

cinética de la desaparición del caudal sanguíneo de coloides de oro radiactivo protegidos con polivinilpirrolidona (PVP)³

Los coloides de oro radiactivo (^{198}Au) inyectados por vía endovenosa, se acumulan predominantemente en el hígado en un tiempo relativamente breve. Este hecho, debido a la fagocitosis de las partículas por las células de Kupffer, permite determinar el flujo sanguíneo hepático. La cinética con que se realiza este proceso fue materia de discusión durante algún tiempo, especialmente en lo que se refiere a la influencia del diámetro medio de las partículas y de la dosis del coloide inyectado. Así, Sheppard y col. (1) y Schoenberg y col. (2) comprobaron que el diámetro de las micelas no influye sobre la velocidad de fagocitosis, mientras que Dobson y col. (3) y Zilversmit y col. (4) mantienen el criterio opuesto. En lo que respecta al problema de la influencia de la dosis de coloide sobre la velocidad de captación, los trabajos de Meredith (5) e Iio y Wagner (6) permitieron demostrar que, para dispersiones con tamaños de partículas constantes, la cinética de fagocitosis puede asimilarse a las ecuaciones matemáticas propuestas por Michaelis y Menten para reacciones enzimáticas, expresando la dosis en mg o μg por Kg de animal. Recientemente Cohen y col. (7), trabajando con coloides de ^{198}Au protegidos con gelatina, han ampliado este criterio al proponer un modelo cinético que explica las discrepancias referentes a la influencia del tamaño medio de las partículas sobre la velocidad con que las mismas son fagocitadas. Dado que las experiencias fueron realizadas con coloides de tamaño medio de partículas variable, se demuestra que la fagocitosis es un proceso que sigue una cinética que matemáticamente se puede asimilar a las ecuaciones de Michaelis-Menten, siempre y cuando se las planteen en función del número de partículas co-

1. Orientación Física, Departamento de Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

2. Gerencia de Energía, Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires, Argentina.

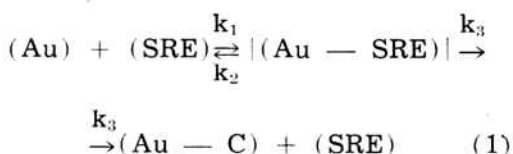
3. Trabajo recibido para su publicación el 15 de diciembre de 1968.

TABLA I

Preparación Nº	Diámetro medio (Angström)	Concentración en oro (mg/ml)	pH	Concentración de actividad (mCi/ml)
1	25	2.9	6.1	10.0
2	25	3.3	5.7	9.8
3	41	3.3	6.2	9.2
4	165	4.7	5.2	12.1
5	180	4.6	6.7	8.1
6	195	3.9	5.0	12.2

loidades inyectadas por Kg de animal (N_{op}). Por lo tanto, la velocidad de fagocitosis no está influida específicamente por el tamaño medio de las partículas coloidales administradas y sólo depende de N_{op} .

La reacción que representa el proceso de la fagocitosis en términos de una cinética del tipo arriba mencionado se puede escribir como sigue:



En esta ecuación, los símbolos utilizados tienen el significado siguiente:

- (Au) es la concentración de oro coloidal libre, expresada en número de partículas por Kg de animal.
- (SRE) es el número total de lugares activos de adsorción en la superficie de las células reticuloendoteliales por Kg de animal.
- (Au-SRE) es el número de partículas de oro coloidal adsorbidas en la superficie de las células reticuloendoteliales por Kg de animal. Se sabe que en el proceso de la fagocitosis de partículas coloidales, la primera etapa es la adsorción de la micela sobre la superficie celular. En el caso del oro coloidal, esto ha sido visualizado por microscopia electrónica por

Parks y Chiquoine (8) y demostrado indirectamente por Sicot y col. (9). Posteriormente, la partícula coloidal entra a la célula reticuloendotelial por micropinocitosis.

(Au-C) es el número de partículas de oro coloidal que se encuentran en el interior de las células reticuloendoteliales por Kg de animal.

