatro tipos de coloides mencionados, administrados por vía endovenosa.

Los resultados más importantes se resumen en los gráficos de las figuras III-3 y III-4, en los que se facilita la comparación de la distribución en función del tiempo, de ambos coloides crecidos y germen.

En las tablas III-5 a III-8 se indican los resultados logrados en el análisis del comportamiento de los cuatro tipos de radiocoloides en estudio, inyectados en la cavidad aponeurótica de la pata trasera de los animales de experimentación.

Los valores más significativos se comparan en las figuras III-5 y III-6.

Es necesario recordar que, en los casos en que las actividades medidas son bajas, los errores relativos cometidos en las determinaciones resultan elevados. Por lo tanto, en los órganos en los cuales la localización de las dispersiones es pequeña, se puede observar que generalmente las desviaciones standard son relativamente apreciables.

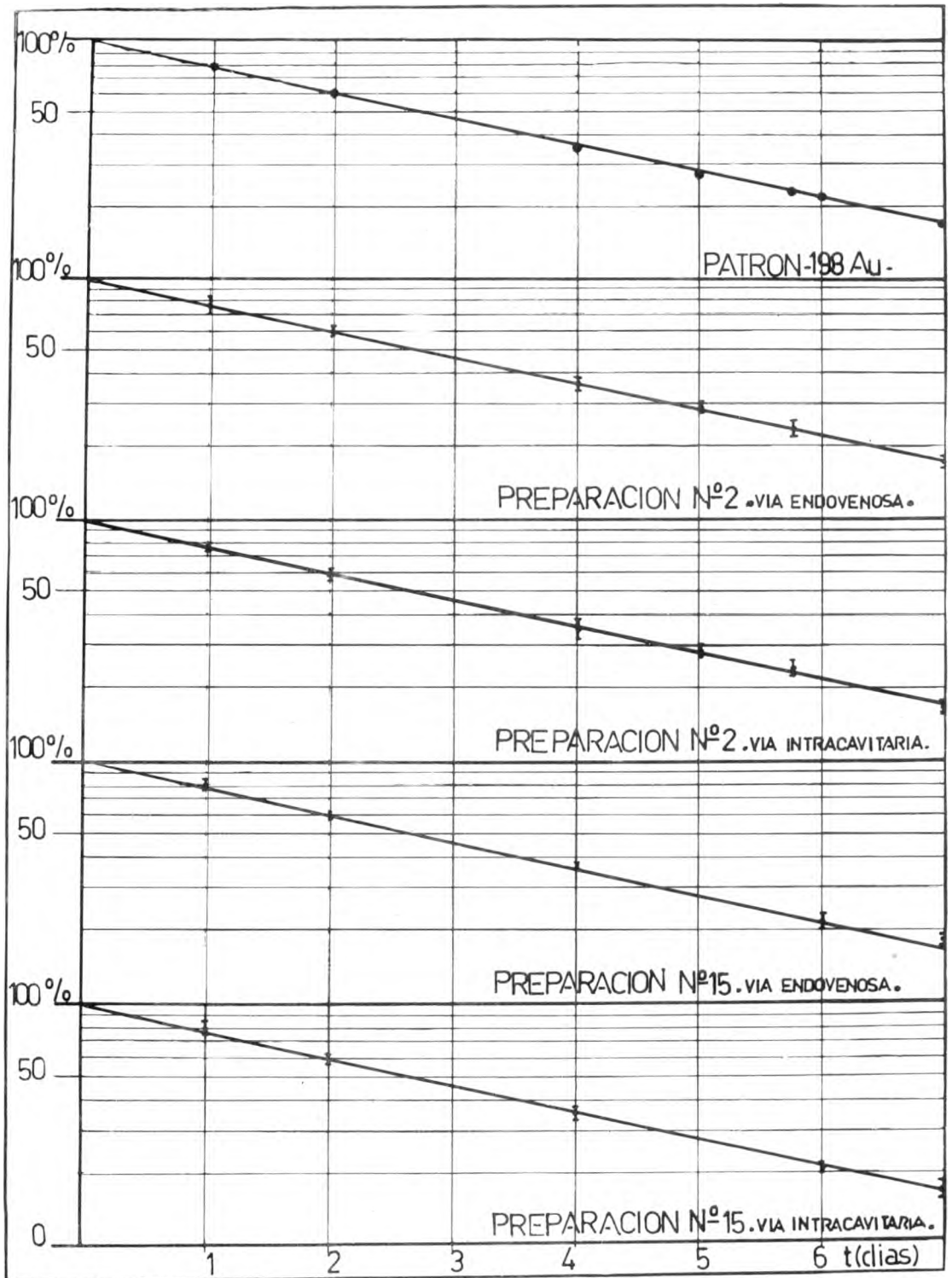


Fig III-1.- Resultados obtenidos a partir de las mediciones de la actividad de los animales enteros, inyectados con dispersiones de 198-Au coloidal, protegidas con gelatina.-

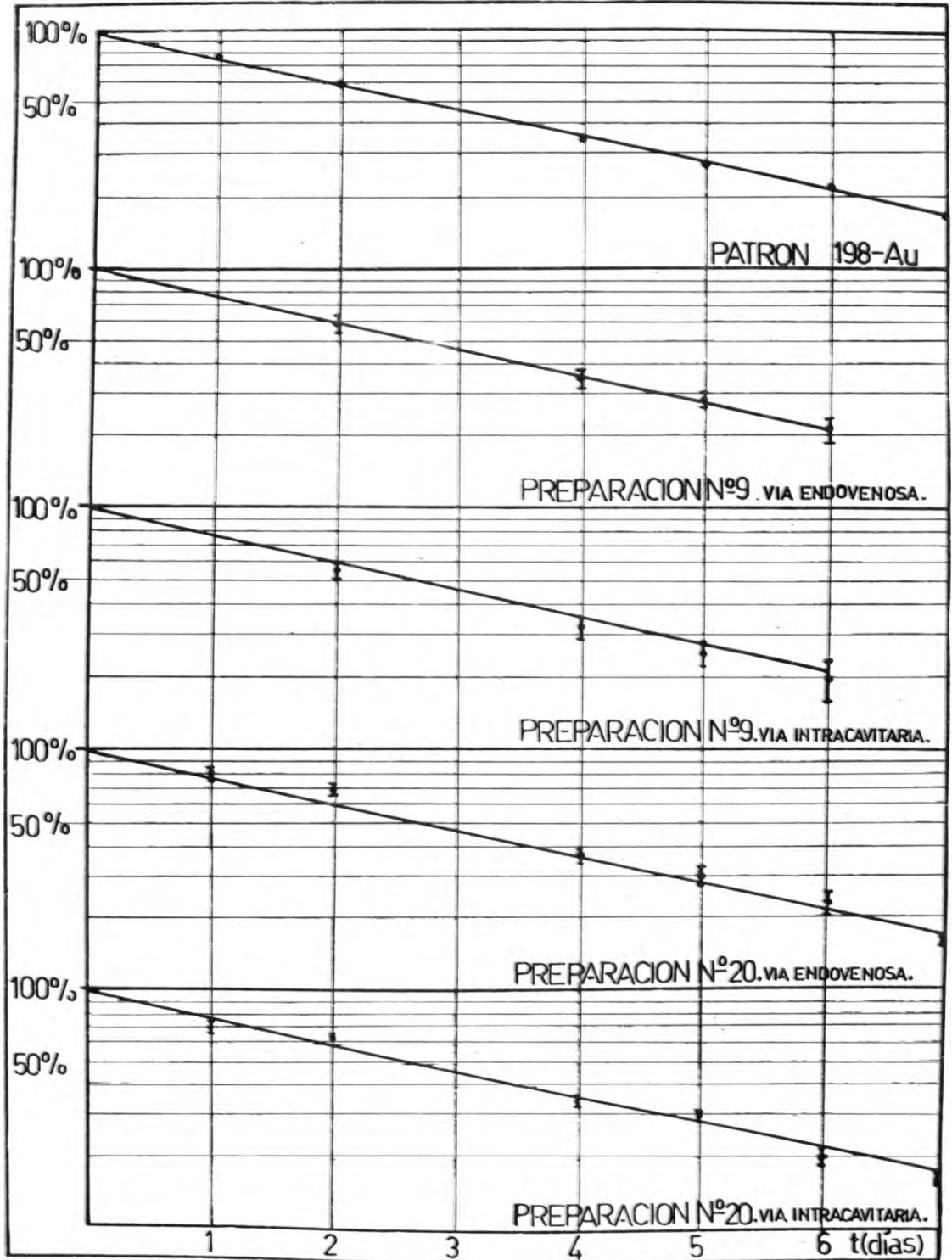


Fig. III-2.- Resultados obtenidos a partir de las mediciones de la actividad de los animales enteros, inyectados con dispersiones de 198-Au coloidal, protegidas con polivinilpirrolidona (PVP).

Tabla III - 1.- Distribución biológica obtenida después de inyección endovenosa del coloide número 2 de la Tabla II-1.-

ORGANO	Por Ciento de Actividad $\pm \sigma$ al tiempo de:							
	1 Hr.	6 Hr.	1 d.	3 d.	6 d.	8 d.		
HIGADO	91.76 \pm 0.89	92.81 \pm 0.44	92.83 \pm 1.18	92.64 \pm 1.20	93.24 \pm 1.04	93.88 \pm 0.64		
BAZO	1.50 \pm 0.50	1.38 \pm 0.13	1.32 \pm 0.23	1.32 \pm 0.15	1.38 \pm 0.25	1.12 \pm 0.17		
SANGRE	0.24 \pm 0.04	0.23 \pm 0.07	0.09 \pm 0.03	0.09 \pm 0.04	0.04 \pm 0.03	0.05 \pm 0.04		
RIÑONES	0.20 \pm 0.013	0.20 \pm 0.01	0.17 \pm 0.03	0.18 \pm 0.028	0.16 \pm 0.02	0.14 \pm 0.015		
PULMONES	0.03 \pm 0.013	0.04 \pm 0.017	0.04 \pm 0.007	0.03 \pm 0.014	0.02 \pm 0.03	0.03 \pm 0.02		
ESTERNOX	0.11 \pm 0.016	0.06 \pm 0.006	0.07 \pm 0.04	0.06 \pm 0.024	0.07 \pm 0.03	0.05 \pm 0.01		
RESPO	6.14 \pm 0.82	5.24 \pm 0.30	5.19 \pm 0.52	5.71 \pm 1.26	5.08 \pm 0.50	4.67 \pm 0.62		
Actividad Especifica del Hígado / Actividad Especifica del Bazo $\pm \sigma$ al tiempo de:								
1 Hr.	6 Hr.	1 d.	3 d.	6 d.	8 d.			
5.90 \pm 2.22	5.13 \pm 0.97	3.37 \pm 0.57	3.06 \pm 0.57	2.51 \pm 0.53	2.80 \pm 0.74			

Tabla III - 2 - Distribución biológica obtenida después de inyección endovenosa del coleside número 9 de la Tabla II-1.-

ORGANO	Por Ciento de Actividad $\pm \sigma$ al tiempo de:							
	1 Hr.	6 Hr.	1 d.	4 d.	6 d.	8 d.		
HIGADO	92.16 \pm 3.44	93.33 \pm 2.98	92.97 \pm 3.41	94.15 \pm 1.70	92.98 \pm 1.97	96.38 \pm 0.91		
BAZO	1.58 \pm 0.53	1.64 \pm 0.61	1.18 \pm 0.15	1.44 \pm 0.24	1.60 \pm 0.41	0.93 \pm 0.14		
SANGRE	0.65 \pm 0.24	-	0.44 \pm 0.27	0.34 \pm 0.10	0.31 \pm 0.14	0.28 \pm 0.33		
RIÑONES	0.27 \pm 0.04	0.15 \pm 0.05	0.24 \pm 0.05	0.28 \pm 0.10	0.28 \pm 0.12	0.11 \pm 0.12		
PULMONES	0.19 \pm 0.06	0.20 \pm 0.06	0.17 \pm 0.05	0.12 \pm 0.02	0.14 \pm 0.05	0.09 \pm 0.12		
ESTERNON	0.01 \pm 0.015	0.01 \pm 0.017	0.01 \pm 0.01	0.03 \pm 0.03	0.10 \pm 0.02	0.02 \pm 0.03		
RESTO	3.38 \pm 2.04	3.45 \pm 1.39	3.02 \pm 1.41	2.62 \pm 1.02	2.56 \pm 0.58	2.27 \pm 0.83		
Actividad Especifica del Hígado / Actividad Especifica del Bazo $\pm \sigma$ al tiempo de:								
1 Hr.	6 Hr.	1 d.	4 d.	6 d.	8 d.			
4.08 \pm 0.97	3.87 \pm 1.52	3.91 \pm 0.88	3.14 \pm 0.66	3.03 \pm 1.41	2.63 \pm 1.22			

Tabla III - 3.- Distribución biológica obtenida después de inyección endovenosa del coloide número 15 de la Tabla II-1.-

ORGANO	Por Ciento de Actividad $\pm \sigma$ al tiempo de:							
	1 Hr.	6 Hr.	1 d.	2 d.	4 d.	6 d.	8 d.	
HIGADO	87.85 \pm 1.48	88.91 \pm 2.54	86.59 \pm 2.64	88.73 \pm 1.86	87.01 \pm 1.92	88.34 \pm 3.45	87.76 \pm 3.54	
BAZO	4.26 \pm 1.48	4.12 \pm 1.65	4.38 \pm 1.47	4.90 \pm 1.03	5.12 \pm 1.56	5.34 \pm 2.55	5.44 \pm 3.33	
SANGRE	1.01 \pm 0.36	0.17 \pm 0.04	0.10 \pm 0.017	0.09 \pm 0.08	0.08 \pm 0.05	0.05 \pm 0.06	0.01 \pm 0.02	
RIÑONES	0.60 \pm 0.08	0.56 \pm 0.21	0.47 \pm 0.10	0.38 \pm 0.08	0.34 \pm 0.03	0.20 \pm 0.04	0.21 \pm 0.09	
PULMONES	0.09 \pm 0.03	0.06 \pm 0.02	0.05 \pm 0.015	0.014 \pm 0.012	0.04 \pm 0.015	0.07 \pm 0.016	0.01 \pm 0.011	
ESTERNO	0.11 \pm 0.03	0.11 \pm 0.03	0.14 \pm 0.014	0.09 \pm 0.03	0.15 \pm 0.017	0.09 \pm 0.03	0.07 \pm 0.03	
RESTO	6.08 \pm 1.23	6.21 \pm 1.33	7.13 \pm 0.69	6.97 \pm 1.55	7.25 \pm 0.67	6.08 \pm 1.01	5.08 \pm 1.28	
Actividad Específica del Hígado / Actividad Específica del Bazo $\pm \sigma$ al tiempo de:								
1 Hr.	6 Hr.	1 d.	2 d.	4 d.	6 d.	8 d.		
2.01 \pm 0.38	1.93 \pm 0.65	0.86 \pm 0.37	0.49 \pm 0.16	0.55 \pm 0.32	0.57 \pm 0.22	0.98 \pm 0.31		

Table III - 4.- Distribución biológica obtenida durante de investigación endovenosa del colico número 20 de la Tabla II-1.-

ORGANO	Por Ciento de Actividad $\pm \sigma$ al tiempo de:							
	1 Hr.	6 Hr.	1 d.	2 d.	4 d.	6 d.	8 d.	
HEGADO	86.20 \pm 2.26	86.86 \pm 3.38	89.96 \pm 1.90	87.57 \pm 3.33	87.79 \pm 3.13	88.87 \pm 1.62	88.61 \pm 1.91	
BAZO	3.02 \pm 1.26	4.54 \pm 1.15	4.41 \pm 1.11	5.27 \pm 2.27	4.58 \pm 1.67	5.00 \pm 0.76	5.32 \pm 1.42	
SANGRE	4.48 \pm 0.98	1.49 \pm 0.45	0.16 \pm 0.05	0.06 \pm 0.02	0.02 \pm 0.02	0.00 \pm 0.07	0.03 \pm 0.03	
RIÑONES	0.28 \pm 0.07	0.16 \pm 0.05	0.12 \pm 0.03	-	0.14 \pm 0.01	0.17 \pm 0.04	0.18 \pm 0.06	
PULMONES	0.38 \pm 0.08	0.29 \pm 0.01	0.17 \pm 0.05	0.18 \pm 0.02	0.18 \pm 0.06	0.16 \pm 0.04	0.16 \pm 0.02	
ESTRUCION	0.07 \pm 0.03	0.07 \pm 0.006	0.07 \pm 0.04	0.04 \pm 0.01	0.06 \pm 0.03	0.05 \pm 0.02	0.02 \pm 0.03	
RESTO	5.18 \pm 0.64	5.61 \pm 0.28	5.28 \pm 1.82	6.02 \pm 0.79	5.25 \pm 0.33	5.66 \pm 1.47	5.30 \pm 1.33	
Actividad Especifica del Hígado / Actividad Especifica del Bazo $\pm \sigma$ al tiempo de:								
1 Hr.	6 Hr.	1 d.	2 d.	4 d.	6 d.	8 d.		
1.39 \pm 0.39	1.16 \pm 0.08	0.72 \pm 0.28	0.45 \pm 0.20	0.57 \pm 0.24	0.60 \pm 0.23	0.76 \pm 0.51		

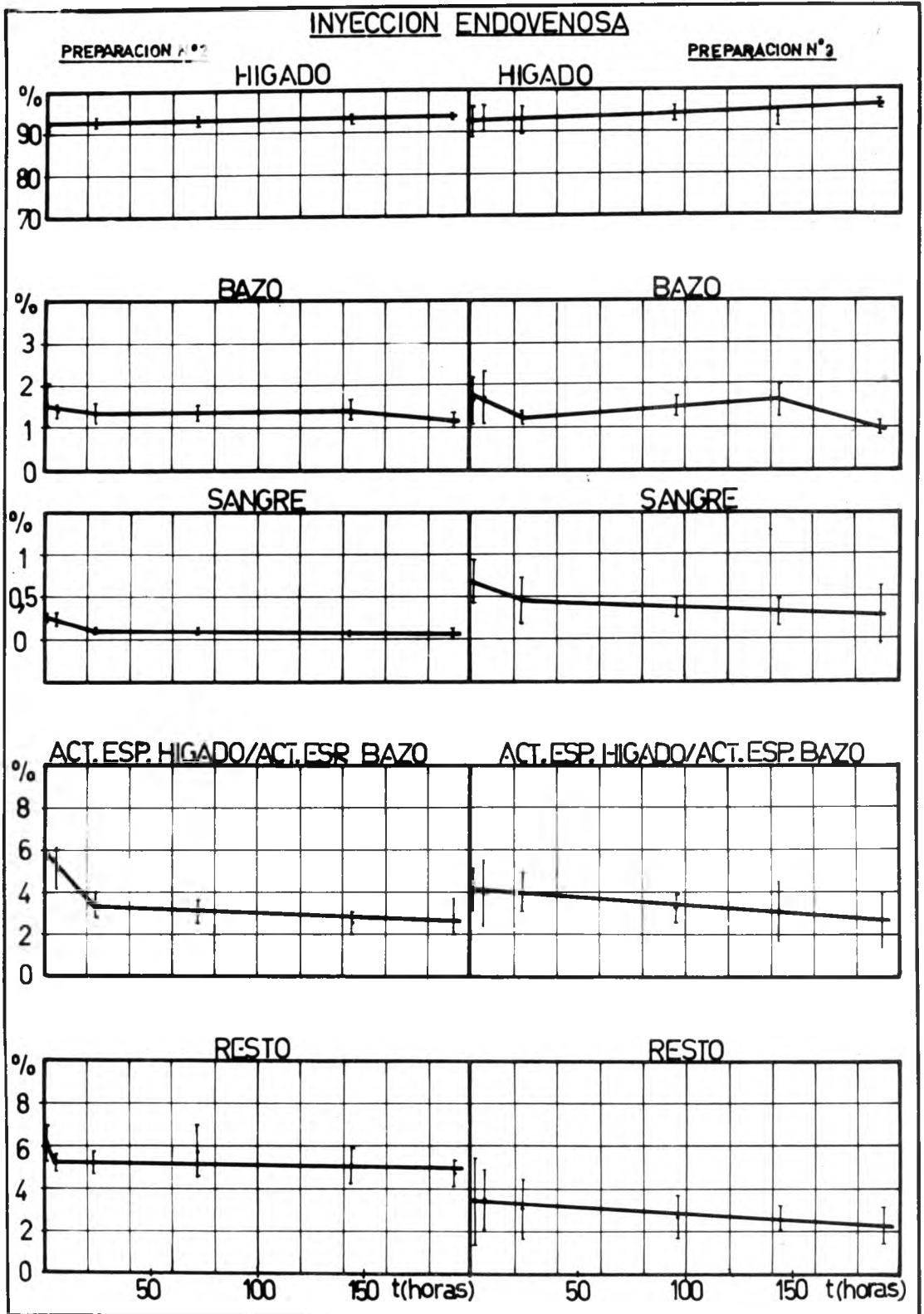


Fig. III-3.- Resultados más importantes obtenidos en el estudio del comportamiento biológico de los coloides números 2 y 9 de la Tabla II-1, administrados por vía endovenosa.-

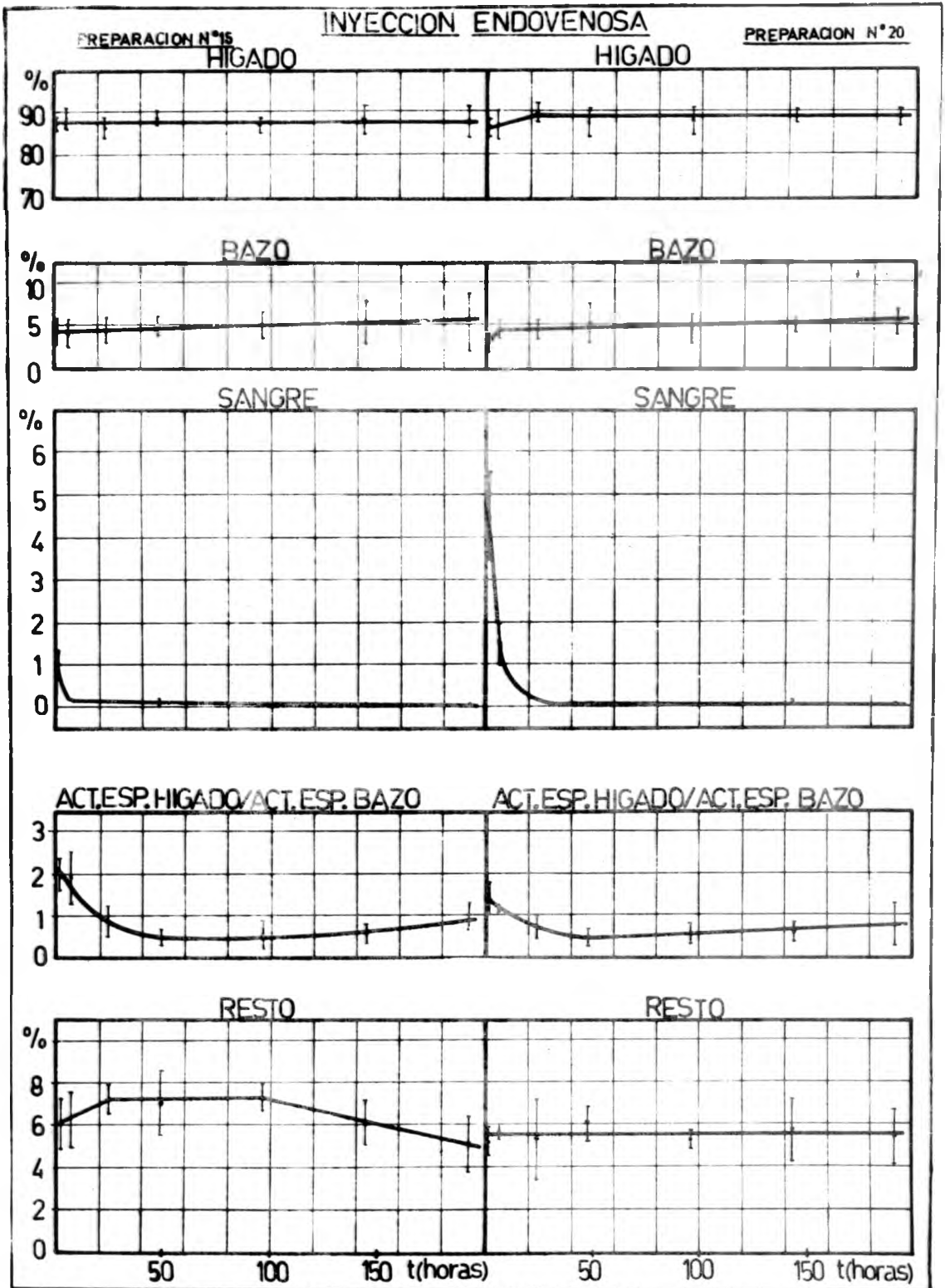


Fig. III-4.- Resultados más importantes obtenidos en el estudio del comportamiento biológico de los coloides números 15 y 20 de la Tabla II-1, administrados por vía endovenosa.-

Tabla III - 5 - Distribución biológica obtenida después de inyección intracavitaria del coloide número 2 de la Tabla II-1.

ORGANO	Por Ciento de Actividad ± σ al tiempo de:							
	1 Hr.	6 Hr.	1 d.	3 d.	6 d.	8 d.	3 a.	8 d.
PATA	57.21 ± 4.67	47.10 ± 3.92	39.40 ± 2.17	39.70 ± 4.38	41.24 ± 1.99	41.11 ± 3.02		
S.O.S.	5.00 ± 2.18	9.78 ± 2.64	10.32 ± 2.26	10.30 ± 2.45	10.01 ± 3.04	9.40 ± 5.88		
HIGADO	30.48 ± 3.01	38.73 ± 2.28	41.03 ± 2.69	40.33 ± 6.41	40.21 ± 4.19	40.65 ± 3.24		
BAZO	0.26 ± 0.07	0.50 ± 0.06	0.72 ± 0.09	0.60 ± 0.12	0.48 ± 0.12	0.48 ± 0.12		
RIÑONES	0.08 ± 0.019	0.10 ± 0.013	0.12 ± 0.026	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.014	0.14 ± 0.07		
PULMONES	0.07 ± 0.05	0.05 ± 0.011	0.02 ± 0.017	0.03 ± 0.017	0.01 ± 0.017	0.02 ± 0.03		
ESTERION	0.04 ± 0.017	0.07 ± 0.011	0.04 ± 0.022	0.03 ± 0.015	0.01 ± 0.018	0.01 ± 0.013		
RESTO	6.36 ± 0.79	6.57 ± 1.22	7.62 ± 0.66	7.20 ± 1.55	6.63 ± 1.46	7.17 ± 1.38		
Actividad Específica del Hígado / Actividad Específica del Bazo ± σ al tiempo de:								
1 Hr.	6 Hr.	1 d.	3 a.	6 d.	8 d.			
7.16 ± 0.57	4.81 ± 0.67	3.61 ± 0.35	3.99 ± 0.47	4.30 ± 0.86	3.91 ± 0.92			

Sistema Ganglionar Satélite.

Tabla III-6.- Distribución biológica obtenida después de inyección intracavitaria del coloides número 9 de la Tabla II-1.-

ORGANO	Por Ciento de actividad $\pm \sigma$ al tiempo de:							
	1 Hr.	6 Hr.	1 d.	4 d.	6 d.	8 d.	6 d.	8 d.
PATA	69.59 \pm 4.75	65.17 \pm 0.83	61.11 \pm 3.73	62.06 \pm 4.36	60.46 \pm 5.55	61.93 \pm 4.96		
S.G.S.*	0.87 \pm 0.76	9.67 \pm 2.26	18.59 \pm 7.24	16.04 \pm 4.48	13.03 \pm 4.60	8.83 \pm 1.99		
HIGADO	9.42 \pm 2.93	9.28 \pm 3.94	9.18 \pm 3.52	12.81 \pm 2.69	11.66 \pm 2.83	14.41 \pm 3.90		
BAZO	0.23 \pm 0.09	0.24 \pm 0.05	0.28 \pm 0.25	0.35 \pm 0.19	0.50 \pm 0.34	0.47 \pm 0.26		
RIÑONES	1.26 \pm 0.32	1.80 \pm 0.48	1.49 \pm 0.51	1.18 \pm 0.20	1.17 \pm 0.35	0.57 \pm 0.36		
PULMONES	0.015 \pm 0.03	0.00	0.04 \pm 0.03	0.06 \pm 0.05	0.07 \pm 0.06	0.13 \pm 0.13		
TESTICULOS	0.00	0.00	0.01 \pm 0.02	0.04 \pm 0.03	0.06 \pm 0.09	0.04 \pm 0.05		
RESTO	15.06 \pm 5.47	13.89 \pm 3.09	11.45 \pm 3.15	12.20 \pm 2.85	11.25 \pm 2.72	9.72 \pm 3.56		
Actividad Especifica del Hígado / Actividad Especifica del Bazo $\pm \sigma$ al tiempo de:								
1 Hr.	6 Hr.	1 d.	4 d.	6 d.	8 d.			
3.56 \pm 1.39	3.94 \pm 2.00	2.41 \pm 2.40	1.73 \pm 0.82	0.64 \pm 0.35	0.71 \pm 0.44			

* Sistema Ganglionar Satellite.

Tabla III-7.- Distribución biológica obtenida después de inyección intracavitaria del coloide número 15 de la Tabla II-1.-

ORGANO	Por Ciento de Actividad $\pm \sigma$ al tiempo de:							
	1 Hr.	6 Hr.	1 d.	2 d.	4 d.	6 d.	8 d.	
PATA	75.27 \pm 3.85	46.08 \pm 7.75	46.61 \pm 7.80	46.36 \pm 6.15	47.31 \pm 3.24	45.98 \pm 6.74	46.78 \pm 4.08	
S.G.S.	1.90 \pm 0.45	4.12 \pm 1.22	3.38 \pm 1.10	2.35 \pm 0.19	2.86 \pm 1.51	2.76 \pm 0.74	2.03 \pm 1.71	
HIGADO	17.34 \pm 3.02	41.83 \pm 7.16	42.16 \pm 6.65	42.18 \pm 5.01	41.55 \pm 3.16	41.56 \pm 4.40	41.97 \pm 5.47	
BAZO	0.71 \pm 0.30	1.74 \pm 0.78	1.50 \pm 0.49	1.31 \pm 0.22	1.75 \pm 0.14	1.17 \pm 0.44	0.81 \pm 0.36	
RIÑONES	0.25 \pm 0.05	0.32 \pm 0.05	0.34 \pm 0.07	0.18 \pm 0.03	0.24 \pm 0.03	0.17 \pm 0.03	0.09 \pm 0.02	
PULMONES	0.14 \pm 0.04	0.04 \pm 0.03	0.02 \pm 0.008	0.00	0.03 \pm 0.02	0.02 \pm 0.02	0.00	
ESTERON	0.04 \pm 0.01	0.02 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01	0.01 \pm 0.03	0.07 \pm 0.012	0.04 \pm 0.047	0.01 \pm 0.02	
RESTO	4.53 \pm 0.36	5.40 \pm 0.85	4.37 \pm 0.85	4.33 \pm 0.39	4.19 \pm 0.86	4.56 \pm 0.95	4.44 \pm 0.69	
Actividad Especifica del Hgado / Actividad Especifica del Bazo $\pm \sigma$ al tiempo de:								
1 Hr.	6 Hr.	1 d.	2 d.	4 d.	6 d.	8 d.		
2.12 \pm 0.83	2.21 \pm 0.55	1.75 \pm 0.60	1.65 \pm 0.46	0.77 \pm 0.15	0.79 \pm 0.18	1.92 \pm 0.63		

* Sistema Ganglionar Satélite.

Tabla III-8.- Distribución biológica obtenida después de la eyección intracavitaria del coelido número 20 de la Tabla II-1.

ORGANO	Porcentaje de Actividad $\pm \sigma$ al tiempo de:							
	1 Hr.	6 Hr.	1 d.	4 d.	6 d.	8 d.		
PANCREAS	75.02 \pm 6.60	75.35 \pm 2.55	75.92 \pm 1.82	76.46 \pm 4.38	74.32 \pm 2.32	76.36 \pm 4.18		
S.G.S.	0.53 \pm 0.60	0.85 \pm 0.90	0.41 \pm 0.09	0.69 \pm 0.90	1.35 \pm 1.30	1.73 \pm 2.70		
HIGADO	3.18 \pm 1.05	4.23 \pm 1.91	4.06 \pm 1.90	4.38 \pm 2.70	5.25 \pm 2.32	3.92 \pm 2.22		
BAZO	0.30 \pm 0.15	0.42 \pm 0.17	0.40 \pm 0.11	0.48 \pm 0.20	0.52 \pm 0.32	0.37 \pm 0.15		
RIÑONES	0.03 \pm 0.04	0.01 \pm 0.008	0.02 \pm 0.0013	0.04 \pm 0.04	0.04 \pm 0.033	0.05 \pm 0.048		
PULMONES	0.02 \pm 0.018	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.016	0.03 \pm 0.03	0.01 \pm 0.03	0.02 \pm 0.03		
ESTERNOON	0.01 \pm 0.006	0.01 \pm 0.009	0.01 \pm 0.006	0.01 \pm 0.008	0.01 \pm 0.008	0.00		
RESIDUO	14.26 \pm 3.60	14.90 \pm 3.72	14.74 \pm 6.86	15.84 \pm 4.81	16.70 \pm 4.07	16.72 \pm 9.10		
Actividad Especifica del Hígado / Actividad Especifica del Bazo $\pm \sigma$ al tiempo de:								
1 Hr.	6 Hr.	1 d.	4 d.	6 d.	8 d.			
0.87 \pm 0.33	0.75 \pm 0.21	0.78 \pm 0.34	0.80 \pm 0.49	0.84 \pm 0.19	0.50 \pm 0.24			

* Sistema Ganglionar Satélite.

