

Disertación del recipiendario del Premio Bayer 2001 Dr. Enrique L. Portiansky.

**Sr. Vicedecano de la Facultad de Ciencias Veterinarias,
Sr. Vicepresidente de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria,
Sr. Presidente del Jurado,
Sr. Representante de la Casa Bayer Argentina,
Colegas,
Señoras y Señores.**

Reseña de 20 años en el campo de la sanidad animal

Ante todo quisiera agradecer a la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria por haber creído en mi y en mi trabajo.

A los miembros del jurado por haberme distinguido con el Premio Bayer en mérito a una trayectoria en el campo de la salud animal, que aunque corta, fue muy fructífera gracias a quienes fueron mis pares en cada uno de esos momentos, así como las instituciones que me apoyaron.

A la empresa Bayer, que desde hace muchos años apoya a las Ciencias Veterinarias, como en esta oportunidad, a través del otorgamiento de este premio.

A mi familia, por acompañarme todo estos años y permitirme desarrollar la tarea que tanto quiero.

A la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Veterinarias, sus autoridades de hoy y de entonces, hace más de 20 años, a mis profesores, compañeros, y colegas que me formaron, guiaron y enseñaron y a todos aquellos que me permitieron que les transmitiera mis conocimientos y errores.

A mis compañeros de trabajo de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de La Plata.

A los integrantes del Instituto de Patología, en particular a los de la Cátedra de Patología General Veterinaria, por su diario interactuar en lo laboral y en lo social.

Al Instituto Weizmann de Ciencias de Israel, que me permitió forjar mis primeras armas en el campo de la investigación.

Al CONICET, por permitirme continuar en el trabajo de investigación, aún bajo las circunstancias políticas y económicas más desfavorables.

Al JICA, por su cooperación brindada a nuestra Facultad y a la Empresa Sirex S.A. por el aporte de equipamientos para nuestro laboratorio.

A los Laboratorios Bagó, Labinca, Hoechst, Vetanco y Medipharma por brindarme su apoyo financiero a lo largo de estos 20 años de profesión.

A los amigos de siempre y a todos aquellos a quienes no nombré anteriormente, pero que de una u otra forma colaboraron en tareas científicas y docentes.

Mi historia profesional comienza en la misma Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Allí comencé a desear lo desconocido. Buscar el porque de las cosas, tentando teorías

en un mundo que se me tornaba tan amplio como inalcanzable. Muchos fueron los temas que me atraparon a lo largo de los cinco años de mi carrera, pero sin dudas el que más me subyugó fue el fascinante y casi incipiente campo de la inmunología, de la mano del Dr. E. Pennimpe. Fue tanta mi afinidad por el conocimiento de las interacciones de antígenos y anticuerpos con el resto del organismo, que decidí continuar mis estudios de posgrado en un tema íntimamente relacionado. Fue así que en 1982 ingresé al Instituto Weizmann de Ciencias de Israel, donde en el laboratorio del Dr. G. Berke trabajé durante 2 años en la respuesta inmune frente a células tumorales. Los experimentos consistían en la inoculación experimental de ratones con células tumorales contra las cuales el animal generaba células citotóxicas.

Una vez extraídas dichas células, se las enfrentaba nuevamente contra las células tumorales que le habían dado origen confirmando así su especificidad. Pero el objetivo final, y dado que hasta ese momento se desconocía el mecanismo por el cual los linfocitos T destruían a sus células blanco, fue determinar si las membranas de dichos linfocitos presentaban algún poder citolítico, independiente del resto de la célula.

Fue necesario entonces comenzar a estudiar distintos métodos para el aislamiento de las membranas plasmáticas y su posterior reinsertión en células distintas a la de origen.

Asimismo, fue necesario estudiar distintos métodos de detección, visuales, inmunológicos y físicos para certificar la presencia de las membranas originales, en las células implantadas. Las membranas fueron aisladas y transplantadas a una

célula no citotóxica, transformándola en citotóxica, pero lamentablemente sin ninguna especificidad. Hoy se sabe que el poder citocida de los linfocitos T citotóxicos reside en los gránulos contenidos en el interior del soma celular, pero que es imprescindible la presencia de la membrana para que dicho efecto sea específico. Si bien los resultados no fueron los esperados, fueron suficientes como para escribir una Tesis que me permitió obtener el título de Master of Sciences.

Al regresar al país en plena democracia del año 1985, comencé a buscar un laboratorio donde poder continuar mis estudios. Luego de algunos meses de incertidumbre logré incorporarme al laboratorio de Patología, en la Facultad de Medicina de la UNLP, dirigido por el Dr. R. Laguens. Para ese momento ya contaba con una beca de perfeccionamiento del CONICET que se prolongaría durante 6 años. En este laboratorio y junto al Dr. P. González, comenzamos a estudiar otro aspecto de la respuesta inmune: la respuesta inmune mediada por anticuerpos, en la fiebre aftosa. Para este proyecto teníamos planteado un estudio en ratones como modelo experimental y otro en bovinos. El trabajo en ratones consistía en la inoculación experimental del virus y su sacrificio en diferentes períodos, para determinar el grado de daño producido. Lo interesante fue que, a través de este modelo encontramos que el páncreas es un excelente órgano para el estudio de la regeneración celular. Gracias a estos estudios, conseguimos el financiamiento del laboratorio Hoechst de Alemania para probar drogas de uso humano, de aplicación en las pancreatitis. Mediante la aplicación de inmunomoduladores pudimos

determinar que en la patogenia de la fiebre aftosa actúa fundamentalmente la inflamación general y que a su vez existe una respuesta inmune competente que se puede exacerbar.