Considerando que las mediciones se realizan cuando el sistema se encuentra en estado estacionario, y efectuando los tratamientos cinéticos habituales (10, 11), se demuestra que:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_s}{V_m} \times \frac{1}{(N_{op})} + \frac{1}{V_m} \quad (2)$$

En esta ecuación, V es la velocidad de depuración de los coloides de la sangre, expresada en número de partículas por Kg de animal por minuto; V_m , velocidad máxima de depuración expresada en las mismas unidades, se obtiene cuando todos los "lugares" superficiales están ocupados con partículas de oro coloidal. En estas condiciones, la velocidad de entrada de las partículas al interior de la célula reticuloendotelial, es decir, la velocidad de fagocitosis, es máxima. Por lo tanto, $V_m = k_3 \times (\text{SRE})$. Como es habitual, K_s es igual a $(k_2 + k_3)/k_1$ y debido a que k_2 es igual a cero (6), K_s resulta equivalente a k_3/k_1 .

Dadas las características exponenciales de las curvas de la actividad remanente en sangre en función del tiempo, es posible evaluar la constante de depuración k, a partir de la igualdad $k = 0.693/T$, donde T es el período de semidepuración, o sea el tiempo requerido para que la actividad sanguínea se reduzca a la mitad.

TABLA II

- Coefficiente de Correlación: + 0.886.
- Pendiente: $(1.68 \pm 0.08) \times 10^{-15}$ (partículas por Kg de animal por minuto)⁻¹.
- Valor del Test "T": 20.27.
- Ordenada en el origen: 3.49 ± 0.22 minutos.
- Valor del Test "T": 15.80.
- V_m : $(4.13 \pm 0.20) \times 10^{14}$ partículas por Kg de animal por minuto.
- K_s : $(2.08 \pm 0.16) \times 10^{15}$ partículas por Kg de animal.