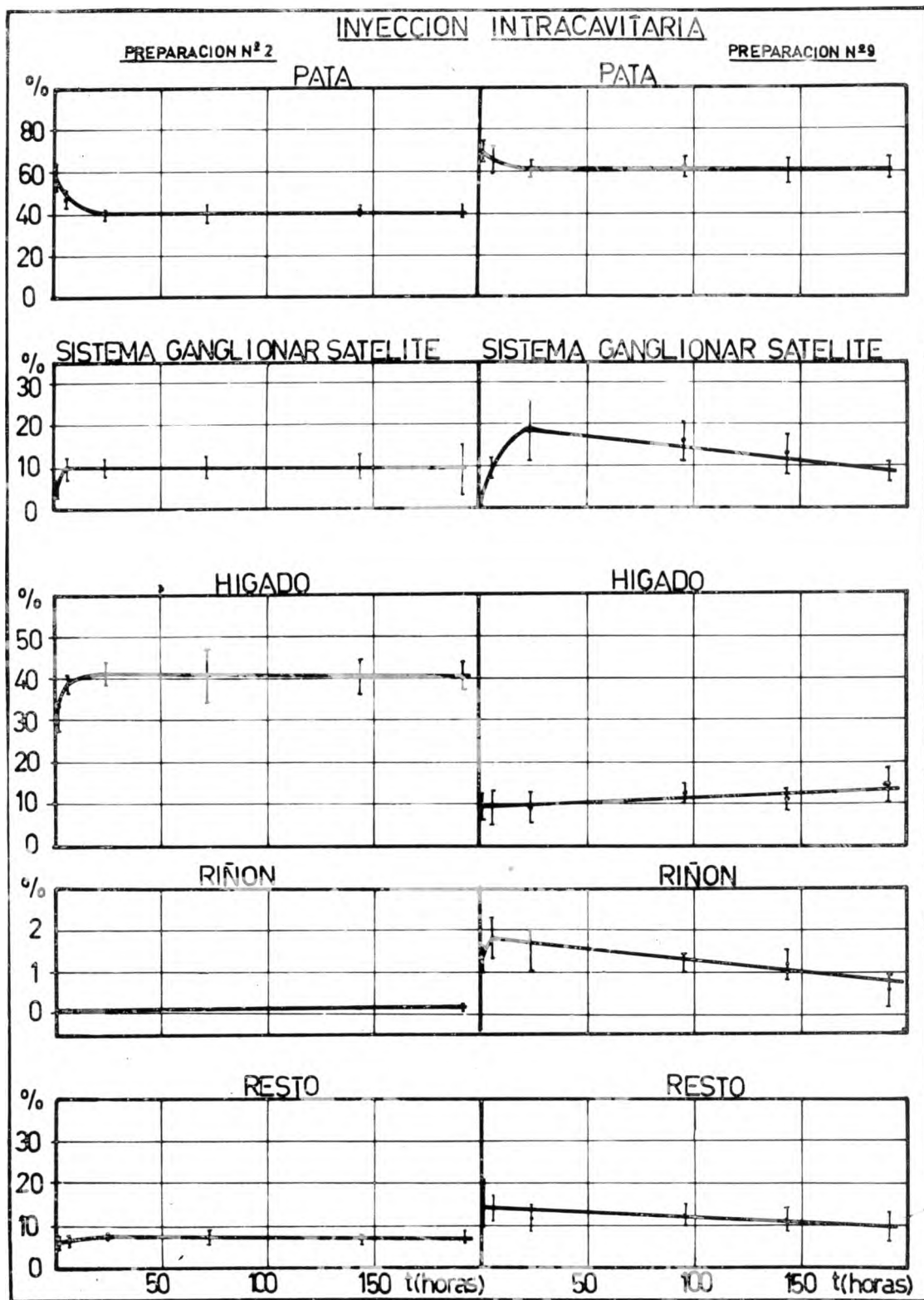


Fig. III-5.- Resultados más importantes obtenidos en el estudio del comportamiento biológico de los coloides números 2 y 9 de la Tabla II-1, administrados por vía intracavitaria.-

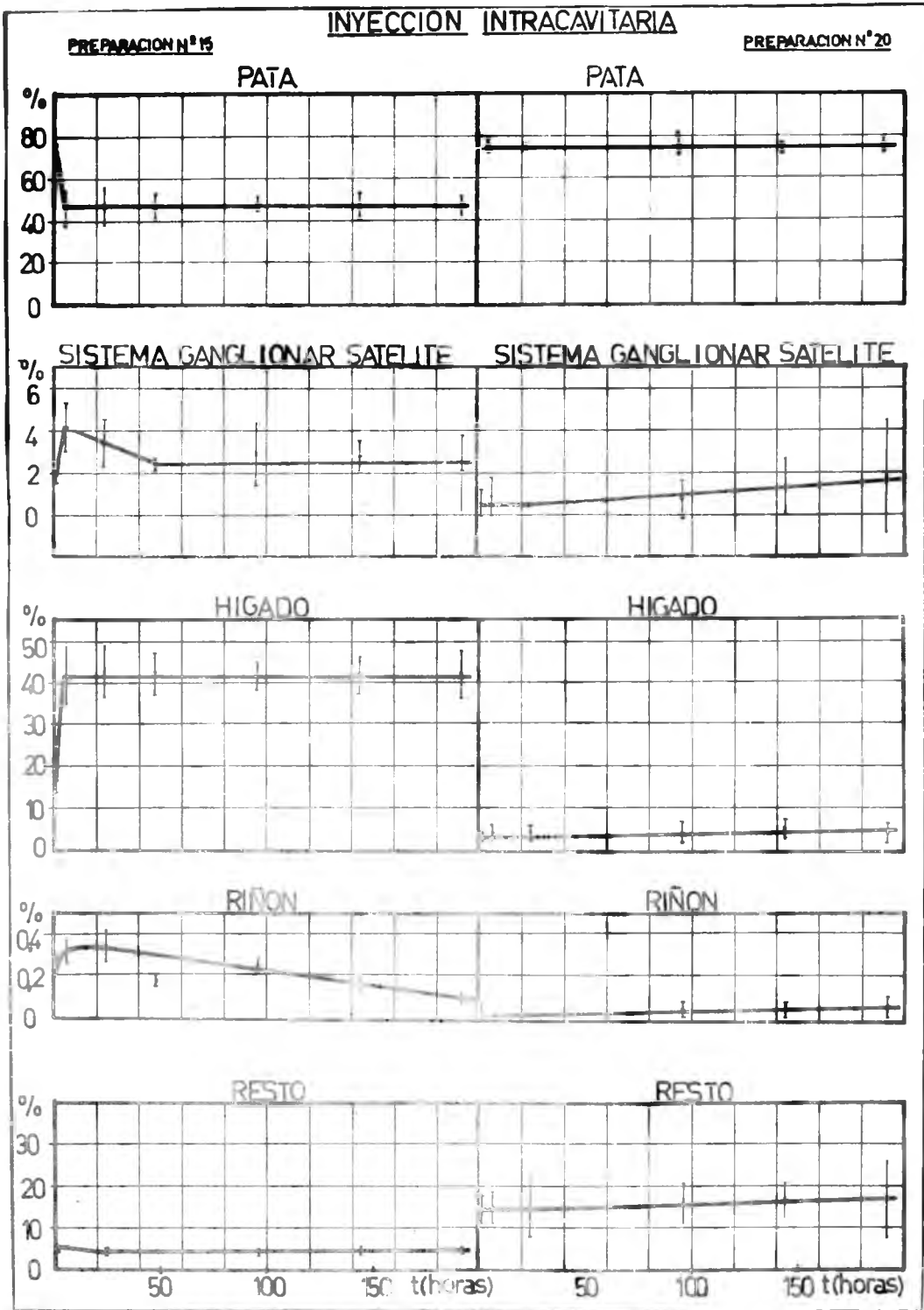


Fig. III-6.- Resultados más importantes obtenidos en el estudio del comportamiento biológico de los coloides números 15 y 20 de la Tabla II-1, administrados por vía intracavitaria.-

III-3-5.- Centellograffa.- (1)

Para evaluar el comportamiento de los radiocoloides en estudio, como agente diagnóstico en el ser humano, se encaró la realización de algunos ensayos centellográficos.

Para ello se contó con un centellógrafo marca "Nucleograph", de la firma Siemens, modelo 1965. El aparato posee un cristal de centelleo para radiaciones gamma, de INa (ITl) de 2" x 2" y un colimador de 7 orificios, cuya distancia focal es de 7 cm. Este sistema está conectado a un espectrómetro gamma monocanal y a un discriminador de intervalos. La inscripción se realiza por percusión.

Consideramos importante destacar la necesidad de utilizar la mínima actividad, compatible con la obtención de una imagen suficientemente contrastada del órgano total. La inyección de una actividad excesiva puede enmascarar eventuales zonas que no han captado la dispersión. En los casos de centellograffa hepática que presentamos y que fueron estudiados con el fin de evaluar la forma y la funcionalidad del hígado, en ciertos casos patológicos, la actividad inyectada fué siempre menor o igual a 70 μ Ci.

Además se estudiaron los ganglios de distintas cadenas linfáticas, mediante linfograffa indirecta.

Todas las observaciones fueron realizadas en niños cuya edad oscilaba entre los 2 y 9 años.

Caso 1.

En este paciente se compara la imagen centellográfica obtenida con un coloide crecido protegido con gelatina y la lograda con una dispersión del mismo tipo estabilizada con PVP, una vez que la actividad de la primera, se hizo practicamente despreciable.

Se estudió la presencia de una metástasis hepática de un carcinoma

(1) Agradecemos la colaboración y el asesoramiento prestados por el Doctor Eduardo Lanari (hijo), del Laboratorio Central de Radioisótopos del Hospital de Niños, en las observaciones centellográficas que se detallan en el presente capítulo.

renal, en un niño de 7 años. En las figuras III-7 y III-7-a, se reproducen las centellografías hepáticas obtenidas con un coloide de ^{198}Au protegido con gelatina y con PVP, respectivamente.

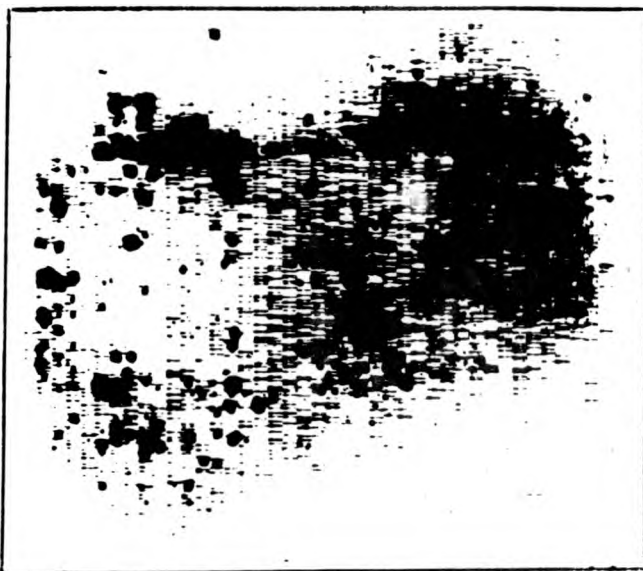


Fig. III-7.-

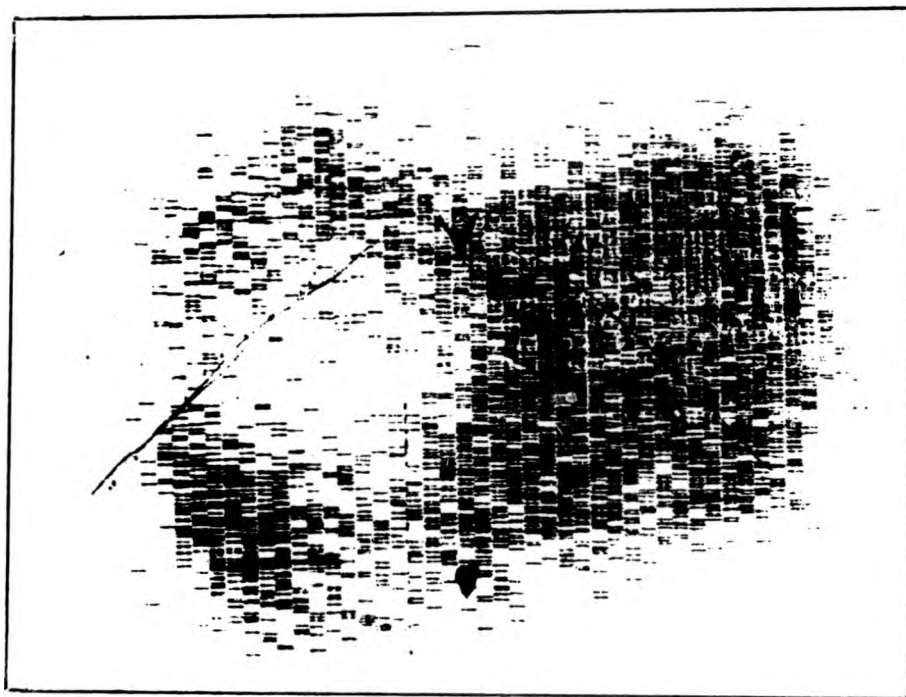


Fig. III-7-a.-

Actividad Inyectada: 70 μCi . Actividad máxima medida: 2.000 c/min.

Supresión de fondo: 300 c/min.

Se verifica la presencia de una metástasis única en el lóbulo hepático derecho. Dicha metástasis no era claramente diagnosticable con Rayos-X.

Caso 2.

Esta observación se efectuó en un niño de 8 años de edad, al cual se le había realizado previamente una hepatectomía parcial quirúrgica.

Los resultados obtenidos mediante la inyección de 70 μCi de un coloide de ^{198}Au crecido protegido con PVP, se muestran en la figura III-8.

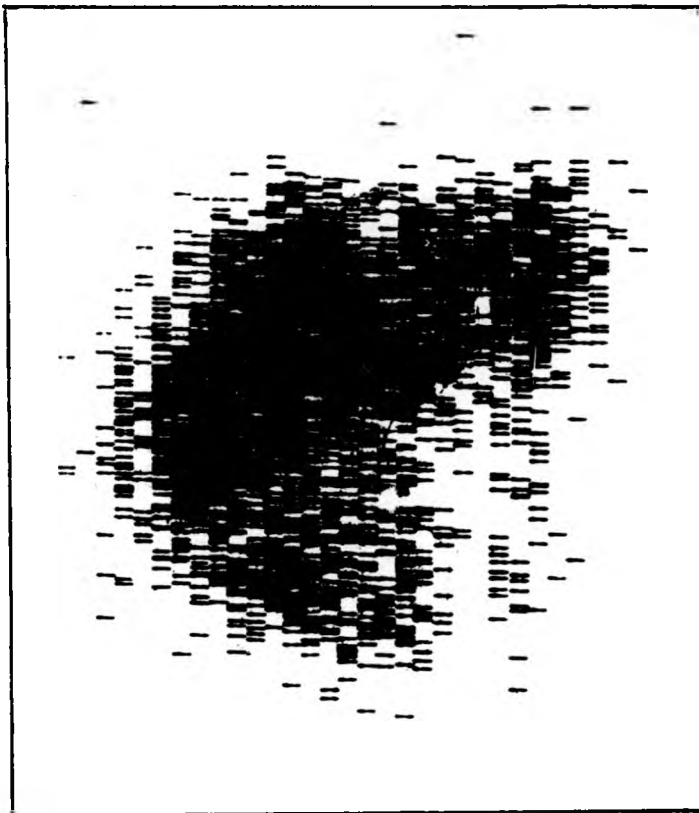


Fig. III-8.-

Actividad Inyectada: 70 μCi Actividad máxima medida: 3.000 c/min.
Supresión de fondo: 300 c/min.

Caso 3.

Esta observación fué realizada en un niño de 2 años de edad, inyectado con 70 μ Ci de un coloide de ^{198}Au crecido, protegido con PVP. El paciente presentaba hepatomegalia e hipertensión portal. Esta última, se diagnosticó por medio de la determinación de la diferencia entre la velocidad de circulación sanguínea entre el plexo hemorroidal superior y el hígado y, entre la primera región y el corazón, utilizando ^{131}I .

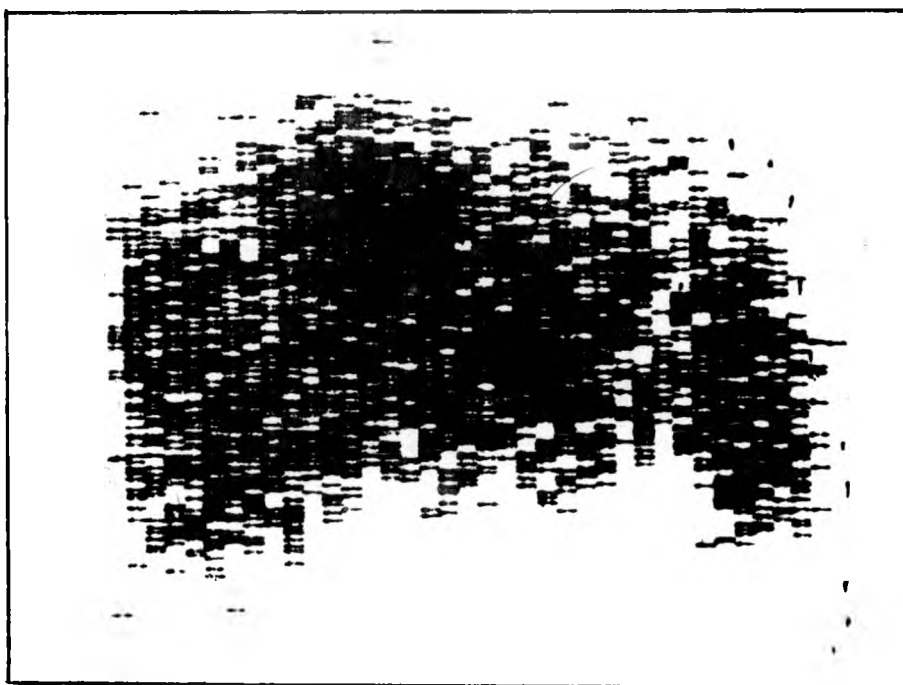


Fig. III-9.-

Actividad Inyectada: 70 μ Ci Actividad máxima medida: 2.000 c/min.
Supresión de fondo: 300 c/min.

Es de señalar que el hígado ocupa todo el ancho de la cavidad abdominal y que la imagen centellográfica de dicho órgano se presenta marcadamente difusa.

Todos estos signos indican una cirrosis hepática, la que fue confirmada posteriormente por biopsia.

Caso 4.

Con el fin de realizar una linfografía indirecta de los ganglios inguinocrurales, se inyectó 40 μ Ci de un coloide germen de ^{198}Au protegido con gelatina, en el espacio interdigital de ambos pies de un niño de 9 años de edad. El paciente presentaba una adenopatía en el pliegue inguinal derecho.

Las observaciones se realizaron a las 12 y 24 horas de inyectado el preparado, habiéndose reproducido los resultados logrados, en las figuras III-10 y III-10-a, respectivamente.

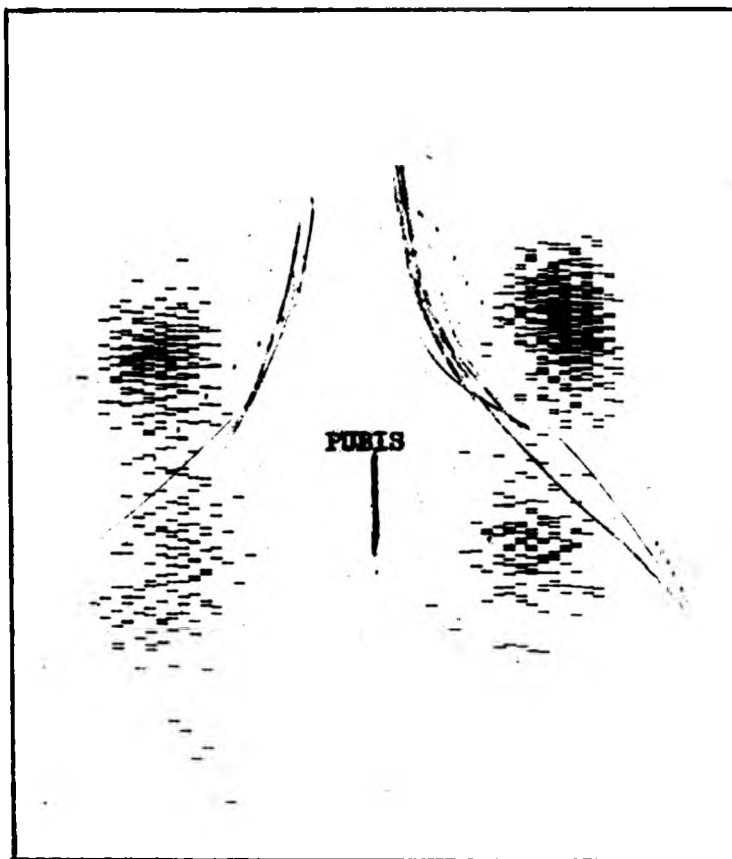


Fig. III-10-a-

Actividad Inyectada: 40 μ Ci en cada pie.
Actividad máxima medida : 12.000 c/min.
Supresión de fondo : 300 c/min.
Tiempo : 12 horas.

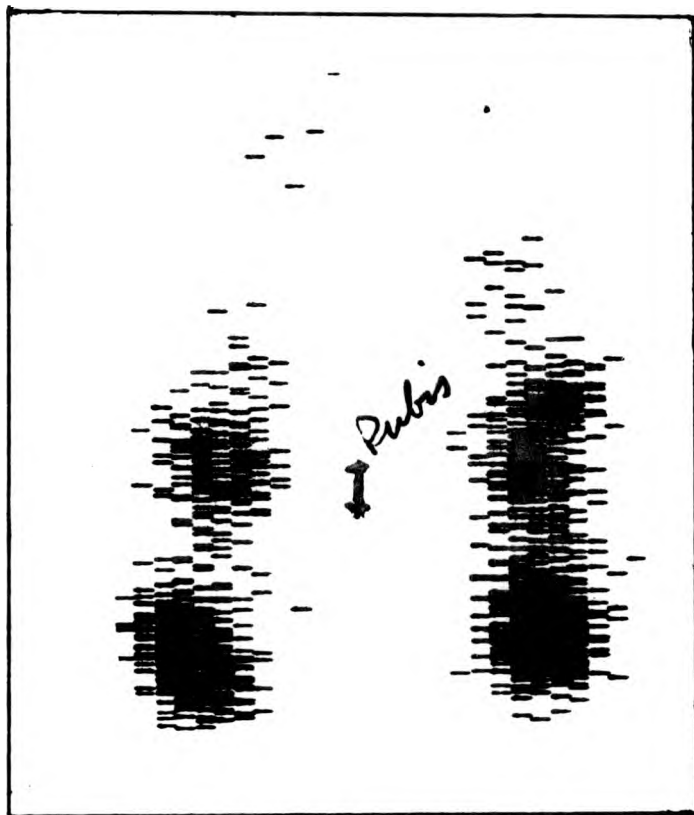


Fig. III-10-a.-

Actividad Inyectada: 40 μ Ci en cada pie.

Actividad máxima medida : 28.000 c/min.

Supresión de fondo : 300 c/min.

Tiempo : 24 horas.

Con la actividad administrada se logró una correcta visualización de los ganglios orurales e inguinales. No hubo acumulación hepática del coloide. En esta determinación se comparó la movilidad linfática en ambas extremidades inferiores. Dado que ambas eran semejantes, se pudo descartar la presencia de una infiltración del ganglio inguinal. Se comprobó la acumulación del radiocoloide en los ganglios precitados, en función del tiempo.

Caso 5.

Con fines terapéuticos, se administraron 5 mCi de ^{198}Au coloidal, de tipo germen, estabilizado con gelatina, en cada uno de los espacios

interdigitales de los pies de una niña de 7 años, que padecía de un neuroblastoma con metástasis en la cadena linfática lumboaórtica. Las observaciones se realizaron a las 48 y 72 horas de inyectado el producto; los resultados respectivos se encuentran en las figuras III-11 y III-11-a.

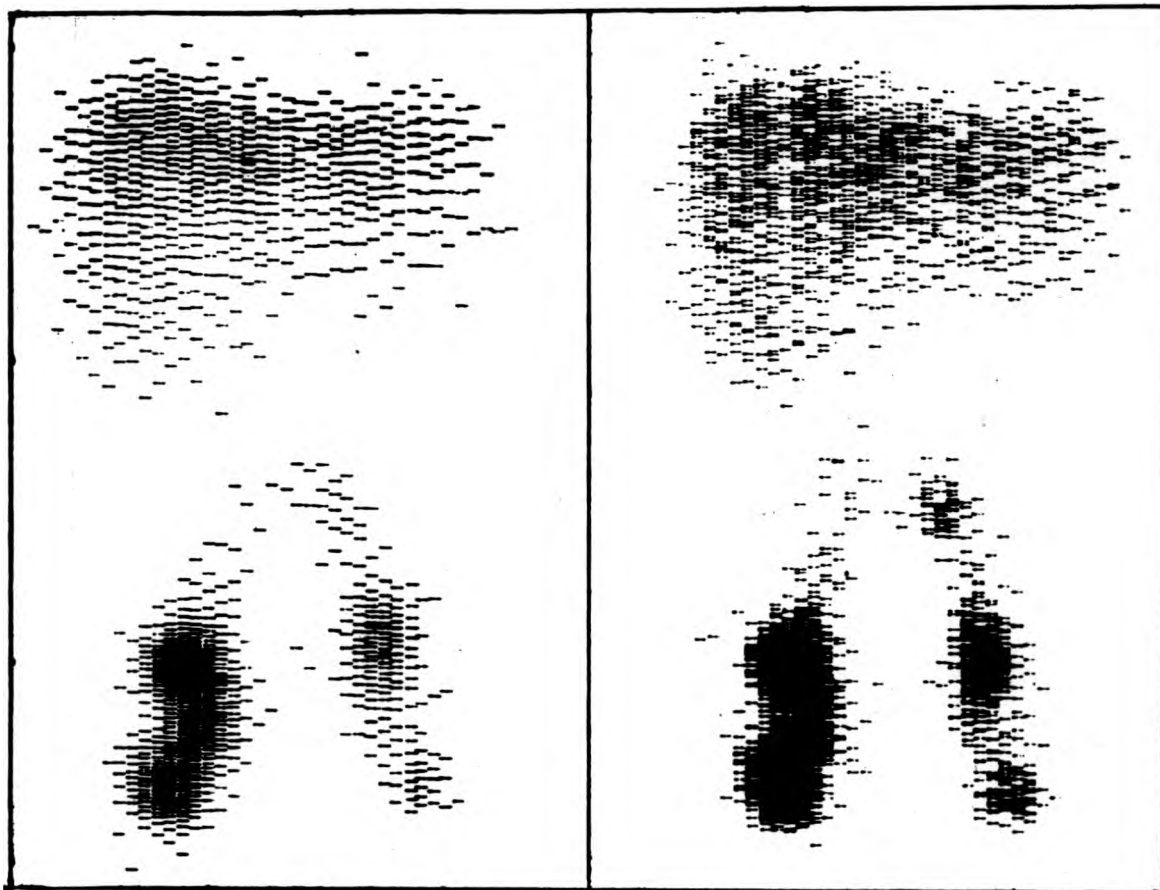


Fig. III-11.-

Tiempo: 48 horas.

Actividad Inyectada : 5 mCi en cada pie.

Actividad máxima medida en hígado : 2.800 c/min.

Actividad máxima medida en el ganglio inguinal : 13.000 c/min.

Supresión de fondo : 300 c/min.

Fig. III-11-a.-

Tiempo: 72 horas.

Se verificó la creciente acumulación del radiocoloide en los ganglios regionales, así como también su concentración simultánea en el hígado. La forma de este órgano es normal. Este detalle permitió verificar que la anatomía y fisiología del hígado probablemente no había sufrido alteración.

No se pudo detectar actividad en la zona lumboaórtica, por posible reemplazo del estroma ganglionar. Esto confirmó la presunción diagnóstica de metástasis en los ganglios mencionados.

Caso 6.

En este paciente, un niño de 7 años, se estudió la movilización linfática de un coloide de ^{198}Au german protegido con gelatina, cuando se lo inyecta en la zona tributaria de un sistema ganglionar afectado por la enfermedad de Hodgkin, cuyo diagnóstico había sido establecido por biopsia. La afección estaba localizada en el paquete ganglionar cervical y supraclavicular, del lado izquierdo.

Se inyectaron 40 μCi del preparado, en forma simétrica, debajo del cuero cabelludo de ambas regiones occipito-parietales.

Las observaciones centellográficas fueron realizadas a las 12 y 24 horas de administrado el producto; los resultados respectivos se encuentran en las figuras III-12 y III-12-a.

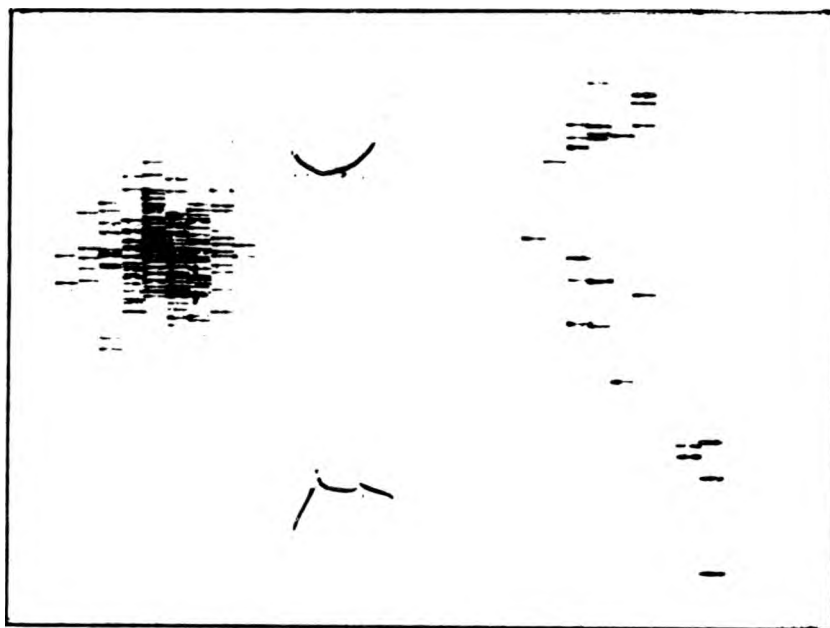


Fig. III-12.-

Tiempo : 12 horas.

Actividad Inyectada: 40 μCi en cada región tributaria.

Actividad máxima medida: 1.500 c/min.

Supresión de fondo : 200 c/min.

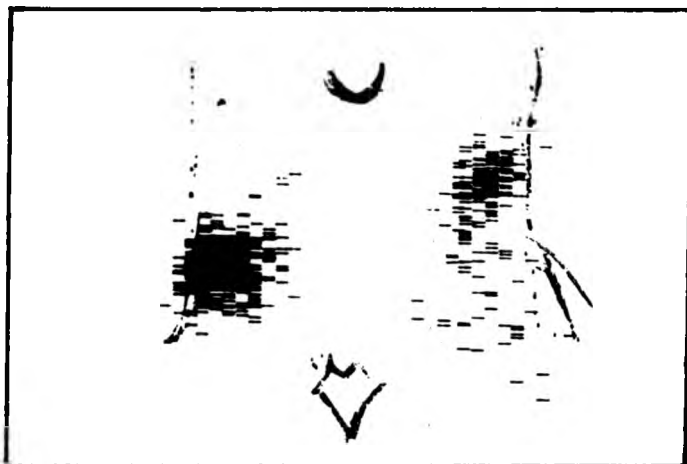


Fig. III-12-a.

Tiempo : 24 horas.

Actividad Inyectada: 40 μ Ci en cada región tributaria.

Actividad máxima medida : 1.500 c/min.

Supresión de fondo : 200 c/min.

Se comprobó la diferencia entre la estructura ganglionar derecha, que es normal y la izquierda, que está alterada por invasión neoplásica de dicho paquete ganglionar.

La alta actividad específica, así como la inocuidad, estabilidad y la constancia de las propiedades fisicoquímicas, especialmente el diámetro medio de las partículas, que puede ser prefijado en forma aproximada, permiten vislumbrar que los coloides de ^{198}Au pueden utilizarse en una amplia gama de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

Las observaciones centellográficas realizadas, demuestran la posibilidad de utilizar el coloide oroide, protegido con PVP, en el diagnóstico de afecciones hepáticas.

III-4.- DISCUSION.-

Antes de entrar en la discusión detallada de los resultados obtenidos, creemos conveniente referirnos en forma breve a algunos aspectos relacionados con las técnicas de medición empleadas en los estudios de distribución en animales.

Cuando se efectúa este tipo de determinaciones y con el fin de obte-

ner geometrías perfectamente comparables, es corriente proceder a una mineralización de los órganos en estudio, o por lo menos realizar una homogeneización de los mismos, antes de medir sus actividades.

Sin embargo, en el caso que nos ocupa, existen varios inconvenientes que hacen poco aconsejable este proceder. En primer lugar se requiere un tratamiento químico que puede tener cierto grado de complejidad y de riesgo. Existe además la posibilidad de que se formen depósitos de oro radiactivo en las paredes de los recipientes en los que se realizan las mineralizaciones. Dado que debe efectuarse la medición sobre partes alícuotas de los líquidos resultantes del tratamiento anterior, dichos depósitos no serán medidos, con lo que se falsearán los resultados.

Es necesario considerar también los probables errores cometidos en la determinación de volúmenes de los líquidos activos. Cuando se ha realizado la homogeneización de los órganos, estas medidas suelen ser dificultosas, dada la consistencia del material a manipular.

Teniendo en cuenta estos hechos, hemos resuelto aplicar la técnica descrita en el párrafo III-3-3, que consiste en la medición de los órganos enteros. La ventaja de este método radica en su gran simplicidad. Sin embargo debido a que las determinaciones de actividad se efectúan con fuentes de distinto volumen, las muestras deben ubicarse a una distancia de por lo menos 20 cm del cristal de centelleo, para disminuir las variaciones del ángulo cónico. Debe señalarse además que el volumen de los órganos estudiados es relativamente pequeño y la energía del fotón gamma emitido por el ^{198}Au es medianamente elevada.

Estas consideraciones nos hacen suponer que los errores que pudimos haber cometido, atribuibles a las pequeñas diferencias geométricas, son marcadamente inferiores a los que se hubieran originado con el empleo de otro tipo de métodos.