Por un lado pudimos ver que los encargados de producir las lesiones en el páncreas eran los neutrófilos atraídos por los propios virus y no los linfocitos como hasta ese entonces se suponía. Por otro lado, vimos que la cantidad de anticuerpos aumentaban en comparación con la respuesta no modulada. Estos resultados nos dirigieron a estudiar el mecanismo en si mismo de la respuesta inmune de base humoral. A través de estos estudios pudimos romper uno de los dogmas de la inmunología, que dice que los clones celulares poseen la información para responder en contra de los antígenos, pero que estos clones requieren de un proceso de maduración previa.

Nosotros determinamos que las células que producen anticuerpos están preparadas para responder inmediatamente pero que existe un freno que regula su funcionamiento. La respuesta inmune frente al virus aftoso fue también estudiada en bovinos. Lejos de inducir la enfermedad, nuestro modelo pretendía determinar la respuesta inmune frente a un inmunomodulador. Para ello contamos con el auspicio del laboratorio Labinca, productor de la ciclofosfamida. Con estos estudios pudimos determinar que la vacunación conjunta contra el virus de la fiebre aftosa, utilizando la vacuna oleosa y la ciclofosfamida, aumentaba no solo la respuesta inmune humoral al doble de la respuesta sin modular, medida en términos de protección, sino que además se prolongaba en el tiempo más de 3 veces. Lamentablemente en

1995, por decreto presidencial, se prohibió la manipulación del virus aftoso en laboratorios no autorizados, debiendo suspender nuestras investigaciones.

Simultáneamente, fuí desarrollando trabajos paralelos con otros colegas en temas siempre relacionados con el sistema inmune y la salud animal. Fue así que junto con la Dra C.Castellano realizamos un trabajo de tesis doctoral, en donde estudiábamos aspectos clínicos e inmunológicos de la demodeccia canina. El mencionado trabajo pretendía determinar el o los factores que incidían en la inmunosupresión observada en dicha enfermedad. Para ello se tomaron animales espontáneamente enfermos y posteriormente tratados, a los que se les tomaba suero para utilizarlo en pruebas funcionales de fagocitosis y de estimulación linfocitaria. Nuestro trabajo demostró que en el suero de los pacientes enfermos existía un producto proveniente del parásito, del organismo o de la interacción entre ambos que impedía el desarrollo de la respuesta inmune por bloqueo de los macrófagos.

Años mas tarde, gracias a los auspicios del laboratorio Medipharma pudimos establecer nuevas propiedades de la lidocaína, lo que valió la aprobación de una patente de invención. En este trabajo se determinó que la lidocaína ejerce un efecto protector, aparentemente a través de su acción sobre mensajeros secundarios de membrana, en contra de las infecciones virales. Vimos entonces que esta droga era efectiva contra el parvovirus canino y el virus aftoso, entre otros.

Allá por 1995, en pleno auge de la colaboración de nuestra Facultad con la Universidad de Tokio, a través

de la agencia JICA, decidí continuar mi labor científica en la Cátedra de Patología General, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, donde ejercía la docencia bajo la dirección del Dr. E.Gimeno. Con el Dr. Gimeno comenzamos a trabajar en otro aspecto de la respuesta inmune: la detección de patógenos mediante técnicas basados en principios inmunológicos. Las técnicas de inmunohistoquímica permiten la detección de antígenos en tejidos previamente fijados e incluidos en parafina mediante el uso de un anticuerpo marcado brindando una reacción coloreada en el sitio de unión específica. La acción del formol sobre los tejidos induce, en ciertas ocasiones, el enmascaramiento de los antígenos presentes en los tejidos. Por ello, al comenzar nuestro trabajo conjunto encontramos un método para desenmascararlos y permitir una mejor detección de los mismos.

Simultáneamente y gracias al equipamiento donado por JICA, comenzamos a utilizar un analizador de imágenes que nos permitió cuantificar y caracterizar objetos microscópicos. El analizador de imágenes es un programa informático

que permite incorporar imágenes observadas al microscopio o elementos macroscópicos, transformarlos en lenguaje informático (digitalización) y obtener información numérica de los mismos. Así es posible determinar cuantas células tiene un tejido, que formas tienen dichas células, que espacio ocupan en el tejido total y hasta que intensidad de color presentan. Basados en estas propiedades, pudimos combinar las técnicas inmunohistoquímicas con la informática y obtener así, un dato que nos permitía especular con la cantidad de antígeno presente en el tejido y en consecuencia, establecer el daño producido. Mediante esta metodología es posible, asimismo, determinar la transformación de células normales en neoplásicas, pronosticar la evolución de una fractura, establecer control de calidad de productos farmacéuticos, hacer estudios de funcionalidad, etc. Todos estos trabajos nos permitieron elaborar un plan, que hoy estamos poniendo en marcha, para establecer un nuevo campo de la Patología: la Patología cuantitativa.

Pasemos ahora entonces a este llamativo aspecto de la Patología.

Hacia una Patología Cuantitativa

¿Quién puede prescindir hoy de una computadora para realizar cualquier tarea que otrora realizara manualmente?, ¿Quién no desearía hoy poder apretar un simple botón para hacer un diagnóstico y otro para encontrar la solución? Los procesos de inteligencia artificial son cada vez más sofisticados y resuelven mayores interrogantes. Tal vez y sólo tal vez, algún día puedan superar a la inteligencia humana. Pero lo cierto es que hoy en día, en los albores de este siglo XXI, las computadoras son tan sólo objetos inertes que responden con precisión y rapidez a las exigencias de aquel que, con su inteligencia y conocimientos, supo prepararlas para tales circunstancias.

