

# 50 años en el Laboratorio Clínico

El laboratorio de Análisis Clínicos es un componente básico del sistema de salud que tiene como finalidad colaborar con el diagnóstico, control de la evolución y/o tratamiento y prevención de los problemas de salud a través de información confiable, oportuna y confidencial que permita al médico una correcta toma de decisiones. La tecnología, junto con el recurso humano son los pilares sobre los cuales desarrolla su actividad.

En el pasado el progreso se vivía de una manera sostenida y los productos aparecían en el mercado en forma continua y predecible. Actualmente la velocidad con que se desarrollan las innovaciones tecnológicas no tiene precedentes en la historia de la humanidad. Esta revolución tecnológica complementada con trascendentales avances científicos, ha producido grandes cambios en las diferentes ramas de la Bioquímica.

En ocasión de celebrarse el 50° Aniversario de la Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires, el Comité de Redacción de Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana ha decidido solicitar a reconocidos expertos en diferentes ramas de nuestra disciplina su visión acerca de los cambios producidos en algunas especialidades en los últimos 50 años.

## TOXICOLOGÍA

### La evolución que he visto de la toxicología

Otmaro Enrique Roses

- *Farmacéutico-Bioquímico*
- Doctor en Farmacia y Bioquímica
- Licenciado en Criminalística
- Profesor Titular Consulto de Toxicología y Química Legal
- Correspondencia: oroses@sinectis.com.ar

(Nota: dejo constancia de que sólo podré hablar de los últimos 45 años).

La evolución la enfocaré desde dos aspectos: el que me tocó vivir y el de la evolución a nivel mundial.

### Evolución de la toxicología que me tocó vivir

Consideraré los aspectos evolutivos en lo analítico e instrumental y en el investigativo.

#### Aspectos analítico e instrumental

Desde el punto de vista analítico, mi experiencia se remonta a 1965, en que llegué a aplicar por breve tiempo la cromatografía en papel.

Un año después ya trabajábamos en la cromatografía en placa fina de sílica gel.

Complementariamente, en la identificación de sustancias empleábamos la espectrofotometría ultravioleta (con un Beckman DU), instrumento que también usábamos para la cuantificación de sustancias, en ultravioleta y color. Se conocían los principios y existencia de los cromatógrafos de gases con columna empacada, a uno de los cuales se pudo acceder hacia fines de la década del 60. Dicho aparato (Varian) estaba equipado con un detector de ionización de llama y de captura electrónica. Se utilizó tanto en detección como en cuantificación de sustancias, principalmente de plaguicidas clorados.

Ya desde mi acceso en 1965 se utilizaban rutinariamente las unidades de Conway para la determinación de etanol, metanol, monóxido de carbono y cianuros. En la actualidad son técnicas aún vigentes en muchos laboratorios. Las técnicas para determinar monóxido de carbono por el espectro de absorción (espectroscopios de Bunsen y de Hartridge) no dieron resultados satisfactorios.

Los metales mercurio y plomo se determinaban por colorimetría de los complejos que formaban con la diti-zona y el arsénico por la técnica también colorimétrica de Vasac y Sedivec del dietililicarbamato argéntico, actualmente superada, pero de una relativa vigencia al extremo de que hasta hace unos 10 años estaba en la USP y la usan muchos laboratorios forenses en nuestro país con resultados aceptables. En 1987, mediante esta técnica

se estableció y siguió la evolución de una intoxicación masiva por arsénico en la ciudad de Olavarría.

Hacia 1977 se comienza a emplear la espectrofotometría de absorción atómica con corrección de fondo y se incrementa la analítica mediante cromatografía gaseosa con columna capilar con detectores de ionización de llama, de captura electrónica y específicos para nitrógeno y fósforo (NP) y espectrofotometría ultravioleta con barrido automático. Con el espectrofotómetro de absorción atómica se hizo entre 1980 y 1982 el seguimiento de casos de intoxicación producidos por fenilmercurio empleado por las denominadas "pañaleras" para tratar el material que las mismas reciclaban. Con el mismo dispositivo se detectó la contaminación con fenilmercurio de soluciones parenterales de gran volumen unos años más tarde.

