

Dibujo digital mediante Adobe Photoshop para el análisis de la citoarquitectura neuronal

Digital drawing using Adobe Photoshop for the analysis of neuronal cytoarchitecture

*Diana Torres Luna^{1,2}, *Carlos Francisco Reyes García^{1,2}, Ximena Jaqueline Rodríguez Medrano^{1,2}, Lendy Yustin García Miranda¹, Esther Juárez Cortes^{1,3} y José Vicente Negrete Díaz^{1,2,3}

1 Laboratorio de Plasticidad Cerebral y Neurociencia Integrativa, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato, México.

2 Programa de Licenciatura en Psicología Clínica, Departamento de Enfermería Clínica, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato, México.

3 Programa de Licenciatura en Fisioterapia, Departamento de Enfermería Clínica, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato, México.
jv.negrete@ugto.mx

**Ambos autores trabajaron por igual para la realización del presente trabajo*

Resumen

Este artículo presenta una técnica novedosa para trazar la citoarquitectura neuronal, utilizando Adobe Photoshop, con el propósito de preservar la integridad de la forma de la neurona teñida con el método Golgi-Cox. Esta técnica revela detalles importantes de la neurona, como la forma del soma, de las dendritas y de las espinas dendríticas, lamentablemente es sensible a la luz y puede perderse con el tiempo. El dibujo digital mostró que puede obtenerse un trazo preciso de los detalles de las neuronas, ofreciendo la posibilidad de destacar los elementos esenciales para el estudio de la conectividad cerebral y las interacciones entre células nerviosas, mostrando mayor detalle al ojo humano que la cámara lucida tradicional, al permitir un mejor enfoque y amplificación. Este tipo de herramienta resulta valiosa tanto en la investigación científica como en la educación.

Abstract

This article exposes a novel technique for drawing the neuronal cytoarchitecture, using Adobe Photoshop, to preserve the integrity of the neuron's shape stained with the Golgi-Cox method. This technique reveals important details of the neuron, such as the shape of the soma, dendrites and dendritic spines, unfortunately it is sensitive to light and can be lost over time. The digital drawing showed that a precise trace of neuron details can be obtained, offering the possibility of highlighting the essential elements for the study of brain connectivity and nerve cell interactions, showing greater detail to the human eye than the traditional camera lucida, by allowing better focusing and magnification. This type of tool is valuable in scientific research and education.

Palabras clave: Golgi-Cox, morfología neuronal, espinas dendríticas, dibujo digital.

Introducción

En la actualidad, existe una carrera por el desarrollo de técnicas que permitan acceder al estudio del sistema nervioso como hasta ahora no ha sido posible, en la confianza de que los avances tecnológicos ofrecen múltiples herramientas para este propósito, en particular la aplicación de imágenes digitales para el estudio de estructuras a un nivel de precisión y rapidez que sólo el uso de sistemas informáticos permite. Es irrefutable que existe una plasticidad cerebral dependiente de la experiencia, además de la carga genética, esta plasticidad puede evaluarse a nivel funcional y estructural, ambos estrechamente regulados uno al otro, con una alta correlación. Así, el estudio de la ultraestructura neuronal nos permite conocer la función, normal o alterada, del sistema nervioso, como es el caso de la presencia de alteraciones morfológicas de las neuronas y de sus componentes en los trastornos mentales. Un ejemplo de ello son las alteraciones encontradas por diversos estudios en la esquizofrenia, como el alargamiento ventricular, reducción en el volumen y peso cerebral (Harrison & Weinberger, 2005); en cuanto a cambios estructurales se señalan anomalías en la organización sináptica, dendrítica y axonal (Negrete Díaz & Moreno Rodríguez, 2018). Algunas regiones de interés que comparten gran información con un mínimo de cambio son: Corteza prefrontal, Hipocampo y Amígdala. La corteza prefrontal se ha asociado a funciones ejecutivas como la toma de decisiones (Valdés G. & Torrealba L., 2006). Por

consiguiente, en el hipocampo es esencial para la memoria episódica a largo plazo y facilita la navegación espacial (Dalton et al., 2022; citado de SCOVILLE & MILNER, 1957). Por último, la amígdala, que recibe información somatosensorial y visual, donde sus regiones crean conexiones con otras áreas encargadas de diversas funciones indispensables en realizar un adecuado funcionamiento. Visualizar y analizar la actividad neuronal que se ve afectada en estas regiones es de suma importancia para comprender el progreso de los trastornos o enfermedades neurodegenerativas.