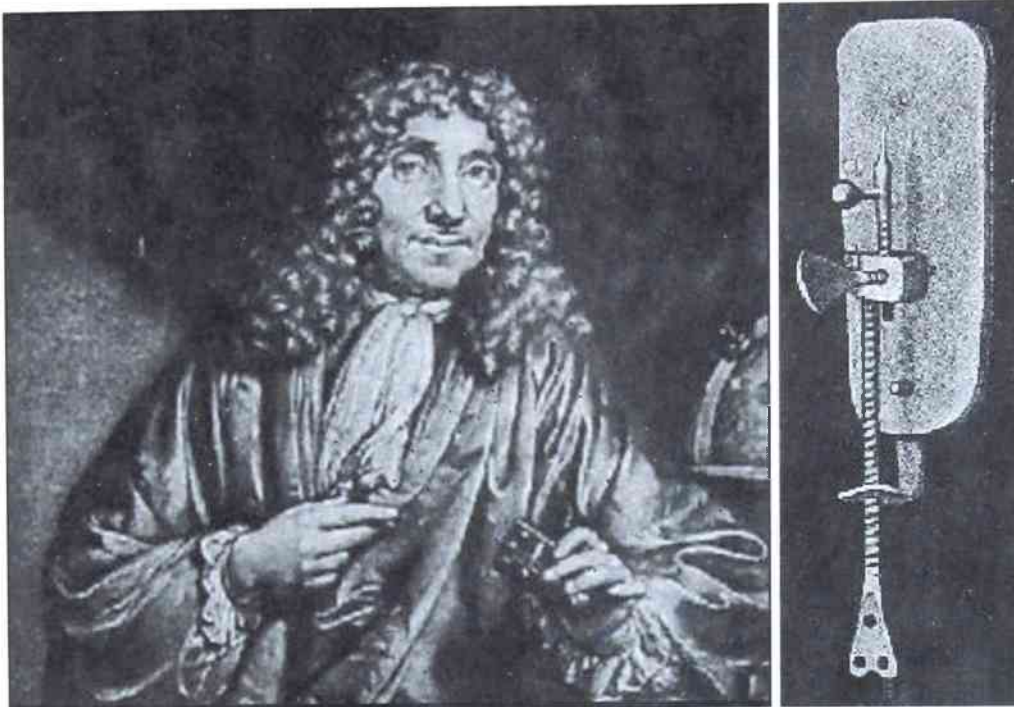
Las Ciencias Veterinarias, como tantas otras ciencias, han evolucionado gracias al constante estudio, esmero y tesón de aquellos, que en sus propias épocas, se valieron de las herramientas de las que disponían para encontrar la respuesta a sus interrogantes. La Patología, dentro de las Ciencias de la Salud, también fue evolucionando a lo largo de los siglos.

En el siglo IV A.C., la cultura griega, a través de Hipócrates, comenzó el estudio racional de las enfermedades. Sin embargo, la Patología de aquella época era netamente empírica y basada en la observación de los humores. Los estudios postmortem no estaban

permitidos por motivos religiosos. Hacia el siglo III A.C., Aristóteles, considerado como el padre de la Anatomía y Fisiología modernas, comenzó la disección de cadáveres animales. Cuatro siglos más tarde, Galeno estableció el principio que toda alteración de una función deriva de la lesión de un órgano y en consecuencia, toda lesión de un órgano provoca una alteración de la función. Luego de Galeno la Medicina entró en un largo período de estancamiento. Las supersticiones de la época superaban a los descubrimientos, y así pasarían varios siglos.

Sin duda, uno de los mayores inventos de la historia estuvo en manos de los hermanos Jansen, al confeccionar el primer microscopio. No obstante, fue un holandés llamado Antonio van Leeuwenhoek (Fig. 1) quien en su afán de perfeccionar la calidad de las lentes descubrió, hacia mediados del siglo XVII, que en la naturaleza existía un mundo microscópico deseoso de ser descubierto. Gracias a la invención del microscopio comenzaron a comprenderse muchos fenómenos, que hasta ese momento se atribuían a la gracia de un Ser superior. Y así, los grandes maestros de la historia descubrieron la presencia de bacterias en los alimentos y en el agua de bebida y pudieron relacionarlas con las enfermedades que manifestaban los animales.

Figura 1



Los microscopios se fueron sofisticando; las lentes eran más precisas y los sistemas mecánicos más complejos. Se incorporaron distintos sistemas de lentes que permitían una mejor o al menos, una visualización más específica de los objetos.

La invención del microscopio electrónico de transmisión dió paso a una nueva rama de la Biología: la Anatomía ultraestructural y así se pudieron ver por primera vez los agentes causales de la rabia, el moquillo, la fiebre aftosa y tantos otros responsables de las enfermedades virales de los animales. Los organoides celulares sospechados por los más avezados investigadores, dejaron de ser un misterio, para convertirse en realidades. El microscopio confocal, junto con el microscopio electrónico de barrido han permitido tener una idea tridimensional de los objetos, que bajo el microscopio regular sólo se veían en forma plana.

Pero tanto los tratados clásicos de Patología macroscópica, como los de Patología microscópica se han limitado a la descripción subjetiva de los fenómenos observados. Pocos son los datos cuantitativos que podemos rescatar y muchos de ellos están restringidos a formas y tamaños relativos: “semejante a un grano de mijo”, “tamaño de una naranja”, “color borravino o lechoso” ... y estas comparaciones no son ajenas a las realizadas en otras ciencias.