Por esa misma época comienza a comercializarse un equipo de cromatografía en placa fina de sílica gel normalizada (Toxilab MR) con revelado secuencial y provisto de un atlas en color que permite un diagnóstico orientativo de distintas drogas. Comenzamos a trabajar con dicho dispositivo hacia 1984. Los resultados se confirmaban por espectrofotometría ultravioleta y cromatografía gaseosa.

En la década del 90 comenzamos a trabajar rutinariamente en Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) con detector ultravioleta y fluorométrico y cromatografía gaseosa acoplada a detector de masas por impacto electrónico.

## Aspecto investigativo

En la década del 60-70 se trabajó especialmente sobre contaminación ambiental, en zonas abiertas de la ciudad de Buenos Aires, en la cuenca del Riachuelo y en ambientes confinados como son las estaciones de las líneas de subterráneos.

Posteriormente, se profundizó la analítica toxicológica en cuanto a detección de drogas en medios biológicos y determinación de parámetros de exposición y efecto de contaminantes en los trabajadores en ambientes laborales, tales como los metales pesados plomo y mercurio, y la actividad de deltaaminolevulinícodehidratasa. Estos y otros más agregados se realizan también hasta la fecha si bien las determinaciones de alteraciones cromosómicas no se efectúan en la Cátedra de Toxicología y Química Legal.

A partir de 1970 se comenzó a prestar soporte analítico para la identificación y cuantificación de sustancias tóxicas.

En la década que da inicio en ese año se emprendieron estudios sobre la presencia de plaguicidas clorados en grasas humanas y de animales antárticos así como en aguas del Océano Antártico, costas patagónicas y ríos Uruguay y de la Plata.

Paralelamente se hicieron estudios sobre el metabolismo del etanol en humanos y animales, con especial importancia forense en los primeros.

Entre 1981 y 2008 se desarrollaron estudios químicos y comportamentales (en animales) de drogas de abuso, entre ellas una decocción con características alucinógenas empleada en el norte argentino y toxicocinéticos de etanol, nicotina, cotinina y cocaína.

Se continuó con el estudio de la presencia de drogas de abuso en medios biológicos, como consecuencia del material arribado para su estudio en casos humanos.

Desde 1986 se diseñaron diversos trabajos epidemiológicos sobre las alteraciones que provocan contaminantes industriales y ambientales sobre sujetos expuestos, que permitieron establecer las producidas sobre los distintos sistemas endócrinos e inmunológicos, así como la incidencia del consumo de bebidas alcohólicas en parámetros ligados a la exposición al plomo.

A partir de 1994 se comenzó a realizar análisis de sustancias "dopantes" en humanos y en equinos, con metodologías de punta, contándose numerosas detecciones de esas sustancias, que llevaron a promover la disminución drástica de su empleo, con el consiguiente beneficio para la salud y la ética deportiva.

Los servicios analíticos, que en 1996 constituían unas 80 determinaciones distintas, llevaron a la creación del Centro de Asesoramiento Toxicológico Analítico, en el que se realizan, a pedido, estudios analíticos de Toxicología de Fármacos, Alimentaria, Forense y Laboral.

Se efectúan estudios sobre la incidencia del plomo en la producción de radicales libres en animales de experimentación y la posible acción neoplásica de PCB en humanos.

Desde el año 2001 se trabaja en la especiación del arsénico, así como en las alteraciones cromosómicas que el mismo produce.

También se estudian varios casos de exposición ambiental a metales en grandes grupos poblacionales y en ambientes familiares.

En 2010 se concluye un trabajo en animales sobre la distribución en el organismo y las alteraciones histopatológicas y comportamentales que producen en ratas las distintas formas de presentación del catión plata.