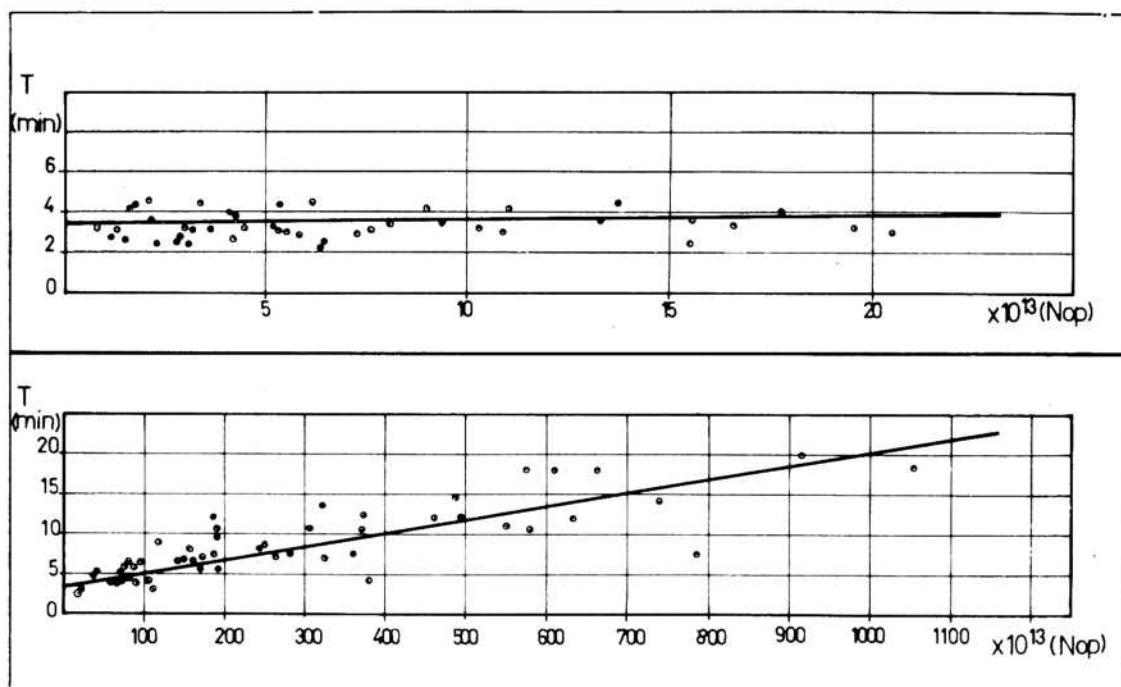


FIG. 1. Variación del periodo de semidepuración de coloides de ^{198}Au protegidos con polivinilpirrolidona (PVP) en función del número de partículas inyectadas por Kg de animal.

Por otra parte, siendo $V = K \times (N_{op})$, ya que se admite que el sistema se encuentra en estado estacionario, se demuestra que la ecuación (2) se transforma en

$$T = \frac{0.693}{V_m} \times (N_{op}) + 0.693 \times \frac{K_s}{V_m} \quad (3)$$

donde $0.693/V_m$ es la pendiente y $0.693 \times K_s/V_m$ es la ordenada en el origen de la recta que se obtiene cuando se representa T en función de (N_{op}) .

Es evidente que, si la ecuación (3) es válida independientemente del tamaño medio de las partículas coloidales inyectadas, el modelo propuesto es correcto. Cohen y col. (7) aplicaron dicho modelo a coloides protegidos con gelatina.

El objeto del presente trabajo consiste en establecer si el tratamiento arriba expuesto es válido también para coloides de ^{198}Au protegidos con polivinilpirrolidona (PVP) y si se observa alguna variación en el valor de V_m . Por otra parte, se han realizado experiencias tendientes a demostrar si se produce o no el fenómeno de bloqueo del sistema reticuloendotelial cuando se suministra un exceso de PVP junto con una dosis indicadora del coloide de ^{198}Au estabilizado con dicho

agente. Como se sabe, el fenómeno de bloqueo consiste en un aumento anormal del valor de T , y se observa perfectamente cuando se inyecta un exceso de gelatina junto con un coloide protegido con dicha sustancia (12).

Material y método

Hemos utilizado 6 coloides de oro radiactivo ^{198}Au estabilizados con PVP, preparados según la técnica propuesta por Caro y col. (13). Todas las preparaciones fueron estériles, estaban exentas de sustancias pirogénicas y evidenciaron un contenido en ^{198}Au iónico menor que 0.5 %. Las demás características de los preparados se consignan en la tabla I.

Las concentraciones de actividad están referidas al día de la preparación del coloide.

Los valores del diámetro medio de las partículas y de la concentración en oro de los coloides fueron determinados por métodos espectrofotométricos elaborados previamente (14, 15). Con estos datos se calcula N_{op} mediante la fórmula:

$$N_{op} = \frac{9.86 \times 10^{19} \times d}{D_3} \quad (4)$$

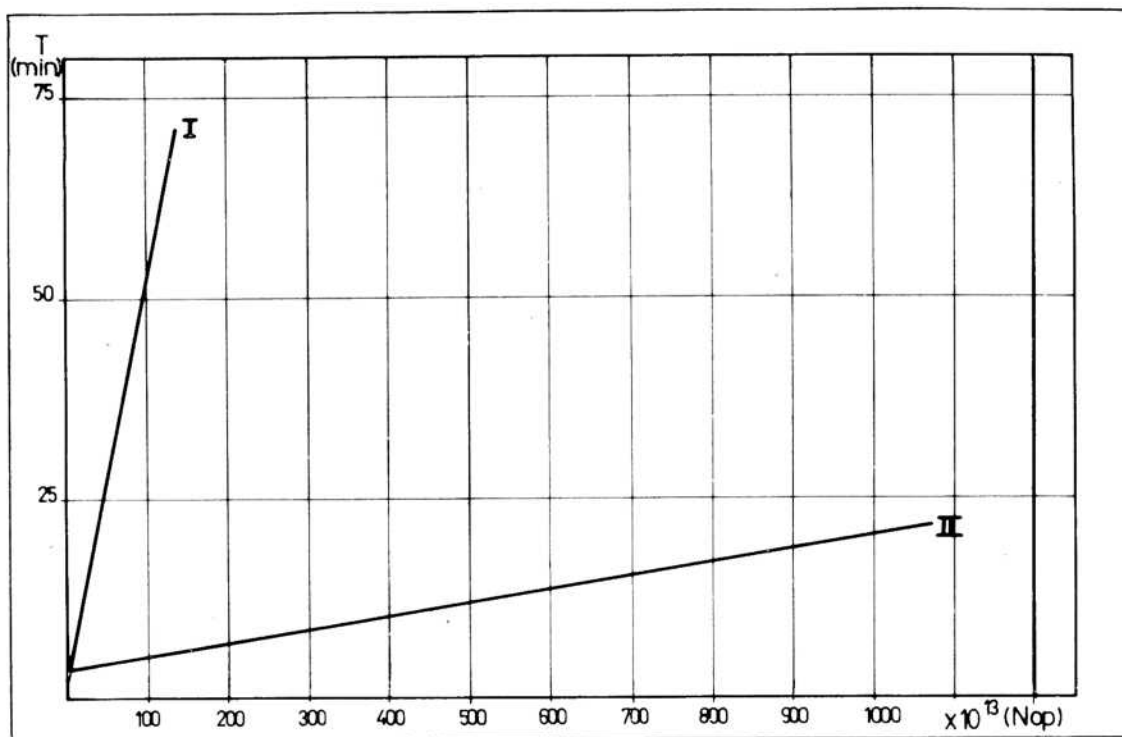


FIG. 2. Variación del periodo de semidepuración de coloides de ^{198}Au protegidos con gelatina (I) y con polivinilpirrolidona (II) en función del número de partículas inyectadas por Kg de animal.

donde d es la dosis expresada en mg de oro por Kg de animal, determinada a partir del volumen de coloide inyectado, la concentración en oro del coloide y el peso del animal, y D es el diámetro medio de las partículas, expresado en Angström.

Hemos utilizado 114 ratas blancas de la cepa "Wistar", machos y hembras, que pesaban aproximadamente 350 g.

La desaparición de los coloides de la sangre se determinó por medición continua y registro automático de la actividad remanente en sangre. Para ello se usó una técnica de canulación carotídeo-carotidiana propuesta por Cohen y col. (16), mediante la cual se obtiene una circulación sanguínea extracorporeal. Las dispersiones, llevadas a un volumen de 0.7 ml con una solución de ClNa al 0.9 %, fueron inyectadas por vía endovenosa a través de una cánula plástica insertada en la vena yugular. El valor de T se obtuvo a partir de las curvas representadas en papel semilogarítmico, previa sustracción del fondo y de la componente lenta que aparece al final de la curva. En nuestros experimentos, el valor de (N_{op}) , osciló entre 7.99×10^{12} y 1.05×10^{16} partículas por Kg de animal.

Resultados

Con los resultados obtenidos en los 114 experimentos llevados a cabo, hemos representado el periodo de semidepuración (T), en función del número de partículas inyectadas por Kg de animal (Fig. 1).

Con dichos puntos hemos efectuado el análisis de regresión correspondiente, lo que permitió calcular la pendiente y la ordenada en el origen de la recta de la figura 1. Introduciendo estos valores en la ecuación (3), se obtuvo la velocidad máxima de fagocitosis, V_m , y el valor de K_s . Los resultados logrados, con su error standard, se resumen en la tabla II, donde asimismo se acotan los valores del test "T" para la pendiente y la ordenada en el origen.

Cabe señalar que el valor de la ordenada en el origen se obtiene por extrapolación de la recta de regresión.