El hombre ha sentido la necesidad de darle un valor real a los objetos, para poder compararlos y clasificarlos, estableciendo así un orden de magnitud dentro del Universo, tratando de comprender, de esa manera, los fenómenos físicos, químicos o biológicos. Así surgieron las unidades de medida que se basaban en las propias partes del cuerpo, como la pulgada, la brazada o el pie, pero también se hizo necesario diferenciar

lo claro de lo oscuro, surgiendo así los nombres de los colores o contar elementos, inventándose los sistemas numéricos.

Si bien la morfometría microscópica tiene sus orígenes en van Leeuwenhoek, quien estableció el tamaño aproximado de las células sanguíneas, no contamos en la actualidad con tratados de Histología o Patología que indiquen cuales son los valores normales o patológicos de las formas o cantidades de células que forman los tejidos de nuestros seres vivos.

Afortunadamente, con el advenimiento de las computadoras, también comenzó la posibilidad de medir objetos o cuantificarlos de una manera más precisa y rápida que la forma manual. El análisis computarizado de imágenes es, pues, la manera más moderna con la que contamos para darle un valor objetivo a los procesos que se observan mediante la lupa o el microscopio. No obstante, surge una pregunta: ¿Porqué debemos valernos de la morfometría? La respuesta puede estar resumida en los siguientes puntos:

1. Para disminuir la variedad en la cuantificación de parámetros tisulares y celulares.

Si bien la Biología no es exacta y por lo tanto no lo es ni la forma ni el número de células, es indudable que los tejidos normales se comportan de manera similar en el resto de los organismos de la misma especie. La desviación de los valores normales, más allá de los desvíos estándar estadísticos, permite establecer los diagnósticos patológicos. Así, el aumento del número de células normales en un tejido determinado

permitirá diagnosticar una hiperplasia; si la variación reside en el tamaño de las células observadas, hablaremos entonces de hipertrofia. Si las variaciones no sólo residen en el número o el tamaño, sino que además, inciden en las formas o en el grado de ploidía, podríamos aventurarnos a diagnosticar un tejido neoplásico.

2. Para proveer una escala cuantitativa

Teniendo una medida de longitud común para todos los tejidos analizados, los términos “del tamaño de una naranja” o “color borravino” pasarán a ser meros términos románticos de la Patología antigua.

3. Para que la cuantificación sea reproducible

Es posible que el recuento de 10 células, en forma manual, sea más rápido y menos oneroso que al utilizar una computadora. Sin embargo, los tejidos cuentan con miles de células.

Pidámosle a un colega que determine en forma manual el número total de células de cualquier tejido y probablemente veremos, que en cada uno de los recuentos obtendrá un resultado distinto. Utilizando una computadora, cada recuento será similar al anterior. Pero pensemos en algo más difícil de cuantificar: ¿Cómo podemos establecer visualmente cuando un tejido está más o menos intensamente teñido? La vista humana es capaz de discernir sólo una gama de 20 tipos distintos de grises en una escala degradada de 250 tonalidades.

De la misma forma, tampoco puede diferenciar los millones de colores que puede distinguir una

computadora. Es por ello que una computadora es la herramienta fundamental, a la hora de establecer un diagnóstico basado en la densidad óptica o los colores de los objetos que se desean cuantificar.

4. Para incrementar la sensibilidad en la identificación de cambios mínimos.

¿Es posible encontrar una mitosis entre miles de células? ¿Resulta sencillo encontrar un núcleo picnótico entre miles de núcleos? , tal vez para el ojo más experimentado sea relativamente sencillo, pero para la mayoría de los observadores esto será un verdadero desafío. Una computadora, por su parte, sólo necesita unas pocas instrucciones para localizarlos sin inconvenientes.

5. Para tener una herramienta en el control de calidad.

Los productos farmacéuticos, así como los productos alimenticios destinados al consumo humano o animal, necesitan que la calidad de los mismos sea de la máxima pureza.

Además de los procesos bioquímicos a los que deben someterse, es casi imperioso que desde el punto de vista morfológico tengan la presentación más apropiada. La computadora puede evaluar con certeza una gran cantidad de parámetros físicos: color, densidad, tamaño, forma y dispersión de partículas, homogeneidad de los componentes, etc.

6. Para proveer referencias estandarizadas a la enseñanza.

Nuestros alumnos reciben la información que nosotros elaboramos. Cuanto más objetiva sea ésta, mayores posibilidades tendrán los alumnos para generar sus propias teorías.

7. Para usar como herramienta de diagnóstico e investigación.

Sin dudas, una computadora en su estado actual no puede reemplazar el conocimiento del hombre. Sin embargo, puede ser utilizada para mejorar la calidad del diagnóstico y para permitir descubrir todo aquello que escapa a los sentidos humanos.

¿Es posible reemplazar el diagnóstico clásico por el morfométrico? La respuesta la dará el tiempo. Para que la morfometría reemplace al diagnóstico subjetivo será necesario masificar el uso de computadoras, implementar un exhaustivo entrenamiento en las técnicas de análisis de imágenes, aceptar a la morfometría como una práctica estandarizada, compararla con otro tipo de artes y evaluar su relación costo-beneficio.

Pero finalmente, ¿en qué consiste el análisis morfométrico? El objetivo principal de la microscopía digital es la representación de las imágenes en forma numérica. De esta forma puede ser almacenada, procesada y evaluada por la computadora (Fig. 2).