En 2010, como parte de un convenio, se dispone el comienzo de estudios del impacto de contaminantes sobre el ser humano en la cuenca del Riachuelo-Matanza.

## Evolución de la toxicología a nivel mundial

Por los años 60, la Toxicología era en su mayor parte analítica y auxiliar de la Medicina. En tal sentido, cabe recordar que en muchas universidades, en especial en

las carreras de Medicina, la Toxicología era un apéndice de la Farmacología.

Se puede decir que los aspectos analíticos, investigativos y regulatorios se desarrollaron en áreas impensadas debido a accidentes de naturaleza tóxica que involucraban a grupos humanos. Una característica general es que el avance de nuestra ciencia estuvo siempre por detrás de los primeros episodios tóxicos registrados.

Es así como los fenómenos de intoxicación a nivel industrial dieron origen a la Toxicología Laboral, que involucraba la determinación de tóxicos en el aire del ambiente de trabajo y posteriormente a la determinación de los denominados índices biológicos de exposición.

Los episodios de intoxicaciones, fundamentalmente por micotoxinas y los casos de Minamata y Niigata llevaron a la Toxicología Ambiental y a la Alimentaria, la primera ligada previamente a los episodios de elevación de la mortandad de poblaciones en riesgo por problemas respiratorios en Londres debidos a las nieblas tóxicas.

En 1969 René Truhaut crea el término "Ecotoxicología" con el que involucra no sólo la presencia de tóxico en el ambiente, sino que también cómo es su dinámica en el mismo. El Dr. Truhaut, farmacéutico y académico de Francia, ostentaba también el honroso título de Coronel de la Resistencia durante la Segunda Guerra Mundial.

En lo ambiental fue un hito importante el libro de Rachel Carson "Primavera silenciosa", tal vez exagerando los riesgos, pero con la virtud de poner en conocimiento del público en general la problemática de los plaguicidas.

El incremento y difusión de los fenómenos de adicción a drogas promovieron el desarrollo de la Toxicología de esas sustancias (denominada Toxicología Social).

La irrupción de la Talidomida en el mercado farmacéutico llevó a la Toxicología de los Fármacos, tomando un campo que con anterioridad era de la Farmacología.

Últimamente, las características propias de las ciencias forenses han llevado a la Toxicología Forense, asentada sobre la analítica y la investigación, de trascendental importancia que adquiere para dilucidar casos de notoria trascendencia. Baste mencionar el desarrollo que tienen las determinaciones de ADN.

En la actualidad se puede hablar, también de la Toxicología Genética, un renovado desarrollo de la Ecotoxicología llevando los conceptos no sólo al hombre sino también a las distintas especies biológicas. El desarrollo de los mecanismos de las intoxicaciones y de la Toxicocinética ha servido, entre otras cosas, para optimizar tratamientos en intoxicados y diseñar antídotos que salvan numerosas vidas o previenen intoxicaciones de gravedad.

Queda mucho por hacer, pero el camino comienza con un primer paso...y ese paso se ha dado.

## BIOQUÍMICA CLÍNICA

### De las proteínas plasmáticas a la proteómica

Los cambios fundamentales que se operaron a nivel analítico, en los últimos 50 años, con aplicación al campo clínico

Pablo Bresciani<sup>1</sup>, Marco Pizzolato<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bioquímico

<sup>2</sup> Dr. en Bioquímica

Depto. de Bioquímica Clínica

Laboratorio de Proteínas. INFIBIOC

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Universidad de Buenos Aires

Correspondencia: mapizzolato@hotmail.com

pd Bresciani@yahoo.com.ar

El estudio de los distintos tipos de disproteinemias con fines diagnósticos alcanzó un importante desarrollo en los últimos 50 años, posteriormente a los estudios pioneros de Tiselius (1) mediante la electroforesis libre y a la introducción de la electroforesis de zona sobre distintos medios soporte (papel, agar, acetato de celulosa, almidón, agarosa, poliacrilamida) en las décadas del 50 y del 60 (2) (3).