Cuando se midieron animales enteros, se mantuvo una distancia similar entre las fuentes y el cristal. Con la técnica elegida, de fácil realización, NICOLINI y col., 1966, (223) estudiando coloides marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, han podido determinar eliminaciones metabólicas significativas a partir de la diferencia entre el período de semidesintegración efectivo y el T físico de ese núclido. En este caso, la eliminación calculada a partir de las mediciones de los cuerpos enteros de los ratones, coincidió satisfactoriamente con la determinada a partir de las actividades de las heces y de la orina.

En nuestros experimentos, la igualdad del T físico y del período de semidesintegración efectivo, indica la ausencia de una tal eliminación. En algunas oportunidades, en que se lograron efectuar mediciones de la actividad urinaria, se comprobó que la misma alcanzaba como máximo a 0.1% de la actividad inyectada.

Puede decirse que, en general, hemos obtenido distribuciones biológicas de las dispersiones en estudio, que son compatibles con su naturaleza coloidal. En efecto, cuando los preparados se inyectan por vía endovenosa, se observa su localización preferencial en los órganos que poseen un elevado número de células reticuloendoteliales. Asimismo, se verifica una permanencia relativamente apreciable en el sitio de la inyección, cuando se los administra en cavidades del organismo.

Considerando aisladamente los coloides estabilizados con PVP, se puede observar que la diferencia más importante en su comportamiento biológico, cuando se los inyecta en la cavidad aponeurótica de la pata posterior, es la migración linfática y la localización renal netamente superiores del coloide germen, con respecto a las del crecido.

Resulta interesante comparar las propiedades biológicas de los coloides estudiados, teniendo en cuenta los diferentes agentes estabilizantes.

Puede observarse que las distribuciones obtenidas después de inyección endovenosa de los coloides crecidos, protegidos con gelatina o con PVP, son prácticamente idénticas. Lo mismo se comprueba luego de la administración endovenosa de uno u otro coloide germen. Es interesante destacar sobre todo la similitud en la localización en el hígado y en el bazo. Las relaciones entre las actividades específicas de estos dos órganos, son prácticamente iguales cuando se comparan ambos coloides crecido o ambos germenes. Consideramos que las pequeñas diferencias observadas en los órganos donde las actividades son mínimas, (riñones, pulmones y esternón), carecen de significado práctico.

Cuando los preparados se inoculan en la cavidad aponeurótica de la pata trasera de los ratones, se observan diferencias en sus distribuciones, que son aún más evidentes con ambos coloides crecidos. La acumulación hepática de ambas dispersiones protegidas con gelatina es elevada y semejante. A pesar de ésto, la localización en el sistema ganglionar satélite es superior en el caso del coloide germen. Esta diferencia, que

como ya señaláramos, también se ha observado en el caso de los soles estabilizados con PVP, podría atribuirse al pequeño diámetro medio de las partículas de tipo germen.

La movilización linfática de los coloides germen protegidos con gelatina, permite utilizarlos como agentes trazadores en linfografías indirectas. Esto ha sido comprobado en las observaciones centellográficas detalladas en el párrafo III-3-5 y estimamos que su uso podría resultar de importancia práctica. Debe destacarse que durante la preparación de estos coloides germen, no se produce ninguno de los inconvenientes señalados en el Capítulo II para el caso de los coloides crecidos estabilizados con gelatina, por lo que estimamos puede procederse a la utilización rutinaria de los coloides de ^{198}Au de tipo germen protegidos con esa sustancia.

La comparación de los resultados centellográficos obtenidos cuando uno u otro coloide crecido fue administrado por vía endovenosa, permite comprobar una gran coincidencia entre ambos centellogramas. Por esta razón, así como por la nitidez de las imágenes obtenidas con el coloide de ^{198}Au crecido protegido con PVP, se infiere que es posible utilizar este preparado como agente trazador en centellografías hepáticas. La semejanza en su comportamiento biológico con el de coloides del mismo tipo estabilizados con gelatina, cuando son administrados por vía endovenosa, así como su mayor facilidad y seguridad de preparación, permite predecir que estos preparados pueden reemplazar con ventaja a los coloides crecidos protegidos con aquella sustancia.

Por otra parte sería interesante encarar la posibilidad de utilizar el coloide crecido protegido con PVP, cuando se realicen aplicaciones intracavitarias de ^{198}Au . Su menor movilización linfática permite compararlo favorablemente, también en este sentido, con los coloides del mismo tipo estabilizados con gelatina. Es de señalar que las cantidades que hemos administrado por vía intracavitaria, no se inyectan habitualmente en seres humanos con fines diagnósticos. Sin embargo elegimos expresamente estas dosis elevadas, con el fin de diferenciar el comportamiento biológico de los preparados en estas condiciones.

CAPITULO IV

CINETICA DE LA DESAPARICION DE COLOIDES DE

ORO RADIOACTIVO DEL CAUDAL SANGUINEO

IV-1.- INTRODUCCION.-

Anteriormente se determinó la distribución biológica de coloides de ^{198}Au inyectados por vía endovenosa, demostrándose que estos preparados se localizan preferentemente en los órganos que poseen células reticulo-endoteliales, de los cuales el hígado es el que capta el coloide en mayor proporción.

En el presente capítulo se estudiará la rapidez con que los coloides radiactivos desaparecen del caudal sanguíneo, constituyendo dicho valor un índice de la velocidad con que estas dispersiones se fijan en la zona mencionada. Analizando el fenómeno desde el punto de vista cuantitativo, es posible obtener información sobre el flujo sanguíneo hepático, el estado funcional del sistema reticuloendotelial de dicho órgano, así como el mecanismo por el cual se realiza la captación hepática de la partícula coloidal, informaciones éstas que tienen sentido práctico, por cuanto se las requiere habitualmente en estudios de diagnóstico clínico.

IV-2.- ANTECEDENTES.-

METCHNIKOFF, 1884, (224), 1901, (225) demostró por primera vez que el fenómeno de la fagocitosis puede ser considerado como un proceso general por el cual ciertas células extraen del sistema circulatorio, partículas extrañas al organismo.

Corrientemente se clasifican esas células en polimorfonucleadas y mononucleadas. Entre las primeras se encuentran los neutrófilos, heterófilos y eosinófilos polimorfonucleados presentes en la sangre, la médula ósea y en ciertos tejidos. Entre los segundos cabe citar los monocitos de la sangre circulante, así como los macrófagos de los tejidos y de ciertos órganos como el hígado, bazo, nódulos linfáticos y médula ósea, donde se encuentran fijos y alineados en los bordes de los vasos sanguíneos y linfáticos. El conjunto de este tipo de células fué denominado

Sistema Reticuloendotelial (SRE) por ASCHOFF,1924,(226). A partir de entonces una serie considerable de estudios, principalmente efectuados "in vitro", demostraron la eficiencia del SRE como medio de defensa del organismo.

El SRE hepático está representado fundamentalmente por las células estrelladas de von Kupffer, (v. KUPFFER,1899,(227)), que se encuentran en los sinusoides del hígado. La captación de las partículas coloidales circulantes en el caudal sanguíneo, se realiza preponderantemente por estas células, debido a causas hemodinámicas y mecánicas. En el bazo, nódulos linfáticos y médula ósea, las células reticuloendoteliales bordean los senos de estos órganos. Se investiga la presencia de elementos del SRE en otras regiones del organismo, principalmente el pulmón, (COLLET y POLICARD,1962,(228)).

Desde el punto de vista ultraestructural, la actividad fagocitaria está asociada con los lisosomas; de DUVE y WATTIAUX,1966,(229) estudiaron la correlación funcional entre estos orgánulos y el fenómeno de la fagocitosis. Generalmente se considera que este proceso se realiza en dos etapas; en la primera la célula reticuloendotelial adsorbe la partícula en su superficie; en la segunda aquella es engolfada por el mecanismo de pinocitosis. Según de ROBERTIS y col.,1965,(230,pag.489) la primera etapa puede deberse a causas físicas, por ejemplo electrostáticas, o químicas, mientras que la segunda requiere un cierto trabajo celular. HIRSCH,1965,(231) ha logrado visualizar ambas etapas mediante microcinematografía. Cuando esto es posible, la partícula engolfada es digerida. Dado que los coloides de oro no se digieren, permaneciendo definitivamente en el interior de la célula, GORDON y col.,1965,(232) han marcado con estos preparados sustancias con el fin de seguir el proceso de su digestión. En este fenómeno intervienen activamente los lisosomas.

Si las partículas captadas son de naturaleza coloidal, algunos autores prefieren denominar al fenómeno coloidopexia o ultrafagocitosis.

Cuando una dispersión coloidal circula por el caudal sanguíneo, puede demostrarse que la velocidad con que desaparece del sistema circulatorio, es un índice de la rapidez con que es fagocitada por el hígado. Por lo tanto, la determinación de ese valor, constituye un método importante para estudiar el estado funcional del SRE hepático.

BULL,1915,(233) estudió por primera vez la velocidad con que desapa-

rece un material corpuscular del caudal sanguíneo, utilizando bacilo tifoideo. DRINKER y SHAW, 1921, (234) estudiaron el mismo parámetro empleando dióxido de manganeso. Estas determinaciones fueron efectuadas por primera vez con coloides radiactivos por Jones y col., (169).

Posteriormente, se comenzó a investigar la influencia del diámetro medio de las partículas inyectadas sobre la velocidad de captación.

Sheppard y col., (143) y SHEPPARD y col., 1951, (235) estudiaron este problema con coloides de ^{198}Au comprobando que no se puede verificar una influencia del tamaño de las partículas inyectadas sobre el tiempo que tardan en desaparecer de la sangre. Por lo contrario, DOBSON y col., 1949, (236) y Zilversmit y col., (172) observaron que el diámetro medio de las partículas coloidales que circulan por el caudal sanguíneo influye sobre la velocidad con que son fagocitadas. En fecha más reciente, SCHOENBERG y col., 1961, (237) demostraron que cuando se inyecta 10^6 a 10^7 partículas / Kg, de látex de poliestireno de tamaño uniforme y apreciablemente mayor que el de los coloides de ^{198}Au en estudio, su diámetro no influye sobre la velocidad de desaparición.

GABRIELI, 1951, (238) estudió la velocidad con que desaparecen del caudal sanguíneo de ratas, las partículas de oro coloidal radiactivo inyectadas en el mismo, llegando a la conclusión de que esta determinación constituye un índice de la función fagocitaria.

El primer modelo matemático que permitió explicar en forma clara las curvas de desaparición de la actividad sanguínea cuando se inyectan coloides radiactivos, fue elaborada por DOBSON y JONES, 1952, (239) para un coloide de fosfato de cromo- ^{32}P . Al mismo tiempo estos autores establecieron la forma y las condiciones en las cuales se puede determinar el flujo sanguíneo hepático a partir de la velocidad con que desaparece un coloide de la sangre. En este sentido es interesante mencionar que antes de la elaboración de esta técnica, el flujo sanguíneo hepático solamente podía determinarse con métodos como los elaborados por BRADLEY y col., 1945, (240) y MYERS, 1947, (241), los cuales implican la necesidad de canular las venas hepáticas.

Siguiendo a Dobson y Jones (239), supongamos que un material se mezcla perfectamente con la sangre sin fijarse a ninguno de sus elementos; que siempre la misma fracción del volumen sanguíneo total irriga cierto órgano, por ejemplo el hígado, captando éste una determinada porción constante del material coloidal. Luego su velocidad de desaparición de

la sangre será proporcional a la cantidad de coloide presente, en la misma, en cada instante.

Matemáticamente ésto corresponde a una ecuación del tipo:

$$- \frac{dc}{dt} = k \cdot c \quad \text{IV-1}$$

donde c es la concentración del coloide, t , el tiempo y k , una constante de proporcionalidad que suele llamarse constante de desaparición. Esta ecuación es similar a la que caracteriza una reacción de primer orden. Transponiendo en la ecuación IV-1, tendremos:

$$- \frac{dc}{c} = k \cdot dt \quad \text{IV-2}$$

Esta ecuación puede integrarse entre los límites t_0 y t y entre c_0 y c_t . El resultado obtenido será el siguiente:

$$- (\ln c_t - \ln c_0) = k \cdot t \quad \text{IV-3}$$

que puede ser escrita igualmente como:

$$\ln c_t = -k \cdot t + \ln c_0 \quad \text{IV-4}$$

Si representamos el logaritmo natural de la concentración en función del tiempo, obtendremos una recta de pendiente negativa, cuyo valor será igual a k , siendo su ordenada en el origen igual a c_0 . Generalmente se expresa este tipo de ecuación en la forma exponencial, con lo que resulta:

$$c_t = c_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{IV-5}$$

donde k es la constante de desaparición.

Suponiendo que el órgano en estudio, en este caso el hígado, puede captar todo el material coloidal que pasa por él, k nos da una medida de la fracción de volumen sanguíneo que irriga el órgano en un instante. Conociendo el volumen sanguíneo total, determinado experimentalmente por medio del colorante T-1824 o empleando seroalbúmina humana marcada con 132-I, como fué sugerido por KELLERSOHN, 1960, (242), el flujo sanguíneo

hepático, (F.H.) será igual a:

$$F.H. = k \cdot V.S. \quad IV-6$$

donde F.H. es el flujo sanguíneo hepático, expresado en litros / minuto, k es la constante de desaparición, expresada en min^{-1} y V.S. es el volumen sanguíneo total, expresado en litros.

El valor de k puede determinarse fácilmente a partir del período de semidesaparición, $T_{1/2}$, que se define como el tiempo necesario para que la actividad sanguínea disminuya a la mitad. A partir de la ecuación IV-3 se puede deducir que:

$$T_{1/2} = \frac{0.693}{k} \quad IV-7$$

Si el órgano en estudio no capta todas las partículas coloidales presentes, debe introducirse un factor de eficiencia, que se define como:

$$\eta = \frac{k}{K} \quad IV-8$$

donde k es la constante de desaparición determinada a partir del $T_{1/2}$ y K es la fracción del volumen sanguíneo total que irriga el órgano. Este último valor debe utilizarse para calcular el flujo sanguíneo. BENHAMOU y col., 1957, (243) han determinado en el hígado de conejo aislado, una eficiencia de aproximadamente 71%, para un pasaje del coloide. Cuando se desconoce el valor de η , se puede calcular el flujo mínimo que atraviesa el órgano, utilizando la constante de desaparición, k, obtenida a partir del $T_{1/2}$.

Este método ha sido aplicado en seres humanos por DOBSON y col., 1953, (244) y a partir de entonces se lo utiliza corrientemente en determinaciones clínicas. En la práctica se aceptan como $T_{1/2}$ normales para coloides de ^{198}Au , los valores comprendidos entre 1 y 4 minutos. Si el volumen sanguíneo no está alterado, y el $T_{1/2}$ supera los 4 minutos, puede suponerse que existen alteraciones en la circulación o función hepática. Mediante este procedimiento se ha logrado diagnosticar diversos casos de cirrosis. VETTER y col., 1954, (245) y KROOK, 1956, (246) han estudiado la aplicación de este método en clínica humana.

Sin embargo es necesario aclarar que los datos obtenidos no proveen

un diagnóstico univalente. STROUN y col.,1964,(247) han analizado este problema, llegando a la conclusión de que el método es de indudable valor práctico, pero que se lo debe correlacionar con los datos provistos por el laboratorio. Por otra parte SALKY y col.,1965,(248) han observado que se producen alteraciones en la función fagocitaria, en individuos con enfermedades inmunitarias. Un efecto semejante ha sido determinado por GROCH y col.,1965,(249) en casos de leucemia aguda.

SAGE y col.,1964,(250) han utilizado un método similar para determinar el flujo linfático en las extremidades de seres humanos, inyectando coloides de ^{198}Au con partículas muy pequeñas.

HOLLENBERG y DOUGHERTY,1966,(251) determinaron los flujos sanguíneos de la arteria hepática y de la vena porta, en perros, mediante una solución salina de ^{85}Kr . GRÄNGSJÖ y col.,1966,(252) han logrado establecer el flujo sanguíneo en zonas muy pequeñas, midiendo la actividad remanente de hematíes marcados con ^{32}P , mediante semiconductores que detectaban la radiactividad en lugares apropiados, donde fueron insertados.

TURCO y col.,1966,(253) han investigado la cinética de la captación del Rosa de Bengala. Como fué señalado en el Capítulo III, esta sustancia no se fija permanentemente en el hígado, eliminándose por vía biliar y duodenal. Los cálculos cinéticos fueron realizados mediante análisis compartamental, empleándose una computadora digital. En este sentido conviene recordar que el Rosa de Bengala se localiza en las células parenquimatosas del hígado.

DOBSON y col.,1966,(254) han revisado diversos problemas fisicoquímicos y biológicos relacionados con la determinación del flujo sanguíneo hepático mediante radiocoloides, especialmente fosfato de cromo- ^{32}P .

BIOZZI y col.,1953,(255) estudiaron igualmente la velocidad de desaparición de coloides del sistema circulatorio. Utilizaron generalmente carbón coloidal como material de experimentación y han propuesto un tratamiento matemático, que difiere del formulado por Dobson y Jones.

Biozzi y col. definen la constante de desaparición K como:

$$K = \frac{\log c_1 - \log c_2}{t_2 - t_1} \quad \text{IV-9}$$

Por otra parte se puede definir una nueva constante, simbolizada

con α , que es igual a:

$$\sqrt[3]{K} \cdot \frac{P_a}{P_o} = \alpha \quad \text{IV-10}$$

La constante α , tiene distintos valores según la especie animal considerada. En la fórmula IV-10, P_a es la masa del animal y P_o es la suma de las masas del hígado y del bazo. Para las cantidades relativamente elevadas de carbón coloidal que fueron utilizadas en estas experiencias, los autores propusieron la siguiente ecuación cinética:

$$- \frac{dc}{dt} = K \cdot \frac{c}{c_o} \quad \text{IV-11}$$

BENACERRAF y col., 1955, (256) han propuesto el empleo de microagregados de albúmina humana marcados con ^{131}I , como material de estudio. Esta sustancia tiene la característica interesante de ser metabolizada por las células de Kupffer. BIOZZI, 1965, (257) y PALMER y col., 1966, (258) han estudiado este proceso, siguiendo el destino ulterior del ^{131}I .

Para estudiar la desaparición de los coloides del sistema circulatorio, se puede recurrir a diversas técnicas. Primeramente se utilizó un procedimiento en el cual se extraen muestras de sangre a distintos tiempos. La concentración del coloide se verifica a partir de mediciones de las actividades de volúmenes iguales de sangre. Si se utiliza carbón coloidal, se la puede determinar midiendo las absorbancias a 750 μ . Cuando se emplea esta técnica, es muy difícil analizar las actividades sanguíneas, a pesar de lo cual ha permitido establecer algunos hechos importantes.

En estos trabajos se observó generalmente un aumento de los $T_{1/2}$, cuando se incrementan las dosis de los coloides inyectados.

Las curvas de desaparición suelen presentar una parte final cuyo $T_{1/2}$ es mucho más elevado que el de la inicial. La actividad correspondiente a esa porción es más o menos elevada, según el material coloidal empleado. En el caso de los coloides de ^{198}Au , SICOT y col., 1966, (259) han demostrado que la componente lenta se debe al ^{198}Au iónico presente en el coloide. Para determinar el $T_{1/2}$ correspondiente al compartimiento hepático es necesario sustraer la componente final a la curva to-

tal. En algunos casos puede observarse una porción inicial breve y de $T_{1/2}$ sumamente pequeño, admitiéndose generalmente que esta componente de la curva se debe a la mezcla de la sustancia activa en el volumen sanguíneo total, fenómeno conocido con el nombre de "mixing".

MEREDITH, 1961, (260) analizó el problema del aumento de los $T_{1/2}$ con dosis crecientes de coloides de $^{198}\text{-Au}$, en forma más completa, planteando la posibilidad de utilizar un tratamiento matemático similar al propuesto por MICHAELIS y MENTEN, 1913, (261) para las reacciones enzimáticas. Este criterio será analizado con más detalle en el párrafo IV-3-2. La técnica experimental utilizada por Meredith consistía esencialmente en determinar la concentración del coloide de $^{198}\text{-Au}$ en la sangre en función del tiempo, midiendo la actividad en la cabeza del animal en forma continua, por integración y registro automático. Esta técnica se basa en la suposición de que el coloide no se fija en el sistema nervioso central, o sea de que toda la actividad medida a nivel de la cabeza del animal corresponde a la actividad sanguínea. Se puede determinar al mismo tiempo la curva de captación hepática, colocando otro centelleador en la zona del hígado, midiendo la actividad de la misma por integración y registro automático.

Utilizando un tratamiento matemático similar pero simplificado, IIO y WAGNER, 1963, (262) estudiaron la función fagocitaria en el hombre, empleando microagregados de albúmina humana marcados con $^{131}\text{-I}$. Asimismo WAGNER y col., 1963, (263) investigaron la influencia de diversos estados infecciosos sobre aquella función. CASTRO-FIORE, 1964, (264) estudió el problema, empleando microagregados de albúmina marcados con $^{131}\text{-I}$ y la técnica experimental propuesta por Meredith (260).

Cohen y col., (178) propusieron otra técnica de medición continua de la actividad sanguínea, que consiste en efectuar una derivación carotídeo - carotidiana, con lo que se obtiene una circulación extracorporeal. De esta manera se puede medir la radioactividad de la sangre con un cristal de pozo, por integración y registro automático, lográndose una mejor eficiencia.

En nuestro país, LOTTI, 1964, (265) estudió el flujo hepático en seres humanos, empleando coloides de $^{198}\text{-Au}$ como agentes trazadores.

IV-3.- PARTE EXPERIMENTAL.-

Como resulta evidente de lo expuesto, el estudio de la influencia de la dosis y del diámetro medio de las partículas inyectadas sobre el período de semidesaparición de la sangre de los coloides de ^{198}Au , ofrece interés teórico y práctico. Además, se observa que los resultados obtenidos, presentan ciertas contradicciones.

En este capítulo hemos abordado el tema desde el punto de vista fisicoquímico y biológico. Para ello hemos analizado primeramente los resultados logrados por otros autores, estableciendo luego un modelo, que, creemos, permite explicar las diferencias observadas en los trabajos citados, así como algunos aspectos de la función del sistema reticuloendotelial. Asimismo hemos verificado experimentalmente el modelo propuesto.

IV-3-1.- Fundamento teórico.-

Partiendo del trabajo de Dobson y Jones (239), en el cual se supone que la velocidad de desaparición de los coloides administrados por vía endovenosa es proporcional a la concentración de los mismos en cada instante, puede demostrarse que la concentración inicial del coloide de oro en la sangre no debe influir sobre el $T_{1/2}$ observado. En este sentido conviene recordar que este valor es igual a $0.693 / k$ y por ende independiente de c_0 . Esta es precisamente una de las propiedades fundamentales de una reacción de primer orden.

Sin embargo, existen varios autores, citados en el párrafo anterior, que han comprobado un aumento del $T_{1/2}$ con dosis crecientes de coloide. Este fenómeno también ha sido verificado por nosotros.

Creemos que una aproximación válida al problema, es el replanteo de la ecuación IV-1; en lugar de expresar las cantidades del coloide en mg de oro, las hemos indicado en número de partículas.

Para llevar este valor a concentraciones sanguíneas o a algún parámetro proporcional, es necesario considerar que las experiencias se han realizado sobre distintos animales, de diferente volumen sanguíneo. La relación entre este valor y la masa del animal es constante, en una especie dada. Por lo tanto, consideramos posible expresar la concentración del coloide en número de partículas / Kg de animal. De esta manera la ecuación se escribe como:

$$-\frac{d N_p}{d t} = k \cdot N_p \quad \text{IV-12}$$

La integración en la forma usual, nos lleva a la ecuación:

$$N_p = N_{op} \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{IV-13}$$

En estas ecuaciones N_p representa el número de partículas por Kg al tiempo t , N_{op} es el número de partículas / Kg iniciales, y k es la constante de desaparición definida anteriormente, cuyo valor evidentemente no cambia.

Puede demostrarse que si la desaparición de coloides del caudal sanguíneo estuviese regida por la ecuación IV-13, sería de esperar que el $T_{1/2}$ fuese independiente del número de partículas inyectadas, es decir de la cantidad de coloide e igualmente del diámetro medio de sus partículas.

Esta independencia no puede comprobarse experimentalmente en todos los casos, lo que permite suponer que el fenómeno en estudio responde a una cinética de primer orden con respecto al número de partículas inyectadas, solamente cuando este valor es bajo. Si el mismo aumenta, se tendería a una reacción de orden cero, en la que existe una influencia del diámetro medio de las partículas inyectadas, sobre el $T_{1/2}$. Otra posibilidad es que el proceso responda a una cinética de orden fraccionario, como fué propuesto por PARKER y FINNEY, 1960, (266).

De cualquier modo es evidente que una explicación cinética de la desaparición de coloides radiactivos del caudal sanguíneo no responde a un esquema sencillo. Estimamos que la aplicación de un tratamiento matemático similar al propuesto por Michaelis y Menten para las reacciones enzimáticas puede constituir una solución valedera. Este modelo ya fue aplicado por Meredith (260) y en forma algo diferente por Iio y Wagner (262). Sin embargo en esos trabajos, se expresan las concentraciones de los coloides en mg / Kg, con lo cual se restringe el tratamiento a dispersiones de propiedades fisicoquímicas características y constantes. En nuestro caso, al expresar la dosis del coloide en número de partículas / Kg de animal, es posible aplicar el modelo a coloides de $^{198}\text{-Au}$, con diferente tamaño de partículas.

En el razonamiento que sigue, (Au) representa la concentración de oro coloidal libre y (SRE) la concentración total de células reticuloendoteliales. Cuando dichas células captan una partícula coloidal, ésta es adsorbida sobre la superficie celular, lo que puede asimilarse a la formación del complejo enzima - sustrato. La concentración de este "complejo", se simbolizará con (Au-SRE); su existencia ha sido demostrada mediante microscopía electrónica por PARKS y CHIQUOINE, 1957, (267), e indirectamente por SICOT y col., 1963, (268). Posteriormente la partícula de oro es engolfada; este último fenómeno se conoce también con el nombre de micropinocitosis. La concentración de oro en el interior de la célula se simboliza con (Au-C).

La ecuación que representa el fenómeno puede esquematizarse así:



Las barras significan que el complejo intermedio es inestable.

De acuerdo con BRIGGS y HALDANE, 1925, (269), la velocidad de formación del complejo Au-SRE es la siguiente:

$$\frac{d(\text{Au-SRE})}{dt} = k_1 \left[(\text{SRE}) - (\text{Au-SRE}) \right] (\text{Au}) - k_2 (\text{Au-SRE}) - k_3 (\text{Au-SRE}) \quad \text{IV-15}$$

o sea:

$$\frac{d(\text{Au-SRE})}{dt} = k_1 \left[(\text{SRE}) - (\text{Au-SRE}) \right] (\text{Au}) - \left[(\text{Au-SRE}) \cdot (k_2 + k_3) \right] \quad \text{IV-16}$$

Cuando el oro coloidal adsorbido sobre la célula reticuloendotelial llega a un máximo, $d(\text{Au-SRE}) / dt$ será igual a cero. Por lo tanto:

$$\begin{aligned} (\text{Au-SRE}) \cdot (k_2 + k_3) &= k_1 \left[(\text{SRE}) - (\text{Au-SRE}) \right] (\text{Au}) = \\ &= k_1 \left[(\text{SRE}) \cdot (\text{Au}) - (\text{Au-SRE}) \cdot (\text{Au}) \right] \quad \text{IV-17} \end{aligned}$$

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{(\text{SRE}) \cdot (\text{Au}) - (\text{Au-SRE}) \cdot (\text{Au})}{(\text{Au-SRE})} =$$

$$= \frac{(SRE) \cdot (Au)}{(Au-SRE)} - (Au)$$

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} + (Au) = \frac{(SRE) \cdot (Au)}{(Au-SRE)}$$

$$(Au-SRE) = \frac{(SRE) \cdot (Au)}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + (Au)} \quad \text{IV-18}$$

Por otra parte, es posible demostrar por consideraciones cinéticas clásicas, que:

$$\frac{d(Au)}{dt} = - \frac{d(Au-SRE)}{dt} - \frac{d(Au-C)}{dt} \quad \text{IV-19}$$

Nuevamente, cuando $d(Au-SRE) / dt$ es igual a cero, es decir cuando la reacción se encuentra en estado estacionario, se puede escribir:

$$\frac{d(Au)}{dt} = - \frac{d(Au-C)}{dt} \quad \text{IV-20}$$

o sea

$$- \frac{d(Au)}{dt} = \frac{d(Au-C)}{dt} = k_3 \cdot (Au-SRE) \quad \text{IV-21}$$

Combinando esta ecuación con la fórmula IV-18, puede demostrarse que la velocidad de desaparición del oro coloidal radiactivo de la sangre es igual a:

$$v = - \frac{d(Au)}{dt} = k_3 \cdot (Au-SRE) = \frac{k_3 \cdot (SRE) \cdot (Au)}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + (Au)} \quad \text{IV-22}$$

Quando todas las células reticuloendoteliales han adsorbido partículas de oro coloidal, la velocidad de desaparición será máxima, siendo la concentración del complejo (Au-SRE) igual a la de las células reticuloendoteliales totales (SRE). Por lo tanto, la velocidad máxima de des-

aparición, simbolizada con V_m , es igual a:

$$V_m = k_3 \cdot (\text{Au-SRE}) = k_3 \cdot (\text{SRE}) \quad \text{IV-23}$$

Sustituyendo este valor en la ecuación IV-22, puede escribirse que la velocidad de desaparición del coloide de la sangre en cualquier instante, v , es igual a:

$$v = \frac{V_m \cdot (\text{Au})}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + (\text{Au})} \quad \text{IV-24}$$

En cinética enzimática se reemplaza generalmente el valor de $(k_2 + k_3) / k_1$ por una única constante, conocida con el nombre de constante del sustrato, simbolizada con K_m . Por lo tanto escribiremos la ecuación IV-24 como:

$$v = \frac{V_m \cdot (\text{Au})}{K_m + (\text{Au})} \quad \text{IV-25}$$

Una vez analizado el fenómeno hasta este punto, es necesario encontrar una forma práctica para expresar los datos experimentales y adaptarlos al modelo descripto. Sabemos que la velocidad de desaparición del coloide de la sangre puede escribirse como:

$$v = - \frac{d(\text{Au})}{dt} = k \cdot (\text{Au}) \quad \text{IV-26}$$

donde k es la constante de desaparición.

En nuestro caso, expresamos la concentración del coloide en número de partículas / Kg. Por lo tanto:

$$v = - \frac{dN_p}{dt} = k \cdot N_p \quad \text{IV-27}$$

Para calcular el número de partículas presentes en cualquier instante, dt , puede utilizarse la ecuación IV-13. Por lo tanto, la velocidad de desaparición, v , es igual a:

$$v = - \frac{dN_p}{dt} = k \cdot N_{op} \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{IV-28}$$

Puede considerarse que un minuto después de la inyección del coloide, ya se produjo el "mixing" y que la reacción está por lo tanto en estado estacionario. Si, como ya hemos señalado, expresamos la concentración del oro coloidal libre, (Au), con N_{op} , la ecuación IV-25 puede escribirse como:

$$v = k \cdot N_{op} \cdot e^{-k \cdot t} = \frac{V_m \cdot (N_{op})}{K_m + (N_{op})} \quad \text{IV-29}$$

En esta ecuación, K_m representa, como anteriormente a $(k_2 + k_3) / k_1$. Para aplicar este tratamiento, conviene destacar que el valor de k , debe calcularse a partir del $T_{1/2}$ correspondiente al compartimiento hepático, obtenido por sustracción de la componente lenta a la curva total. En este caso, puede considerarse que la velocidad de desaparición calculada, corresponde a la velocidad de captación hepática.

Para utilizar la ecuación IV-29 en forma más práctica, conviene invertirla, siguiendo el procedimiento propuesto por LINEWEAVER y BURK, 1934,(270). Puede demostrarse que la inversa de la velocidad de desaparición del coloide de la sangre es igual a:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k \cdot N_{op} \cdot e^{-k \cdot t}} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{N_{op}} + \frac{1}{V_m} \quad \text{IV-30}$$

Por lo tanto, si representamos $1 / k \cdot N_{op} \cdot e^{-k \cdot t}$ en función de $1/N_{op}$, obtendremos una recta, si la reacción sigue el modelo que proponemos. La ordenada en el origen de esta recta será igual a $1 / V_m$ y su pendiente será igual a K_m / V_m . Por otra parte, se demuestra fácilmente que el valor de $1 / N_{op}$, cuando la recta corta al eje de las abscisas, es igual a $- 1 / K_m$.

El tratamiento matemático que hemos descripto, utiliza por primera vez el número de partículas por Kg de animal como expresión de la concentración de oro coloidal; al número de partículas que desaparece del caudal sanguíneo por minuto, por Kg de animal, lo emplea como unidad de velocidad de desaparición o de captación hepática. Si lo postulado es válido, la ecuación IV-30 debe cumplirse para coloides de cualquier diámetro de partículas.

Por último, creemos conveniente señalar que en el modelo precedente se supone que el número de células fagocitarias permanece constante. Sin embargo KELLY y col., 1960, (271) han observado que luego de la fijación hepática de material coloidal, tiene lugar una proliferación de células reticuloendoteliales en ese órgano. Esto se puso en evidencia por una mayor incorporación de ^{32}P . Sin embargo, el fenómeno no se produce inmediatamente después de la inyección del coloide, por lo que creemos válida la suposición de que en el tiempo relativamente breve en que se realizan nuestras experiencias, el número de células fagocitarias hepáticas permanece constante.

IV-3-2.- Verificación Experimental.-

Detallaremos las experiencias efectuadas con el fin de comprobar prácticamente la validez del modelo propuesto en el párrafo anterior.

IV-3-2-1.- Material.-

Hemos utilizado los coloides de oro radiactivo (^{198}Au) preparados por el Departamento de Radioelementos del Centro de Estudios Nucleares de Saclay, Francia. Sus características fueron señaladas en el párrafo I-3-2-1.