Morfología Neuronal

En neurociencias, la morfología neuronal nos indica el grupo de tipo al que pertenece y sus dimensiones mediante técnicas especializadas que permitan la visualización de la célula nerviosa. Una neurona, también llamada célula nerviosa, permite el proceso y transmisión de la comunicación en el sistema nervioso (Carlson, 2014). Su estructura, en su mayoría, está compuesta por un soma, dendritas, axón y botones terminales. El soma estructura un mensaje a compartir y de acuerdo con el tipo de la neurona, será su forma. Las dendritas tienen por funcionalidad recibir y transmitir los mensajes entre neuronas. Previamente, el axón, cubierto de vaina de mielina, conduce la información desde el soma a las terminales dendríticas, este mensaje toma por nombre *potencial de acción*, siendo un breve pulso, con la misma magnitud y duración.

Plasticidad: sináptica, neuronal y cerebral

La plasticidad es indispensable en el cerebro de todo ser vivo. El cerebro tiene una notable habilidad de adaptación de estímulos internos y externos (Buszka et al., 2023), por ejemplo, ser capaz de aprender nuevas habilidades, crear nuevas memorias y responder ante lesiones a lo largo de su vida. Es importante tener en cuenta un comportamiento de la plasticidad: Primero, la actividad de la plasticidad siempre se va a estar relacionada con la transmisión sináptica, mientras más eficiente es la transmisión, más cambios puede producir. Segundo, estos comportamientos pueden suceder en un periodo de corto plazo o en un periodo de largo plazo. La plasticidad sináptica se define como el mecanismo que induce cambios en la eficiencia sináptica como resultado de la actividad neuronal de alta frecuencia derivada de la experiencia (Bello-Medina et al., 2022). La plasticidad neuronal, a su vez, se ve sustentada de neurotransmisores; su relación con la dopamina se ve implicada en el fortalecimiento de las conexiones neuronales (Carlson, 2014). El condicionamiento instrumental, derivado de una potenciación a largo plazo, promueve a la dopamina a seguir realizando la plasticidad neuronal. Otro ejemplo que puede mencionarse es un estudio en monos adultos, consistió en cortar uno de los nervios que brindaba la información motora en alguna de las manos, se observó que los mapas topográficos de la actividad neuronal correspondiente a este nervio no presentaron actividad tan pronto se hizo la cirugía, sin embargo, semanas después se observó que la estimulación en otro dígito enviaba estimulación a las neuronas correspondientes al tejido cortado. Por último, la plasticidad cerebral se le denomina a la capacidad del encéfalo para adaptarse ante diferentes circunstancias como puede ser la reestructura funcional neuronal o la rehabilitación ante una lesión, entre algunas otras circunstancias (Alvarez, 2021).

Análisis de Sholl

Siendo una de las técnicas innovadoras de su época y actualmente vigente, es una técnica compartida por Donald Sholl, en 1956, que permite cuantificar la morfología neuronal. Consistió en contar las ramificaciones dendríticas desde el soma, indicado por el número de bifurcaciones (Sholl, 1953). Considerando la minuciosidad de esta técnica, la misma se presentará en detalle en un siguiente trabajo.

Tinción de Golgi-Cox

Esta tinción proporciona una imagen de las estructuras neuronales que se encuentran en el cerebro. Fue desarrollada por Camillo Golgi en 1873 siendo una de las primeras en revelar de manera tridimensional las neuronas, en base a una tinción de plata (Zaldivar Verdier et al., 2024). En un estudio sobre la evaluación de reorganización neuronal en regiones relacionadas con la esquizofrenia, se utilizó el método de Golgi-Cox en PD82 para cuantificar la arborización dendrítica y la densidad espinal neuronal (Bringas et al., 2012). De acuerdo con la conclusión por parte de sobre el uso de esta técnica, su tiempo aplicado es menor y a bajo costo.