Si bien el fraccionamiento de las proteínas plasmáticas y otros líquidos biológicos mediante la *electroforesis* permitió obtener 5 a 7 fracciones, dependiendo del tipo de técnica, recién después de la introducción de la *Inmunoelectroforesis*, por parte de Grabar y Williams (4), a mediados de la década del 50, es que se logra la identificación de las mismas incluidas en cada fracción.

La inmunoelectroforesis combina una primera etapa de electroforesis seguida de una segunda etapa de inmunodifusión en geles, según el principio descrito previamente por Ouchterlony. Mediante este método se separan alrededor de unas 30 proteínas cuya alteración cuantitativa (por déficit o por sobreexpresión) posee un importantísimo valor para el diagnóstico o para el control de la evolución de distintas patologías. Una de las limitaciones de esta técnica es que brinda resultados de tipo semi-cuantitativo.

Con fines cuantitativos se desarrollaron sucesivamente, a mediados de la década del 60, los métodos de la *Inmunodifusión radial* introducida originalmente por Mancini, Carbonara y Heremans(5) y la *Electroinmunodifusión* descrita por Laurell (6).

El principio de la Inmunodifusión Radial reside en la difusión de una sustancia antigénica (Ag), en un medio soporte de gel que contiene, uniformemente distribuido, un anticuerpo (Ac) específico de tipo precipitante dirigido

contra el Ag que se desea cuantificar. Como producto de la interacción Ag – Ac se forma un anillo de precipitación cuya superficie resulta directamente proporcional a la concentración del Ag en cuestión.

En el caso de la Electroinmunodifusión, también denominada “*rocket electroforesis*”, el Ag se desplaza a través de un gel que contiene un Ac específico, uniformemente distribuido, pero en lugar de hacerlo de manera pasiva como en la Inmunodifusión, es forzado a desplazarse a lo largo del gel bajo la acción de un campo eléctrico. En este caso, como producto de la reacción Ag – Ac, se obtienen picos de precipitación (*rockets*) la altura de los cuales es proporcional a la concentración del Ag. La principal limitación de esta técnica es que se utiliza un *buffer* a un pH próximo al punto isoeléctrico de las Inmunoglobulinas (Igs), para asegurarse que el desplazamiento del Ac por el efecto del campo eléctrico sea nulo; esto hace que la técnica posea especial aplicación para todas aquellas proteínas que tengan movilidad electroforética superior a las Igs, de modo que se produzca la “*crossed electroforesis*” deseada, y no resulta adecuada en cambio, para la correcta cuantificación de las Igs. Se utiliza exitosamente para la cuantificación de distintos factores de coagulación y de distintos tipos de apolipoproteínas entre otras aplicaciones.

Debido al motivo previamente descrito es que la Inmunodifusión Radial se ha impuesto, a nivel clínico, como la técnica de elección para la cuantificación de proteínas en líquidos biológicos y en especial para la determinación cuantitativa de las distintas Igs (IgG, IgA, IgM, IgD). En la actualidad se utilizan en forma rutinaria, sobre todo en laboratorios de alta complejidad, métodos automatizados mediante técnicas de *Immunofelometría* o *Inmunoturbidimetría*.

La realización del *Proteinograma Electroforético* ha experimentado también considerables avances con los equipos automatizados, pues ha logrado una mejor estandarización de las técnicas, y por lo tanto una mejor reproducibilidad, permitiendo que la interpretación y validación final, con la ineludible intervención profesional, no se vea afectada por los frecuentes pormenores provocados por los artefactos o fallas casuales.

Mediante la *electroforesis capilar* se ha incrementado en forma significativa la sensibilidad para detectar moléculas proteicas en líquidos biológicos en el orden de los nano, pico y femtomoles. La electroforesis capilar, aunque por el momento a un costo aún elevado, con su gran versatilidad de métodos analíticos ha encontrado lugar en la especialidad de Proteínas en Bioquímica Clínica, introduciendo equipos especialmente preparados para la realización del Proteinograma Electroforético de rutina.