Hemos trabajado con doce dispersiones, cuyas propiedades fisicoquímicas han sido resumidas en la Tabla IV-1. El diámetro medio, expresado en Å , y la concentración en oro de los radiocoloides, expresada en mg / ml , fueron determinados mediante los métodos espectrofotométricos descritos en el Capítulo I; los demás valores, con los procedimientos indicados en el Capítulo II.

Las concentraciones radiactivas absolutas están referidas al día de la elaboración del coloide.

Todas las dispersiones eran estériles, estaban exentas de sustancias pirogénicas y fueron mantenidas en frascos herméticamente cerrados a temperatura ambiente. Las preparaciones 1 y 2 son coloides de tipo germen; las restantes son coloides crecidos.

La dosis suministrada, expresada en mg de oro / Kg , puede calcularse fácilmente a partir del volumen inyectado, de la concentración del coloide y de la masa del animal. Con ese valor, se determina el número de

partículas / Kg, aplicando la fórmula:

$$N_{op} = \frac{9.86 \times 10^{19} \cdot d}{(2a)^3} \quad \text{IV-31}$$

donde d, es la dosis expresada en mg de oro / Kg de animal y 2a es el diámetro medio de las partículas, expresado en Å.

Tabla IV-1.- Características fisicoquímicas de los preparados de oro coloidal radiactivo (^{198}Au), utilizados en la determinación de la velocidad de desaparición del caudal sanguíneo.

Preparación	Diámetro medio	Concentración en oro	p H	Oro Iónico	Concentración Radiactiva
-	Å	mg / ml	-	%	mCi / ml
1	74	3.5	5.4	2.7	23.1
2	92	3.4	5.7	1.0	21.3
3	244	3.8	6.0	1.1	53.5
4	247	3.7	5.7	0.3	135.0
5	253	4.0	5.7	1.9	38.6
6	255	4.3	5.5	0.9	34.8
7	258	3.9	5.7	2.6	23.1
8	266	3.9	5.1	0.5	29.5
9	267	3.7	5.6	0.7	39.1
10	273	6.6	5.1	1.3	107.5
11	280	4.4	5.7	1.2	52.1
12	292	3.7	5.5	0.6	31.8

IV-3-2-2.- Animales.-

Las experiencias fueron realizadas sobre 100 ratas albinas de la cepa "Wistar", machos y hembras, cuyas masas estaban comprendidas entre 200 y 400 gramos. Los animales recibieron una alimentación sintética normalizada, agua "ad-libitum" y fueron mantenidos a temperatura ambiente en jaulas apropiadas, hasta el momento de las experiencias.

IV-3-2-3.- Técnica Experimental.-

La velocidad relativamente elevada con que los coloides desaparecen del sistema circulatorio, hace necesaria la medición continua de la actividad sanguínea por integración y registro automático, para lo cual hemos adoptado el método propuesto por Cohen y col., (178). Debido a la constancia de la actividad específica del preparado, resulta evidente que la actividad sanguínea es proporcional a la concentración del coloide en cada momento y por lo tanto al número de partículas presentes en la sangre.

a) Se anestesia una rata de alrededor de 300 g con 0.1 g de uretano por cada 100 g de animal. Se descubre la vena yugular externa derecha y la arteria carótida primitiva izquierda, eliminando completamente las adventicias. Se introduce una cánula metálica en la vena yugular, la que es mantenida allí durante toda la experiencia, por lo que conviene fijarla a la piel. Por ella se introducen 500 Unidades Internacionales de heparina por cada 100 g de animal. Luego se inserta, en la extremidad cefálica y cardíaca de la arteria carótida un catéter de polietileno, que en nuestras experiencias poseía 0.76 mm de diámetro interno y 1.22 mm de diámetro externo. Esta etapa debe realizarse rápidamente, con el fin de evitar en lo posible una prolongada disminución del caudal sanguíneo en la región cefálica. Conviene fijar el catéter a la piel del animal, para conservar la geometría. El catéter, cuya longitud es de 1 metro, contiene una solución de heparina 1:1 en solución de cloruro de sodio al 0.9%. Su parte media se halla enrollada alrededor de un tubo de 1 cm de diámetro externo. Una vez realizadas las operaciones descritas, se obtiene una circulación extracorporeal, en la cual el tiempo de pasaje de la sangre por el catéter oscila entre 10 y 20 segundos. El volumen sanguíneo extracorporeal es de aproximadamente 0.5 ml, lo que representa entre 2 y 5% del volumen total de sangre. La operación dura corrientemente entre 20 y 30 minutos, siendo mínima la pérdida de sangre experimentada por la rata.

b) Preparado el animal, se lo coloca lo más cerca posible del sistema de medición y se introduce cuidadosamente en el cristal de pozo, convenientemente blindado, el tubo a cuyo alrededor se ha fijado la parte media del catéter. El cristal está conectado con un espectrómetro gamma monocanal, un integrador y un registrador automático. Las condiciones elec-

trónicas del sistema usado en todas las experiencias, fueron las siguientes:

Voltaje del fotomultiplicador	1.200 Voltios.
Base del discriminador	5 Voltios.
Ancho de Canal	Infinito.
Ganancia	100 - 100 (Máxima).
Rango del Integrador	150.000 impulsos/minuto.
Constante de tiempo	0.56 segundos.
Velocidad del Papel del Registrador	10 mm / minuto.

La eficiencia de medición del ^{198}Au en las condiciones indicadas era de 46% .

o) Para preparar la solución del coloide de oro radiactivo a inyectar, se mide exactamente un volumen que posea aproximadamente una actividad de 12 μCi / 100 g de animal y se lo lleva a 0.7 ml con una solución de cloruro de sodio al 0.9%. Se toma esta dilución con una jeringa de 1 ml y se la inyecta por la cánula metálica insertada en la vena yugular, en alrededor de 2 a 3 segundos. La actividad comienza a subir al cabo de 15 a 30 segundos de finalizada la inyección.

Una vez que la actividad ha descendido hasta formar la componente lenta, la que debe ser lo suficientemente larga como para permitir su correcta extrapolación, se suspende la experiencia. Se llevan los datos de las actividades corregidas por fondo, en función del tiempo, a coordenadas semilogarítmicas. Se resta de la curva total la componente lenta y se determina mediante la recta así obtenida el período de semidesaparición, $T_{1/2}$. A partir de este valor se calcula k, empleando la fórmula IV-7.

En la figura IV-1, pag. 152, puede observarse el esquema de un experimento de derivación carotídeo - carotidiana.

IV-3-2-4.- Resultados.-

En la figura IV-2, pag. 153, se muestra una curva de desaparición de la actividad sanguínea obtenida en las condiciones establecidas en el párrafo anterior. El análisis de la misma se presenta en la figura IV-3, pag. 154. Puede observarse que la curva correspondiente al compartimiento hepático, responde exactamente a una función exponencial.

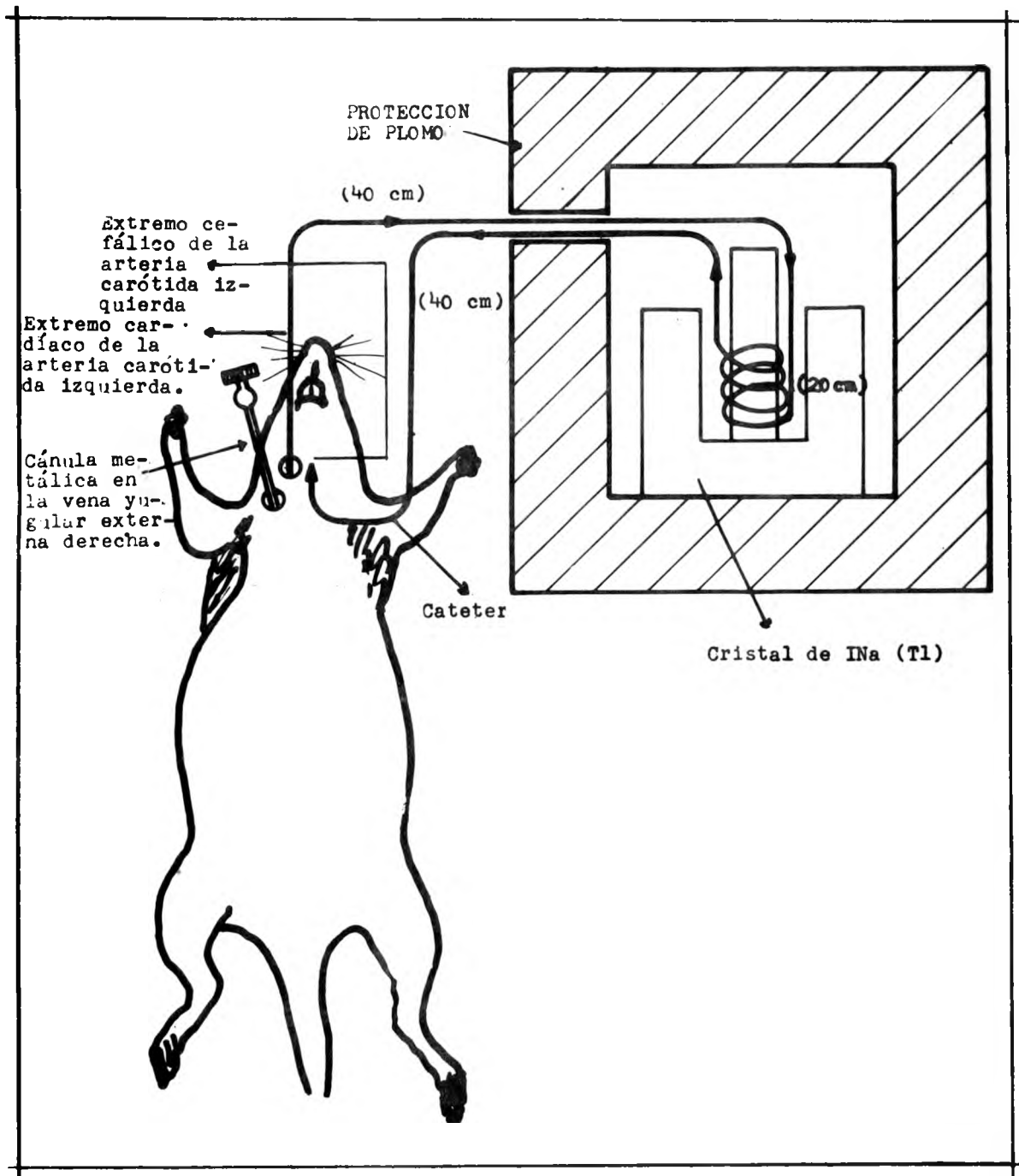


Fig. IV-1.- Esquema de un experimento de derivación carotídeo - carotidiana.-

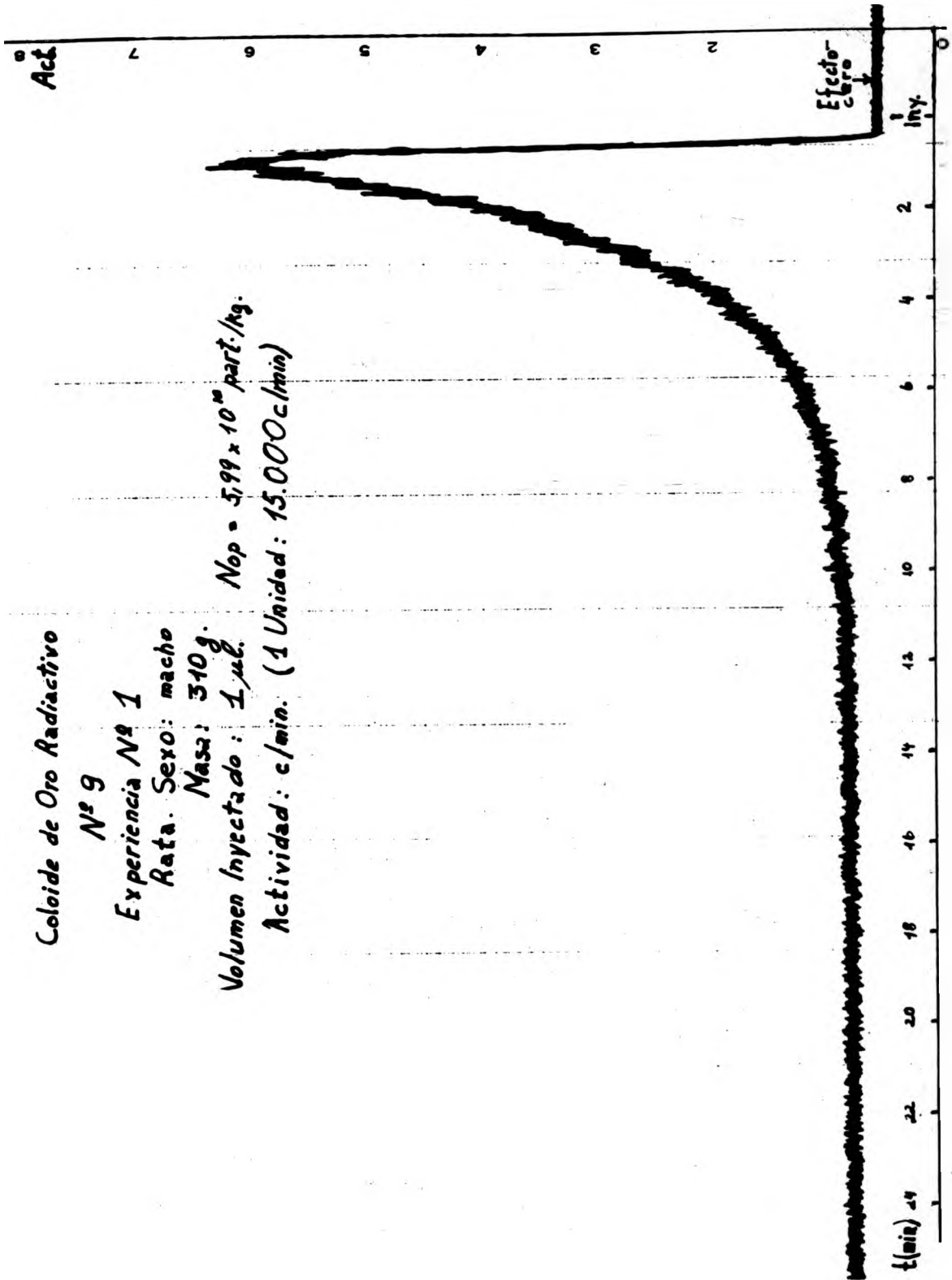


Fig. IV-2.- Curva de desaparición de la actividad sanguínea, obtenida mediante derivación carotídeo-carotidiana e integración y registro automático de la actividad sanguínea.-

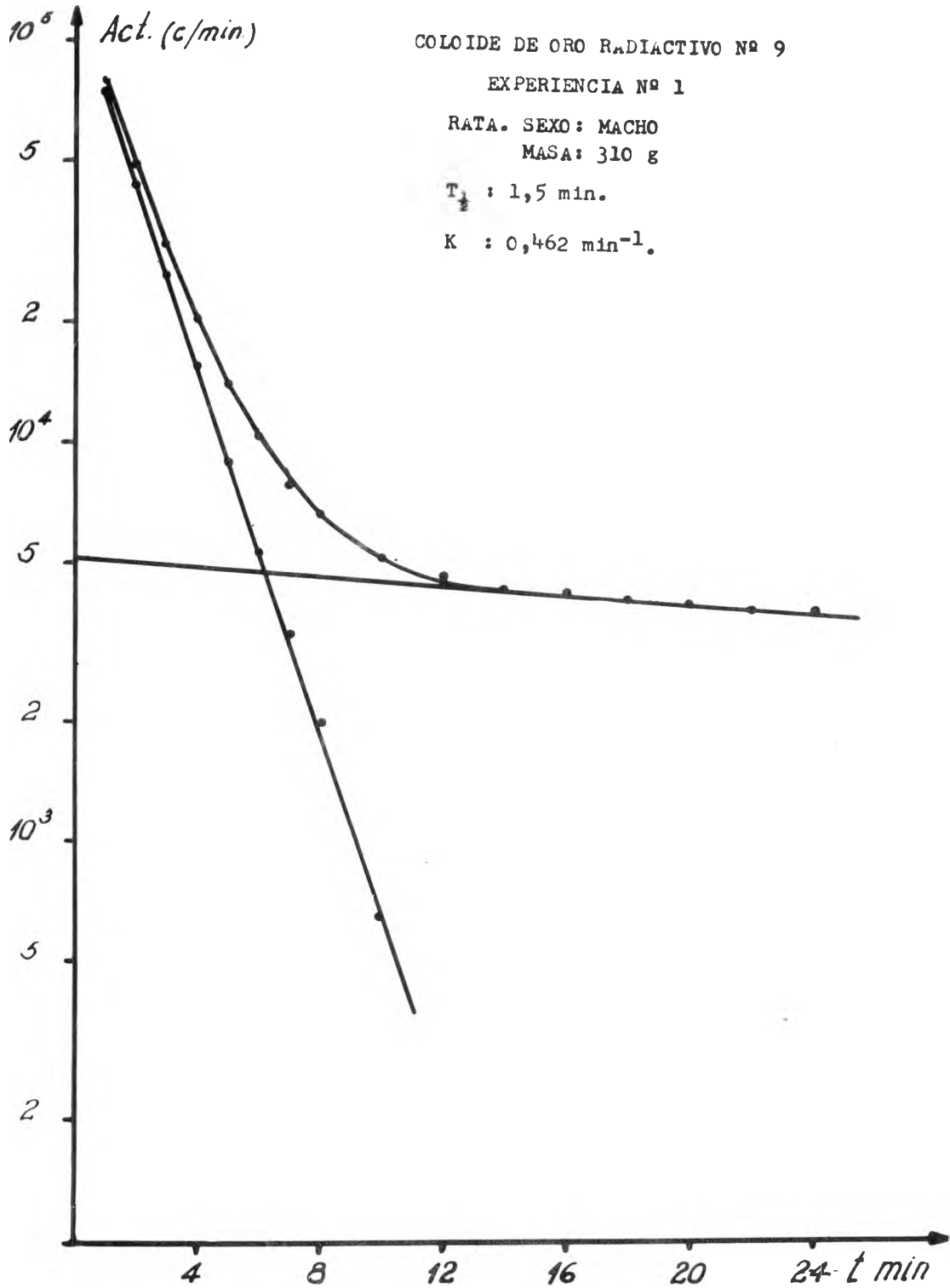


Fig. IV-3.- Análisis de una curva de desaparición de la actividad sanguínea.-

En la Tabla IV-2 se consignan los resultados obtenidos. Los valores indicados en las distintas columnas, tienen los siguientes significados:

- primera: las dosis inyectadas, en mg de oro / Kg de animal.
- segunda: los diámetros medios de las partículas, en Å.
- tercera: dosis, en número de partículas / Kg de animal, calculadas mediante la fórmula IV-31.
- cuarta : los periodos de semidesaparición , $T_{1/2}$, en minutos, correspondientes al compartimiento hepático.
- quinta : constantes de desaparición, k, correspondientes, en min^{-1} .
- sexta : velocidades de desaparición, en número de partículas desaparecidas / Kg de animal / minuto, calculadas mediante la fórmula IV-28.
- séptima: las inversas de las velocidades de desaparición.
- octava : las inversas del número de partículas iniciales / Kg de animal.

Tabla IV-2.- Velocidad de desaparición del caudal sanguíneo de coloides de oro radiactivo (^{198}Au), después de inyección endovenosa de distintas dosis de coloides.-

Dosis	2 a	N_{op}	$T_{1/2}$	k	v	$1/N_{op}$	$1/v$
mg/Kg	Å	$\times 10^{10}$	min	min^{-1}	$\times 10^{10}$	$\times 10^{-14}$	$\times 10^{-14}$
0.0101	280	4.55	2.0	0.347	1.11	2189	9009
0.0118	267	5.99	1.5	0.462	1.74	1669	5747
0.0127	267	6.44	1.7	0.408	1.69	1553	5917
0.0127	267	6.44	1.7	0.408	1.69	1553	5917
0.0161	280	7.21	2.2	0.315	1.66	1387	6024
0.0165	280	7.41	2.4	0.288	1.60	1350	6250
0.0196	280	8.77	1.7	0.408	2.38	1140	4202
0.0226	292	8.86	1.1	0.630	2.97	1129	3367
0.0209	280	9.38	1.1	0.630	3.14	1066	3184
0.0209	280	9.38	1.7	0.408	2.54	1066	3937
0.0209	280	9.38	2.5	0.277	1.98	1066	5050

Continuación de la Tabla IV-2.-

Dosis	2 a	N _{op}	T _{1/2}	k	v	1/N _{op}	1/v
mg/Kg	• A	x10 ¹⁰	min	min ⁻¹	x10 ¹⁰	x10 ⁻¹⁴	x10 ⁻¹⁴
0.0215	280	9.61	2.6	0.267	1.97	1041	5076
0.0248	292	9.75	1.9	0.365	2.47	1026	4049
0.0266	292	10.45	1.7	0.408	2.84	956	3521
0.0298	292	11.7	2.3	0.301	2.60	855	3846
0.0317	267	16.1	2.4	0.289	3.49	621	2865
0.0270	247	17.3	1.4	0.495	5.17	578	1934
0.0408	267	20.7	2.1	0.331	4.82	483	2075
0.0408	267	20.7	2.0	0.347	5.06	483	1976
0.0435	267	22.0	1.7	0.408	5.94	455	1685
0.0432	247	27.6	1.4	0.495	8.39	362	1192
0.0450	247	28.9	1.3	0.533	9.18	346	1089
0.0450	247	28.9	2.0	0.347	7.11	346	1406
0.0450	247	28.9	2.3	0.302	6.45	346	1550
0.0450	247	28.9	1.3	0.533	9.18	346	1089
0.0615	266	32.0	2.7	0.257	6.31	312	1585
0.0615	266	32.0	2.8	0.248	6.20	312	1613
0.0615	266	32.0	3.0	0.231	5.86	312	1706
0.0703	266	36.7	1.5	0.463	10.7	272	934
0.0703	266	36.7	1.8	0.385	9.58	272	1043
0.0703	266	36.7	2.4	0.289	7.89	272	1207
0.0907	267	45.8	1.8	0.385	12.0	212	833
0.0997	267	50.8	1.8	0.385	13.3	197	752
0.0997	267	50.8	1.8	0.385	13.3	197	752
0.114	266	59.7	2.6	0.267	12.2	167	820
0.114	266	59.7	2.8	0.248	11.6	167	862
0.163	267	83.0	2.0	0.347	20.5	120	488
0.141	253	84.8	3.7	0.187	13.1	118	763
0.200	267	102	2.0	0.347	24.9	98.0	402
0.209	267	105	2.0	0.347	25.8	95.2	388
0.209	267	105	2.5	0.277	22.9	95.2	437
0.327	267	166	1.9	0.365	42.0	60.2	238

Continuación de la Tabla IV-2.-

Dosis	2 a	N _{op}	T _{1/2}	k	v	1/N _{op}	1/v
mg/Kg	λ	x10 ¹⁰	min	min ⁻¹	x10 ¹⁰	x10 ⁻¹⁴	x10 ⁻¹⁴
0.327	267	166	2.5	0.277	35.1	60.2	285
0.336	267	175	2.5	0.277	37.1	57.1	270
0.392	258	222	1.9	0.365	56.3	45.0	178
0.392	258	222	2.8	0.248	43.0	45.0	233
0.371	253	223	3.6	0.193	35.2	44.8	284
0.389	253	232	2.4	0.289	47.0	43.1	213
0.583	258	330	4.4	0.158	44.2	30.3	226
0.698	267	355	3.1	0.224	63.9	28.2	156
0.698	267	355	3.4	0.204	59.0	28.2	169
0.628	253	376	3.5	0.198	61.2	26.6	163
0.636	253	380	2.9	0.239	73.6	26.3	136
0.762	267	387	3.2	0.217	67.6	25.8	148
0.681	253	407	2.2	0.315	93.7	24.6	107
0.766	258	431	2.7	0.257	89.2	23.2	112
0.793	258	447	2.6	0.267	93.0	22.4	108
0.866	255	506	1.8	0.385	132	19.8	75.8
0.890	255	525	1.9	0.365	132	19.0	75.8
1.22	267	617	3.0	0.231	115	16.2	87.0
1.15	255	671	2.0	0.347	165	14.9	60.6
1.15	255	671	2.1	0.331	159	14.9	62.9
1.48	267	685	2.3	0.301	153	14.6	65.4
1.49	273	690	2.5	0.277	146	14.5	68.5
1.55	273	720	2.4	0.289	156	13.9	64.1
1.83	273	847	2.1	0.331	202	11.8	49.5
1.83	273	847	2.1	0.331	202	11.8	49.5
1.83	273	847	2.5	0.277	178	11.8	56.2
1.84	273	856	2.8	0.248	166	11.7	60.2
1.85	273	861	2.2	0.315	191	11.6	52.4
1.53	255	900	2.0	0.347	222	11.1	45.0
1.58	244	1054	3.9	0.178	157	9.49	63.7
1.71	244	1143	3.7	0.187	178	8.75	56.2

Continuación de la Tabla IV-2.-

Dosis	2 a	N _{op}	T _{1/2}	k	v	1/N _{op}	1/v
mg/kg	Å	x10 ¹⁰	min	min ⁻¹	x10 ¹⁰	x10 ⁻¹⁴	x10 ⁻¹⁴
2.19	253	1313	4.3	0.161	179	7.61	55.9
1.99	244	1326	4.0	0.173	193	7.54	51.8
2.78	267	1406	3.7	0.187	219	7.11	45.7
2.26	244	1505	4.0	0.173	219	6.64	45.7
2.26	244	1505	3.8	0.183	229	6.64	43.7
2.79	253	1671	5.3	0.131	193	5.98	51.8
2.79	253	1671	6.1	0.114	167	5.98	59.9
3.27	255	1908	3.6	0.192	300	5.24	33.3
3.27	255	1908	4.2	0.165	265	5.24	37.7
7.20	273	3343	3.7	0.187	518	2.99	19.3
0.141	74	3402	3.5	0.198	551	2.93	18.1
0.261	74	6318	5.2	0.134	735	1.58	13.6
9.47	244	6322	8.5	0.0817	476	1.58	21.0
0.522	74	12587	10.5	0.0725	851	0.79	11.8
0.554	74	13316	13	0.0533	676	0.75	14.8
0.875	74	21092	17	0.0408	824	0.47	12.1
0.923	74	22162	17	0.0408	858	0.45	11.7
1.78	74	42982	21	0.0330	1375	0.23	7.27
6.03	92	76426	42	0.0165	1244	0.13	8.03
6.08	92	77044	51	0.0136	1051	0.13	9.51
3.91	74	93798	40	0.0173	1390	0.10	7.20
5.54	74	133164	68	0.0102	1351	0.075	7.40

Si se representa 1/v en función de 1/N_{op} se obtiene una recta, dentro de los errores experimentales aceptables. En la misma no se observan discontinuidades imputables a la variación del tamaño de las partículas inyectadas. Realizando los cálculos necesarios, se puede demostrar que la ordenada en el origen es de $7 \times 10^{-14} (\text{partículas/Kg/minuto})^{-1}$. Por lo tanto, la velocidad máxima con que desaparecen las partículas de oro coloidal radiactivo (198-Au) del caudal sanguíneo, es de 1.4×10^{13} partículas / Kg / minuto. Como ya hemos señalado, este valor corresponde a -

gualmente a la velocidad máxima de captación hepática. Por otra parte, la pendiente de la recta es igual a 4.1; luego el valor de K_s es de aproximadamente 5.7×10^{13} partículas / Kg; su significación será discutida en el párrafo siguiente. Es necesario destacar que los valores obtenidos deben ser considerados como aproximados, dada la dispersión estadística de los datos experimentales.

Interesa señalar que es posible analizar los resultados obtenidos, mediante un criterio diferente, adaptado del trabajo de Iio y Wagner, (262). En efecto, puede demostrarse que, si se representan los valores de $T_{1/2}$ en función de N_{op} , se obtiene una recta, igualmente de la forma $y = a \cdot x + b$. En la misma, y , corresponde a $T_{1/2}$ y x , a N_{op} ; el valor de la pendiente, a , es igual a $0.693/V_m$; la ordenada en el origen, b , vale $0.693 \cdot K_s/V_m$. Este último valor permite determinar el $T_{1/2}$ para una dosis de coloide que tiende a cero. Si se analizan nuestros datos experimentales con este criterio, pueden calcularse los siguientes valores: 2.3 minutos, para la ordenada en el origen; 1.3×10^{13} partículas / Kg / minuto, para la velocidad máxima de desaparición o de captación hepática y 4.3×10^{13} partículas / Kg para K_s . Como puede observarse, los valores numéricos de V_m y de K_s , obtenidos con ambos métodos, coinciden satisfactoriamente, especialmente si se tienen en cuenta los errores experimentales.

IV-4.- DISCUSION.-

La técnica con que hemos determinado la velocidad de desaparición de los coloides de 198-Au del caudal sanguíneo, permite establecer la capacidad fagocitaria del SRE "in vivo", sin modificar apreciablemente las condiciones hemodinámicas del animal. Asimismo, mediante su aplicación, es posible efectuar las mediciones inmediatamente después de finalizada la inyección. Es fácil verificar, que la variación de actividad de la sangre que circula por el catéter, es proporcional a la que experimenta la sangre total, aun si se produjeran pequeñas alteraciones de la velocidad sanguínea en el catéter.

Sin embargo, consideramos necesario discutir ciertos detalles, en función de los cuales podría eventualmente objetarse, en parte, la técnica experimental utilizada, así como algunas conclusiones obtenidas.

Como hemos demostrado en el Capítulo I, la dilución de los prepa-

rados no afecta mayormente el resultado de la determinación espectrofotométrica del tamaño medio de sus partículas. Por lo tanto, estimamos posible introducir este valor en la fórmula IV-31, aun si la concentración de las dispersiones es diferente a la utilizada en la determinación espectrofotométrica. Es necesario señalar, que las diluciones fueron preparadas inmediatamente antes de ser suministradas al animal y en ningún caso se observó un enturbiamiento o un principio de floculación.

Mc-INTRYE y col., 1965, (272) han observado que la heparina disminuye la capacidad fagocitaria del SRE. Por el contrario, FILKINS y DI LUZIO, 1966, (273) verificaron un aumento de dicha actividad, en cortes de hígado "in vitro", en presencia de aquella sustancia. De todas maneras estimamos que los valores obtenidos por nosotros no demuestran una mayor alteración de la funcionalidad del SRE debido a la heparina, por cuanto son comparables a los logrados por otros autores, que trabajaron sin la administración de dicho anticoagulante.

Las investigaciones de BARROW y col., 1951, (274), de BENACERRAF y col., 1959, (275) y de GILMAN y TROWELL, 1965, (276), han establecido que, con las actividades administradas en nuestras experiencias, la función fagocitaria de las células reticuloendoteliales hepáticas no se modifica debido a las características radiactivas de las dispersiones inyectadas. Las mismas consideraciones son válidas para la determinación del flujo sanguíneo hepático en seres humanos.

En el estudio completo del estado funcional del SRE, es necesario considerar otros factores que pueden deprimir o estimular la actividad del sistema. En una primera etapa de nuestras experiencias, en las cuales inyectamos cantidades relativamente elevadas de coloides con partículas de distinto diámetro medio, observamos que, cuando este valor es pequeño, los $T_{1/2}$ correspondientes resultan más largos que cuando se administran dosis comparables de dispersiones con partículas grandes. Esto fué primeramente interpretado como demostración de la existencia de una diferente capacidad fagocitaria para partículas grandes o pequeñas. También podría suponerse que la menor velocidad de captación de coloides de tipo germen, sea debida a un eventual exceso de gelatina libre en estas dispersiones, exceso que, como se detallará en el próximo capítulo, disminuye la capacidad fagocitaria del SRE. Sin embargo, las experiencias realizadas con el fin de separar la gelatina libre de los coloides, dieron resultados negativos. Por otra parte, si se acepta la

teoría propuesta por JIRGENSONS, 1958, (277) para explicar la disposición geométrica de los agentes estabilizantes sobre las partículas coloidales liófbas, es poco probable la presencia de una mayor cantidad de gelatina libre en soles con partículas pequeñas, debiéndose observar teóricamente el efecto contrario.

El análisis de la totalidad de los resultados obtenidos en nuestras experiencias muestra que la representación del período de semidesaparición en función del número de partículas inyectadas por Kg de animal, es una recta. Esto significa que, con dosis muy bajas de dispersiones con partículas pequeñas, se obtienen $T_{1/2}$ normales, inferiores a 4 minutos, mientras que es posible lograr $T_{1/2}$ superiores a este valor con coloides crecidos, cuando las dosis administradas son elevadas; ésto fué comprobado en forma experimental.

En general puede observarse que, cuando el número de partículas sobrepasa un valor que se encuentra alrededor de 10^{13} partículas/Kg de animal, los $T_{1/2}$ son superiores a 4 minutos, independientemente del diámetro medio de las micelas inyectadas. Esto se debe probablemente a una incapacidad funcional o mecánica de las células reticuloendoteliales hepáticas, para fagocitar las partículas suministradas en un tiempo normal y/o a la existencia de un número limitado de células de Kupffer. La situación analizada corresponde a lo que clínicamente se conoce con el nombre de saturación del SRE. En dicho caso, la velocidad de desaparición del coloide de la sangre no depende del flujo sanguíneo hepático, sino de la cantidad inyectada. Por lo tanto es importante señalar que, cuando se realizan las determinaciones clínicas habituales de aquel flujo, es necesario administrar menos que 10^{13} partículas / Kg, cuando se utilizan los coloides de 198-Au estudiados.

Para explicar estas observaciones y postular un modelo cinético general de la fagocitosis de coloides, es necesario aplicar un tratamiento similar al propuesto por Michaelis y Menten para las reacciones enzimáticas, en función del número de partículas coloidales administradas. En este caso, si se expresa la velocidad con que desaparece la dispersión del sistema circulatorio, v , en número de partículas desaparecidas /Kg de animal/minuto y la dosis inyectada, N_{op} , en número de partículas /Kg de animal, puede verificarse que la representación de $1/v$ en función de $1/N_{op}$, es una recta. Por lo tanto, no puede admitirse una influencia

específica del tamaño de las micelas suministradas sobre la velocidad con que éstas desaparecen del plasma. Esta aproximación teórica ha podido comprobarse experimentalmente dada la posibilidad de determinar prácticamente el diámetro medio de las partículas y la concentración en oro de los coloides de $^{198}\text{-Au}$.