Metodología

Para realizar el dibujo digital se debe contar con preparaciones histológicas permanentes de cortes de tejido cerebral teñidos con la técnica de Golgi-Cox, que se resume a continuación: 1) extracción del tejido cerebral mediante perfusión cardiaca con solución salina al 0.9%, 2) inmersión del cerebro en solución de Golgi-Cox para su tinción, con cambio de solución a las 24 horas, y 14 días más en dicha solución en total oscuridad, 3) se coloca el cerebro ahora en solución con sacarosa al 30% donde permanecerá de 3-5 días antes de ser cortados, 4) cortes de tejido cerebral a 200 y 150 micrómetros, usando un vibratomo (Campden Instruments, UK), 5) revelado de la tinción, se hacen pasar los cortes por un tren de tinción (Zaldivar Verdier et al., 2024, a head ePub), consistente en pasos sucesivos en H₂O por 1 minuto, hidróxido de amonio por 25 minutos, H₂O, fijador rápido de Kodak por 25 minutos, etanol al 50% por un 1 minuto, etanol al 70% por 1 minuto, etanol al 96% por 5 minutos, etanol 100% por 10 minutos, segundo etanol 100% por 10 minutos y finalmente Xileno por 15 minutos. Seguidamente los cortes se montan con resina sintética y se dejan secar por al menos cuatro semanas antes de su visualización al microscopio.

Obtención de video e imagen digital

Con el propósito de preservar la tinción y favorecer el análisis a detalle de la citoarquitectura neuronal, se realizó una revisión de varios programas de captura y edición de imagen, mismos que fueron probados a fin de decidir cuál ofrecía mayores ventajas para el trazado de las dendritas y espinas dendríticas. Estos programas fueron: *After Effects* (Adobe), *ImageJ* (NIH), *Adobe Fresco* y *Adobe Photoshop*, siendo este último la mejor opción, particularmente porque es amigable para dibujar, ampliar, corregir, herramientas del pincel, y principalmente porque resulta muy fácil dibujar sobre video y retirar posteriormente el video, a fin de conservar únicamente el trazo de la neurona sobre un fondo blanco, tal como ocurre empleando la tradicional cámara lúcida acoplada al microscopio óptico. Se precisa la captura en video es necesaria a fin de visualizar la neurona a diferentes profundidades dadas por el enfoque, de modo que resulte tan similar como la visualización directa al microscopio. Para obtener el video digital de la neurona se procedió de la siguiente manera:

Se coloca la laminilla en un microscopio (Olympus Japan 255633) que cuente con una cámara digital (OMAX A3RDF50) para ser utilizado con el programa de visualización y análisis *OMAX TouView* (versión x64, 4.11.19627.20210925). Se selecciona una región, tal como la corteza cerebral, se localiza una neurona típica (bien teñida, completa y aislada), por ejemplo, una neurona piramidal. Se selecciona en el apartado "Listado de cámaras" el nombre del microscopio y/o cámara.

Una vez seleccionada la neurona y visualizada por el programa en la computadora, se da clic en *video* que aparece en la opción de "Captura & resolución". Esto desplegará un menú para poder ajustar la grabación.

Se abrirá una ventana llamada "Formato de video & decodificador" y se seleccionará el formato de video que deseamos. En el siguiente apartado se ajusta el nombre y sitio de guardado del video. La siguiente ventana se llama "Codificador" en donde se ajusta dependiendo a como se desea trabajar. Se finaliza una vez la configuración este hecha.

Finalmente se determina mediante el enfoque micrométrico del microscopio, dónde inicia a visualizarse la neurona o sección de esta a videograbar y hasta dónde se extiende en el eje Z (profundidad), para poder captar la mayor cantidad de elementos de la neurona. Una vez establecido el rango, se obtiene el video iniciando en la región superior, descendiendo lentamente, hasta la porción inferior. Detenemos la grabación y se tendrá el video listo para trabajar.

Abrir el programa de *Adobe Photoshop* para poder realizar el trabajo. Dar clic en *Abrir>en tu ordenador>seleccionar en la carpeta el video que se realizó>abrir*; el menú que se abre sirve para trabajar con la selección que se desee. Estos pasos permiten acceder al video para trabajar.

En la esquina inferior derecha hay una sección en donde se encontrarán diferentes paneles (propiedades, ajustes, biblioteca) y en la parte de abajo se encontrarán otros; se seleccionará el de capas desplegándose un nuevo menú. Se dará clic al icono de + para añadir una capa nueva, puede que se añada a una carpeta "Grupo de videos", o de nombre similar, por lo que se deberá sacar la nueva capa de la carpeta y ponerla arriba de dicha carpeta.