Cuando distintos cuadros patológicos se acompañan de una alteración cuantitativa en la síntesis de Igs (disgammaglobulinemias), una exacerbada síntesis de las

mismas (hipergammaglobulinemia) se denomina Gammapatía, la cual, dependiendo de su origen, puede ser de tipo policlonal (la mayoría de las veces), de tipo monoclonal y excepcionalmente de tipo oligoclonal. Para la tipificación inmunológica de las mismas se utiliza ventajosamente la *Electroinmunofijación*, originalmente descrita por Alper y Johnson (7). El principio del método consiste en un fraccionamiento electroforético previo de la muestra, en las condiciones habituales, seguido de una reacción Ag – Ac *in situ*, la que se logra cubriendo con los respectivos Ac monoespecíficos la superficie del gel. En la práctica se realiza en forma de canales con Ac dirigidos contra las distintas clases de cadenas pesadas y los distintos tipos de las cadenas livianas de las Igs (cinco en total, más un canal correspondiente al control de corrida del mismo paciente). En el caso de observar una reacción positiva, es decir una imagen superponible con el pico o banda homogénea encontrada o sospechada en el control, frente a una sola clase de cadena pesada y un solo tipo de cadena liviana corresponderá a una Gammapatía Monoclonal, caso contrario, será de tipo policlonal.

Si bien puede incluirse a la *Ultracentrifugación* como método, a nivel analítico o preparativo, para el aislamiento y purificación de proteínas, no tiene en general aplicación práctica con fines clínicos, salvo en casos muy particulares como el aislamiento de los distintos tipos de Lipoproteínas. El método se basa en la separación de las proteínas mediante centrifugación a muy altas revoluciones, lo que es posible alcanzar aplicando vacío y refrigerando para evitar la desnaturalización, a distintas densidades, en base a su coeficiente de sedimentación o de flotación según los casos.

Otros métodos aplicados con el mismo objetivo fueron la utilización de la cromatografía líquida convencional utilizando columnas, de intercambio iónico, gel filtración o afinidad mediante las cuales se han aislado y purificado gran cantidad de proteínas, aunque su uso quedó relegado fundamentalmente al laboratorio de investigación y no al de Análisis Clínicos. Algo semejante ha ocurrido con el *isoelectroenfoque* y la *isotacoforesis*. Desde hace un tiempo la *cromatografía líquida de alta performance (HPLC)* ha encontrado aplicación en el fraccionamiento con alta sensibilidad y resolución para proteínas del tipo de la hemoglobina, sobre todo para la identificación de variantes anormales de la misma.

Podemos mencionar también la *electroforesis en dos dimensiones (2D)*, que combina un primer fraccionamiento por isoelectroenfoque (separación por puntos isoeléctricos) seguido de una electroforesis en la segunda dimensión (en ángulo de 90°) en un soporte de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (separación por pesos moleculares, *SDS-PAGE*).

En los últimos 40 años nuestro grupo de trabajo ha realizado aportes originales, tanto desde el punto de vista metodológico para la identificación y cuantifica-

ción de proteínas en líquidos biológicos, como para el control de cambios en su estructura y concentración en curso de distintas patologías. Hemos tomado al *Mieloma Múltiple* como modelo típico de una enfermedad que presenta una “proteína marcadora”, denominada genéricamente componente “M” y que estructuralmente es una Inmunoglobulina Monoclonal, cuya concentración sérica resulta proporcional al tamaño del tumor, de tal forma que su cuantificación aporta, además de un elemento de diagnóstico, el control de la respuesta terapéutica, para establecer remisión y recaída del cuadro clínico. En los últimos 20 años nos hemos interesado especialmente en el seguimiento de los pacientes con Mieloma post trasplante autólogo de médula ósea (TAMO) (16) (18) (21).