Evidentemente, el valor de V_m así calculado, representa la velocidad máxima con que los coloides pueden desaparecer del caudal sanguíneo, pero este valor corresponde también a la velocidad máxima con que las partículas son fagocitadas en el hígado. Por otra parte, se puede demostrar

una concordancia satisfactoria entre el valor experimental de (N_{0p}) para el cual V/V_m es igual a 0.5 y el valor de K_s .

En 10 de las experiencias referidas anteriormente, se realizó una segunda inyección una vez que la actividad sanguínea de la primera había llegado al 2 ó 3 % de la actividad inicial. En dicha segunda inyección, se administró una dosis de coloide igual a la de la primera, pero disuelta en una solución que contenía 100 mg de polivinilpirrolidona por Kg de animal de iguales características a las de la utilizada como agente protector en la preparación del coloide y sometida al mismo tratamiento térmico (esterilización en autoclave a 121° C. durante 30 minutos). Si se comparan los períodos de semidepuración obtenidos después de la primera y de la segunda inyección, se observa un aumento de 1.2 ± 0.2 minutos en el valor del T, correspondiente a la segunda experiencia.

Cabe señalar que, utilizando coloides de ^{198}Au estabilizados con gelatina, disueltos en una solución que contiene 25 mg por Kg de animal de gelatina de la misma procedencia y tratada en igual forma que la que se había utilizado como agente estabilizante en la preparación de los coloides, se observó un aumento de T de aproximadamente 17 minutos, trabajando en condiciones experimentales similares (17).

Discusión

Los resultados expuestos confirman, en primer lugar, que el modelo basado en el tratamiento matemático propuesto por Michaelis y Menten para reacciones enzimáticas, también es válido para explicar la cinética que sigue el proceso de la fagocitosis de coloides de oro radiactivo protegidos con polivinilpirrolidona, en el rango estudiado, es decir, con valores de N_{0p} comprendidos entre 7.99×10^{12} y 1.05×10^{16} partículas por Kg de animal. Si bien el coeficiente de correlación obtenido, + 0.886, es menor que el logrado en las experiencias realizadas con dispersiones estabilizadas con gelatina, + 0.984 (7), parece razonable aceptar que los datos obtenidos en este trabajo también se ajustan a la ecuación (3) dentro de los errores experimentales posibles. Por lo tanto, cabe aceptar también en

este caso que la velocidad de fagocitosis no está influida específicamente por el tamaño de las partículas inyectadas, por lo menos, en el rango estudiado (25 a 195 Angström).

Lo dicho demuestra la posibilidad de utilizar estos coloides para determinar el flujo sanguíneo hepático.

Sin embargo, interesa fundamentalmente discutir aquí la diferencia observada entre los datos obtenidos con coloides protegidos con gelatina y con PVP. Con este fin, hemos representado las rectas de regresión correspondientes a ambas series de experiencias (Fig. 2).

Es evidente, en primer lugar, que existe una diferencia muy significativa entre los valores de las pendientes de ambas rectas, lo que indica que las velocidades máximas de fagocitosis son también significativamente distintas. Recordemos que V_m , en el caso de dispersiones estabilizadas con gelatina, vale $(1.39 \pm 0.07) \times 10^{13}$ partículas por Kg de animal por minuto, mientras en el caso estudiado en el presente trabajo es $(4.13 \pm 0.20) \times 10^{14}$ partículas por Kg de animal por minuto, es decir, aproximadamente 30 veces mayor. Esta observación resulta especialmente llamativa si se tiene en cuenta el hecho de que la distribución biológica de ambos tipos de coloides inyectados por vía endovenosa es muy semejante (18).

La diferencia expuesta debe ser atribuida primordialmente a la distinta naturaleza del agente protector que recubre a la micela de oro en uno u otro caso. Las experiencias de bloqueo parecen confirmar este punto de vista.