Figura 2



Cuando hablamos de imágenes debemos diferenciar las distintas aplicaciones que el término permite. Así, cuando interpretamos una imagen, en realidad, lo que estamos haciendo es reconocer los objetos que componen la misma: un bovino en una pastura, un hígado cirrótico, una célula necrosada o una mitocondria en división. El procesamiento de las imágenes es, por su parte, la manipulación de esas imágenes, de forma tal que resalten los objetos deseados y tiendan a desaparecer los restantes. El análisis de imágenes es la ciencia de extracción cuantitativa de datos (numéricos, geométricos, densitométricos o espectrométricos) de las imágenes. La comprensión de las imágenes es el arte por el cual una imagen, que fue inicialmente interpretada y posteriormente procesada y analizada, permite llegar a un diagnóstico.

Para poder obtener los datos numéricos, que son los que finalmente

permitirán llegar a la comprensión de las imágenes, es necesario, a través de una serie de etapas, que podrían resumirse en las siguientes:

1. Captura y digitalización

Las imágenes que se observan en la naturaleza o a través del microscopio o la lupa deben ser atrapadas, de alguna forma, para que queden retenidas dentro de la computadora. Existen diversos medios que permiten realizar esta operación, pero todos se basan en el mismo principio: transformar una imagen analógica en una imagen digital; es decir, una imagen que esté subdividida en unidades gráficas denominadas pixels (Fig. 3). Estos pixels tienen atributos tales como la ubicación espacial dentro de la imagen, la luminosidad y la capacidad de representar blancos y negros, escala de grises o colores (Fig. 4).

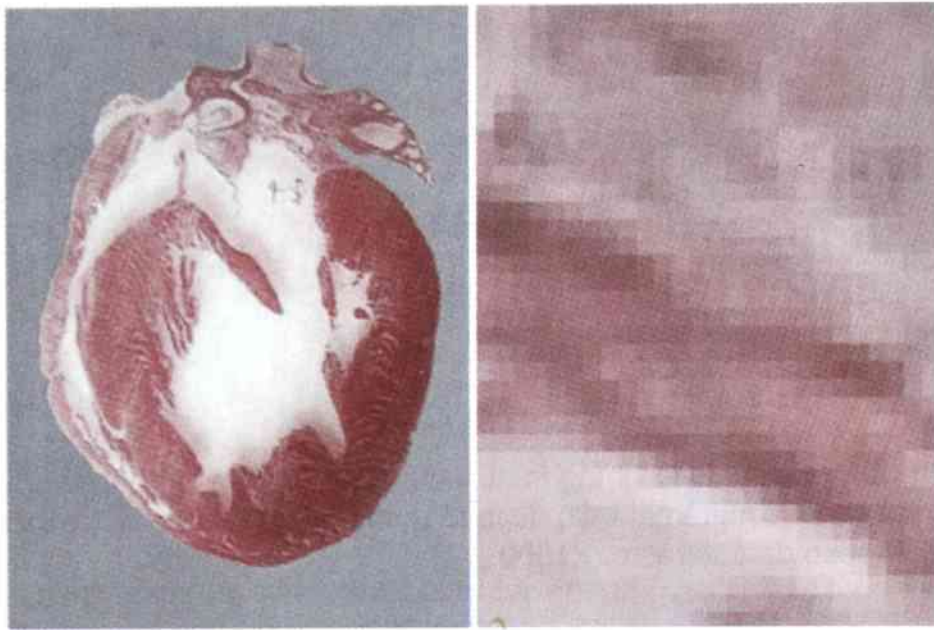


Fig. 3. Imagen digital de un corazón hipertrófico de rata: Izquierda: imagen de aspecto real. Derecha: Imagen aumentada 160 veces para observar los pixels que la forman.

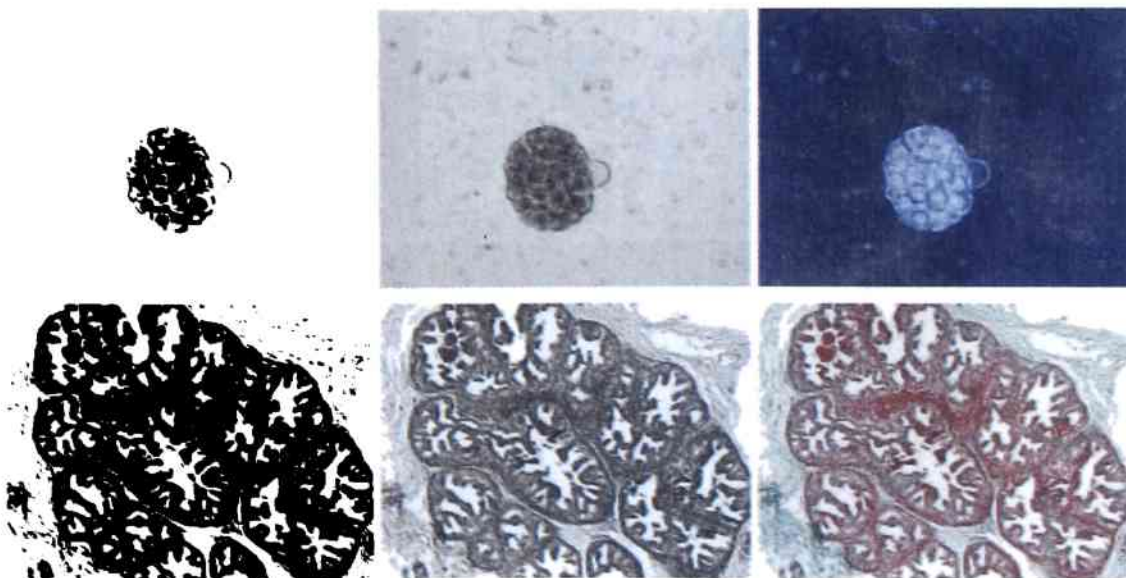


Fig. 4. Arriba: imagen binaria (blancos y negros) (izquierda); escala de grises (centro) y color (derecha) de un huevo de *Dipylidium caninum*. Abajo: imagen binaria (blancos y negros) (izquierda); escala de grises (centro) y color (derecha) de un corte histológico de la glándula de Skene o próstata femenina de la vizcacha.