Las observaciones realizadas, demuestran que los valores del $T_{1/2}$ dependen del número de partículas inyectadas y no de su diámetro medio. Por lo tanto, independientemente de este último valor, el $T_{1/2}$ es constante para un determinado número de partículas / Kg. Si se asimilan al fenómeno en estudio las apreciaciones de FRIEDLANDER y col., 1964, (278, pag.5), concernientes a la ley de la desintegración radiactiva, que también es de primer orden, puede considerarse que la constante de desaparición, k , representa la probabilidad de que una partícula sea captada en la unidad de tiempo, dado que su número es relativamente elevado. Esto permite suponer que el SRE hepático fagocita con la misma probabilidad las partículas coloidales de distinto tamaño.

De acuerdo con todo lo expuesto, no sería necesario que las preparaciones de oro coloidal radiactivo utilizadas en la determinación del flujo sanguíneo hepático en seres humanos, posean una absoluta homogeneidad en el diámetro de sus partículas, como suele aceptarse en la práctica clínica. Sin embargo, ya se ha destacado que, la determinación espectrofotométrica del diámetro medio de las partículas, es más insegura cuando las dispersiones son muy heterogéneas. Por lo tanto, si bien parece prescindible que todas las micelas posean el mismo diámetro, creemos conveniente que los soles sean lo más homogéneos posible. Estas observaciones deben recordarse al analizar el trabajo de PLAYOUST y col., 1959, (279), en el cual se discute la utilidad del coloide de $^{198}\text{-Au}$ como trazador para determinar el flujo sanguíneo hepático.

Asimismo, es posible explicar satisfactoriamente las discrepancias observadas en los trabajos indicados en el párrafo V-2, concernientes a la influencia del tamaño de las partículas sobre el $T_{1/2}$. Teniendo en cuenta que en las experiencias de Dobson y col., (236) y de Zilvermit y col., (172), se inyectaron dosis relativamente elevadas y semejantes de coloides con partículas grandes y pequeñas, los períodos de semidesaparición más largos observados en el último caso son perfectamente admisibles. Por otra parte, en las investigaciones de Sheppard y col., (235) ya señaladas, se suministraron coloides de oro cuyas partículas poseían un

diámetro que oscilaba entre 200 y 1000 Å en un caso y entre 700 y 2000 Å en el otro. Aunque hay una diferencia neta en el diámetro medio de las partículas de ambos preparados y si bien no se han indicado las dosis administradas, es aceptable suponer que no se llegó a inyectar un número superior a 10^{13} partículas / Kg en ninguno de los dos casos.

Por último analizaremos brevemente el significado del valor de K_s , obtenido en nuestras determinaciones. Resulta evidente que la interpretación de este parámetro no es simple, ya que no es posible relacionarlo con la afinidad entre la partícula de oro coloidal y la célula de Kupffer, como podría inferirse a partir de las consideraciones habituales de cinética enzimática. Sin embargo, puede establecerse que K_s corresponde al número de partículas / Kg de animal, con el que se obtiene una velocidad de desaparición igual a la mitad de su valor máximo, V_m . Esta interpretación, que es la original, ha sido aconsejada por DIXON y WEBB, 1958, (280, pag. 19), cuando se desconocen los valores de las distintas constantes de velocidad de la reacción y dado que evidentemente nos encontramos en este caso, estimamos que la misma es la única admisible. Además, con ella concuerdan los resultados experimentales obtenidos.

De las experiencias realizadas, así como de lo expresado en el presente párrafo, se deducen algunas conclusiones generales, que conviene resumir. La aplicación de un tratamiento cinético, del tipo propuesto por Michaelis y Menten, a la fagocitosis de partículas coloidales, así como su verificación experimental, permite establecer que la reacción IV-14, pag. 144, es válida para cualquier tamaño de micelas. Estimamos que dicha reacción rige en forma general el fenómeno en estudio. Las consideraciones referentes al orden del proceso, están subordinadas al número de partículas inyectadas. A partir de las ecuaciones de Michaelis y Menten, se puede deducir, como ya lo hemos indicado, que la representación del $T_{1/2}$ en función de N_{op} es una recta. De los valores de su pendiente y ordenada en el origen se concluye que la fagocitosis cumple con todas las características de una reacción de primer orden con respecto al número de partículas, si este valor es apreciablemente menor que K_s . Cuando N_{op} se hace comparable a K_s o aun mayor, se observa que el

$T_{1/2}$ depende del número de partículas inyectadas; por lo tanto la reacción deja de ser de primer orden, para tender a una de orden cero.

Con el fin de verificar la generalidad de las apreciaciones cinéticas expuestas, consideramos interesante establecer con otro tipo de radiocoloides si los valores de K_s y de V_m se mantienen en el mismo orden de magnitud. Para ello es necesario disponer de métodos prácticos, mediante los cuales se pueda conocer la concentración y el tamaño de las partículas de las dispersiones utilizadas. De esta manera sería posible lograr una normalización del método que permite determinar el flujo sanguíneo hepático en seres humanos.

- o - o - o - o -

CAPITULO V

BLOQUEO DEL SISTEMA RETICULOENDOTELIAL

V-1.- INTRODUCCION.-

En el estudio descripto en el capítulo anterior, se utilizó como único material coloidal una dispersión de oro radiactivo cuyas partículas estaban protegidas con gelatina. El análisis cinético de las curvas de desaparición de estos coloides del caudal sanguíneo, demostró que el proceso de la fagocitosis posee todas las características de una reacción de primer orden con respecto al número de partículas, cuando este valor es inferior a 10^{13} partículas / Kg de animal. Si se administra una cantidad mayor, se observa que el período de semidesaparición del coloide de la sangre es superior a 4 minutos. Este fenómeno se debe probablemente a las razones señaladas en la discusión del capítulo anterior. Cuando se aplica un tratamiento matemático similar al propuesto por Michaelis y Menten para las reacciones enzimáticas, y se expresan los datos en función del número de partículas / Kg de animal, se demuestra que el proceso está regido por una cinética de ese tipo en todo el rango de número de partículas estudiado.

Sin embargo, existe otra posibilidad de obtener $T_{1/2}$ superiores a 4 minutos, utilizando coloides de ^{198}Au protegidos con gelatina, sin necesidad de inyectar más de 10^{13} partículas / Kg de animal. Esto puede lograrse suministrando en forma simultánea, un exceso de gelatina. Cuando se inyectan prácticamente al mismo tiempo dos coloides diferentes, se produce un aumento anormal del $T_{1/2}$ de uno de ellos; se admite que eso ocurre cuando las propiedades superficiales son iguales. En estas condiciones se acepta generalmente que, cuando el período de semidesaparición del coloide de la sangre se hace mayor que 4 minutos, se produce el llamado fenómeno de bloqueo del sistema reticuloendotelial. A pesar de ese incremento, las curvas siguen manteniendo sus características exponenciales.

El mecanismo por el cual se produce el bloqueo no está aclarado totalmente aún, y el objeto de esta parte de nuestro trabajo es contribuir a su explicación. Este fenómeno tiene además cierta importancia práctica, por estar ligado a procesos patológicos en los cuales la capa-

cidad fagocitaria del SRE se encuentra alterada.

Debemos destacar que existen varios tipos de bloqueo del SRE, estudiando nosotros solamente el caso de los coloides de oro radiactivo protegidos con gelatina o con PVP y el efecto bloqueante de uno u otro de estos compuestos agregados en exceso.

V-2.- ANTECEDENTES.-

En el campo del estudio de los radiocoloides, fueron probablemente MURRAY y KATZ, 1955, (281), quienes verificaron por primera vez el fenómeno de bloqueo del SRE al suministrar un exceso de gelatina antes de la administración de un coloide de $^{198}\text{-Au}$ protegido con ese agente. Demostraron que el aumento del $T_{1/2}$ es proporcional a la cantidad de gelatina presente. Asimismo observaron que la inyección de un exceso de alfa y beta globulinas junto con la gelatina, provoca un incremento del $T_{1/2}$ del coloide de la sangre aun superior al habitual. Los autores mencionados interpretaron este hecho como una prueba de que el efecto bloqueante de la gelatina se debe a que, en presencia de un exceso de esta sustancia, se produce una unión más estable del coloide de $^{198}\text{-Au}$ protegido con gelatina, con las proteínas plasmáticas, lo que favorecería una permanencia más prolongada del coloide en la sangre. La formación de un complejo entre estos coloides y ciertas globulinas plasmáticas fué sugerida por SIMON, 1954, (282) y por MURRAY, 1956, (283) en base a experiencias de electroforesis sobre papel, con sueros de animales que habían recibido dicho radiocoloide por vía endovenosa. Asimismo BONToux, 1961, (284) ha observado, en estudios de difracción luminosa, una cierta interacción de la gelatina con determinadas proteínas plasmáticas.

SEAMAN y MURRAY, 1957, (285) demostraron la presencia de gelatina o una sustancia similar, en el hígado de animales que habían recibido una dosis bloqueante de ese compuesto.

JENKIN y ROWLEY, 1961, (286) postularon que para otro tipo de coloides, el bloqueo del SRE está relacionado con un agotamiento de las opsoninas plasmáticas. Posteriormente, MURRAY, 1963, (287) amplió este criterio. Según este autor, el recubrimiento de las partículas de oro coloidal radiactivo por las opsoninas sería necesario para que se produzca la fagocitosis del coloide. Cuando se administra un exceso de gelatina, es-

ta sustancia se uniría con las opsoninas, impidiendo que las mismas recubran las partículas de oro. Esto provocaría la disminución de la velocidad de captación hepática de la dispersión. Según MURRAY, 1963, (288), el depósito de opsoninas también debe agotarse para que se produzca el bloqueo. Estas interpretaciones están basadas principalmente en la necesidad de que el agente bloqueante posea las mismas propiedades superficiales que la sustancia que estabiliza el coloide.

Sin embargo, NORMANN y BENDITT, 1965, (289) demostraron que es posible lograr el bloqueo de la fagocitosis de carbón coloidal protegido con gelatina, en presencia de un exceso de seroalbúmina desnaturalizada. Los mismos autores, (290), han podido aislar un factor sérico que, cuando se lo adsorbe sobre las partículas de carbón coloidal, impediría el bloqueo.

FILKINS y col., 1966, (291) y FILKINS y DI LUZIO, 1966, (292), han efectuado experiencias con cortes de hígado "in vitro" y coloides de 198-Au estabilizados con gelatina; en presencia de un exceso de esta sustancia, observaron un bloqueo, que interpretaron como producido por un agotamiento de opsoninas, ya que, cuando las partículas coloidales se opsonizaban, el fenómeno de bloqueo no se producía.

Por otra parte, BENACERRAF y col., 1957, (293) postularon que la disminución de la capacidad fagocitaria de las células de Kupffer para coloides de carbón protegidos con gelatina, frente a una excesiva cantidad de dicho agente, se debería a una inhibición competitiva de esas células, por parte de la gelatina. En apoyo de esta hipótesis fueron realizadas una serie de experiencias.

BIOZZI y col., 1957, (294) han determinado que ciertos estrógenos poseen una acción estimulante sobre el SRE, fenómeno que también fue observado por HOWARD y col., 1959, (295) al administrar una dosis de mycobacterium tuberculosis. Por otra parte, STUART y col., 1960, (296) establecieron que ciertos lípidos simples poseen una acción inhibitoria más o menos marcada sobre la capacidad fagocitaria del SRE. Esto podría estar relacionado con la localización de una acetilcolinesterasa en las células reticuloendoteliales del hígado, señalada por BALLANTYNE, 1966, (297).

Con posterioridad, BIOZZI y col., 1963, (298) demostraron que la opsonización de partículas coloidales inertes no disminuye el grado de bloqueo. Sin embargo, BIOZZI y col., 1963, (299) determinaron que la opso-

nización de salmonellas con inmunosueros, tiene efecto positivo sobre la fagocitosis de estos microorganismos. WAGNER e IIO, 1964, (300), en sus estudios de la fagocitosis de microagregados de seroalbúmina humana marcada con ^{131}I , en seres humanos, suponen igualmente que el bloqueo del SRE originado por alta concentración de gelatina, se debe a la acción competitiva de esta sustancia en las células de Kupffer del hígado.

Más recientemente, KOENIG y col., 1965, (301) realizaron una serie de experiencias, que sugieren que el bloqueo de la fagocitosis de coloides de ^{198}Au estabilizados con gelatina, cuando ésta última se encuentra en exceso, se debe a la simple presencia del agente bloqueante en el caudal sanguíneo. Estos autores, no lograron impedir el bloqueo por opsonización de las partículas de ^{198}Au , lo que se opone a la hipótesis formulada por Murray. Por otra parte, observaron que, cuando el hígado de un animal que previamente ha recibido una dosis bloqueante de gelatina, se perfunde "in vitro" con un coloide de ^{198}Au , no se logra obtener el fenómeno de bloqueo. Esto contradice claramente la hipótesis de la inhibición competitiva, por lo menos en el sentido en que fue formulada por Benacerraf y col. Cuando en el líquido de perfusión se agrega gelatina, se obtiene el bloqueo, tanto si el hígado estaba bloqueado previamente o no. Por valoración de la hidroxiprolina producida por hidrólisis de la gelatina, comprobaron que esta sustancia, agregada en exceso, permanece durante más tiempo en el plasma que el coloide de ^{198}Au .

En base a estas determinaciones se sugiere que la acción bloqueante de la gelatina se debe a su presencia "per se" en el plasma sanguíneo.

Dado que las hipótesis expuestas son las más importantes formuladas hasta el momento, creemos conveniente resumirlas. La primera, supone una acción de la gelatina en el plasma sanguíneo, ya sea, a) estabilizando la unión entre el coloide de ^{198}Au y ciertas proteínas plasmáticas, o b) por agotamiento de las opsoninas circulantes o totales, que serían necesarias para la fagocitosis del coloide. En la segunda se postula una acción de la gelatina a nivel hepático, por inhibición competitiva en las células de Kupffer. La tercera hipótesis, supone que la gelatina actúa simplemente por su presencia en el caudal sanguíneo.

Consideramos oportuno además, mencionar una serie de trabajos que si bien no están relacionados directamente con el bloqueo tal como se ha encarado en este capítulo, pueden proporcionar referencias de interés.

AFIFI y col.,1965,(302) han observado que, cuando se inyecta gelatina, alrededor de 20 minutos después del suministro de un coloide de 198-Au protegido con gelatina, se produce un nuevo incremento de la actividad sanguínea. Los autores interpretan el fenómeno como debido a una liberación del oro coloidal adsorbido sobre la célula fagocitaria, producida por la administración de un exceso de gelatina, sustancia que igualmente tiende a fijarse sobre las células de Kupffer. La intensidad del fenómeno disminuye si el intervalo transcurrido es mayor que 20 minutos, o si las dosis de gelatina inyectadas decrecen. Este efecto se conoce con el nombre de "fenómeno de caza", denominación sugerida previamente por Sioot y col.,(268). Los resultados son solamente positivos si se utiliza gelatina y un coloide protegido con esta sustancia. Es posible impedir el fenómeno, si se pinza la vena porta, observándose la liberación del coloide de 198-Au a la circulación sanguínea, una vez abierto dicho vaso. Estas observaciones favorecen marcadamente la hipótesis de que la gelatina actúa a nivel hepático, sugiriendo asimismo que la generalización propuesta por Murray (287) debe analizarse en forma cuidadosa antes de ser aceptada.

WIENER y col.,1964,(303) estudiaron la velocidad con que desaparece de la sangre una dispersión de carbón coloidal, en ratas bloqueadas previamente o no con dióxido de torio coloidal ("Thorotrast"). Posteriormente se realizó el estudio de los detalles ultraestructurales de las células fagocitarias hepáticas, por microscopía electrónica. Los autores concluyen que, en sus condiciones de trabajo, el bloqueo del SRE puede deberse a una inhibición relativa de la reconstitución de las membranas de las células fagocitarias, una vez realizada la micropinocitosis, pero no a la destrucción de aquéllas.

Asimismo, LEMPERLE,1966,(304) comprobó que ciertas sustancias que estimulan el SRE, lo hacen actuando sobre las membranas de los lisosomas de las células fagocitarias.

BARANOVA y TUSTANOVSKI,1965,(305) observaron que la administración de "Thorotrast" inhibe la síntesis de alfa globulinas en el hígado.

NORMANN,1966,(306) estableció que, cuando se inyectan simultánea-

mente una dispersión de carbón coloidal y otra de albúmina marcada con un colorante, se produce una inhibición mutua de la fagocitosis de ambas sustancias.

HIATT y BONORRIS, 1966, (307) han demostrado que la amilasa sérica no es removida del plasma sanguíneo por el hígado de perros que recibieron una dosis bloqueante de "Thorotrast". Las experiencias fueron realizadas "in vivo" y por estudios histológicos de cortes de hígado.

KOENIG y col., 1966, (308) verificaron que la fagocitosis de "staphylococcus aureus" es inhibida por la adición de arsenito o cuando la temperatura disminuye a menos de 20 ° C.

BLATTERBERG y LEVY, 1962, (309) observaron una sustancia depresora del SRE, segregada por el intestino, que podría ser responsable de la disminución de la actividad fagocitaria durante el shock. En fecha más reciente, los mismos autores, (310) y (311), estudiaron esta sustancia en forma más detallada, sugiriendo que su acción no se produce por bloqueo del SRE.

Todas estas últimas experiencias parecen indicar que el hígado debe probablemente intervenir en el fenómeno de bloqueo del SRE, pero que hay otros factores adicionales que es necesario tener en cuenta para su explicación.

V-3.- PARTE EXPERIMENTAL.-

V-3-1.- Material y Métodos.-

V-3-1-1.- Oro Coloidal Radiactivo (198-Au).-

Se trabajó con distintas dispersiones de oro coloidal radiactivo (198-Au) que, en su mayor parte, fueron provistos por el Departamento de Radioelementos del Centro de Estudios Nucleares de Saclay, Francia, y se describen en el párrafo IV-3-3-1.

De los coloides consignados en la Tabla V-1, se utilizaron los preparados números 4, 8, 9, 11 y 12. Además se emplearon otros dos radiocoloides que respondían a las características especificadas en la Tabla V-1.

Tabla V-1.- Características fisicoquímicas de coloides de 198-Au, no in-
cluidos en la Tabla IV-1.-

Prepa- ración	Diámetro medio	Estabilizante	Concentración en oro	p H	Concentración Radiactiva
-	Å	-	mg / ml	-	mCi / ml
1	210	Gelatina Tipo Gr-Pr (*)	2.9	5.7	74.0
2	279	Kollidon- 25 (*)	3.6	5.1	16.0

(*) Las especificaciones de estas sustancias han sido indicadas en el párrafo II-3-2, pag. 75.

V-3-1-2.- Agentes bloqueantes.-

Al efecto se utilizaron distintos tipos de gelatina cuyas caracte-
rísticas fisicoquímicas se señalan en la Tabla V-2. Las propiedades de
la PVP utilizada como agente protector de los coloides y como sustancia
bloqueante, ya han sido indicadas en el párrafo II-3-2.

Tabla V-2.- Propiedades fisicoquímicas de los distintos tipos de gelati-
na utilizadas en las experiencias de bloqueo del SRE.-

Tipo	Punto Isoeléctrico (a)	Viscosidad	Cenizas (b)	p H (c)	Peso Molecular (d)
-	-	milipoise	%	-	-
Gr-Pr	4.7 ± 0.1	-	-	5.5 ± 0.1	-
R-1	4.4 ± 0.1	49	0.2	5.4 ± 0.1	605.000
R-2	6.8 ± 0.3	27	0.2	4.8 ± 0.1	275.000
R-3	9.2 ± 0.5	61	1.1	4.1 ± 0.1	475.000

(a) Determinación turbidimétrica efectuada por nosotros.

(b) Dato obtenido por calentamiento de la sustancia a 550 °C;
se incluyen cloruros.

- (c) Determinación efectuada por nosotros, con una solución al 3%, que sufrió un proceso de doble calentamiento en autoclave a 121 ° C durante 30 minutos.
- (d) Determinación efectuada por el Profesor Paul Creach, a quien agradecemos su colaboración.

Los datos correspondientes a la viscosidad y al contenido en cenizas, fueron determinados por A. Rousselot, proveedor de las gelatinas tipo R-1, R-2 y R-3.

Todas las diluciones de los distintos tipos de gelatina fueron preparadas con una concentración de 30 mg/ml, similar a la que contienen los coloides de 198-Au cuando están protegidos con esta sustancia; las mismas fueron calentadas, en autoclave, dos veces, a 121 ° C durante 30 minutos. Esta operación fué realizada con el fin de someter a la gelatina utilizada como agente bloqueante, al mismo ciclo térmico que la empleada en la elaboración del coloide. Estas soluciones también fueron utilizadas para la determinación de los pesos moleculares.

V-3-1-3.- Animales.-

Se utilizaron aproximadamente 50 ratas de las mismas características que las señaladas en el Capítulo IV. Por otra parte, en las experiencias referidas en los párrafos V-3-2-4 y V-3-2-5 se utilizaron conejos albinos, de tipo standard, de 2 Kg aproximadamente.

V-3-1-4.- Técnica Experimental y Análisis de las curvas.

Se utilizó la técnica experimental descrita en el párrafo IV-3-2-3. Las soluciones de gelatina fueron inyectadas, juntamente con el coloide de 198-Au por la vena yugular externa derecha.

Las curvas fueron analizadas en forma similar a la detallada en el mismo párrafo. Se determinó el $T_{1/2}$ correspondiente al compartimiento hepático, restando a la curva de la actividad sanguínea total en función del tiempo, la componente lenta correspondiente. Debe señalarse que en algunos casos en que los $T_{1/2}$ eran muy elevados, esta componente lenta no fue observada, por lo que se calculó el período de semidesaparición con la única exponencial presente.

V-3-2.- Resultados.-

Se consideran los resultados logrados en las diferentes experiencias realizadas. Debido a que cada grupo de experimentos tiene distinta fundamentación y que en algunos de ellos se realizan manipulaciones accesorias, hemos creído conveniente analizar los datos obtenidos en forma separada.

V-3-2-1.- Bloqueo con gelatina de tipo Gr-Pr.-

En una primera serie de experiencias se estudió la relación existente entre la dosis de gelatina y el grado de bloqueo producido. Como bloqueante se utilizó una solución al 3% de gelatina tipo Gr-Pr.

Tabla V-3.- Valores del $T_{1/2}$ y de k , para coloides de 198-Au de tipo S-2, en presencia de diferentes dosis de gelatina tipo Gr-Pr.

Dosis de Gelatina agregada	Dosis de oro	Diámetro medio	N_{op}	$T_{1/2}$	k
mg/Kg	mg/Kg	Å	$\times 10^{10}$	min	min^{-1}
0.40	0.0432	247	27.6	2.0	0.347
0.64	0.0408	267	20.7	2.3	0.301
1.29	0.0408	267	20.7	2.5	0.277
2.58	0.0408	267	20.7	3.4	0.204
5.00	0.0209	280	9.38	6.0	0.115
10.65	0.0408	267	20.7	11.0	0.063
18.48	0.114	266	59.7	14.5	0.048
19.74	0.121	266	63.2	16.5	0.042
24.0	0.203	267	103	22.0	0.032
25.0	0.0432	247	27.6	29.3	0.024
26.4	0.105	267	53.2	17.5	0.040
28.1	0.121	247	77.3	19.5	0.036
34.1	0.105	266	55.0	25.0	0.028
57.8	0.050	266	26.1	38.0	0.018
85.9	0.376	266	192	53.0	0.013

Del análisis de estos valores se puede deducir que existe una pro-

proporcionalidad directa entre la dosis de gelatina inyectada y el $T_{1/2}$ observado para la desaparición del coloide de ^{198}Au de la sangre. Esta proporcionalidad ya fué observada por Murray y Katz, (281).

V-3-2-2.- Bloqueo con gelatinas de distinto punto isoelectrico.-

Posteriormente se utilizaron tres tipos diferentes de gelatina, identificadas como R-1, R-2 y R-3 en la tabla V-2. Dado que el peso molecular de las mismas era conocido, calculamos las dosis inyectadas, en mg de gelatina / Kg de animal, y en número de moléculas de gelatina / Kg de animal. Estos últimos valores han sido simbolizados con N_m/Kg en la tabla V-4, en la que figuran los resultados obtenidos en estas experiencias.

Tabla V-4.- Valores del $T_{1/2}$ y de k, para coloides de ^{198}Au de tipo S-2, en presencia de diferentes dosis de gelatina de tipo R-1, R-2 y R-3.-

Dosis de gelatina agregada	Tipo	pHi	N_m/Kg	Dosis de oro	2 a	N_{op}	$T_{1/2}$	k
mg/Kg	-	-	$\times 10^{15}$	mg/Kg	$^{\circ}$ A	$\times 10^{10}$	min	min^{-1}
1.67	R-1	4.4	1.66	0.0943	247	60.6	3.1	0.224
5.16	R-1	4.4	5.13	0.0408	267	20.7	6.5	0.107
9.30	R-1	4.4	9.25	0.443	292	171	8.5	0.082
9.30	R-1	4.4	9.25	0.443	292	171	11.0	0.063
9.50	R-1	4.4	9.45	0.452	292	175	13.0	0.053
16.45	R-1	4.4	16.40	0.698	267	355	21.0	0.033
19.40	R-1	4.4	19.30	0.335	267	170	17.5	0.040
22.7	R-1	4.4	22.6	0.201	247	129	22.0	0.031
23.5	R-1	4.4	23.4	0.027	280	11.2	18.0	0.039
24.3	R-1	4.4	24.2	0.173	292	66.5	15.0	0.046
25.6	R-1	4.4	25.5	0.101	267	51.0	21.0	0.033
26.3	R-1	4.4	26.2	0.165	292	63.3	23.5	0.030
40.0	R-1	4.4	39.8	0.109	266	56.6	26.0	0.027
8.6	R-2	6.8	18.9	0.412	292	159	6.0	0.115
9.1	R-2	6.8	20.0	0.020	280	8.3	2.0	0.347

Continuación de la Tabla V-4.-

Dosis de gelatina agregada	Tipo	pHi	N_m/Kg	Dosis de oro	2 a	N_{op}	$T_{1/2}$	k
mg/Kg	-	-	$\times 10^{15}$	mg/Kg	Å	$\times 10^{10}$	min	min^{-1}
9.55	R-2	6.8	21.0	0.022	280	8.9	2.6	0.267
9.55	R-2	6.8	21.0	0.016	280	6.7	4.0	0.173
22.8	R-2	6.8	50.2	0.162	292	62.5	14.0	0.050
23.2	R-2	6.8	51.0	0.412	292	159	11.0	0.063
24.3	R-2	6.8	53.5	0.434	292	167	17.5	0.040
25.0	R-2	6.8	55.0	0.245	247	156	14.0	0.050
10.0	R-3	9.2	12.7	0.186	292	71.8	2.1	0.330
10.0	R-3	9.2	12.7	0.165	292	63.3	1.9	0.365
10.0	R-3	9.2	12.7	0.175	292	67.7	3.2	0.217
20.2	R-3	9.2	25.7	0.119	247	76.5	6.7	0.103
21.7	R-3	9.2	27.6	0.161	247	103	10.1	0.067
24.7	R-3	9.2	31.4	0.119	247	76.5	8.0	0.087

El análisis de los resultados consignados en esta tabla lleva a conclusiones interesantes que conviene señalar. En primer lugar, nuevamente se comprueba una proporcionalidad directa entre la dosis de gelatina y el $T_{1/2}$ con que desaparece el coloide de $^{198}\text{-Au}$ de la sangre.

En segundo lugar, debe destacarse el hecho de que aparentemente el punto isoeléctrico de la gelatina utilizada como agente bloqueante tiene alguna influencia sobre el grado de bloqueo observado. Si se representa el $T_{1/2}$ de la desaparición de los coloides de $^{198}\text{-Au}$ de la sangre en función de la dosis agregada en exceso de las distintas gelatinas, expresadas en mg de gelatina / Kg de animal, se obtienen tres rectas de pendiente diferente. Sin embargo, cuando se hace la representación de los $T_{1/2}$ en función del número de moléculas de gelatina / Kg de animal, las rectas correspondientes a las gelatinas de punto isoeléctrico 6.8 y 9.2 se confunden en una sola.

Conviene destacar igualmente que el grado de bloqueo observado con la gelatina de tipo Gr-Pr es prácticamente idéntico al obtenido con la

gelatina de tipo R-1; se debe señalar que los puntos isoeléctricos de ambas sustancias son muy semejantes.

Cabe mencionar que hasta el presente no se habían observado estas diferencias en el grado de bloqueo de gelatinas de distinto punto isoeléctrico.

V-3-2-3.-

En la siguiente serie de experiencias hemos tratado de aclarar la incógnita relacionada con el σ_{c_1} en el que se ejerce la acción de la gelatina, problema ya señalado en el párrafo V-2.

Para ello hemos efectuado una serie de tres inyecciones sucesivas en el mismo animal, dejando que la actividad sanguínea descienda hasta hacerse prácticamente igual al fondo, después de cada una de ellas. En la primera inyección se administró el coloide de 198-Au protegido con gelatina, disuelto en solución de cloruro de sodio al 0.9%; en la segunda se agregó además una dosis bloqueante de gelatina. Fagocitado el coloide, se administró una tercera inyección que incluía nuevamente el coloide de 198-Au suspendido en solución de cloruro de sodio al 0.9%. Estos experimentos se realizaron con los cuatro tipos de gelatina referidos en la tabla V-2.

El esquema que sirvió de base a estas experiencias puede ser resumido de la siguiente forma: si la gelatina ejerce su acción bloqueante debido a una inhibición competitiva de las células de Kupffer, su efecto debiera mantenerse durante un tiempo apreciable, como lo han admitido también Koenig y col., (301); por lo tanto el $T_{1/2}$ observado en la tercera inyección sería comparable al determinado en la segunda.

Por otra parte, si la acción bloqueante de la gelatina se realizara a nivel plasmático, podría suponerse que el $T_{1/2}$ en la tercera inyección tendría que ser comparable al de la primera, admitiendo presuntivamente que la gelatina ya no se encuentra en el plasma sanguíneo en grado apreciable.

Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la Tabla V-5.

Tabla V-5.- Resultados obtenidos en las experiencias de tres inyecciones sucesivas, utilizando en la segunda de ellas, gelatinas de tipo Gr-Pr, R-1, R-2 y R-3.-

Experiencia	Dosis de gelatina agregada	Tipo	pHi	Dosis de oro	2 a	N _{op}	T _{1/2}	k
-	mg/Kg	-	-	mg/Kg	Å	$\times 10^{10}$	min	min ⁻¹
1-1	0	-	-	0.105	267	53.2	1.8	0.385
1-2	26.4	Gr-Pr	4.7	0.105	267	53.2	17.5	0.040
1-3	0	-	-	0.105	267	53.2	9.5	0.073
2-1	0	-	-	0.030	247	27.6	1.1	0.630
2-2	26.8	Gr-Pr	4.7	0.030	247	27.6	19.5	0.036
2-3	0	-	-	0.030	247	27.6	10.0	0.069
3-1	0	-	-	0.034	280	14.1	3.3	0.210
3-2	23.1	R-1	4.4	0.022	280	9.2	18.0	0.039
3-3	0	-	-	0.034	280	14.1	10.5	0.066
4-1	0	-	-	0.245	247	156	1.7	0.408
4-2	25.0	R-2	6.8	0.245	247	156	13.5	0.051
4-3	0	-	-	0.245	247	156	6.5	0.107
5-1	0	-	-	0.161	247	103	2.4	0.288
5-2	21.7	R-3	9.2	0.161	247	103	10.1	0.069
5-3	0	-	-	0.161	247	103	3.0	0.231
6-1	0	-	-	0.261	247	166	1.9	0.365
6-2	24.1	R-3	9.2	0.261	247	166	6.3	0.110
6-3	0	-	-	0.261	247	166	3.4	0.204

Nuevamente es posible observar una influencia del pHi de las gelatinas utilizadas, sobre el grado de bloqueo obtenido; pero el T_{1/2} en la tercera inyección no concuerda con ninguna de las posibilidades mencionadas previamente. Sin embargo resulta interesante mencionar que los

valores intermedios observados en la tercera inyección pueden ser explicados admitiendo cualquiera de los dos niveles de acción de la gelatina, ello si se hacen algunas suposiciones accesorias.

Si la acción bloqueante de la gelatina tiene lugar por inhibición competitiva de las células de Kupffer, es razonable admitir, basándose en las experiencias de Afifi y col., (302), que dicha acción se realiza durante la primera etapa de la fagocitosis, es decir cuando la gelatina y el oro coloidal compiten por el lugar de adsorción. Una vez que la molécula de gelatina ha sido englobada, podría eventualmente suponerse que la célula reticuloendotelial es capaz de adsorber una partícula de oro coloidal. Tampoco debe desestimarse la idea de una metabolización de la gelatina en el interior de la célula de Kupffer. Consideramos que una regeneración de las células reticuloendoteliales es poco probable, ya que el tiempo transcurrido entre la segunda y la tercera inyección es, como máximo, de tres horas.

Si, en cambio, se acepta que la gelatina actúa a nivel plasmático, los $T_{1/2}$ son perfectamente explicables, suponiendo que si bien la casi totalidad del coloide de 198-Au ha sido fagocitada, una parte de la gelatina circula todavía en el caudal sanguíneo, ejerciendo su acción bloqueante de acuerdo con la cantidad remanente. Esta hipótesis estaría corroborada por las determinaciones efectuadas por Koenig y col., (301), en las cuales se comprueba que el $T_{1/2}$ de la gelatina es más prolongado que el del coloide de 198-Au. En este sentido creemos que las experiencias citadas en este párrafo pueden considerarse como una prueba indirecta de aquellas determinaciones.

En caso de aceptarse la teoría de Murray (287), podría igualmente suponerse una regeneración parcial de las opsoninas.