En la parte central-inferior se verá la línea del tiempo, aquí se deberá ajustar la línea de tiempo de la capa 2 para que abarque todo el video para poder dibujar.

Se selecciona la herramienta de pincel que se encuentra en la parte izquierda. Podría aparecer una ventana emergente que pedirá que se convierta en objeto inteligente por lo que debemos darle en "ok" para que lo convierta en automático. Se selecciona el color con el que se desee trabajar, así como el tipo de pincel y tamaño.

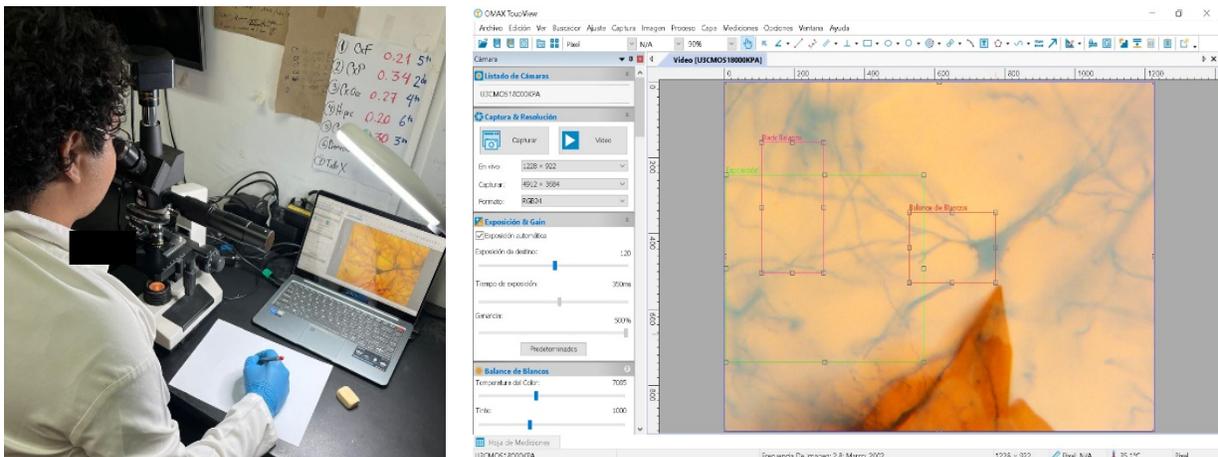
Verificar que se esté trabajando en la capa superior para dibujar en una capa transparente sin afectar el video original. Posteriormente se comienza a dibujar, para ajustar el momento del video se debe hacer uso de la herramienta de línea del tiempo para avanzar o retroceder el video y encontrar todo el cuerpo de la neurona. Este paso se realiza varias veces para poder dibujar todas las estructuras. En caso de querer borrar, cambiar de color o ajustar algo lo podemos hacer con las herramientas que están en el lado izquierdo de la pantalla de trabajo.

Una vez concluido el dibujo se borra la carpeta "Grupo de videos". Una vez eliminado se añadirá una nueva capa, se seleccionará el bote de pintura (barra lateral izquierda), se escogerá el color deseado para el fondo y se pintará toda la capa nueva y esta capa nueva se pasará hacia abajo de la capa de dibujo.

Se dará clic a la parte superior izquierda en *archivo>exportar>Exportación rápida como PNG* y será guardado.