2. Procesamiento.

En esta etapa se opera sobre la imagen para realzar las formas de la misma, a través de la modificación

de la intensidad de luz o el contraste (Fig. 5). Asimismo, pueden emplearse filtros para separar objetos entre sí, realzar unos y ocultar otros (Fig. 6).

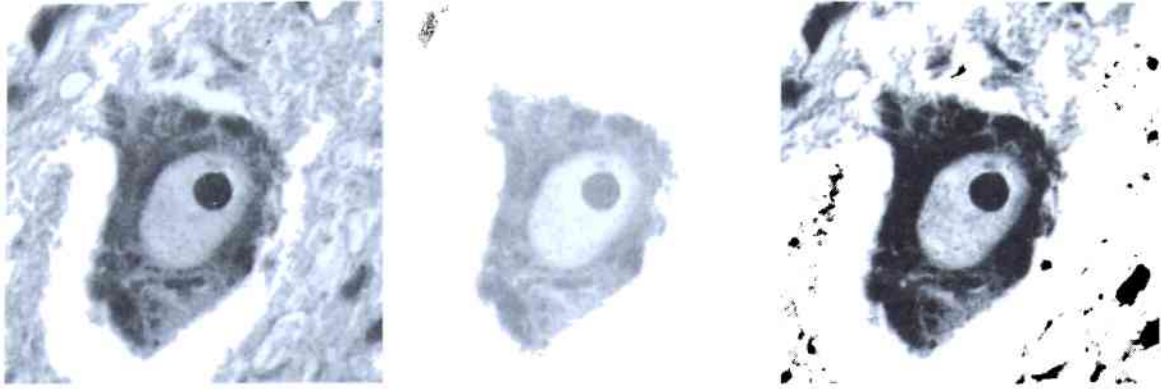


Fig. 5. Procesamiento de las imágenes. Izquierda: Imagen normal de una neurona de la lámina 9 de la metámera C5 de la rata macho adulta; centro: exceso de luz; derecha: Exceso de contraste. X1000

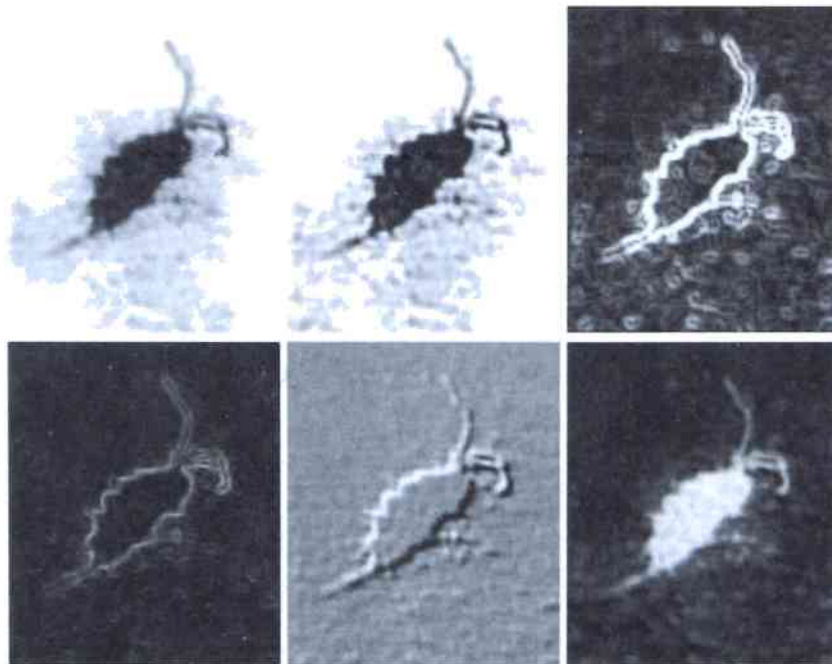


Fig. 6. Filtrado de la *Tritrichomonas foetus* originalmente teñido mediante técnicas inmunohistoquímicas. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: imagen original; filtro de alto pasaje; filtro Sobel; filtro Roberts; filtro Sculpt; inversión de la imagen.

3. Segmentación.

Como su nombre lo sugiere, en esta etapa se pretende separar los objetos a ser analizados del resto de los componentes de la imagen. Es posible

separar los objetos mediante técnicas de binarización (transformación de los pixels en blancos o negros); restricción de grises; selección de colores o por filtración. (Fig. 7)