V-3-2-4.- Pinzamiento de la vena porta.-

Con el fin de facilitar la consideración de esta serie de experiencias, es necesario admitir como hipótesis de trabajo, que la acción bloqueante se realiza primordialmente en el hígado, ya sea por inhibición competitiva de las células de Kupffer o por simple presencia de la gelatina en el plasma que llega al hígado.

Pensamos que sería posible obtener una confirmación de esta hipótesis, disminuyendo la cantidad de gelatina que llega específicamente al hígado. Para lograrlo, nos hemos valido del procedimiento de obstruir

la circulación en la vena porta, practicando un pinzamiento de la misma. Si bien esta manipulación no anula completamente la llegada de gelatina al hígado, la disminuye en forma notable. En este sentido conviene recordar las experiencias de Afifi y col., (302), referidas en el párrafo V-2.

Naturalmente el flujo de partículas de oro disminuye igualmente, pero el aumento del $T_{1/2}$ producido en este caso, resulta pequeño si se lo compara con el incremento debido a la inyección de un exceso de gelatina.

Esto se ha podido comprobar en experiencias preliminares, en las cuales se midió el $T_{1/2}$ con que desaparece un coloide de 198-Au de la sangre cuando la vena porta está cerrada mediante una pinza o no.

Por lo tanto, si la hipótesis de trabajo mencionada anteriormente es correcta, ante la presencia de un exceso de gelatina, debiera observarse un $T_{1/2}$ más corto con la vena porta obstruida por pinzamiento, que cuando este vaso está abierto.

Las experiencias realizadas en este sentido, han sido resumidas en la Tabla V-6.

La primera determinación ha sido realizada en una rata, mientras que en todas las demás se han utilizado conejos de 2 Kg aproximadamente.

Para efectuar el pinzamiento de la vena porta, se aisló, en primer lugar, una porción de la misma, inmediatamente anterior al hilio hepático. En el momento conveniente, el vaso fué pinzado mediante una pinza de Kocher cuyos extremos habían sido protegidos con material plástico, o alternativamente, con un hilo de lino grueso, que, pasado por debajo del vaso, se levantaba en el momento oportuno. Las operaciones en las cuales se había dañado inadvertidamente el hígado o algún vaso sanguíneo vecino, fueron desechadas. La región abdominal abierta, fué mantenida mojada con algodón embebido en solución de cloruro de sodio al 0.9%, tibia.

En la cuarta columna de la Tabla V-6, que corresponde a la vena porta, se ha indicado con una P, cuando la determinación se realiza con el vaso obstruido por pinzamiento; cuando el mismo está abierto, se lo in-

gica con la letra A:

El punto isoelectrico de la gelatina utilizada como agente bloqueante era de 4.7 en todos los casos.

Tabla V-6.- Resultados logrados en las experiencias de pinzamiento de la vena porta.-

Expe- riencia	Dosis de gelatina agregada	Dosis de oro	Vena orta	2 a	N _{op}	T _{1/2}	k
-	mg/Kg	mg/Kg	-	$\frac{\circ}{\Delta}$	$\times 10^{10}$	min	min ⁻¹
1-1	0	0.073	P	292	28.2	3.7	0.187
1-2	17.4	-	P	-	-	5.7	0.122
1-3	0	-	A	-	-	21.0	0.033
2-1	15.0	0.433	P	210	464	5.9	0.117
2-2	0	-	A	-	-	12.1	0.057
3-1	20.0	0.115	P	210	124	1.9	0.365
3-2	0	-	A	-	-	7.0	0.099
4-1	0	0.231	A	210	257	1.3	0.532
4-2	12.0	0.231	P	210	257	1.4	0.495
4-3	0	-	A	-	-	9.0	0.077
4-4	0	0.058	A	210	63.9	5.8	0.120

Los resultados expuestos son dificiles de analizar desde un punto de vista estrictamente cuantitativo, debido a la relativamente escasa cantidad de determinaciones y a las variaciones observadas en los valores obtenidos.

A pesar de ello es evidente que los resultados logrados sugieren que el $T_{1/2}$ efectivamente es menor cuando se impide la entrada de la gelatina al hígado por vía portal, observándose un aumento neto de aquel valor cuando dicha sustancia es admitida por esa vía. Esta demostración hace necesario aceptar la suposición de que la gelatina debe llegar al hígado por vía portal para ejercer su acción bloqueante.

V-3-2-5.- Bloqueo de coloides de 198-Au protegidos con gelatina o con PVP mediante una de estas sustancias agregadas en exceso.-

Por último hemos realizado una serie de experiencias en las cuales se ha investigado la posibilidad de obtener el fenómeno de bloqueo del SRE, con sustancias de naturaleza distinta a la del agente que estabiliza los coloides de 198-Au .

Para ello, hemos utilizado los coloides de 198-Au consignados en la tabla V-1, soluciones al 10% de las gelatinas de tipo Gr-Pr y R-3 y una solución al 20% de Kollidon-25.

Hemos trabajado con conejos cuya masa oscilaba alrededor de 2 Kg.

El motivo para realizar estas experiencias surge de varias observaciones efectuadas por otros autores.

En primer lugar, cabe señalar que la necesidad de que el agente bloqueante sea igual a la sustancia estabilizante para que se produzca el bloqueo, no es una conclusión inmediata de las experiencias referidas por Murray, (287). Las determinaciones de Wagner e Iio, de Normann y Benditt y de Afifi y col., ya mencionadas, confirman la necesidad de analizar esta generalización con cuidado.

En nuestras experiencias consideramos de especial interés el estudio de la posibilidad de demostrar el bloqueo del sistema reticuloendotelial con coloides de 198-Au protegidos con PVP, cuando se inyecta un exceso de esta sustancia o de gelatina.

Los resultados obtenidos se han resumido en la Tabla V-7. Debido al conocimiento del peso molecular medio de la polivinilpirrolidona utilizada, hemos calculado asimismo el número de moléculas de esta sustancia administradas por Kg de animal.

Tabla V-7.- Resultados obtenidos en las experiencias de bloqueo de coloides de 198-Au protegidos con gelatina o con PVP. mediante la inyección de un exceso de una u otra de estas sustancias.-

Expe- riencia	Bloqueante	Dosis del bloqueante	N_m / Kg del bloqueante	Estabili- zante	Dosis de oro	N_{op}	$T_{1/2}$	k
-	-	mg / Kg	$\times 10^{17}$	-	mg/Kg	$\times 10^{10}$	min	min^{-1}
1-1	-	-	-	Gelatina Gr-Pr	0.0215	22.9	1.8	0.385
1-2	PVP	7.8	1.88	Gelatina Gr-Pr	0.0215	22.9	1.7	0.408
1-3	Gelatina Gr-Pr	7.8	-	Gelatina Gr-Pr	0.0215	22.9	7.0	0.099
2-1	-	-	-	PVP	0.09	40.9	2.0	0.347
2-2	PVP	100.0	24.0	PVP	0.09	40.9	2.4	0.288
2-3	Gelatina Gr-Pr	50.0	-	PVP	0.09	40.9	5.5	0.126
2-4	Gelatina Gr-Pr	50.0	-	PVP	0.09	40.9	4.5	0.154
2-5	PVP	50.0	12.0	PVP	0.90	409	2.4	0.288

Continuación de la Tabla V-7.-

Experiencia	Bloqueante	Dosis del bloqueante mg / Kg	N _m / Kg del bloqueante x 10 ¹⁷	Estabilizante	Dosis de oro mg/Kg	2 a	N _{op} x10 ¹⁰	T _{1/2} min	k min ⁻¹
-	-	-	-	-	-	A	-	-	-
3-1	-	-	-	PVP	0.09	279	40.9	2.0	0.347
3-2	PVP	50.0	12.0	PVP	0.09	279	40.9	2.6	0.267
3-3	Gelatina Gr-Pr	50.0	-	PVP	0.09	279	40.9	5.0	0.139
3-4	-	-	-	PVP	0.09	279	40.9	2.6	0.267
4-1	-	-	-	PVP	0.08	279	36.3	2.0	0.347
4-2	PVP	44.2	10.6	PVP	0.08	279	36.3	1.4	0.495
4-3	Gelatina Gr-Pr	44.2	-	PVP	0.043	279	21.8	7.5	0.0925
4-4	-	-	-	PVP	0.08	279	36.3	2.2	0.315
4-5	Gelatina R-3	13.3	0.168	PVP	0.032	279	14.5	4.5	0.154
4-6	-	-	-	PVP	0.08	279	36.3	2.2	0.315

De los resultados expuestos se desprenden varias observaciones importantes. La PVP no bloquea la fagocitosis de coloides de 198-Au protegidos con gelatina, y, aun a dosis elevadas, (hasta 100 mg de PVP / Kg de animal), no bloquea tampoco a dispersiones estabilizadas con PVP.

Hemos logrado bloquear la fagocitosis de coloides de 198-Au protegidos con PVP, inyectando un exceso de gelatina de tipo Gr-Pr, (experiencias 2-3, 2-4, 3-3 y 4-3) y R-3, (experiencia 4-5), todas de la tabla V-7, si bien la magnitud del fenómeno es menor que con coloides de 198-Au estabilizados con gelatina.

Hemos intentado reproducir el "fenómeno de oasa". En experiencias previas efectuadas con coloides de 198-Au protegidos con gelatina de pH igual a 4.7, lo habíamos obtenido inyectando gelatina de iguales características aproximadamente 20 minutos después de la inyección de oro coloidal radiactivo. Sin embargo, en este caso, cuando se utilizan soles de 198-Au estabilizados con PVP, los resultados fueron completamente negativos con PVP, y con gelatinas de pH 4.7 y 9.2, inyectadas 6, 13 y 26 minutos después de administrado el coloide, respectivamente.

En las experiencias mencionadas en este párrafo es necesario destacar que, cuando se inyecta una dispersión del coloide de 198-Au protegido con PVP, diluida en una solución de cloruro de sodio al 0.9%, después de haber obtenido el bloqueo con gelatina, los $T_{1/2}$ observados son normales, (experiencias 3-4, 4-4 y 4-6 de la tabla V-7). Esto último se observa aun en presencia de un exceso de PVP en la experiencia 2-5 de la misma tabla. Estos experimentos indican que en este caso la gelatina actuaría a nivel plasmático.

La experimentación referida en este párrafo permite comprobar además, que el coloide de 198-Au, crecido, protegido con PVP, puede reemplazar perfectamente a los soles del mismo tipo estabilizados con gelatina, en determinaciones clínicas del flujo sanguíneo hepático en seres humanos.

Al respecto cabe señalar que, en el Centro de Medicina Nuclear y en colaboración con los Doctores V. Pecorini y J. Martínez - Seeber, ya lo hemos aplicado con ese objeto, obteniendo resultados satisfactorios en determinaciones preliminares.

V-4. - DISCUSION. -

La primera hipótesis formulada para interpretar el mecanismo por el que se produce el bloqueo de la fagocitosis de coloides de ^{198}Au protegidos con gelatina, frente a un exceso de dicha sustancia, se debe a Murray y Katz (281). En ella se postula la formación de un complejo entre ciertas proteínas plasmáticas y el radiocoloide estabilizado con gelatina. La presencia de un exceso de este compuesto favorecería la estabilidad de aquella unión y por lo tanto se prolongaría la permanencia del coloide en la sangre. De ser correcta esta interpretación, debería ser posible demostrar la formación de un complejo de la naturaleza mencionada.

Las experiencias de Simon, (282), Murray, (283) y de Bontoux, (284), no permiten aceptar en forma concluyente la existencia de dicho complejo "in vivo". Por otra parte, COHEN y col., 1965, (312) han demostrado mediante electroforesis sobre cellogel, que los coloides de ^{198}Au protegidos con gelatina, aislados, poseen la misma movilidad que cuando están mezclados o incubados con proteínas séricas o presentes en el suero de animales inyectados con estos radiocoloides.

De estos experimentos se deduce que, si bien la formación del complejo en cuestión es posible, ésto no ha podido ser demostrado en forma indubitable. En nuestra opinión y con los conocimientos actuales, la hipótesis de Murray y Katz (281), no puede aceptarse.

Posteriormente, Murray, (287) sugirió que el bloqueo del SRE podría explicarse en base a un agotamiento de las opsoninas circulantes o del depósito de estas sustancias (288). De ser correcta esta suposición, debería observarse una disminución neta en el grado de bloqueo, cuando se inyectan partículas coloidales previamente opsonizadas. Esto fue comprobado únicamente en las experiencias realizadas por Filkins y Di Luzio, (292). Consideramos que, en las mismas, no se debe desestimar la posibilidad de un cambio en las propiedades superficiales de las partículas coloidales, lo que podría explicar la ausencia de bloqueo. Por el contrario, Biozzi y col., (298) y Koenig y col., (301), demostraron que la opsonización de las partículas de oro coloidal no anula el efecto bloqueante de la gelatina "in vivo".

En algunas de nuestras experiencias, la gelatina se administró inmediatamente después del coloide, observándose que el bloqueo se produ-

gía apenas finalizada la inyección del agente bloqueante y con la intensidad habitual. Resulta difícil aceptar que el agotamiento de las opsoninas circulantes o el depósito de estas sustancias, pueda producirse en un plazo tan breve.

Recordemos también que, para formular su hipótesis, Murray tuvo en cuenta fundamentalmente sus observaciones experimentales, en las cuales solamente se producía el bloqueo cuando las propiedades superficiales de ambos coloides eran iguales. Nuestras experiencias referidas en el párrafo V-3-3-5, así como las ya mencionadas, realizadas por otros autores, demuestran claramente que esta premisa no se cumple en forma general.

Por todo lo dicho, creemos conveniente desestimar también la hipótesis propuesta por Murray, (287)(288).

La interpretación que supone una inhibición competitiva de las células de Kupffer, para explicar la acción bloqueante de un exceso de gelatina, debida a Benacerraf y col., (293), tiene mayor apoyo experimental.

En principio, nos parece razonable admitir que la gelatina actúa a nivel hepático, dados los resultados obtenidos en nuestras experiencias de pinzamiento de la vena porta y los logrados por Afifi y col., (302) y por Biozzi y col., (298). Sin embargo, no estamos completamente de acuerdo con la idea de una inhibición competitiva. Esto implicaría aceptar que la gelatina inyectada en exceso, aun con posterioridad a la administración del coloide de 198-Au, se adsorbería sobre las células fagocitarias antes que las partículas coloidales, inhibiendo por lo tanto la adsorción de éstas últimas. La prolongada permanencia de la gelatina en el plasma sanguíneo, así como el hecho de que no se observa el bloqueo al perfundir con coloides de 198-Au el hígado de un animal que ha recibido un exceso de gelatina, se oponen a este criterio. Con el fin de comprobar una eventual acción bloqueante de la PVP, se inyectaron dosis relativamente elevadas de esta sustancia, la cual según MAURER y col., 1955, (313) se localiza en el hígado. En este caso, resulta muy difícil aceptar la ausencia de bloqueo, si se supone que la acción bloqueante se debe a una inhibición competitiva de las células de Kupffer.

Teniendo en cuenta lo expresado, estimamos que la hipótesis formulada por Benacerraf y col., (293) no es aplicable en términos generales.

Hasta el momento la interpretación más aceptable y amplia es la propuesta por Koenig y col., (301). No hemos podido hallar en las experiencias de otros autores o en las nuestras, evidencias que contradigan su hipótesis. Incluso, consideramos que nuestra labor experimental se complementa con la realizada por Koenig y col. Sin embargo, estos autores, no formulan ninguna suposición acerca del lugar específico o el mecanismo de la acción bloqueante de la gelatina.

Teniendo en cuenta los resultados de nuestras experiencias de pinzamiento de la vena porta, así como los obtenidos por Afifi y col., (302) y por Benacerraf y col., (293), creemos posible postular que la acción bloqueante del exeso de gelatina se realiza a nivel hepático, durante la primera etapa de la fagocitosis. La rapidez con que se produce el fenómeno, el $T_{1/2}$ elevado de la gelatina en sangre, así como la necesidad de que esta sustancia se encuentre en el caudal sanguíneo para ejercer su acción bloqueante, aparentemente se oponen a lo expresado. Esta contradicción puede explicarse si se supone que la gelatina actúa en el momento en que llega por vía portal a los sinusoides hepáticos, donde se encuentran las células de Kupffer, disminuyendo de alguna manera la capacidad fagocitaria de las mismas, aun sin necesidad de unirse a ellas.

Podría suponerse que dicha acción se efectúa por intermedio de alguno de los factores plasmáticos citados en el párrafo V-2. En este sentido conviene señalar las experiencias de Normann y Benditt (290), que hasta el momento parecen haber logrado los resultados más aceptables; sin embargo éstos podrían invalidarse si se supone que la adsorción del factor plasmático aislado, sobre las partículas de carbón, altera las propiedades superficiales de las mismas en forma tal, que se impide el bloqueo por esta circunstancia. De todas maneras, la consideración de esta alternativa requiere un estudio más cuidadoso, por lo que no será tenida en cuenta en lo que sigue.

Las experiencias referidas en el párrafo V-3-2-2, demuestran que la capacidad bloqueante de gelatinas de distinto punto isoeléctrico, no es la misma; puede pensarse que las diferencias observadas sean atribuibles a una distinta estructura molecular de dichos agentes. Pero para ello, la especificidad de las células reticuloendoteliales, con respecto a la naturaleza química de las sustancias que fagocitan, debería ser muy marcada. Las pruebas experimentales aportadas en este capítulo, así como las ya mencionadas de otros autores, permiten desestimar este criterio.

En nuestra opinión, las experiencias del párrafo V-3-2-2 hacen más razonable suponer que las cargas de las moléculas de gelatina intervienen en el fenómeno de bloqueo. Al respecto conviene recordar las observaciones de de Robertis y col., (230, pag. 489) concernientes a la influencia de factores electrostáticos sobre la adsorción de partículas coloidales en las células del SRE. Por otra parte, al pH sanguíneo, el coloide de 198-Au y las gelatinas de tipo Gr-Pr y R-1, de mayor efecto bloqueante, poseen una carga neta negativa; la gelatina de tipo R-2 prácticamente se encuentra en su punto isoeléctrico, mientras que la R-3, presenta una carga neta positiva. Consecuentemente, podría aceptarse que las moléculas de gelatina que llegan al nivel de las células fagocitarias hepáticas por vía portal, provocarían una alteración en las mismas, que disminuiría su capacidad para adsorber partículas de oro; en este efecto, las cargas negativas de las moléculas bloqueantes tendrían papel preponderante, ya que las gelatinas con cargas netas de este signo poseen una acción marcadamente superior a las de tipo R-2 y R-3.

Los resultados consignados en el párrafo V-3-2-5 ofrecen algunas comprobaciones adicionales, que sustentan la hipótesis formulada previamente. Maurer y col., (313) han demostrado que la administración prolongada de altas dosis de PVP, provoca la disminución del nivel de anticuerpos en el suero de conejos. TOYAMA, 1965, (314) ha observado que cantidades muy elevadas de PVP producen una severa linfocitopenia, así como el bloqueo y colapso de los folículos linfáticos, a pesar de lo cual el hígado no presenta cambios histológicos aparentes. Considerando las experiencias de TOTHILL, 1965, (315), puede admitirse que el comportamiento biológico de la PVP, principalmente la de bajo peso molecular, es apreciablemente diferente al de la gelatina, en lo que se refiere a su permanencia en el caudal sanguíneo.

Si la hipótesis de Murray o la de Benacerraf y col. fuese correcta, debería observarse que la PVP bloquea la fagocitosis de coloides de 198-Au estabilizados con esta sustancia. Sin embargo, hemos comprobado que éste no es el caso, aun con dosis relativamente elevadas de PVP. La causa de este hecho, podría atribuirse a que la molécula de PVP no posee cargas inherentes a su estructura química, tal como las presenta la gelatina debido a su carácter protéico. Aun más importante es la verificación de que la gelatina ejerce un efecto bloqueante frente a coloides de 198-Au estabilizados con PVP, si bien la magnitud del fenómeno es menor

a la observada con coloides protegidos con gelatina. Esta verificación experimental, que se opone a la interpretación de Murray (287), puede explicarse igualmente si se admite el mecanismo de cargas propuesto.

Al formular la hipótesis expuesta, no pretendemos haber adelantado una explicación completa o única del mecanismo por el cual se produce el bloqueo del SRE en las condiciones por nosotros estudiadas. Los experimentos realizados, así como las conclusiones que emanan de sus resultados, constituyen solamente un intento destinado a explicar ciertos hallazgos contradictorios. Podría suponerse, por otra parte, que fueran varios los factores que intervienen al mismo tiempo en la producción del fenómeno. En este sentido conviene mencionar la posibilidad de considerar el SRE como un sistema multicompartamental, sugerida por los trabajos de SCHAPIRO y col., 1966, (316) y de CARRAZ y FIORINA, 1967, (317).

Para lograr una interpretación del mecanismo íntimo del bloqueo del SRE se requieren más aportes experimentales, incluyendo la utilización de métodos de otro tipo. Considerando las experiencias de Wiener y col., (303) y de Lemperle, (304), estimamos que resultaría de interés la investigación del papel de las membranas de las células fagocitarias en el bloqueo. Para ello sería de utilidad realizar observaciones seriadas de las células de Kupffer en distintas condiciones experimentales, y en especial, de sus membranas, en el microscopio electrónico. PAPADIMITROU, 1966, (318) ha observado de esta manera que las membranas de diversas células fagocitarias sufren cambios estructurales cuando un virus o una bacteria se aproxima a ellas o entra en su contacto. Asimismo, BRANDT y FREEMAN, 1967, (319) demostraron un aumento en el espesor y una disminución en la resistencia eléctrica de las membranas de la ameba "chaos - chaos", fenómenos éstos, correlacionados con el de la pinocitosis.

Por último consideramos conveniente aclarar que en nuestros experimentos hemos estudiado únicamente los efectos inmediatos producidos por el agente bloqueante.

Sin embargo puede decirse que no hemos comprobado la existencia de un periodo de latencia en la inducción del bloqueo, como fué observado por Parker y Finney, (266).

La técnica experimental empleada por nosotros, posee las ventajas ya señaladas en el capítulo anterior, aunque la misma no siempre es com-

parable a la de algunos otros autores. Por lo tanto consideramos necesario ser muy cuidadosos en la generalización de nuestras observaciones, las que deben considerarse válidas solamente para las condiciones experimentales empleadas por nosotros o aquéllas que pueden aceptarse como equivalentes.

- o - o - o - o -

CAPITULO VI

CONCLUSIONES Y RESUMEN

VI-1.- CONCLUSIONES.-

1) Se propone un procedimiento espectrofotométrico basado en la teoría de Mie, para la determinación del tamaño medio de las partículas y de la concentración en oro, de coloides de oro radiactivo (198-Au).

El método propuesto es aplicable a coloides de 198-Au cuyas partículas poseen un diámetro medio igual o menor que 30 μ .

Se comparan los valores obtenidos mediante aplicación de este método, con los logrados por la microscopía electrónica y el análisis radiométrico; se comprueba una concordancia satisfactoria en los resultados.

2) Se propone el empleo de la polivinilpirrolidona (PVP) como protector en la preparación de coloides de 198-Au. Se comprueba que dicho agente posee propiedades ventajosas con respecto a la gelatina, corrientemente utilizada.

3) Se estudia el comportamiento biológico de los radiocoloides de oro, en ratones; estas experiencias, así como los ensayos centellográficos realizados en seres humanos, permiten establecer que las dispersiones crecidas protegidas con PVP, podrían reemplazar con ventaja a los soles del mismo tipo estabilizados con gelatina, en sus aplicaciones médicas y biológicas.

4) El estudio de la desaparición de los coloides de 198-Au del caudal sanguíneo, demuestra que el valor del período de semidesaparición y el orden del proceso, dependen del número de partículas inyectadas y no de su tamaño.

La cinética de la fagocitosis de estas partículas está regida por ecuaciones del tipo de las propuestas por Michaelis y Menten para las reacciones enzimáticas, planteadas en función del número de partículas / Kg de animal.

5) Se estudia el bloqueo del Sistema Reticuloendotelial para la fagocitosis de coloides de ^{198}Au estabilizados con gelatina, en presencia de un exceso de este agente.

Se explica el fenómeno suponiendo una disminución de la capacidad fagocitaria de las células de Kupffer, inducida por las moléculas de gelatina que llegan a ellas por vía portal.

Este criterio permite unificar las hipótesis formuladas previamente por otros autores y explicar las contradicciones observadas.

BIBLIOGRAFIA

- (1) GRAHAM, Th.: Liquid Diffusion applied to Analysis.- Phil. Trans.: 151, 183 - 224, 1861.-
- (2) OSTWALD, Wo.: Die Welt der vernachlässigten Dimensionen.- Theodor Steinkopff Verlag, Dresden und Leipzig, 1921.-
- (3) STAUDINGER, H.: Organische Kolloidchemie.- Dritte Auflage, Vieweg - Braunschweig, 1950.-
- (4) ZSIGMONDY, R.: Die hochrote Goldlösung als Reagens auf Kolloide.- Z. f. Analyt. Chem.: 40, 697 - 719, 1901.-
- (5) SCHNEIDER, V.: Das Radiogold (Au-198) in der Medizin. Eine Literaturübersicht 1958 - 1962.- Kernforschungszentrum Karlsruhe, KFK - 143, Mai 1963.-
- (6) TAPLIN, G.V., JOHNSON, D.E., DORE, E.K. and KAPLAN, H.S.: Lung Photoscans with macroaggregates of Human Serum Radioalbumin.- Health Phys.: 10, 1219 - 1227, 1964.-
- (7) DE PAOLI, T., HAGER, A., NICOLINI, J.O. and RADICELLA, R.: Albumin Macroaggregates Labelled with ^{99m}Tc - To.- Int. J. Appl. Rad. & Isotopes: 17, 551- 554, 1966
- (8) SIEDENTOPF, H. und ZSIGMONDY, R.: Ueber Sichtbarmachung und Größensbestimmung Ultramikroskopischer Teilchen mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser.- Ann. Phys.: 10, 1 - 39, 1903.-
- (9) GENIN, G.: Osmose, Dialyse, Ultrafiltration.- Dunod, Paris, 1928.-
- (10) JIRGENSONS, B. and STRAUMANIS, M.E.: A short Textbook of Colloid Chemistry.- Second and Enlarged Edition, Pergamon Press, Oxford, 1964.-
- (11) HOLLIDAY, A.K.: Effect of Dialysis on the properties of nuclear gold sols.- Trans. Faraday Soc.: 43, 661 - 667, 1947.-
- (12) van't HOFF, J.H.: Die Rolle des Osmotischen Druckes in der Analogie zwischen Lösungen und Gasen.- Z. Physik. Chem.: 1, 481 - 508, 1887,-
- (13) OSTWALD, Wo. und MUENDLER, K.: Ueber Osmose und Quellung disperser Systeme.- Koll. Zeitschr.: 24, 7 - 27, 1919.-
- (14) ZSIGMONDY, R.: Kolloidchemie.- Fünfte Auflage, Otto Spangner, Leipzig, 1927.-
- (15) ZSIGMONDY, R. und THIESSEN, P.A.: Das kolloide Gold.- Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1925.-

- (16) FINDLAY, A.: Der Osmotische Druck.- Theodor Steinkopff Verlag, Dresden und Leipzig, 1914.-
- (17) SCHERRER, P.: Bestimmung der Grösse und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen.- Nachr. Kgl. Ges. Wiss. Gött., Math. u. Phys.: 1, 1, 1918.-
- (18) JONES, P.W.: Measurement of Particle Size by the X-ray method.- Proc. Roy. Soc.: A-166, 16 - 43, 1938.-
- (19) MILLIGAN, W.O. and MORRISS, R.H.: Morphology of Colloidal Gold. A Comparative Study.- J. Am. Chem. Soc.: 86, 3461 - 3467, 1964.-
- (20) SPROULL, W.T.: X-Rays in Practice.- Mc.- Graw - Hill Book Co., New York, London, 1946.-
- (21) DEBYE, P. und MÖNCKE, H.: Ergebnisse der technischen Röntgenforschung.- Fortschritte der Röntgenforschung: 2, 1, 1931.-
- (22) SHULL, C.G. and ROESS, L.C.: X-ray Scattering at Small angles by finely divided solids. General approximate theory and applications.- J. Appl. Phys.: 18, 295 - 307, 1947.-
- (23) TURKEVICH, J., HUBBELL, H.H. and HILLIER, J.: Electron Microscopy and Small Angle X-Ray Scattering.- Disc. Faraday Soc.: 8, 348 - 352, 1950.-
- (24) TURKEVICH, J. and HUBBELL, H.H.: Low Angle X-Ray Diffraction of Colloidal Gold and Carbon Black.- J. Am. Chem. Soc.: 73, 1 - 7, 1951.-
- (25) SUITO, E., UYEDA, N. and KATSUMI, M.: The Measurement of the Size of the Colloidal Particle by the Ultracentrifugal method and Electron Microscopy.- Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.: 36, 197 - 205, 1958.-
- (26) BECHHOLD, H. und SCHLESINGER, M.: Die Grössenbestimmung von subvisiblen Virus durch Zentrifugieren.- Biochem. Zeitschr.: 236, 387 - 414, 1931.-
- (27) ZILVERSMIT, D.B., BOYD, G.A. and BRUGER, M.: The preparation and particle Size Measurement of monodisperse radioactive Gold Colloids.- J. Lab. & Clin. Med.: 40, 261-266, 1952.-
- (28) ZEMLITSKII, E.Ya.: A new method of dispersion analysis by Centrifugation.- Coll. J.: 27, 150 - 154, 1965.- Trad. Koll. Zh.: 27, 186 - 192, 1965.-
- (29) GIRARDI, F. e PIETRA, R.: Analisi delle dimensioni di particelle di oro colloidale radioattivo mediante centrifugazione.- Min. Nucl.: 5, 97 - 101, 1961.-
- (30) ANGOSO - MARINA, M.: Fosfatos Coloidales de Cromo con Fósforo-32.- An. R. Soc. Esp., Fis. y Quim.: 60-B, 381 - 390, 1964.-

- (31) BEISCHER, D. und KRAUSE, F.: Das Elektronenmikroskop als Hilfsmittel der Kolloidforschung.- Naturwiss.: 25, 825 - 829, 1937.-
- (32) v. BORRIES, B. und KAUSCHE, G.A.: Die Ultramikroskopische Bestimmung der Partikelform und Grösse von kolloidem Gold.- Koll. Zeitschr.: 90, 132 - 141, 1940.-
- (33) ANDERSON, T.F.: The Study of Colloids with the Electron Microscope.- Adv. Coll. Res.: 1, 353 - 390, 1942.-
- (34) TURKEVICH, J. and HILLIER, J.: Electron Microscopy of Colloidal Systems.- Anal. Chem.: 21, 475 - 485, 1949.-
- (35) TURKEVICH, J., STEVENSON, P.C. and HILLIER, J.: A Study of the nucleation and growth processes in the Synthesis of Colloidal Gold.- Disc. Faraday Soc.: 11, 55 - 75, 1951.-
- (36) TURKEVICH, J., STEVENSON, P.C. and HILLIER, J.: The formation of Colloidal Gold.- J. Phys. Chem.: 57, 670 - 673, 1953.-
- (37) TAKIYAMA, K.: Formation and Aging of Precipitates. VIII.- Formation of monodisperse Particles. Gold Sol Particles by Sodium Citrate Method.- Bull. Chem. Soc. Japan: 31, 944 - 950, 1958.-
- (38) BURTON, E.F., SENNET, R.S. and ELLIS, S.G.: Specimen Changes due to electron bombardment in the electron microscope.- Nature: 160, 565, 1947.-
- (39) STOEBER, W.: Statistical Size distribution Analysis.- Lab. Invest.: 14, 892 - 908, 1965.-
- (40) COOPER, W.D., CRAIK, D.J. and PARFITT, G.D.: Analysis of Particle Size Distribution in Colloidal Dispersions by Electron Microscopy.- Koll. Zeitschr. u. Zeitschr. f. Polym.: 205, 108 - 111, 1965.-
- (41) FISCHER, E.A.: Colloidal Dispersions.- J. Wiley and Sons, Inc., New York, 1950.-
- (42) MARON, S.H., MOORE, C. and POWELL, A.S.: Electron Microscopy of Synthetic Lattices.- J. Appl. Phys.: 23, 900 - 905, 1952.-
- (43) MARON, S.H. and ELDER, M.E.: Determination of Latex Particle Size by Light Scattering. I.- Minimum Intensity Method.- J. Coll. Sci.: 18, 107 - 118, 1963.-
- (44) ESPENSCHIED, W.F., KERKER, M. and MATIJEVIC, E.: Logarithmic Distribution Functions for Colloidal Particles.- J. Phys. Chem.: 68, 3093 - 3097, 1964.-
- (45) HONIG, E.P.: Logarithmic Distribution Function for Colloidal Particles.- J. Phys. Chem.: 69, 4418 - 4419, 1965.-
- (46) FARADAY, M.: Experimental Relations of Gold (and other Metals) to Light.- Phil. Mag.: 14, 407 - 417; 512 - 539, 1857.-