Creemos que sería posible explicar esta observación, si se tiene en cuenta que $V_m = k_3 \times (\text{SRE})$. En base a esto, podría suponerse o bien un incremento del número de lugares en la superficie de las células reticuloendoteliales o, más probablemente, un aumento en el valor de k_3 , es decir, de la velocidad de entrada de la partícula al interior de la célula reticuloendotelial.

Si, por otra parte, aceptamos como verdadera la hipótesis adelantada por Drutz y col. (19) e independientemente por Caro (20), de que el bloqueo es un fenómeno que tiene lugar a nivel de la superficie de las células reticuloendoteliales, los resultados obtenidos en las experiencias de bloqueo y en el estudio cinético se corroboran mutuamente y apoyan la hipótesis mencionada. En efecto, si suponemos que la velocidad de entrada al

interior de las células reticuloendoteliales está aumentada en el caso de las partículas protegidas con PVP, es razonable pensar que cuando se inyectan dichas partículas, aun en presencia de un exceso de su protector, el grado de bloqueo, es decir, la disminución de la velocidad de fagocitosis, debe ser marcadamente menor.

Conclusiones

Se demuestra que la fagocitosis de coloides de ^{198}Au protegidos con polivinilpirrolidona (PVP) sigue una cinética que matemáticamente se puede asimilar a las ecuaciones de Michaelis-Menten. El tratamiento planteado en función del número de partículas inyectadas por Kg de animal demuestra que, en el rango estudiado, el tamaño medio de las partículas no influye específicamente sobre la velocidad de fagocitosis.

Los valores de V_m y de K_s son mayores que los datos correspondientes determinados con coloides de ^{198}Au estabilizados con gelatina. Interpretamos que esta diferencia se debe fundamentalmente a la distinta naturaleza del agente protector utilizado en cada caso. Las experiencias de bloqueo parecen confirmar este punto de vista.

Por lo tanto, se puede concluir que, tanto para el caso de los coloides de ^{198}Au protegidos con gelatina (7) como para los estabilizados con PVP, el tamaño medio de las partículas no afecta específicamente la velocidad con que las partículas son fagocitadas. Sin embargo, la naturaleza del agente protector utilizado en uno u otro caso ejerce una influencia importante sobre dicho parámetro. Estimamos que esta observación podría explicarse, suponiendo una variación de la velocidad con que la partícula coloidal entra en la célula reticuloendotelial.

Resumen

Se estudió la cinética con que los coloides de oro radiactivo (^{198}Au) protegidos con polivinilpirrolidona (PVP), con tamaños medios de partículas comprendidos entre 25 y 195 Angström, desaparecen del caudal sanguíneo. Para ello se determinó la actividad del coloide en sangre en función del tiempo, mediante una circulación extracorporeal, lograda por canulación carotídeo-carotidiana y registro automático de la actividad sanguínea.

Se demostró que la variación del período de semidepuración (T) en función del número de partículas inyectadas por Kg de animal (N_{op}) es una función lineal con un coeficiente de correlación de $+ 0.886$. Esta observación indica que la cinética que sigue el proceso de la fagocitosis de estos coloides es matemáticamente asimilable a las ecuaciones propuestas por Michaelis y Menten para reacciones enzimáticas, planteadas en función de (N_{op}). Por lo tanto, el tamaño medio de las partículas coloidales no influye específicamente sobre la velocidad de fagocitosis. Los resultados experimentales obtenidos en 114 experiencias y su correspondiente análisis de regresión, demuestran que la velocidad máxima de fagocitosis, V_m , es de $(4.13 \pm 0.20) \times 10^{14}$ partículas por Kg de animal por minuto y que K_s vale $(2.08 \pm 0.16) \times 10^{15}$ partículas por Kg de animal.

Al comparar estos resultados con los logrados en un estudio anterior (7), efectuado con coloides de ^{198}Au estabilizados con gelatina, se evidenció que el valor de V_m es aproximadamente 30 veces mayor, es decir, que T es considerablemente inferior para el mismo número de partículas inyectadas por Kg de animal. Esta observación indica que, además del número de partículas administradas por Kg de animal, la naturaleza del agente protector que recubre la micela coloidal, influye sobre la velocidad de fagocitosis. Creemos que la diferencia observada podría explicarse eventualmente, si se admite una variación de la velocidad con que la partícula entra al interior de la célula reticuloendotelial, que dependería del agente protector utilizado.