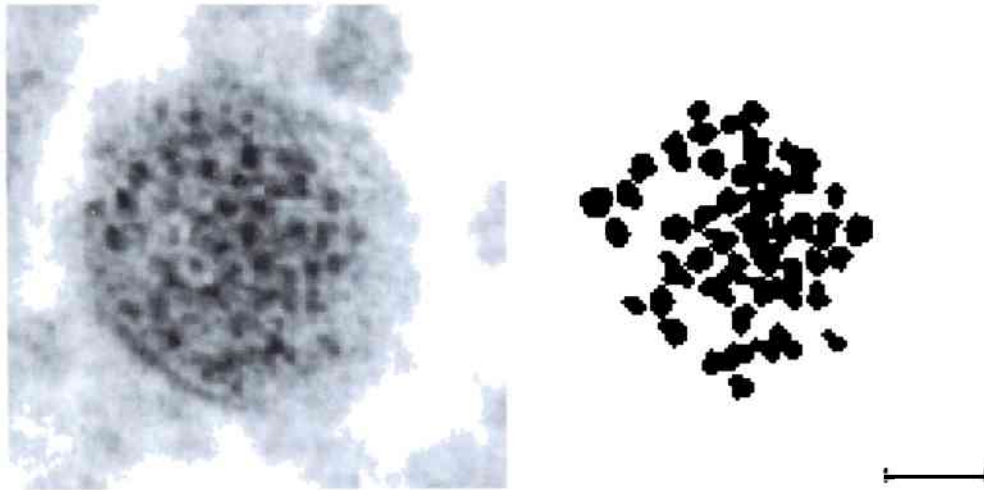


Fig. 7. Segmentación del sistema tubular del *Eperithroozoon suis* mediante un proceso de binarización (barra = 200 nm)

4. Análisis de las formas/densidad óptica.

Al llegar a esta etapa se deberá definir la calibración espacial (magnitud de los objetos) y/o la calibración de intensidad de luz, si la medición incluirá la determinación de la densidad óptica. A continuación, debe establecerse cuales son los parámetros morfométricos a medir y entre decenas de ellos, podrá seleccionar el área, el diámetro, el largo o la redondez. También se podrá establecer la cantidad de los objetos seleccionados. Todos los datos

obtenidos serán numéricos y esto permitirá ingresar a la última etapa.

5. Presentación gráfica y estadística.

Una vez que los datos numéricos fueron obtenidos, podrán ser transportados a una planilla de cálculo para su evaluación estadística y confección de la gráfica correspondiente.

Si se compara el proceso de análisis de imágenes con un artículo científico se verá como lo muestra la Tabla 1, una analogía bastante clara entre ambos.

<i>Análisis</i>	<i>Artículo</i>
Interpretación de la imagen	Introducción
Captura de la imagen	Materiales y Métodos
Digitalización de la imagen	
Procesamiento de la imagen	
Segmentación de la imagen	
Análisis de las formas	Resultados
Análisis de la densidad óptica	
Presentación gráfica	
Análisis estadístico	
Comprensión de Imágenes	Discusión

Tabla 1. Comparación entre el análisis de imágenes y un artículo científico

Muchos de los profesionales que en este momento están leyendo este trabajo habrán escrito su propio artículo científico con mayor o menor dificultad, pero con la satisfacción de haber podido expresar un conocimiento que trascenderá la barrera del tiempo. Si la morfometría puede compararse con un artículo científico, ¿por qué no comenzamos a practicarla?

Muchas han sido las aplicaciones que se han hecho hasta

la actualidad en el campo de la morfometría. Entre otras, podemos citar el grado de malignidad de los tumores a través del contenido de DNA (ploidia), la densidad óptica de sistemas coloreados (test de ELISA, IHQ, LHQ, fluorescencia), la cuantificación de elementos (células, colonias bacterianas, etc.), la cuantificación de partículas virales en cortes de microscopía electrónica, evolución de tratamientos farmacológicos, y la lista, afortunadamente, continúa.

Queda mucho camino por recorrer. Pero creo que se va por ese camino.

Bibliografía

- * Anderson, JM and Lowe, J. Histometry and image analysis. En: Bancroft, JD; Stevens, A and Turner, DR (Eds) Theory and practice of histological techniques. 3rd edition. Churchill Livingstone. NY. Chapter 30. pp 597-618, 1990.
- * Bartlett, TQ; Vannier, MW; McKeel, DW Jr; Gado, M; Hildebolt, CF and Walkup, R. Interactive segmentation of cerebral gray matter, white matter, and CSF: photographic and MR images. *Comput-Med-Imaging-Graph.* 18:449-460, 1994.
- * Costa, EF; Portiansky EL; Massone, AR; Marino, FP; Idiart, JR y Gimeno EJ. Alteraciones en la diferenciación y proliferación celular cutánea en bovinos, inducidas por hipervitaminosis D de origen vegetal. *Analecta Veterinaria* [serial online] ISSN 1514-2590. N1-2; 18:[7 screens] Available from URL: <http://www.medvet.unlp.edu.ar/analecta/AnalectaVol18N1-2.html>. 1998.
- * De Kruif, P. Los cazadores de microbios. Editorial Porrúa. México. Octava edición. 2000.
- * DiGirolamo VMT; Laguens RP; Coronato S; Salas M; Spinelli OM; Portiansky EL and Laguens GE. Quantitative and functional study of breast cancer axillary lymph nodes and those draining other human malignant tumors. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* 19:155-159, 2000.
- * Fernández PE; Sanguinetti, HR; Portiansky, EL; Barbeito, CG and Gimeno, EJ. Detection of illegal estrogen administration through immunohistochemical markers in the bovine prostate. *Pesquisa Veterinaria Brasileira. (Brazilian Journal of Veterinary research).* 19:133-138, 1999.
- * Fernández, PE; Barbeito, CG; Portiansky, EL and Gimeno, EJ. Intermediate filament proteins expression and sugar moieties of normal canine placenta. *Histology and Histopathology* 15:1-6, 2000.
- * Fernández, PE; Portiansky, EL; Barbeito, CG and Gimeno, EJ. Characterisation of cytotrophoblastic-like cells present in subinvolutioned placental sites of the bitch. *Histology and Histopathology.* 13:995-1000, 1998.
- * Flamini, MA; Barbeito, CG; Gimeno, EJ and Portiansky, EL. Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus maximus maximus*. *Annals of Anatomy*, 2002. (en prensa)
- * García Romero, N; Gimeno, EJ and Portiansky, EL. Aquaculture: Image analysis used to measure morphometric characteristics of nuclei and nucleoli of hepatocytes from pejerrey fish. <http://www.mediacy.com/notes/an139fish.htm> - Página World Wide Web correspondiente a Media Cybernetics. Noviembre 1998.