- (47) TYNDALL, J.: On the blue colour of the Sky, the Polarisation of Skylight and on the Polarisation of Light by Cloudy Matter generally.- Phil. Mag.: 37, 384 - 394, 1869.-
- (48) STRUTT, J.W. (Lord Rayleigh): On the Light from Sky, its Polarisation and Colour. On the Scattering of Light by Small Particles.- Phil. Mag.: 41, 107 - 120; 447 - 454, 1871.-
- (49) OSTWALD, W.: Licht und Farbe in Kolloiden.- Theodor Steinkopff Verlag, Dresden und Leipzig, 1924.-
- (50) HELLER, W.: Theoretical Investigation on the Light Scattering of Spheres. XVI.- Range of Practical Validity of the Rayleigh Theory.- J. Chem. Phys.: 42, 1609 - 1615, 1965.-
- (51) van de HULST, H.C.: Light Scattering by Small Particles.- J. Wiley & Sons, New York, 1957.-
- (52) OSTER, G.: The Scattering of Light and its applications to chemistry.- Chem. Rev.: 43, 319 - 365, 1948.-
- (53) OSTER, G.: Light Scattering.- in Weissberger, A. (Editor): Physical Methods of Organic Chemistry, Part III.- Interscience Publ. New York, 2107 - 2145, 1960.-
- (54) KERKER, M.: Electromagnetic Scattering.- Pergamon Press, Oxford, 1963.-
- (55) EHRENHAFT, F.: Die diffuse Zerstreung des Lichtes an kleinen Kugeln, (Ultramikroskopische Studie).- Sitz. Ber. Akad. Wiss. Wien: 114, 1115 - 1141, 1905.-
- (56) MAXWELL - GARNETT, J.C.: Colours in metal glass and in metallic films.- Trans. Roy. Soc. London: A-203, 385 - 420, 1904.-
- (57) MAXWELL - GARNETT, J.C.: Colours in metallic films and in metallic solutions.- Trans. Roy. Soc. London: A-205, 237 - 288, 1906.-
- (58) DEBYE, P.: Der Lichtdruck auf Kugeln von beliebigem Material.- Ann. Phys.: 30, 57 - 136, 1909.-
- (59) GANS, R.: Ueber die Form Ultramikroskopischer Goldteilchen.- Ann. Phys.: 37, 881 - 900, 1912.-
- (60) MIE, G.: Die optischen Eigenschaften kolloider Goldlösungen.- Zeitschr. f. Chem. u. Ind. Koll.: 2, 129 - 133, 1907.-
- (61) MIE, G.: Beitrag zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen.- Ann. Phys.: 25, 377 - 445, 1908.-
- (62) STEUBING, W.: Ueber die optischen Eigenschaften kolloidaler Goldlösungen.- Ann. Phys.: 26, 329 - 371, 1908.-

- (63) MARON, S.H., PIERCE, P.E. and ELDER, M.E.: Determination of Latex Particle Size by Light Scattering. VI.- Minima and maxima in the angular dependence of the polarisation ratio.- J. Coll. Sci.: 19, 591 - 601, 1964.-
- (64) KERKER, M., DABY, E., COHEN, G.L., KRATOHVIL, J. and MATIJEVIC, E.: Particle Size Distribution in La Mer Sulfur Sols.- J. Phys. Chem.: 67, 2105 - 2111, 1963.-
- (65) KERKER, M., MATIJEVIC, E, ESPENSCHIED, W.F., FARONE, W.A. and KITANI, S.: Aerosol Studies by Light Scattering. I.- Particle Size Distribution by Polarisation Method.- J. Coll. Sci.: 19, 213 - 222, 1964.-
- (66) ESPENSCHIED, W.F., MATIJEVIC, E. and KERKER, M.: Aerosol Studies by Light Scattering. III.- Preparation and particle size analysis of Sodium Chloride aerosols of narrow size distribution.- J. Phys. Chem.: 68, 2831 - 2842, 1964.-
- (67) NAKAGAKI, M. and SHIMOYAMA, T.: Theoretical Studies of Light Scattering by Polydispersed Colloidal Systems of Spherical Particles.- Bull. Chem. Soc. Japan: 37, 1634 - 1651, 1964.-
- (68) SHIFRIN, K.S. and PERELMAN, A.Y.: Calculation of Particle Distribution by the Data on Spectral Transparency.- Pure and Appl. Geophys.: 58, 208 - 220, 1964.-
- (69) AVERINK, J.W.A., REERINK, H., BOERMA, J. and JASPERS, W.J.M.: Determination of Particle Size Distribution of Latices by Ultracentrifugation using absorption optics.- J. Coll. & Interface Sci.: 21, 66 - 78, 1966.-
- (70) BRUN, C.: Etude par Diffusion de la Lumière de colloïdes minéraux.- Thèse Doct. Sci.Phys. Fac. Sci. Montpellier, 1965.-
- (71) MATHUR, N.C. and YEH, K.C.: Multiple Scattering of Electromagnetic Waves by Random Scatterers of Finite Size.- J. Math. Phys.: 5, 1619 - 1629, 1964.-
- (72) ESPENSCHIED, W.F., WILLIS, E., MATIJEVIC, E. and KERKER, M.: Aerosol Studies by Light Scattering. IV.- Preparation and Particle Size Distribution of Aerosols consisting of Concentric Spheres.- J. Coll. Sci.: 20, 501 - 521, 1965.-
- (73) BRICE, B.A., HALWER, M. and SPEISER, P.: Photoelectric Light Scattering Photometer for determining high molecular weight.- J. Opt. Soc. Am.: 40, 768 - 778, 1950.-
- (74) PANGONIS, W.J., HELLER, W. and JACOBSON, A.: Tables of Light Scattering Functions for Spherical Particles.- Wayne St. Univ. Press, Detroit, 1957.-
- (75) PENNDORF, R.: New Tables of Mie Scattering Functions.- Geophys. Res. Dir. Air Force, Cambridge Res. Center, 1958 - 1959.-

- (76) DENMAN, H., HELLER, W. and PANGONIS, W.J.: Angular Scattering Functions for Spherical Particles.- Wayne St. Univ. Press, 1963.-
- (77) WOODWARD, D.H.: He - Ne Laser as Source for Light Scattering Measurements.- Appl. Opt.: 2, 1205 - 1207, 1963.-
- (78) JEPPESEN, M.A. and BARLOW, R.B.: Determination of Particle Size of Colloidal Gold from Absorption Spectra.- J. Opt. Soc. Am.: 52, 99 - 101, 1962.-
- (79) DAUCHOT, J. and WATILLON, A.: Optical Properties of Selenium Sols. I.- Computation of Extinction Curves from Mie Equations.- J. Coll. & Interface Sci.: 23, 62 - 72, 1967.-
- (80) TURKEVICH, J., GARTON, G. and STEVENSON, P.C.: The colour of Colloidal Gold.- J. Coll. Sci.: 9, Suppl. 1, 26 - 35, 1954.-
- (81) MORRISS, R.H. and COLLINS, L.F.: Optical Properties of Multilayer Colloids.- J. Chem. Phys.: 41, 3357 - 3363, 1964.-
- (82) ADEN, A.L. and KERKER, M.: Scattering of Electromagnetic Waves from two Concentric Spheres.- J. Appl. Phys.: 22, 1242 - 1246, 1951.-
- (83) CHIANG, Y. and TURKEVICH, J.: Formation of Platelike Colloidal Gold.- J. Coll. Sci.: 18, 772 - 783, 1963.-
- (84) KRISHNAN, R.S.: Dispersion of Depolarisation of Light Scattering in Colloids. I.- Gold Sols.- Proc. Ind. Acad. Sci.: 5, 94 - 107, 1937.-
- (85) SERAPHIN, B.: Ultravioletabsorption kolloidaler Goldlösungen.- Ann. Phys.: 10, 1 - 19, 1952.-
- (86) DOYLE, W.T.: Coagulation, Optical Absorption and Photoconductivity of Colloid Centers in Alkali Halides.- Proc. Phys. Soc. London: 75, 649 - 663, 1960.-
- (87) HAGENS, E. und RUBENS, H.: Die Absorption Ultravioletter, sichtbarer und ultraroter Strahlen in dünnen Metallschichten.- Ann. Phys.: 8, 432 - 454, 1902.-
- (88) OTTER, W.: Optische Konstanten massiver Metalle.- Zeitschr. f. Phys.: 161, 163 - 178, 1961.-
- (89) ABELES, F., BURTON, R. et DOREL, F.: Resistivité électrique et propriétés optiques de couches minces d'or.- J. Phys. Rad.: 23, 267 - 268, 1962.-
- (90) v. FRAGSTEIN, C. und KAMPERMANN, H.: Eine neue einfache polarimetrische Methode zur Bestimmung der optischen Konstanten von Metallen.- Zeitschr. f. Phys.: 173, 39 - 53, 1963.-

- (91) OTTER, W.: Temperaturabhängigkeit der optischen Konstanten massiver Metalle.- Zeitschr. f. Phys.: 161, 539 - 549, 1961.-
- (92) DOREMUS, R.H.: Optical Properties of Small Gold Particles.- J. Chem. Phys.: 40, 2389 - 2396, 1964.- Errata: J. Chem. Phys.: 41, 3259, 1964.-
- (93) v. FRAGSTEIN, C. und ROEMER, H. Ueber Anomalie der optischen Konstanten.- Zeitschr. f. Phys.: 151, 54 - 71, 1958.-
- (94) GRARD, F.: Interpretation théorique des constantes optiques.- J. Phys. (Paris): 29, 109 - 113, 1964.-
- (95) COOPER, B.R., EHREHNREICH, H. and PHILIPP, H.R.: Optical Properties of Noble Metals.- II.- Phys. Rev.: 138-2A, 494 - 507, 1965.-
- (96) ROEMER, H. und v. FRAGSTEIN, C.: Bestimmung des Absorptionskoeffizienten und des Brechungsquotienten von kolloidalem Gold.- Zeitschr. f. Phys.: 163, 27 - 43, 1961.-
- (97) American Institute of Physics Handbook, -Second Edition, Mc Graw - Hill Book Co., 1963.-
- (98) HEIRWEGH, K.P.M.: Errors in Extinction Measurements as due to Scattering of Light by Solutions of relatively Small Particles.- J. Coll. & Interface Sci.: 21, 1 - 8, 1966.-
- (99) PIJCK, J.: La détermination de l'or colloïdal par radioactivation aux neutrons thermiques.- J. Parm. Belg.: 20, 300 - 310, 1965.-
- (100) Spécifications des Radioéléments et molécules marquées à usage médical.- C.E.A., C.E.N. et S.O.R.I.N., 26 - 28, Avril 1964.-
- (101) FABRIKANOS, A., ATHANASSIOU, S. und LIESER, K.H.: Darstellung stabiler Hydrosolle von Gold und Silber durch Reduktion mit Aethyldiaminotetraessigsäure.- Zeitschr. f. Naturforsch.: 18-b, 612 - 617, 1963.-
- (102) CHIOTAN, C., VIZITIU, M., LABAU, V. et NICOLAE, M.: Essais Spectrophotométriques pour la détermination des dimensions des particules d'or colloïdal.- Rev. Roum. Phys.: 11, 519 - 525, 1966.-
- (103) SVEDEBERG, T.: Die Methoden zur Herstellung kolloider Lösungen anorganischer Stoffe.- Theodor Steinkopff Verlag, Dresden, 1920.-
- (104) DURANT, W. and DURANT, A.: The Story of Civilization.- Vol. VII.- The Age of Reason Begins, Chap. 22.- Simon & Scuster, New York, 1961.-
- (105) JUNCKER, J.: Conspectus Chemicæ.- Trad. Alemana, Vol. I, pag. 680, Vol. II, pag. 288, Halle, 1794.-

- (106) FULHAME, M.: An Essai on Combustion.- Johnson, Robinson & Codell, London, 1794.-
- (107) OPERKAMPF, M.: Sur diverses combinations de l'or.- Ann. Chim.: 80, 140 - 162, 1811.-
- (108) KRUEGER, W.: Ueber die Einwirkung des Eiweisses, des Klebers und Gallerte auf das salpetricht - salzsäure Gold.- Schweigg. J. f. Chem. u. Phys.: 33, 210, 1821.-
- (109) PFAFF, C.H.: Ueber das sogenannte Färbende Wesen in der Ostseeluft und dem Ostseewasser, und die desoxidierende Kraft der Wasserdämpfe.- Schweigg. J. f. Chem. u. Phys.: 36, 68, 1822.-
- (110) PELLETIER, J.: Des faites pour servir à l'histoire de l'or.- Ann. Chim. Phys.: 15, 113 - 127, 1820.-
- (111) WACKENROEDER, H.: Ueber die Auffindung sehr kleiner Mengen von Gold.- J. f. prakt. Chem.: 18, 294 - 297, 1839.-
- (112) FARADAY, M.: Experimental Relations of Gold (and other Metals) to Light.- Phil. Trans. Roy. Soc.: 147, 145 - 182, 1857.-
- (113) LIVERSIDGE, A.: On the removal of Gold from Suspensions and solutions by fungoid growth.- Chem. News: 62, 277 - 279; 290 - 299, 1890.-
- (114) ZSIGMONDY, R.: Zur Erkenntniss der Kolloide. Ueber irreversible Hydrosole und Ultramikroskopie.- G. Fischer Verlag, Jena, 1905.-
- (115) OSTWALD, Wil.: Zur Geschichte des kolloiden Goldes.- Z. f. Chem. u. Ind. Koll.: 4, 5 - 14, 1909.-
- (116) LOESNER, H.: Zur Geschichte des kolloiden Goldes.- Z. f. Chem. u. Ind. Koll.: 6, 1 - 3, 1910.-
- (117) ZSIGMONDY, R.: Ueber wässerige Lösungen metallischen Goldes.- Lieb. Ann.: 301, 29 - 54, 1898.-
- (118) NAUMOFF, W.: Ueber die Reaktion bei der Darstellung kolloider Goldlösungen nach der Formaldehydmethode und über den Einfluss von Kohlensäure auf die Bildung dieser Lösungen.- Zeitschr. f. Anorg. Chem.: 88, 38 - 48, 1914.-
- (119) PAULI, W.: Konstitution und Farbe des kolloiden Goldes.- Helv. Chim. Acta: 32, 795 - 810, 1949.-
- (120) ZSIGMONDY, R.: Ueber Amikroskopische Goldkeime.- Z. f. Phys. Chem.: 56, 65 - 82, 1906.-
- (121) WERNICKE, R. y LOSSOM, R.B.: Obtención de oro coloidal Af por el método de Zsigmondy.- An. Asoc. Quim. Arg.: 18, 74 - 97, 1930.-
- (122) PAAL, C.: Ueber kolloidales Gold.- Ber. Dtsch. Chem. Ges.: 35, 2236 - 2244, 1902.-

- (123) KUESPERT, F.: Kolloidales Silber und Gold.- Ber. Dtsch. Chem. Ges.: 35, 4070 - 4071, 1902.-
- (124) GARBOWSKI, L.: Anwendung hochwertiger Phenole, Phenolsäuren und Phenolaldehyde zur Herstellung der Hydrosole von Gold, Silber und Platin.- Ber. Dtsch. Chem. Ges.: 36, 1215 - 1220, 1903.-
- (125) BLAKE, J.C.: On Colloidal Gold, Adsorption and Allotropy.- Am. J. Sci.: 16, 381 - 388, 1903.-
- (126) CASTORO, A.: Darstellung kolloidaler Metalle.- Z. f. Anorg. Chem.: 41, 126 - 131, 1904.-
- (127) DONAU, J.: Ueber eine rote mittels Kohlenoxyd erhaltene kolloidale Goldlösung.- Monatsh. f. Chem.: 26, 525 - 530, 1905.-
- (128) DOERINGKEL, F.: Ueber die Darstellung kolloider Goldlösungen mittels Wasserstoffperoxyds.- Z. f. Anorg. Chem.: 63, 344 - 348, 1909.-
- (129) REITSTOETTER, J.: Ueber Darstellung kolloider Goldlösungen nach dem Keimverfahren.- Koll. Beih.: 9, 221 - 258, 1918.-
- (130) JOEL, E.: Das kolloide Gold in Biologie und Medizin.- Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1925.-
- (131) HAUSER, E.A. and LYNN, J.E.: Experiments in Colloid Chemistry.- Mc Graw - Hill Book Co., New York, 1940.-
- (132) VANINO, L.: Ueber Einwirkung von Zuckerarten auf Goldlösungen.- Koll. Z.: 2, 51 - 53, 1907.-
- (133) BREDIG, G.: Darstellung kolloider Metallösungen durch elektrische Zerstäubung.- Z. f. Ang. Chem.: 1898, 951 - 954, 1898.-
- (134) SVEDBERG, T.: Ueber die elektrische Darstellung einiger neuen kolloidalen Metalle.- Ber. Dtsch. Chem. Ges.: 38, 3616 - 3620, 1905.-
- (135) SVEDBERG, T.: Ueber die elektrische Darstellung kolloidaler Lösungen.- Ber. Dtsch. Chem. Ges.: 39, 1705 - 1714, 1906.-
- (136) FUJITA, H., IZAWA, M. and YAMAZAKI, H.: Gamma Ray Induced Gold Sol from Chloroauric Acid Solution.- Nature: 196, 666 - 667, 1962.-
- (137) ENGELHARDT, H. und FROBEN, W.: Die Wirkung von OH Radikalen und H Atomen in verdünnten wässrigen Lösungen anorganischer Salze im Vergleich mit der von Röntgenstrahlen.- Z. f. Naturforsch.: 17-b, 639 - 646, 1962.-
- (138) KRAMACHI, E.P.: The Problem of Absorption of Light in Solution of Gold and Silver.- Zh. Nauchn. i Prikl. Fotogr. i Kinemat.: 8, 342 - 348, 1963.- Chem. Abstr.: 60, 115 - a, 1964.-

- (139) ANALDI, E. e SEGRE, E.: Segno ed energia degli elettroni emessi da elementi attivati con neutroni.- Il Nuovo Cimento: 11, 452 - 459, 1934.-
- (140) FERMI, E.: Radioattività prodotta da bombardamento di neutroni.- Il Nuovo Cimento: 11, 429 - 441, 1934.-
- (141) STROMINGER, D., HOLLANDER, J.M. and SEABORG, G.T.: Table of Isotopes.- Univ. Calif. Rad. Lab., Berkeley, Calif., UCHL - 1928, Second Edition, April 1958.-
- (142) BARRACHINA, M. and RADICELLA, R.: Perturbation of the thermal neutron flux by finite gold cylinders.- In Preparation, 1967.-
- (143) SHEPPARD, C.W., WELLS, E.B., HAHN, P.F. and GODDELL, J.P.B.: Studies of the Distribution of Intravenous administered colloidal sols of Manganese Dioxide and Gold in human beings and dogs using Radioactive Isotopes.- J. Lab. & Clin. Med.: 32, 274 - 286, 1947.-
- (144) HUDSWELL, F., MILES, B.J., PAYNE, B.R. and TAYLOR, K.J.: The preparation of Radiogold for medical Use (198-Au).- A.E.R.E. I/R, 1341, Harwell, 1954.-
- (145) HENRY, R., HERCZEG, C. et FISHER, C.: Une nouvelle méthode de préparation d'or colloidal radioactif (198-Au).- Int. J. Appl. Rad. & Isotopes: 2, 136 - 139, 1957.-
- (146) DAVIS, P.: Protective Colloid Action of Gelatin.- Trans. Faraday Soc.: 53, 1390 - 1394, 1957.-
- (147) CONSTANT, R. MAISIN, J., VANDERLINDEN, P. et WAMBERSIE, A.: L'or colloidal radioactif (198-Au), ses caractéristiques, son devenir dans l'organisme humain.- J. Belge Rad.: 43, 393 - 412, 1960.-
- (148) DEL TURCCO, A.M. and PIETRA, R.: On a method of preparation of Colloidal Radiogold (198-Au).-Centro di Studi Nucleari d'Ispra, May 1960.-
- (149) DOUIS, M.: Préparation de l'or colloidal 198.- Min. Nucl.: 7, 448 - 450, 1963.-
- (150) CELLINI, R.F., DOMINGUEZ, G. y DE LA CRUZ, F.: La Producción de Radioisótopos en España.- Energía Nuclear: 18, 4 - 20, 1961.-
- (151) JIMENO DE OSSO, F.: Estudio de una solución de oro-198 coloidal obtenido por irradiación de oro mediante reacción (n, gamma).- Tesis, Fac. Ciencias, Madrid, Mayo 1965.-
- (152) IYA, V.K., GOPAL, G.S., CHAUDHARRY, S.V. and METHA, S.C.: Colloidal Gold. Preparation and Particle Size determination by Electron Microscope.- Indian J. Chem.: 3, 317 - 319, 1965.-

- (153) DAVILA, A.T., GREGORIO, E.G. and LUMBA, L.G.: Test Production of Colloidal Gold - 198 at the Philippine Atomic Research Center.- P.A.E.C., Manila, Philippines, May 1965.-
- (154) KARAIIVANOV, I.: Apparatus for Production of Colloidal Radiogold.- Izv. Fis. Inst. s. Aneb.: 13, 149 - 161, 1965.- Chem. Abstr.: 63, 12599-c, 1965.-
- (155) SEREBRYAKOV, N.G.: Preparation of Radiocolloids of Gold for Therapeutic Purposes.- Izotopy i Zluchemia. Khim., Moscow, 1957 - 1958.- AEC - Tr. 4497, 473 - 478, 1958.-
- (156) LEVIN, V.I. and SEREBRYAKOV, N.G.: Production and Preparation with Radioisotopes for Radiotherapy.- Tr. Taskentsk. Konf. po Mirnomu Ispol'z. At. Energie Akad. Nauk. UZSSR.: 2, 407 - 409, 1960.- AEC - Tr. 6390, 540 - 544, 1960.-
- (157) BURK, W.: Ueber die Teilchengrösse und ihre Verteilung in radioaktiven Goldkolloiden.- Isotopentechnik: 1, 218, 1961.-
- (158) KNOLL, P. und LEUSCHKE, W.: Verfahren und Apparatur zur Herstellung medizinisch verwendbarer Goldkolloide.- Kernenergie: 4, 637 - 639, 1961.-
- (159) THIELE, H. and v. LEUFERN, H.S.: Synthetic Protective Colloids.- J. Coll. Sci.: 20, 679 - 694, 1965.-
- (160) DRILL, V.A.: Intravenous Fluid Therapy: Blood, Plasma and Plasma Expanders.- Chap. 39 of Pharmacology in Medicine, ed. V.A. Drill, Second Edition, Mc Graw - Hill Book Co., New York, 1958.-
- (161) RAVDIN, J.S.: Plasma Expanders.- J. Am. Med. Ass.: 150, 10 - 13, 1952.-
- (162) MEIDINGER, F.: La polivinilpirrolidone (PVP), colloïde protecteur de synthèse in vitro et in vivo, (Phénomène de colloïdophylaxie).- Bull. Soc. Chim.: 29, 411 - 416, 1947.-
- (163) Pharmacopée Française: Soluté Injectable d'or colloïdal Radioactif, VIII^{ème} Edition, 1074 - 1077, 1965.-
- (164) COHEN, Y.: Le contrôle des Radioéléments artificiels a usage médical en France.- Ann. Pharm. Franç: 17, 250 - 260, 1959.-
- (165) MAJUMDAR, A.K. and CHAKRABARTTY, M.M.: Paper Chromatography in the Separation of Ions. II.- Separation of precious Metals.- Anal. Chim. Acta: 19, 129 - 131, 1958.-
- (166) BEEN, U. and HØYE, A.: Determination of auric ions in colloidal gold-198 by paper electrophoresis.- J. Chrom.: 17, 631 - 632, 1965.-

- (167) **Farmacopea Nacional Argentina, Codex Medicamentarius Argentino: Ensayo para Sustancias Piretógenas, IV Edición, 696 - 697, 1956.-**
- (168) **RECCHI, N.V.: Manual de Controles Farmacéuticos.- Programa de Producción, C.N.E.A., Agosto 1963.-**
- (169) **JONES, H.B., WROBEL, C.J. and LYONS, W.R.: A method of distributing beta Radiation to the Reticuloendothelial System and adjacent tissues.- J. Clin. Invest.: 23, 783 - 788, 1944.-**
- (170) **SHEPPARD, C.W., GODDELL, J.P.B. and HAHN, P.F.: Colloidal Gold Containing the Radioactive Isotope 198-Au in the Selective Internal Radiation Therapy of Diseases of the Lymphoid System.- J. Lab. & Clin. Med.: 32, 1437 - 1441, 1947.-**
- (171) **HAHN, P.F., GODDELL, J.P.B., SHEPPARD, C.W., CANNON, R.O. and FRANCIS, H.C.: Direct Infiltration of Radioactive Isotopes as a mean of delivering ionizing Radiation to discrete tissues.- J. Lab. & Clin. Med.: 32, 1442 - 1453, 1947.-**
- (172) **ZILVERSMIT, D.B., BOYD, G.A. and BRUCER, M.: The effect of particle size on blood clearance and tissue distribution of Radioactive Colloids.- J. Lab. & Clin. Med.: 40, 255 - 260, 1952.-**
- (173) **ROOT, S.W., ANDREWS, G.A., KNISELEY, R.M. and TYOR, P.D.: The Distribution and radiation effects of intravenously administered colloidal 198-Au in man.- Cancer: 7, 856 - 866, 1954.-**
- (174) **SPODE, E. und BURK, W.: Experimentelle Untersuchungen über das Verhalten verschiedenartiger radioaktiver Goldsole im Organismus.- Strahlenther.: 105, 524 - 529, 1958.-**
- (175) **KATAKURA, Y.: Neutron activation analysis in the determination of Colloidal Gold and Lutetium in biological materials.- Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. (Med.): 12, 223 - 239, 1965.-**
- (176) **MIGITA, T., BAKER, R. and WAGNER (Jr.), H.N.: Relative Rates of Recovery of Parenchymal and Reticuloendothelial Function after Hepathectomy.- J. Clin. Invest.: 45, 1047, 1966.-**
- (177) **BELLION, B., BÜCHI, G., CHIARLE, S., GOVERNA, M., ORSELLO, S., ROSA, U. e SCASSELLATI, G.A.: Nuovo metodo di preparazione del radiofosfato di cromo colloidale. Studio sul meccanismo di formazione e sul comportamento biologico.- Min. Nucl.: 6, 199 - 208, 1962.-**
- (178) **COHEN, Y., COSTEROUSSE, O. et CHIVOT, J.J.: Pharmacodynamie des Colloïdes Radioactifs.- Min. Nucl.: 8, 357 - 366, 1964.-**
- (179) **KURCBART, H. and RADICELLA, R.: A new 32 - P labelled colloid for medical Use.- Int. J. Appl. Rad. & Isotopes: 16, 749 - 751, 1965.-**

- (180) BELLION, B., BÜCHI, G., CHIARLE, S. e SOSI, S.: Studio della repartizione in cavità peritoneale e della migrazione dalla stessa di radiocolloidi con caratteristiche fisiche e chimico - fisiche diverse.- Min. Nucl.: 8, 285 - 289, 1964.-
- (181) ULLBERG, S.: Autoradiographic distribution and excretion studies with Sulphur - 35 labelled Penicillin.- Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.: 85, 550 - 553, 1954.-
- (182) SCHMITTERLOEW, C.G. et COHEN, Y.: Application de l'autoradiographie à l'étude cinétique de la fixation élective d'une substance médicamenteuse.- Ann. Pharm. Franç.: 15, 227 - 234, 1957.-
- (183) ULLBERG, S.: Autoradiographic Studies on the Distribution of Labeled Drugs in the Body.- Proc. 2nd. Int. Conf. Peac. Uses At. En. U. N., Vol. 24, p/164, 248 - 254, Geneva, September 1958.-
- (184) COHEN, Y. et DELASSUE, M.: Modifications de la méthode d'autoradiographie de S. Ullberg sur coups de souris entière.- C. R. Soc. Biol.: 153, 300 - 304, 1959.-
- (185) FRIES, B. and WALLINDER, G.: Absorption of Colloidal Au-198 from Peritoneum and Pleura and its Inhibition by Polyphloretin Phosphate.- Acta Radiol.: 2, 113 - 122, 1957.-
- (186) GREENBERG, M.L., ATKINS, H.L. and SCHIFFEN, L.M.: Erythropoietic and Reticuloendothelial Function in Bone Marrow in Dogs.- Science: 152, 526 - 528, 1966.-
- (187) FELDHERR, C.M. and MARSHALL, J.M.: The use of Colloidal Gold for Studies of Intracellular Exchanges in the amoeba chaos - chaos.- J. Cell.Biol.: 12, 641 - 645, 1962.-
- (188) FELDHERR, C.M.: The intranuclear Distribution of Colloidal Gold in the amoeba chaos - chaos.- Exp. Cell Res.: 38, 670 - 672, 1965.-
- (189) THOMAS, R.L. and KERR, F.W.L.: Electron Microscope Studies of absorption of Colloidal Gold from the subarachnoid space.- Mayo Clin. Proc.: 40, 603 - 608, 1965.-
- (190) KELLY, L.S. and JONES, H.B.: Effects of Irradiation on Nucleic Acid Formation.- Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.: 74, 493 - 497, 1950.-
- (191) GOLDIE, H. and HAHN, P.F.: Distribution and Effect of Colloidal Radioactive Gold in Peritoneal Fluid containing free Sarcoma-37 Cells.- Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.: 74, 638 - 642, 1950.-
- (192) WHEELER, B., JACKSON, M.A. and HAHN, P.F.: Hematology of the dog following intravenous administration of radioactive colloidal gold.- Am. J. Physiol.: 166, 323 - 327, 1951.-

- (193) UPTON, A.C., FURTH, J. and BURNETT (Jr.), W.T.: Liver Damage and Hepatomas in mice produced by radioactive colloidal gold.- Cancer Res.: 16, 211 - 215, 1956.-
- (194) KERR, F.W.L., SCHWARTZ, H.G. and SEAMAN, W.B.: Experimental Effects of Radioactive Colloidal Gold in subarachnoid space: Clinical Application in treating Brain Tumors.- Am. Med. Assoc. Arch. Surg.: 69, 694 - 706, 1954.-
- (195) Mc-CLURE, C.C., CAROTHERS, E.L. and HAHN, P.F.: Distribution and Pathology resulting from intracerebral and intraventricular injection of Radioactive Gold and Silver coated radiogold Colloids.- Am. J. Roentgenol. Rad. Ther. & Nucl. Med.: 73, 81 - 87, 1955.-
- (196) ROSSOTTO, P., STANCANELLI, V. e GEORGACOPULO, P.: Sul Potenziamen- to dell'attività ionizzante del $^{198}\text{-Au}$ indoto dall' H_2O_2 .- Min. Chirurg.: 19, 827 - 830, 1964.-
- (197) MUELLER, J.H.: Radioactive Isotope Therapy, with particu- lar refer- ence to the use of Radiocolloids.- I.A.E.A. n° 27, Vienna, May 1962.-
- (198) RADT, P.: Eine Methode zur röntgenologischen Kontrastdarstellung von Milz und Leber.- Klin. Wochenschr.: 8, 2128 - 2129, 1929.-
- (199) LANARI, E.L., JÖRG, M.E. y AGUIRRE, J.A.: La impregnación visceral mediante sales radiactivas. Método de Exploración Radiológica.- Act. Med. Mund. (Buenos Aires), 1 - 349, 1937.-
- (200) DOERING, P.: Die szintigraphische Darstellung der Leber nach Gabe von kolloidalem Radiogold ($^{198}\text{-Au}$).- Klin. Wochenschr.: 35, 169 - 174, 1957.-
- (201) Scintigraphie Médicale. Radioéléments et molécules marquées pour Scintigraphie, préparés par le C.E.A. (France), le C.E.N. (Belgique) et la S.O.R.I.N. (Italie).- Septembre 1965.-
- (202) HINE, G.J. (Ed.): Instrumentation in Nuclear Medicine.- Academic Press, New York, 1967.-
- (203) FRIEDEL, H.L., Mc INTRYE, W.J. and REJALI, A.M.: A method for the Visualization of the Configuration and Structure of the Li- ver.- Am. J. Roentgenol.: 77, 455 - 471, 1957.-
- (204) BENDER, M.A.: Photoscanning Detection of Radioactive Tracers In- Vivo.- Science: 125, 443 - 444, 1957.-
- (205) ANGER, H.O.: Scintillation Camera.- Rev. Sci. Instr.: 29, 27 - 33, 1958.-
- (206) FLEMING, W.H., Mc ILDRATH, J.D. and KING, E.R.: Medical Scintilla- tion Scanning utilizing closed Circuit TV Contrast Enhancement. Technical Aspects.- Am. J. Roentgenol. Rad. Ther. & Nucl. Med.: 87, 128 - 140, 1962.-

- (207) KAKEHI, H. ARIMIZU, M. and UCHIYAMA, G.: Scan Recording in Colour.- in: Progress in medical Scanning, USAEC, Div. Techn. Inf., Chap. 5, 111 - 131, 1962.-
- (208) KELLERSOHN, C., DESGREZ, A. et LANSIART, A.: Deux nouveaux types de détecteurs pour caméra à rayons-X ou gamma.- in: Medical Radioisotope Scanning, I.A.E.A., Vol. I, 333 - 354, 1964.-
- (209) BENDER, M.A. and BLAU, M.: The Autofluoroscope.- in: Progress in medical Scanning, USAEC, Div. Techn. Inf., Chap. 6, 151 - 157, 1962.-
- (210) SPERGEL, r.: Automatic Data Processing for Digital Autofluoroscope Scintillation Camera.- Pres. Soc. Nucl. Med. Ann. Meet., Philadelphia, Penn, June 1966.-
- (211) DONATO, L., BECHINI, M.F. and PANICHI, S.: Liver Scanning with Colloidal Radiogold.- in: Medical Radioisotope Scanning, I.A.E.A., 87 - 103, 1959.-
- (212) CHRISTIE, J.H. and Mc INTRYE, W.J.: Liver Scanning.- in: Progress in Medical Scanning, USAEC, Div. Techn. Inf., 405 - 432, 1962.-
- (213) CZERNIAK, P.: Scanning Study of 700 Livers. Evaluation of Existing Diagnostic Procedures.- in: Medical Radioisotope Scanning, I.A.E.A., Vol. II, 401 - 430, 1964.-
- (214) CZERNIAK, P., LUBIN, E., DJALDEPTI, M. and DE VRIES, A.: Scintillographic Follow - Up of Amoebic Abscesses and Hydatid Cysts of the Liver.- J. Nucl. Med.: 4, 35 - 44, 1963.-
- (215) QUIMBY, E.H.: Some Problems regarding Permissible Doses with Radioactive Isotopes.- J. Nucl. Med.: 1, 14 - 22, 1960.-
- (216) GOTTSCHALK, A. and ANGER, H.O.: Progress in Radioisotope Scanning: Clinical Application of the Scintillation Camera.- in: Progress in Atomic Medicine, Chap. 4, 78 - 106, Grune & Stratton, USA, 1965.-
- (217) LARSSON, L.G. and JONSSON, L.: Bone Marrow Scanning after Intravenous Injection of Colloidal Au-198.- in: Medical Radioisotope Scanning, I.A.E.A., Vol. II, 193 - 205, 1964.-
- (218) EDWARDS, C.L., ANDREWS, G.A., SITPERSON, B.W. and KNISELEY, R.M.: Clinical Bone Marrow Scanning with Radioisotopes.- Blood: 23, 741 - 756, 1964.-
- (219) KNISELEY, R.M., ANDREWS, G.A., TANIDA, R., EDWARDS, C.L. and KYKER, G.C.: Delineation of Active Marrow by whole - body Scanning with Radioactive Colloids.- J. Nucl. Med.: 7, 575 - 582, 1966.-
- (220) DELALOYE, B. et MAGENANT, P.: La Lymphographie Indirecte et son intérêt en oncologie.- in: Medical Radioisotope Scanning, I.A.E.A., Vienna, Vol. II, 227 - 236, 1964.-