Resultados y discusión

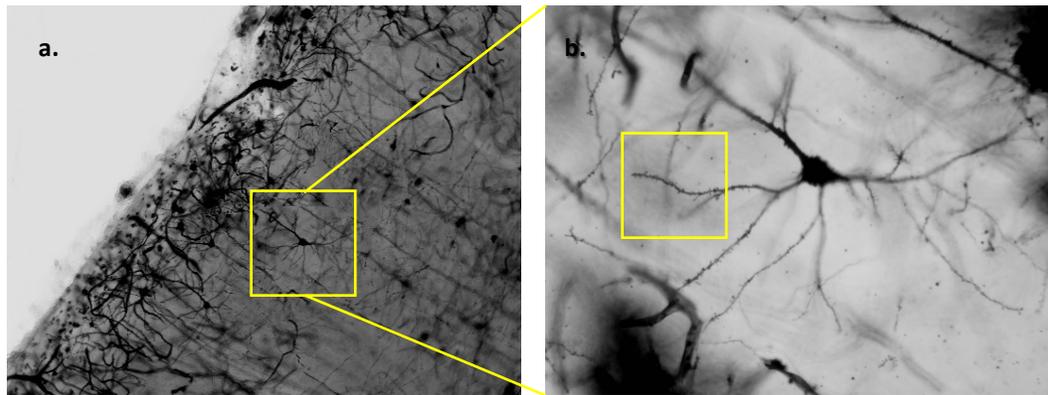
Se puede observar la diferencia entre dos técnicas de dibujo de una neurona teñida por medio de Golgi-Cox (a). Por consiguiente, el dibujo realizado por cámara lúcida (b) muestra un menor número de detalles y un trazado más ligero. Por último, se observa el dibujo digital (c) por medio de *Adobe Photoshop* en donde los detalles sobresalen de manera evidente, así como en los trazos que varían dependiendo del grosor que tenga la parte que se busca replicar. Algo a considerar es que en el caso de la fotografía neuronal puede mostrar menos detalles debido a que queda estática, esto se completa en el dibujo digital pues al ser realizado por medio de videos permite tener mayor enfoque y desenfoque que permite mostrar los detalles con mayor claridad.



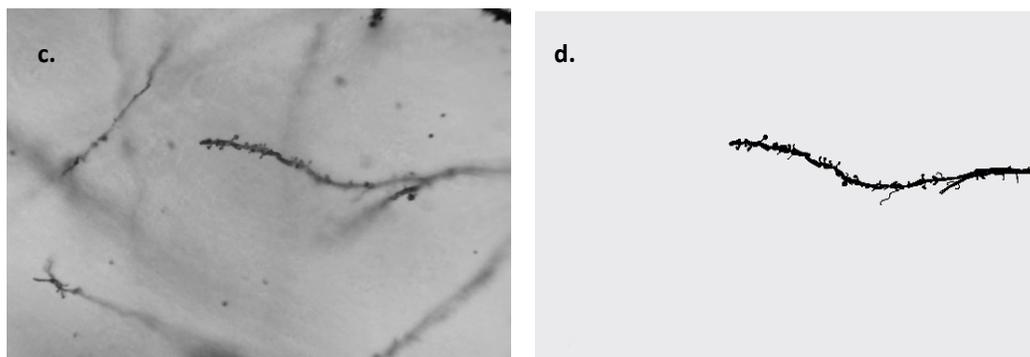
Dibujo por cámara lúcida. Se puede ver cómo se realiza el proceso y la visualización desde el programa TopView OMAX. Fotografías de autoría propia, Laboratorio de Plasticidad Cerebral y Neurociencia Integrativa, UGto.



Comparación visual de la neurona. Neurona en Golgi-cox (a), dibujo a lápiz empleando la cámara lúcida (b) y dibujo digital en Adobe Photoshop (c). Capturas de autoría propia, Laboratorio de Plasticidad Cerebral y Neurociencia Integrativa, UGto.



Enfoque a profundidad de la neurona I. En (a) la visualización de la corteza a 10x, (b) visualización de la neurona a 40x. Capturas de autoría propia, Laboratorio de Plasticidad Cerebral y Neurociencia Integrativa, UGto.



Enfoque a profundidad de la neurona II. (c) visualización de la dendrita de la neurona (b) en aceite de inmersión a 100x, (d) dibujo digital de la dendrita donde pueden apreciarse las espinas dendríticas. Capturas de autoría propia, Laboratorio de Plasticidad Cerebral y Neurociencia Integrativa, UGto.

Sin embargo, existen softwares y equipos especializados que permiten el mapeo en 2D y 3D, siendo Neurolúcida la más famosa en su campo, con más de una década vigente pero inaccesible económicamente, además, Adobe Photoshop no reemplaza herramientas especializadas como este software. Por otra parte, se encuentra Image J que trabajaba únicamente con imágenes en multiproceso.