- * Gimeno, EJ; Costa, EF; Massone, AR and Portiansky, EL. Effects of plant induced hypervitaminosis D on cutaneous structure, cell differentiation and cell proliferation in cattle. *Journal of Veterinary Medicine, Series A.* 47:201-211, 2000.
- * Gimeno, EJ; Massone, AR and Portiansky, EL. Pre-embedding epitope retrieval: an ultrasound based method for unmasking desmine in tissue blocks. *Applied Immunohistochemistry.* 6: 35-41, 1998.
- * Gimeno, EJ; Costa, EF; Portiansky, EL; Massone, AR; Marino, FP and Idiart, JR. Effects of plant induced hypervitaminosis D on cutaneous structure, cell differentiation and cell proliferation, in cattle. *Veterinary Pathology.* 35:507, 1997.
- * Koss, LG. Quantitative and analytical cytology in historical perspective. *J-Cell-Biochem-Suppl.* 19:23-27, 1994.
- * Monteavaro CE; Soto P; Echevarría HM; Catena MC; Portiansky EL and Gimeno EJ. Immunohistochemical detection of *Tritrichomonas foetus* in experimentally infected mice. *Brazilian Journal of Veterinary Research* 20, 43-46, 2000.
- * Mosca, SM; Salas, MA; Portiansky, EL; Cingolani, HE and Moreyra, AE. Early ischemic preconditioning diminishes both infarcted area myocardial stunning in isolated rat heart. *Experimental and Clinical Cardiology.* 4:43-48, 1999.
- * Nemec, E; Vandeputte, S; Van Pachterbeke, C; Vokaer, R.; Budel, V; Deprez, C; Kiss, R and Decaestecker, C. Ploidy and chromatin pattern analysis as an aid for cervical smear diagnosis. *Histology and Histopathology.* 17:403-409, 2002.
- * Paulovich, FB; Portiansky, EL; Gimeno, EJ; Schild, AL; Mendez, MC and Riet-Correa, F. Lectin-histochemical study of lipopigments present in the cerebellum of *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* intoxicated cattle. *Journal of Veterinary Medicine series A.* 2002. (en prensa)
- * Portiansky EL; Alonso CR; Costa EF and Gimeno EJ. Collagenous and elastic system fibres in the aorta of cattle poisoned by *Solanum glaucophyllum*. *Veterinary Record.* 150, 42-45, 2002.
- * Portiansky EL; Barbeito CG; Gimeno EJ; Alonso, CR y Zuccolilli, GO. El análisis computarizado de imágenes como herramienta de diagnóstico en las Ciencias Veterinarias. Primer Congreso Virtual Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Organizado por la AEVEDI (Asociación de Especialistas Veterinarios de Diagnóstico por Imagen). <http://www.aevedi.org/00068CV.htm> . 2000.
- * Portiansky, EL and Gimeno, EJ. A new epitope retrieval method for detection of

structural cytokeratines in the bovine prostatic tissue. *Applied Immunohistochemistry*. 4:208-214, 1996

- * Portiansky, EL. IPP color segmentation used in detection of structural cytokeratines. <http://www.mediacy.com/notes/an122.htm> - Página World Wide Web correspondiente a Media Cybernetics. Noviembre 1996.
- * Portiansky, EL; Massone, AR and Gimeno, EJ. Kinetics of epitope retrieval techniques for unmasking cytokeratins in bovine prostatic tissues after different formaldehyde fixation times. *Applied Immunohistochemistry*. 5:194-201, 1997.
- * Russ J.C. 1999. *The image processing handbook*. Third edition. CRC Press. Boca Raton, Fl.
- * Sánchez, HL; Silva LB; Acosta WG; Portiansky EL and Zuccolilli GO. Distribution of tyrosine hidroxylase-immunoreactive neurones in the diencephalon and mesencephalon of the coypu (*Myocastor coypus*). *Anatomia Histologia Embryologia (Journal of Veterinary Medicine Serie C)*. 29:1-7, 2000.
- * Sánchez, HL; Silva, LB; Goya, R; Portiansky, EL and Zuccolilli, GO. Morphometry of hypothalamic dopaminergic neurones during aging. *Biocell*. 24(2):163. 2000.
- * Schild, AL; Riet-Correa, F; Portiansky, EL; Méndez MdelC and Lühers Graça, D. Congenital cerebellar cortical abiotrophy in Holstein cattle in southern Brazil. *Veterinary Research Communication*. 25:189-195, 2001.
- * Silva, LB; Sanchez, HL; Acosta, W; Portiansky, E and Zuccolilli, GO. GnRH neurones population in the diencephalon of the coypu (*Myocastor coypus*). Estudio inmunohistoquímico de la población de neuronas GnRH en el diencefalo del coipo *Myocastor coypus*). *Revista Chilena de Anatomía*. 18(1):5-11, 2000.
- * von Barthel, CS. Counting particles in tissue sections: choice of methods and importance of calibration to minimize biases. *Histology and Histopathology*. 17:639-648, 2002.