En el plano metodológico hemos realizado la adaptación de técnicas de alta complejidad a la infraestructura de nuestro medio, permitiendo el acceso a las mismas por parte del Laboratorio Clínico.

En ese aspecto se puede mencionar la *Electroinmuno-difusión* (8) en acetato de celulosa publicada inicialmente en la revista *Bioquímica Clínica*, actual *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, y posteriormente ampliada en el *Clinical Chemistry* (9) (11); la *Inmuno-difusión Radial* en igual soporte (10); la *Inmuno-electroforesis Cuantitativa Bidimensional* (12); la *Electroinmunofijación* (13); la *gel filtración en capa fina TLG + inmunofijación* (14) (15); el fraccionamiento de microproteínas urinarias mediante *SDS-PAGE* (19) (20); una modificación de *electroforesis 2D* combinando un fraccionamiento previo en acetato de celulosa seguido de una migración en gradiente de *SDS-PAGE* (22), la implementación de un sistema de coloración ultrasensible con plata coloidal para la determinación de proteínas en líquidos biológicos sin concentración previa (17).

La Proteómica comprende la medición simultánea de una gran cantidad de proteínas en una mezcla compleja. Mediante la combinación de Cromatografía líquida con la Espectrometría de Masas en *tandem*, se ha logrado identificar una gran cantidad de las denominadas “*low molecular weight proteome*” (23).

El desafío futuro de la metodología proteómica reside en comparar su sensibilidad y resolución con la de los inmunoensayos históricos. Es así que mediante el ELISA, por ejemplo, se realiza la determinación de un marcador proteico específico, mientras que con los métodos actuales de *Microarray-Multiplex* se efectúa la determinación de varios marcadores simultáneamente.

La HUPRO (Human Proteome Organisation) está constituida por grupos de investigación en diferentes países y realiza actualmente un estudio multicéntrico abocado a la identificación del perfil de las proteínas del plasma humano, de distintos grupos poblacionales, conformando una base de datos unificada. Se considera que existirían alrededor de un millón de proteínas en el plasma humano, de las cuales se han identificado hasta

la fecha apenas unas 1.200. De ellas, las 22 más comunes representan cuantitativamente cerca del 90% del total, en tanto que del 1% al 10% restante corresponden a las que se encuentran en muy baja concentración.

El objetivo de las nuevas metodologías es lograr pruebas que posean alta sensibilidad, especificidad, resolución, reproducibilidad, bajo costo y la posibilidad de ser automatizadas.

Queda para el futuro no sólo detectar e identificar nuevas proteínas, sino demostrar su función biológica y su potencial relevancia diagnóstica como biomarcadores de diferentes patologías. Se cumpliría así el deseo expresado por el gran Bioquímico inglés Frederick Sanger en ocasión de recibir su primer premio Nobel 1958, (fue premiado por segunda vez en 1980):

*“The determination of the structure of insulin clearly opens up the way to similar studies on other proteins...”*

*“One may also hope that studies on proteins may reveal changes that take place in disease and that our efforts may be of more practical use to humanity”*