Resumo

Estudou-se a cinética com que os colóides do ouro radioativo (^{198}Au) protegidos com polivinilpirrolidona (PVP), com tamanhos médios de partículas compreendidos entre 25 e 195 Angström, desaparecem do caudal sanguíneo. Para isto se determinou a atividade do colóide no sangue em função do tempo, mediante uma circulação extracorpórea por canulação carotídeo-carotidiana, e medida contínua com registro automático da atividade sanguínea.

Demonstrou-se que a variação do período de semidepuração (T) em função do

número de partículas injetadas por Kg de animal (N_{op}) é uma função linear com um coeficiente de correlação do + 0.886.

Esta observação indica que a cinética que segue ao processo de fagocitose destes colóides é matematicamente assimilável às equações propostas por Michaelis e Menten para reações enzimáticas, consideradas em função de (N_{op}). Por tanto, o tamanho médio das partículas coloidais não influe especificamente sobre a velocidade de fagocitose. Os resultados experimentais obtidos em 114 experiências e sua correspondente análise de regressão, demonstram que a velocidade máxima de fagocitose, V_m , é de $(4.13 \pm 0.20) \times 10^{14}$ partículas por Kg de animal por minuto, e que K_s vale $(2.08 \pm 0.16) \times 10^{15}$ partículas por Kg de animal.

Ao comparar estes resultados com os obtidos em um estudo anterior, efetuado colóides de ^{198}Au estabilizados com gelatina, se evidenciou que o valor de V_m é aproximadamente 30 vezes maior, quer dizer que T é consideravelmente inferior para o mesmo número de partículas injetadas por Kg de animal. Esta observação indica que, além do número de partículas administradas por Kg de animal, a natureza do agente protetor que recobre a micela coloidal, influe sobre a velocidade de fagocitose.

Acreditamos que a diferença observada poderia explicar-se, eventualmente, admitindo-se uma variação de velocidade com que a partícula entra no interior da célula reticuloendotelial, que dependeria do agente protetor utilizado.

Summary

The kinetics of the disappearance from the blood stream of polyvinylpyrrolidone (PVP) protected radiogold colloids with mean particles sizes between 25 and 195 Angström, has been studied. For this purpose, the disappearance of the colloids from the blood was determined by continuous and automatic measurement of the radioactivity remaining in the blood, using an extracorporeal blood circulation technique.

It could be shown that the plot of the half-time of disappearance (T) against the number of injected particles per Kg of animal (N_{op}) gives a straight line, having a correlation coefficient of + 0.886. This observation indicates that the kinetics of the process of phagocytosis of these colloids may be assimilated from the

mathematical standpoint, to the equations proposed by Michaelis and Menten for enzyme reactions. Moreover, as the treatment is made in function of (N_{op}), it can be shown that the rate of phagocytosis is not affected specifically by the mean size of the colloidal particles. The experimental results obtained in 114 experiments and their corresponding regression analysis show that the maximal rate of phagocytosis, V_m , is $(4.13 \pm 0.20) \times 10^{14}$ particles per Kg of animal per minute and that K_s has a value of $(2.08 \pm 0.16) \times 10^{15}$ particles per Kg of animal.

When these results are compared with those obtained in a previous work (7), in which gelatin protected radiogold colloids were studied, it can be shown that the value of V_m is approximately 30 times greater, i.e. the half-time of disappearance is considerably shorter for the same number of injected particles per Kg of animal. This observation suggests that besides the number of administered particles per Kg of animal, the nature of the protective agent which covers the colloidal particle affects the rate of phagocytosis. We think that this difference can be explained if we admit a variation of the rate of entrance of the particle into the reticuloendothelial cell, when different protective agents are used.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas el habernos otorgado el subsidio N° 2611/66, que hizo posible la realización de este trabajo.