- (221) ROSSI, R. e FERRI, O.: La visualizzazione della catena mammaria interna con 198-Au. Presentazione di una nuova metodica: la linfoscintigrafia.- Min. Med.: 57, 1151 - 1155, 1966.-
- (222) GEORGI, P. ALTENBRUNN, H.J., SETKA, J. und GÜTZ, H.J.: Untersuchungen über die Magen-Darm-Passage von 198-Au-Kolloid mit der Szintillationskamera.- Nukl. Med.: 5, 246 - 249, 1966.-
- (223) NICOLINI, J.O., PALCOS, M.C. y RADICELLA, R.: Nuevos Aportes sobre un Coloide marcado con 99m-Tc.- Primer Congreso Latinoamericano de Biología y Medicina Nuclear, Lima, Perú, 2 a 8 de Octubre, 1966.-
- (224) METCHNIKOFF, E.: Ueber die Beziehung der Phagocyten zu Milzbrandbacillen.- Virchow's Arch. path. Anat. u. Physiol. u. f. Klin. Med.: 27, 502 - 526, 1884.-
- (225) METCHNIKOFF, E.: L'immunité dans les maladies infectieuses.- Masson et Cie, Paris, 1901.-
- (226) ASCHOFF, L.: Das Retikuloendotheliale System.- Ergeb. Inn. Med. u. Kind.: 26, 1 - 118, 1924.-
- (227) v. KUPFFER, C.: Ueber die sogenannten Sternzellen der Säugethierleber.- Arch. mikr. Anat. u. Entwickl.: 54, 254 - 288, 1899.-
- (228) COLLET, A. et POLICARD, A.: Essai de localisation infra-structurale dans le poumon des éléments du système réticulo-endothélial.- C. R. Soc. Biol.: 156, 991 - 995, 1962.-
- (229) DE DUVE, C. and WATTIAUX, R.: Function of Lysosomes.- Ann. Rev. Physiol.: 28, 435 - 492, 1966.-
- (230) DE ROBERTIS, E.D.P., NOWINSKI, W.W. y SAEZ, F.A.: Biología Celular.- Sexta Edición, El Ateneo, Buenos Aires, 1965.-
- (231) HIRSCH, J.G.: Phagocytosis.- Ann. Rev. Microbiol.: 19, 339 - 350, 1965.-
- (232) GORDON, G.B., MILLER, L.R. and BENSCH, K.G.: Intracellular digestive process in mammalian tissue culture cells.- J. Cell Biol.: 25, 41 - 55, 1965.-
- (233) BULL, C.G.: The phate of typhoid bacili when injected intravenously into normal rabbits.- J. Exptl. Med.: 22, 475 - 483, 1915.-
- (234) DRINKER, C.K. and SHAW, L.A.: Quantitative Distribution of Particulate material (manganese dioxide) administered intravenously to the cat.- J. Exptl. Med.: 33, 77 - 98, 1921.-
- (235) SHEPPARD, C.W., JORDAN, G. and HAHN, P.F.: Disappearance of Isotopically labelled gold colloids from the circulation of the dog.- Am. J. Physiol.: 164, 345 - 350, 1951.-

- (236) DOBSON, E.L., GOPMAN, J.W., JONES, H.B., KELLY, L.S. and WALKER, L.A.: Studies with colloids containing radioisotopes of yttrium, zirconium, columbium and lanthanum. II.- The controlled selective localisation of radioisotopes of yttrium, zirconium and columbium in the bone marrow, liver and spleen.- J. Lab. & Clin. Med.: 34, 305 - 312, 1949.-
- (237) SCHOENBERG, M.D., GILMAN, P.A., MUMAW, V.R. and MOORE, R.D.: The Phagocytosis of Uniform Polystyrene Latex Particles (PLP) by the Reticuloendothelial System (RES) in the rabbit.- Brit. J. Exptl. Pathol.: 42, 486 - 495, 1961.-
- (238) GABRIELI, E.R.: Velocity at which radioactive colloids disappear from the blood. Studies on the Function of the Reticuloendothelial System.- Acta Physiol. Scand.: 23, 283 - 290, 1951.-
- (239) DOBSON, E.L. and JONES, H.B.: The Behaviour of Intravenously Injected Particulate Material.- Acta Med. Scand.: 144, Suppl. 273, 1952.-
- (240) BRADLEY, S.E., INGELFINGER, F.J., BRADLEY, G.P. and CURRY, J.J.: The estimation of hepatic blood flow in man.- J. Clin. Invest.: 24, 890 - 897, 1945.-
- (241) MYERS, J.D.: The hepatic blood flow and splanchnic oxygen consumption of man. Their estimation from urea production or bromsulphalein excretion during catheterization of the hepatic veins.- J. Clin. Invest.: 26, 1130 - 1137, 1947.-
- (242) KELLERSOHN, C.: Principales applications diagnostiques et thérapeutiques des radioéléments artificiels.- C.E.A., France, 1960.-
- (243) BENHAMOU, J.P., AFIFI, F.H., LOVERDO, A. et FAUVERT, R.: La fixation de l'or colloïdal radioactif (^{198}Au) par le foie de lapin isolé et perfusé. I.- Mesure de l'efficacité de l'épuration.- C. R. Soc. Biol.: 151, 442 - 444, 1957.-
- (244) DOBSON, E.L., WARNER, G.F., FINNEY, C.R. and JOHNSTON, M.E.: The Measurement of Liver Circulation by means of the colloid Disappearance Rate. I.- Liver blood flow in normal young men.- Circulation: 7, 690 - 695, 1953.-
- (245) VETTER, H., FALKNER, R. and NEUMAYR, A.: The Disappearance Rate of Colloidal Radiogold from the Circulation and its application to the estimation of Liver Blood Flow in normal and cirrhotic subjects.- J. Clin. Invest.: 33, 1594 - 1602, 1954.-
- (246) KROOK, H.: Circulatory Studies in Liver Cirrhosis.- Acta Med. Scand.: 156, Suppl. 318, 6 - 160, 1956.-
- (247) STROUM, J. MEYKADEH, F., LAPERROUZA, C. et WENGER, P.: Interet et limites des examens a l'or colloïdal radioactif dans l'étude de quelques affections hépatiques.- Helv. Med. Acta: 31, 594 - 601, 1964.-

- (248) SALKY, H.K., MILLS, D. and DI LUZIO, N.R.: Activity of the RES in Diseases of Altered Immunity.- J. Lab. & Clin. Med.: 66, 952 - 960, 1965.-
- (249) GROCH, G.S., PERILLIE, P.E. and FINCH, S.C.: Reticuloendothelial Phagocytic Function in Patients with Leukemia, Lymphoma and Multiple Myeloma.- Blood: 26, 489 - 499, 1965.-
- (250) SAGE, H.H., SINHA, B.K., KIZILAY, D. and TOULON, R.: Radioactive Colloidal Gold Measurements of Lymph Flow and Functional Patterns of Lymphatics and Lymph Nodes in the Extremities.- J. Nucl. Med.: 5, 626 - 642, 1964.-
- (251) HOLLENBERG, M. and DOUGHERTY, J.: Liver Blood Flow measured by portal venous and hepatic arterial routes with 85-Kr.- Am. J. Physiol.: 210, 926 - 932, 1966.-
- (252) GRÄNGSJÖ, G. UFENDAHL, H.R. and WOLGAST, M.: Determination of Regional Blood Flow by means of Small Semiconductor Detectors and Red Cells tagged with Phosphorus-32.- Nature: 211, 1411 - 1412, 1966.-
- (253) TURCO, G.L., CHEMI, F., MOLINO, G. and SEGRE, G.: The kinetics of ¹³¹I Rose Bengal in normal and cirrhotic subjects studied by compartmental analysis and a digital computer.- J. Lab. & Clin. Med.: 67, 983 - 993, 1966.-
- (254) DOBSON, E.L., FINKELSTEIN, L.J., FINNEY, C.R. and KELLY, L.S.: Particulate Chromic Phosphate: Colloid Characteristics suitable for measurement of Liver Circulation.- USAEC Symp. Ser. n° 6, Chap. 27, 477 - 502, 1966.-
- (255) BIOZZI, G., BENACERRAF, B. and HALPERN, B.N.: The kinetics of the granulopoeitic activity of reticuloendothelial system in relation to the dose of carbon injected. Relationship between the weight of the organs and their activity. II.- Brit. J. Exptl. Pathol.: 34, 441 - 457, 1953.-
- (256) BENACERRAF, B., HALPERN, B.N., STIFFEL, C., CRUCHAUD, S. et BIOZZI, G.: Phagocytose d'une fraction du serum chauffée et iodée par le système reticuloendothelial et comportement censecutif de ses cellules à l'égard d'autres colloïdes.- Ann. Inst. Pasteur: 89, 601 - 620, 1955.-
- (257) BIOZZI, G.: Metabolisme des colloïdes par les Cellules de Kupffer.- Confrontation sur la Biologie des Radiocolloïdes, INSTN, Saclay, 30 Mars 1965, DR/gop/65-21/IJ/RA, Juin 1965.-
- (258) PALMER, D.L., RIFKIND, D. and BROWN, D.: I-¹³¹ labelled colloidal human Seroalbumin in the Study of Reticuloendothelial System Function: The Distribution of free and colloidal - bound radiiodide.- J. Lab. & Clin. Med.: 68, 972 - 980, 1966.-

- (259) SICOT, C., AFIFI, F., BENHAMOU, J.P. et FAUVERT, R.: Etude sur la granulopéxie. II.- La deuxième pente de la courbe de décroissance sanguine de l'or colloïdal radioactif.- Rev. Franç. Et. Clin. & Biol.: 11, 707 - 709, 1966.-
- (260) MEREDITH (Jr.), O.M.: Kinetics of Reticuloendothelial Phagocytic Response to intravenously administered Au-198 Colloidal Gold in Rabbits.- Arch. Biochem. & Biophys.: 95, 352 - 362, 1961.-
- (261) MICHAELIS, L. und MENTEN, M.L.: Die Kinetik der Invertinreaktion.- Biochem. Zeitschr.: 49, 333 - 369, 1913.-
- (262) IIO, M. and WAGNER (Jr.), H.N.: Studies of the Reticuloendothelial System. (RES). I.- Measurement of the phagocytic capacity of the RES in man and dog.- J. Clin. Invest.: 42, 417 - 426, 1963.-
- (263) WAGNER (Jr.), H.N., IIO, M. and HORNICK, R.B.: Studies of the Reticuloendothelial System. (RES). II.- Changes in the phagocytic capacity of the RES in patients with certain infections.- J. Clin. Invest.: 42, 427 - 434, 1963.-
- (264) CASTRO-FIORE, A.M.: Contribução ao Estudo Biofísico da Fagocitose.- Tese, Fac. Med. Porto Alegre, Univ. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1964.-
- (265) LOTTI, C.J.: Medición del flujo hepático mediante el "clearance" de oro coloidal radiactivo en condiciones normales y patológicas.- I Simposio Argentino de Medicina Nuclear, C-65, 94, Mendoza, Argentina, 19 - 21 Noviembre, 1964.-
- (266) PARKER, H.G. and FINNEY, C.R.: Latent Period in the induction of reticuloendothelial blockada.- Am. J. Physiol.: 198, 916 - 920, 1960.-
- (267) PARKS, H.F. and CHIQUOINE, A.D.: Observations on Early Stages of Phagocytosis of Colloidal Particles by hepatic Phagocytes of the mouse.- in: Electron Microscopy, Proceedings of the Stockholm Conference, 17 - 20th. September 1956, Ed. S. Sjöstrand and J. Rhodin, 154 - 156, Academic Press, New York, 1957.-
- (268) SICOT, C., AFIFI, F., BENHAMOU, J.P. et FAUVERT, R.: Le phénomène de chasse au cours de la granulopéxie. Etude Préliminaire.- Rev. Franç. Et. Clin. & Biol.: 8, 786 - 788, 1963.-
- (269) BRIGGS, G.E. and HALDANE, J.B.S.: Note on the kinetics of enzyme action.- Biochem. J.: 19, 338 - 339, 1925.-
- (270) LINEWEAVER, H. and BURK, D.: Determination of enzyme dissociation constants.- J. Am. Chem. Soc.: 56, 658 - 666, 1934.-
- (271) KELLY, L.S., DOBSON, E.L., FINNEY, C.R. and HIRSCH, D.: Proliferation of the Reticuloendothelial System in the Liver.- Am. J. Physiol.: 198, 1134 - 1138, 1960.-

- (272) Mo-INTRYE, W.J., SCHAPIRO, R.L. and SCHAPIRO, D.I.: The inhibitory effect of heparin on the clearance of colloidal gold by the RES.- J. Lab. & Clin. Med.: 66, 999, 1965.-
- (273) FILKINS, J.P. and DI LUZIO, N.R.: Effect of heparin and sulfated polysaccharides on "in vitro" Hepatic Phagocytosis.- Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.: 122, 548 - 551, 1966.-
- (274) BARROW, J., TULLIS, J.L. and CHAMBERS (Jr.), F.W.: Effect of X-Radiation and antihistaminic Drugs on the Reticuloendothelial System, measured with Colloidal Radiogold.- Am. J. Physiol.: 164, 822 - 831, 1951.-
- (275) HENACERRAP, B., KIVY-ROSENBERG, E., SEBESTYEN, M.M. and ZWEIFACH, B.W.: The effect of High Doses of X-Radiation on the phagocytic, proliferative and metabolic properties of the reticuloendothelial system.- J. Exptl. Med.: 110, 49 - 64, 1959.-
- (276) GILMAN, R. and TROWELL, O.S.: The effect of radiation on the activity of reticuloendothelial cells in organ cultures of lymph nodes and thymus.- Int. J. Rad. Biol.: 9, 313 - 322, 1965.-
- (277) JIRGENSONS, B.: Organic Colloids.- Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1958.-
- (278) FRIEDLANDER, G., KENNEDY, J.W. and MILLER, J.M.: Nuclear and Radiochemistry.- Second Edition, J. Wiley & Sons, New York, 1964.-
- (279) PLAYOUST, M.R., Mc RAE, J. and BODEN, R.W.: Inefficient hepatic extraction of Colloidal Gold. Resulting Inaccuracies in determination of hepatic blood flow.- J. Lab. & Clin. Med.: 54, 728 - 738, 1959.-
- (280) DIXON, M. and WEBB, E.C.: Enzymes.- Longman's & Green Co., London, 1958.-
- (281) MURRAY, I.M. and KATZ, M.: Factors affecting the rate of removal of gelatin stabilized radiogold colloid from the blood. I.- The retardation of the radiogold disappearance rate by gelatin.- J. Lab. & Clin. Med.: 46, 263 - 269, 1955.-
- (282) SIMON, N.: Radioactive gold in filter paper electrophoresis patterns in plasma.- Science: 119, 95 - 96, 1954.-
- (283) MURRAY, I.M.: Interactions of gelatin - stabilized radiogold colloid and plasma proteins.- Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.: 91, 252 - 255, 1956.-
- (284) BONToux, J.: La gélatine dans l'or colloidal radioactif.- These Doct. Sci. Phys., Montpellier, 1961.-

- (285) SEAMAN, A.R. and MURRAY, I.M.: Observations on the Reticuloendothelial Elements of the Liver and Spleen of the Rat following Injections of Gelatin - Stabilized Gold Colloid.- *Acta Haematol.*: 17, 42 - 50, 1957.-
- (286) JENKIN, C.R. and ROWLEY, P.: The Role of Oponins in the Clearance of living and inert particles by cells of the reticuloendothelial system.- *J. Exptl. Med.*: 114, 363 - 374, 1961.-
- (287) MURRAY, I.M.: The mechanism of Blockade of the Reticuloendothelial System.- *J. Exptl. Med.*: 117, 139 - 147, 1963.-
- (288) MURRAY, I.M.: Clearance Rate in relation to agglutinins for gelatin - stabilized colloids in the Rat.: *Am. J. Physiol.*: 204, 655 - 659, 1963.-
- (289) NORMANN, S.J. and BENDITT, E.P.: Function of the Reticuloendothelial System. I.- A Study of the Phenomenon of Carbon Clearance Inhibition.- *J. Exptl. Med.*: 122, 693 - 707, 1965.-
- (290) NORMANN, S.J. and BENDITT, E.P.: Function of the Reticuloendothelial System. II.- Participation of a Serum Factor in Carbon Clearance.- *J. Exptl. Med.*: 122, 709 - 719, 1965.-
- (291) FILKINS, J.P., SABA, T.M. and DI LUZIO, N.R.: The role of opsonins in the in vitro phagocytosis of colloidal gold by hepatic macrophages.- *Fed. Proc.*: 25, 479, 1966.-
- (292) FILKINS, J.P. and DI LUZIO, N.R.: Mechanism of Gelatin Inhibition of Reticuloendothelial Function.- *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*: 122, 177 - 180, 1966.-
- (293) BENACERRAF, B., BIOZZI, G., HALPERN, B.N. and STIFFEL, C.: Physiology of Phagocytosis of Particles by the RES.- in: *Physiopathology of the Reticuloendothelial System, Symp. Counc. Int. Org. Med. Sci.*, Ed. B.N. Halpern, B. Benacerraf and J.F. Delafresnaye, 52 - 79, Blackwell Sci. Publ. Ltd., Oxford, 1957.-
- (294) BIOZZI, G., HALPERN, B.N., BILBEY, D., STIFFEL, C., BENACERRAF, B. et MOUTON, D.: Oestrogenes et fonction phagocytaire du Systeme Reticuloendothelial (SRE).- *C. R. Soc. Biol.*: 151, 1326 - 1331, 1957.-
- (295) HOWARD, J.G., BIOZZI, G., HALPERN, B.N., STIFFEL, C. and MOUTON, D.: The effect of mycobacterium tuberculosis (BCG) infection on the resistance of mice to bacterial endotoxin and Salmonella Enteritidis Infection.- *Br. J. Exptl. Pathol.*: 40, 281 - 290, 1959.-
- (296) STUART, A.E., BIOZZI, G., STIFFEL, C., HALPERN, B.N. et MOUTON, D.: Effet de quelques lipides simples sur la fonction phagocytaire du Systeme Reticuloendothelial.- *C. R. Acad. Sci.*: 250, 2779 - 2781, 1960.-

- (297) BALLANTYNE, B.: The Reticuloendothelial Localization of Hepatic Acetylcholinesterase.- *Experientia*: 22, 25 - 26, 1966.-
- (298) BIOZZI, G., STIFFEL, C., HALPERN, B.N. and MOUTON, D.: Lack of Action of Serum Opsonins in Phagocytosis of Inert Particles by cells of Reticuloendothelial System.- *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*: 112, 1017 - 1020, 1963.-
- (299) BIOZZI, G., STIFFEL, C., LE MINOR, L., MOUTON, D. et BOUTHILLIER, Y.: Etude quantitative de l'effet opsonisant des immusérums sur la fagocytose des salmonella par les cellules du SRE.- *Ann. Inst. Pasteur*: 105, 635 - 666, 1963.-
- (300) WAGNER (Jr.), H.N. and IIO, M.: Studies of the Reticuloendothelial System (RES). III.- Blockade of the RES in man.- *J. Clin. Invest.*: 43, 1525 - 1532, 1964.-
- (301) KOENIG, M.G., HEYSSEL, R.M., MELLY, A.M. and ROGERS, D.E.: The Dynamics of Reticuloendothelial Blockade.- *J. Exptl. Med.*: 122, 117 - 142, 1965.-
- (302) AFIIFI, F., SICOT, C., BENHAMOU, J.P. et FAUVERT, R.: Etude sur la granulopéxie. I.- Le phénomène de Chasse.- *Rev. Franç. Et. Clin. & Biol.*: 10, 79 - 83, 1965.-
- (303) WIENER, J., MARGARETTEN, W. and SPIRO, D.: An Electron Microscope Study of Reticuloendothelial System Blockade.- *Am. J. Pathol.*: 45, 783 - 803, 1964.-
- (304) LEMPERLE, G.: Effect of RES Stimulation on Endotoxin Shock in mice.- *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*: 122, 1012 - 1015, 1966.-
- (305) BARANOVA, F.S. and TUSTANOVSKI, A.A.: Effect of the functional conditions of the cells of the reticuloendothelial system on the concentration of mucoproteins in blood serum.- *Vop. Med. Khim.*: 11, 83 - 87, 1965.-
- (306) NORMANN, S.J.: Simultaneous clearance of two particles producing Reticuloendothelial Blockade.- *Fed. Proc.*: 25, 538, 1966.-
- (307) HIATT, N. and BONORRIS, G.: Removal of Serum Amylase in dogs and the influence of reticuloendothelial blockade.- *Am. J. Physiol.*: 210, 133 - 138, 1966.-
- (308) KOENIG, M.G., MELLY, M.A. and ROGERS, D.E.: The Reticuloendothelial Uptake of Staphylococcus aureus.- *J. Clin. Invest.*: 45, 1033, 1966.-
- (309) BLATTERBERG, B. and LEVY, M.N.: A humoral reticuloendothelial depressing substance in shock.- *Am. J. Physiol.*: 203, 409 - 411, 1962.-

- (310) BLATTERBERG, B. and LEVY, M.N.: Detection of reticuloendothelial depressing substance in shock.- Am. J. Physiol.: 209, 71 - 74, 1965.-
- (311) BLATTERBERG, B. and LEVY, M.N.: Some Properties of the Reticuloendothelial - depressing substance in the dog.- Am. J. Physiol.: 240, 312 - 314, 1966.-
- (312) COHEN, Y., WEPIERRE, J. et ROUSSELOT, J.P.: Les radioéléments dans l'étude des phénomènes de transport par les protéines plasmatiques.- Rapp. DR/gop/65-4/YC/RA, mars 1965.-
- (313) MAURER, P.H., DIXON, F.J. and DUKSTEIN, W.: Effect of Infusions of Polyvinylpyrrolidone on the Immune Response in Rabbits.- Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.: 88, 550 - 555, 1955.-
- (314) TOYAMA, T.: Studies on the Function of Reticuloendothelial System. II.- Effect of the RES blocking with macromolecular PVP on the lymphoid cell production and the production of serum antibody.- Acta Med. Okayama: 19, 307 - 316, 1965.-
- (315) TOTHILL, P.: The retention by the body of ¹³¹I-Polyvinylpyrrolidone and its effects on Radiation Dose.- J. Nucl. Med.: 6, 582 - 587, 1965.-
- (316) SCHAPIRO, R.L., Mc INTRYE, W.J. and SCHAPIRO, D.I.: The effect of homologous and heterologous carrier on the clearance of colloidal material by the reticuloendothelial systems.- J. Lab. & Clin. Med.: 68, 286 - 299, 1966.-
- (317) CARRAZ, C. et FIORINA, S.: Activation de la formation d'anticorps par le système réticuloendothelial.- Ann. Biol. Clin.: 25, 187 - 189, 1967.-
- (318) PAPADIMITROU, J.M.: Cell membrane changes during contact with some microorganisms.- Nature: 212, 631, 1966.-
- (319) BRANDT, P.W. and FREEMAN, A.R.: Plasma Membrane: Substructural Changes correlated with electrical Resistance and Pinocytosis.- Science: 155, 582 - 585, 1967.-

INDICE

INTRODUCCION GENERAL 1

CAPITULO I

DETERMINACION DEL TAMAÑO DE PARTICULAS COLOIDALES 7

I-1.- INTRODUCCION 7

I-2.- ESTUDIO CRITICO DE LOS PRINCIPALES METODOS 7

 I-2-1.- Ultramicroscopia 7

 I-2-2.- Ultrafiltración y Diálisis 8

 I-2-3.- Métodos Osmóticos 9

 I-2-4.- Difracción de Rayos-X 9

 I-2-5.- Velocidad de Sedimentación 11

 I-2-6.- Microscopia Electrónica 15

 I-2-7.- Métodos Opticos 19

I-3.- PARTE EXPERIMENTAL 27

 I-3-1.- Fundamento teórico del método ensayado 27

 I-3-1-1.- Determinación del tamaño de las
 partículas 27

 I-3-1-2.- Determinación de la concentración en oro. 34

 I-3-2.- Estudio Experimental Critico de los Métodos 37

 I-3-2-1.- Oro Coloidal Radiactivo 38

 I-3-2-2.- Microscopia Electrónica 38

 I-3-2-3.- Espectrofotometría 39

 I-3-2-4.- Resultados Cualitativos 39

 I-3-2-5.- Resultados Cuantitativos 40

 I-3-2-6.- Concentración en oro. Verificación Ex-
 perimental 49

 I-3-3.- Estudio del oro coloidal radiactivo en diferen-
 tes condiciones 51

 I-3-3-1.- Dilución en distintos medios 51

 I-3-3-2.- Influencia de la temperatura 56

 I-3-3-3.- Influencia de la dilución 57

 I-3-3-4.- Influencia del pH 58

I-4.- DISCUSION	59
-----------------------	----

CAPITULO II

PREPARACION DE ORO COLOIDAL RADIOACTIVO (198-Au)	64
II-1.- INTRODUCCION	64
II-2.- ANTECEDENTES	64
II-2-1.- Oro Coloidal no Radiactivo	65
II-2-2.- Oro Radiactivo (198-Au)	69
II-2-3.- Coloide de 198-Au	71
II-3.- PARTE EXPERIMENTAL	72
II-3-1.- Consideraciones preliminares	72
II-3-2.- Material y Reactivos	74
II-3-3.- Aparato para la preparación, con manejo a distancia	75
II-3-4.- Métodos	80
II-3-4-1.- Irradiación de oro metálico	80
II-3-4-2.- Preparación de coloides de oro germen ..	80
II-3-4-3.- Preparación del coloide de 198-Au	82
II-3-5.- Métodos de Análisis	84
II-3-6.- Resultados,.....	88
II-3-7.- Estudio del mecanismo de formación del coloide de 198-Au, crecido, estabilizado con gelatina .	93
II-4.- DISCUSION	94

CAPITULO III

DISTRIBUCION BIOLOGICA DE COLOIDES DE ORO RADIOACTIVO (198-Au)	97
III-1.- INTRODUCCION	97
III-2.- ANTECEDENTES	97
III-2-1.- Estudios de distribución biológica : técnicas generales y resultados obtenidos	97
III-2-2.- Centellografia	101
III-3.- PARTE EXPERIMENTAL	104
III-3-1.- Material	104
III-3-2.- Animales	105
III-3-3.- Técnicas utilizadas	105

III-3-4.- Resultados	107
III-3-5.- Centellografia	122
III-4.- DISCUSION	130

CAPITULO IV

CINETICA DE LA DESAPARICION DE COLOIDES DE ORO RADIOACTIVO DEL CAUDAL SANGUINEO	134
IV-1.- INTRODUCCION	134
IV-2.- ANTECEDENTES	134
IV-3.- PARTE EXPERIMENTAL	142
IV-3-1.- Fundamento teórico	142
IV-3-2.- Verificación Experimental	148
IV-3-2-1.- Material	148
IV-3-2-2.- Animales	149
IV-3-2-3.- Técnica Experimental	150
IV-3-2-4.- Resultados	151
IV-4.- DISCUSION	159

CAPITULO V

BLOQUEO DEL SISTEMA RETICULOENDOTELIAL	165
V-1.- INTRODUCCION	165
V-2.- ANTECEDENTES	166
V-3.- PARTE EXPERIMENTAL	170
V-3-1.- Material y Métodos	170
V-3-1-1.- Oro Coloidal Radiactivo (198-Au)	170
V-3-1-2.- Agentes bloqueantes	171
V-3-1-3.- Animales	172
V-3-1-4.- Técnica Experimental y Análisis de las curvas	172
V-3-2.- Resultados	173
V-3-2-1.- Bloqueo con gelatina de tipo Gr-Pr	173
V-3-2-2.- Bloqueo con gelatinas de distinto punto isoeléctrico	174
V-3-2-3.-	176
V-3-2-4.- Pinzamiento de la vena porta	178

V-3-2-5.- Bloqueo de coloides de 198-Au protegidos
con gelatina o con PVP mediante una de
estas sustancias agregadas en exceso 181

V-4.- DISCUSION 185

CAPITULO VI

CONCLUSIONES Y RESUMEN 191

VI-1.- CONCLUSIONES 191

VI-2.- RESUMEN 193

BIBLIOGRAFIA 196

INDICE 219



VI-2.- RESUMEN.-

1) Se resumen las aplicaciones médicas y biológicas de los coloides de oro radiactivo ($^{198}\text{-Au}$) y se plantea la necesidad de obtener una más amplia información básica acerca de estos preparados, especialmente en lo concerniente a la correlación entre sus propiedades fisicoquímicas y su comportamiento biológico.

2) Se consideran los distintos caminos que permiten determinar el tamaño de las partículas de un coloide y se analiza exhaustivamente la teoría de los métodos ópticos.

Se propone un procedimiento espectrofotométrico, de realización simple y rápida, basado en la teoría de Mie. El diámetro medio se obtiene a partir de la relación entre las densidades ópticas a 526 m μ y a 492 m μ , determinadas experimentalmente. Este valor se interpola en una curva construida teóricamente, en la que se representa la relación referida, en función del diámetro medio de las partículas coloidales.

A partir de la densidad óptica a 526 m μ , es posible conocer la concentración en oro del coloide. Se ha facilitado el cálculo de este último valor, trazando un nomograma.

Se establece que los cambios de temperatura entre -4°C y $+37^{\circ}\text{C}$ y la dilución del preparado en diversos medios y en distintas proporciones, no afectan el resultado de la determinación del tamaño de partículas; el espectro de absorción de las dispersiones se altera cuando se procede a una esterilización de la dilución.

Se discute el dominio de aplicación del método propuesto y se establece su utilidad en el análisis rutinario de los soles de $^{198}\text{-Au}$.

3) Se estudia la preparación de coloides de $^{198}\text{-Au}$ "germen" y "crecido", protegidos con gelatina. Se propone el empleo de la PVP como agente estabilizante para la elaboración de ambos tipos de coloides. En todos los casos se obtienen dispersiones de gran estabilidad, prácticamente libres de oro iónico, pH comprendido entre 5 y 7 y con tamaños de partículas entre 3 y 6 m μ y entre 20 y 30 m μ , respectivamente. Los preparados son estériles y apiretogénicos. La pureza radiactiva del $^{198}\text{-Au}$ es superior al 99.9%.

Se discute el mecanismo de formación de los coloides crecidos,

protegidos con gelatina, estableciéndose que el mismo es más complicado de lo generalmente admitido.

El empleo de la PVP propuesto, soluciona los inconvenientes que se encuentran en el uso de la gelatina. Los coloides crecidos estabilizados con PVP, presentan mayor facilidad y seguridad de preparación.

El estudio fisicoquímico de las dispersiones de tipo germen protegidas con gelatina o con PVP, no permite apreciar diferencias, de las cuales pueda inferirse alguna ventaja derivada del empleo de uno u otro agente estabilizante.

4) Se investiga el comportamiento biológico de los radiocoloides mencionados en el punto anterior, inyectados en la vena dorsal de la cola o en la cavidad aponeurótica de la pata posterior de ratones.

Se comprueba que los preparados no se eliminan significativamente del organismo y que la distribución de ambas dispersiones germen y de ambos coloides crecidos, administrados todos ellos por vía endovenosa, es muy semejante.

Se realizan ensayos centellográficos en seres humanos, demostrándose la nitidez de las imágenes del hígado obtenidas con coloides crecidos protegidos con PVP.

El estudio de la movilización linfática de los productos alojados en la cavidad aponeurótica, demuestra la superioridad de los coloides crecidos estabilizados con PVP, dada su mayor permanencia en el sitio de inyección.

Estos estudios permiten suponer que estas dispersiones podrían reemplazar con ventaja a los soles crecidos protegidos con gelatina para fines diagnósticos y eventualmente terapéuticos.

Se demuestra la posibilidad de efectuar linfograffas indirectas administrando coloides germen estabilizados con gelatina, en la región tributaria correspondiente; ello merced a su mayor movilización linfática.

5) Se analiza la cinética con que los coloides de ^{198}Au protegidos con gelatina desaparecen del caudal sanguíneo, en relación con la dosis inyectada, expresada en número de partículas administradas / Kg de animal.

La adaptación de ecuaciones del tipo propuesto por Michaelis y Menten, al fenómeno de la fagocitosis, permite establecer que la velocidad máxima de desaparición de la sangre o de captación hepática es de aproximadamente 1.4×10^{13} partículas / Kg / minuto, mientras que K_s es de alrededor de 5.7×10^{13} partículas / Kg. La verificación experimental de dicho modelo permite postular la reacción IV-14, pag. 144, que rige este fenómeno, independientemente del tamaño de las partículas inyectadas. Las consideraciones referentes al orden del proceso están subordinadas al valor de N_{op} . Cuando éste es apreciablemente menor que K_s , la reacción es de primer orden, mientras que, si N_{op} es comparable o mayor que K_s , el período de semidesaparición depende del mismo; por lo tanto la reacción deja de ser de primer orden para tender a una de orden cero.

Se discute la aplicación de estas experiencias a la normalización de la determinación del flujo sanguíneo hepático en clínica humana.

6) Se estudia el fenómeno de bloqueo del sistema reticuloendotelial.

Las experiencias realizadas permiten concluir que el efecto bloqueante del exceso de gelatina, inyectado en forma prácticamente simultánea con coloides de ^{198}Au estabilizados con esta sustancia, se ejerce cuando las moléculas de gelatina llegan por vía portal a los sinusoides hepáticos, donde se encuentran las células de Kupffer. Se provocaría una alteración de dichas células, que disminuiría su capacidad para adsorber partículas de oro coloidal. En este proceso podrían intervenir las cargas de las moléculas bloqueantes.

Incidentalmente se demuestra la posibilidad de emplear los coloides crecidos, protegidos con PVP, en la determinación clínica del flujo sanguíneo hepático.