*Fred Sanger, Nobel Lecture (dec 11, 1958)*

## Referencias bibliográficas

1. Tiselius A. Electrophoresis of serum globulins. *Biochem J* 1937; 31: 313-7.
2. Grassmann W, Hannig K. Ein Quantitative Verfahren zur Analyse der Serumproteine durch Papierelektrophorese. *Zchr Physiol Chem* 1952; 290: 1.
3. Kohn J. A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis. *Clin Chim Acta* 1957; 2: 297-303.
4. Grabar P, Williams CA. Methode immunoelectrophorétique d'analyse de mélange des substances antigéniques. *Biochim Biophys Acta* 1955; 17: 67-74.
5. Mancini G, Carbonara A, Heremans J. Immunochemical quantitation of antigen by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965; 193: 265-373.
6. Laurell CB. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in antibody containing agarose gel. *Ann Biochem* 1966; 15: 45-52.
7. Alper C, Johnson M. Immunofixation electrophoresis. Technique for study of proteins polymorphism. *Vox Sang* 1969; 17: 445-52.
8. Pizzolato M, Pizzolato MC, Del Campo GB, Vergani C. Rápida cuantificación de proteínas específicas en líquidos biológicos por electroinmuno-difusión en acetato de celulosa gelatinizado. *Bioquím Clín* 1971; 5: 302-10.
9. Pizzolato MC, Del Campo GB, Pizzolato M, Vergani C. Sensitive, rapid quantitation of serum and urinary proteins by electroimmunodiffusion. *Clin Chem* 1972; 18: 203-5

10. Pizzolato MC, Pizzolato M, Agostoni A. Single radial immunodiffusion of undiluted serum proteins. *Clin Chem* 1972; 18: 237-8.
11. Brancaccio D, Rivolta E, Graziani G, Pizzolato M. Albumin and alfa-2 macroglobulin clearance: a new approaching method for studying selectivity of proteinuria in unconcentrated urine. *Nephron* 1974; 12: 150-6.
12. Pizzolato M. Two-dimensional immunoelectrophoresis on cellulose acetate: improved method for routine protein estimation. *Clin Chim Acta* 1973; 45: 207-14.
13. Pizzolato M, Goñi F, Salvarezza R. Immunofixation on cellulose acetate: An improbe screening method for monoclonal immunoglobulins. *J Immunol Methods* 1979; 26 (4): 365-8.
14. Pizzolato M, Goñi F. Thin layer gel filtration immunofixation: identificaction of abnormal molecular weight immunoglobulins or related fragments. *J Immunol Methods* 1984; 72 (1): 91-5.
15. Pizzolato M, Bresciani P, Goñi F. Value of gel filtration-immunofixation in detection of "M" components with antibody activity. XII International Congress of Clinical Chemistry Río de Janeiro (Brasil). Abril 1984
16. Corrado C, Bruno S, Saslavsky J, Lein J, Cavagnaro F, Tezanos Pinto M, *et al.* Prognostic factors in multiple myeloma: definition of risk groups by multivariate analysis. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1839-44.
17. García M, Madalena L, Bragantini G, Bresciani P, Pizzolato M. Electroinmunofijación de orinas sin concentrar por coloración con metales pesados. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1996; 30 (3): 215-20.
18. Pizzolato M, Bragantini G, Bresciani P, Pavlovsky S, Chuba J, Vidal R, *et al.* Multiple myeloma with double IgG1-K gammopathy with particular response to chemotherapy. *Br J Hematol* 1998; 102: 503-8.
19. Facio ML, Madalena L, Bragantini G, Fraind S, Bresciani P, Pizzolato M. Determinación de microproteínas urinarias en orinas sin concentrar. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2000; 35: 285-92.
20. Madalena L, Facio ML, Angerosa M, Pandolfo M, Bresciani P, Alejandro M, *et al.* Urinary excretion of low molecular weight proteins in patients with pure monoclonal light chain proteinuria. *J Nephrol* 2007; 20: 683-8.
21. Alejandro ME, Madalena LB, Pavlovsky MA, Facio ML, Corrado C, Milone G, *et al.* Oligoclonal bands and immunoglobulin isotype switch during monitoring of patients with multiple myeloma and autologous hematopoietic cell trasplantation: a 16 year experience. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48 (5): 727-31.
22. Facio ML, Madalena L, Bacqué MC, Idiarte L, Pandolfo M, Angerosa M, *et al.* Seguimiento del perfil proteico urinario en el trasplante renal. *Acta Bioq Clin Latinoam* 2010; 44 (4): 653-60.
23. Anderson NL. The Clinical Plasma Proteome : A survey of clinical assay for proteins in plasma and serum. *Clin Chem* 2010; 56 (2): 177- 85.