Bibliografía

1. SHEPPARD, C. W.; JORDAN, G. and HAHN, P. F.: Disappearance of Isotopically Labeled gold colloids from the circulation of the dog. *Am. J. Physiol.*, 164: 345-350, 1951.
2. 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.
3. DOBSON, E. L.; GOFMAN, 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 localization of radioisotopes of yttrium, zirconium and columbium in the bone marrow, liver and spleen. *J. Lab. and Clin. Med.*, 34: 305-312, 1949.

4. 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. and Clin. Med.*, 40: 255-260, 1952.
5. MEREDITH (Jr.), O. M.: Kinetics of Reticuloendothelial Phagocytic Response to intravenously administered ^{198}Au Colloidal gold in Rabbits. *Arch. Biochim. & Biophys.*, 95: 352-362, 1961.
6. 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. Investig.*, 42: 417-426, 1963.
7. COHEN, Y.; INGRAND, J. and CARO, R. A.: Kinetics of the disappearance of Gelatin Protected Radiogold Colloids from the Blood Stream. *Int. J. Appl. Rad. & Isotopes*, 19: 703-705, 1968.
8. PARKS, H. F. and CHIQUOINE, A. D.: Observations on Early Stages of Phagocytosis of Colloidal Particles by hepatic Phagocytes of the mouse. Proc. Stockholm Conf. Electron Microscopy, 154-156, Academic Press, N. Y., 1957.
9. SICOT, C.; AFIFI, F.; BENHAMOU, J. P. et FAUVERT, R.: Le phénomène de chasse au cours de la granulopexie. Étude Préliminaire. *Rev. Franç. Et. Clin. et Biol.*, 8: 786-788, 1963.
10. BRIGGS, G. E. and HALDANE, J. B. S.: Note on the Kinetics of enzyme action. *Biochem. J.*, 19: 338-339, 1925.
11. LINEWEAVER, H. and BURK, D.: Determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56: 658-666, 1934.
12. 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.
13. CARO, R. A.; NICOLINI, J. O. and RADICELLA, R.: Preparation and Biological Behaviour of Radiogold Colloids stabilized with Polyvinylpyrrolidone (PVP). *Int. J. Appl. Rad. & Isotopes*, 19: 547-550, 1968.
14. CARO, R. A. et INGRAND, J.: Détermination Spectrophotométrique de la taille des Particules d'or Colloïdal Radioactif. *Rev. Opt.*, 44: 281-293, 1965.
15. CARO, R. A.; NICOLINI, J. O. and RADICELLA, R.: Determination of Gold Sol Concentration from Spectrophotometric Data. *Int. J. Appl. Rad. & Isotopes*, 18: 327-329, 1967.
16. COHEN, Y.; COSTEROUSSE, O. et CHIVOT, J. J.: Pharmacodynamie des Colloïdes Radioactifs. *Min. Nucl.*, 8: 357-366, 1964.
17. CARO, R. A. et INGRAND, J.: Influence des propriétés physicochimiques de la gélatine sur la vitesse d'épuration sanguine de l'or colloïdal. Rapp. DR/gcp/65-21/RA, Saclay, France, Novembre 1965.
18. CARO, R. A.; DE PAOLI, T.; HAGER, A.; NICOLINI, J. A. y RADICELLA, R.: Preparación y comportamiento biológico de un coloide de oro radiactivo protegido con polivinilpirrolidona (PVP). Informe Comisión Nacional de Energía Atómica N° 213, Buenos Aires, 1968.
19. DRUTZ, D. J.; KOENIG, M. G. and ROGERS, D. E.: Further Observations on the mechanism of Reticuloendothelial Blockade. *J. Exptl. Med.*, 126: 1087-1098, 1967.
20. CARO, R. A.: Contribución al estudio del oro coloïdal radiactivo. Tesis, Universidad de Buenos Aires, 1967.