Conclusiones

La aplicación de este programa para el estudio de la morfología neuronal resulta accesible económicamente, pero quizás uno de los aspectos más relevantes es que permite la preservación de la citoarquitectura neuronal; además se logra una mayor precisión en el trazo y una fácil corrección de errores; por ejemplo, facilita visualizar con mayor precisión los detalles de dendritas y espinas, a diferencia del dibujo a lápiz tradicional. Cabe mencionar que la calidad se equipara al dibujo con otros programas comerciales (Neurolúcida), que siguen dependiendo de la habilidad del dibujante, aunque no los sustituye. Finalmente, puede ser aplicado en entidades educativas o laboratorios de histología, como en nuestro caso, donde esta técnica será aplicada en estudios de citoarquitectura neuronal relacionados a la plasticidad cerebral que subyace a los trastornos mentales explorados en modelos animales. Además, al ser digital, permitirá desarrollar proyectos para investigar nuevas formas de análisis. Contar con este conocimiento favorecerá la comprensión de la enfermedad mental y el mantenimiento de la salud mental en general. Aunque el método de dibujo digital de neuronas requiere un aprendizaje técnico previo sobre el tema, se puede iniciar con un conocimiento básico, además de ser fácil de aprender, respetando el rigor científico para obtener material de calidad de una herramienta útil en investigación.

Agradecimientos

A los compañeros del laboratorio de Plasticidad Cerebral y Neurociencia Integrativa de la UGto., por el cuidado de los organismos, la elaboración de preparaciones histológicas permanentes y el apoyo en la comprensión de textos en inglés: Gloria Ivett Pérez Ontiveros, Brandon Salvador Pacheco Ávila, Nancy Martínez Juárez e Isabella Ximena Morales Galindo. A PRODEP por el apoyo al proyecto de investigación aprobado con registro en UGTO de CIDSC-3231310, al apoyo de nuestra Universidad de Guanajuato. por el financiamiento del proyecto con registro CIIC-246-2023, así como a nuestras autoridades del Campus Celaya-Salvatierra por las facilidades otorgadas para el desarrollo de nuestros proyectos.

Referencias

- Alvarez, A. M. (2021). PLASTICIDAD CEREBRAL, MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES. *SITUA*, 24(1). <https://doi.org/10.51343/SI.V24I1.797>
- Bello-Medina, P. C., González-Franco, D. A., Vargas-Rodríguez, I., & Díaz-Cintra, S. (2022). Estrés oxidativo, respuesta inmune, plasticidad sináptica y cognición en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer. *Neurología*, 37(8), 682–690. <https://doi.org/10.1016/J.NRL.2019.06.002>
- Bringas, M. E., Morales-Medina, J. C., Flores-Vivaldo, Y., Negrete-Díaz, J. V., Aguilar-Alonso, P., León-Chávez, B. A., Lazcano-Ortiz, Z., Monroy, E., Rodríguez-Moreno, A., Quirion, R., & Flores, G. (2012). Clozapine administration reverses behavioral, neuronal, and nitric oxide disturbances in the neonatal ventral hippocampus rat. *Neuropharmacology*, 62(4), 1848–1857. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2011.12.008>
- Buszka, A., Pytyś, A., Colvin, D., Włodarczyk, J., & Wójtowicz, T. (2023). S-Palmitoylation of Synaptic Proteins in Neuronal Plasticity in Normal and Pathological Brains. *Cells*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/CELLS12030387>
- Carlson, N. R. (2014). Fisiología de la conducta / Neil R. Carlson ; traducción GEA Consultoría Editorial (GEA, Trans.). In Fisiología de la conducta. Pearson Educación.
- Dalton, M. A., D'souza, A., Lv, J., & Calamante, F. (2022). New insights into anatomical connectivity along the anterior–posterior axis of the human hippocampus using in vivo quantitative fibre tracking. *ELife*, 11. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.76143>

- Harrison, P. J., & Weinberger, D. R. (2005). Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Molecular Psychiatry*, 10(1), 40–68. <https://doi.org/10.1038/SJ.MP.4001558>
- SCOVILLE, W. B., & MILNER, B. (1957). LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20(1), 11. <https://doi.org/10.1136/JNNP.20.1.11>
- Sholl, D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of Anatomy*, 87(Pt 4), 387. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1244622/>
- Valdés G., J. L., & Torrealba L., F. (2006). La corteza prefrontal medial controla el alerta conductual y vegetativo: Implicancias en desórdenes de la conducta. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 44(3), 195–204. <https://doi.org/10.4067/S0717-92272006000300005>
- Zaldivar Verdier, A., Ximena, I., Galindo, M., León Ventura, F. A., Salvador, B., Avila, P., Cortes, E. J., & Negrete Díaz, J. V. (2024). Aplicación del método Golgi-Cox para la tinción de tejido cerebral. *Verano de La Ciencia*, XXIX, 28. <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/4295>

