

Aplicación del análisis de Sholl para la medición de la longitud dendrítica neuronal

Brandon Salvador Pacheco Avila^{1,2}, Alejandra Mercado Mosqueda^{1,5}, Amaya Zaldivar Verdier^{1,2}, Oscar Eduardo Camacho Hernández⁴, Esther Juárez Cortes^{1,3}, José Vicente Negrete Diaz^{1,2}

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

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

³ Licenciatura en Fisioterapia, Departamento de Enfermería Clínica, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

⁴ Licenciatura en Médico Cirujano, Departamento de Medicina y Nutrición, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato.

⁵ Licenciatura en Nutrición, Departamento de Enfermería Clínica, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato, México.

jv.negrete@ugto.mx, esther.juarez@ugto.mx

Resumen

La diversidad morfológica, la organización y la conectividad de las neuronas son aspectos importantes en el funcionamiento del sistema nervioso, pero especialmente la morfología de las células nerviosas es la que desempeña un papel fundamental en los patrones de comunicación sináptica (Kutzing *et al.*, 2010). En este contexto, las dendritas, que son estructuras receptoras de señales sinápticas, exhiben una notable diversidad en su longitud, forma y patrón de ramificación, mismas que pueden manifestarse en fragmentaciones asociadas a procesos patológicos, pues algunos estudios han revelado que las alteraciones en la morfología dendrítica tienen relación con diversas enfermedades como la esquizofrenia y la enfermedad de Alzheimer (Kutzing *et al.*, 2010).

Para el estudio de este tipo de alteraciones morfológicas se han desarrollado métodos de análisis estructurales, entre los cuales destacan los softwares de cuantificación neuronal automatizada; sin embargo, una técnica estándar que hasta el día de hoy es utilizada es el análisis de Sholl, pues permite cuantificar la longitud dendrítica de la neurona y el número de intersecciones dendríticas de forma manual, esta técnica ha sido empleada en múltiples estudios estructura-función analizando cuantitativamente los cambios morfológicos en las neuronas que pueden estar asociados a neuropatologías (Binley *et al.*, 2014).

El objetivo de este artículo es la puesta a punto de la técnica conocida como análisis de Sholl, usando una plantilla que facilite la cuantificación de la arborización tridimensional a partir de un dibujo bidimensional de neuronas piramidales, localizadas en la capa II/III de la corteza cerebral de la rata, teñidas con el método Golgi-Cox.

Palabras clave: morfología neuronal, análisis de Sholl, dendritas, corteza cerebral.

Antecedentes

En 1953 Donald Sholl presentó un análisis de la cuantificación de la morfología neuronal, esta técnica es completamente manual, misma que ha sido comparada con otros métodos actualizados en los que se utiliza un reprocesamiento de imágenes digitales y una cuantificación automatizada; sin embargo, esta diversidad de métodos pueden introducir sesgos en el usuario o no han sido comparados lo suficiente con el análisis manual para indicar que haya una mejoría en la precisión de datos (Gensel *et al.*, 2010). En varios de los programas computacionales más sofisticados el trazo de la neurona sigue siendo manual y sujeto al error humano; por lo tanto, el análisis de Sholl se considerada una técnica estándar vigente y útil, de uso confiable y sensible para la obtención del número de intersecciones de las dendritas para la estimación de la distancia total de la neurona, iniciando en el soma y hasta la dendrita más distal, en sentido radial (Binley *et al.*, 2014). Es importante tener presente que, el análisis de la morfología neuronal es fundamental para la investigación de procesos involucrados en la progresión de algunas enfermedades, así mismo para cuantificar los efectos de posibles tratamientos (Gensel *et al.*, 2010), además de prácticamente cualquier fenómeno relacionado con el neurodesarrollo y la plasticidad neuronal, tanto en condiciones normales como patológicas.

Morfología de las células nerviosas

La neurona es la unidad elemental para el procesamiento y transmisión de señales en el sistema nervioso, su morfología es variada inclusive en las diferentes subregiones de cada estructura cerebral; sin embargo, la mayoría comparten componentes característicos: un soma, dendritas, axón y botones terminales (Carlson, 2006), (Figura 1B).

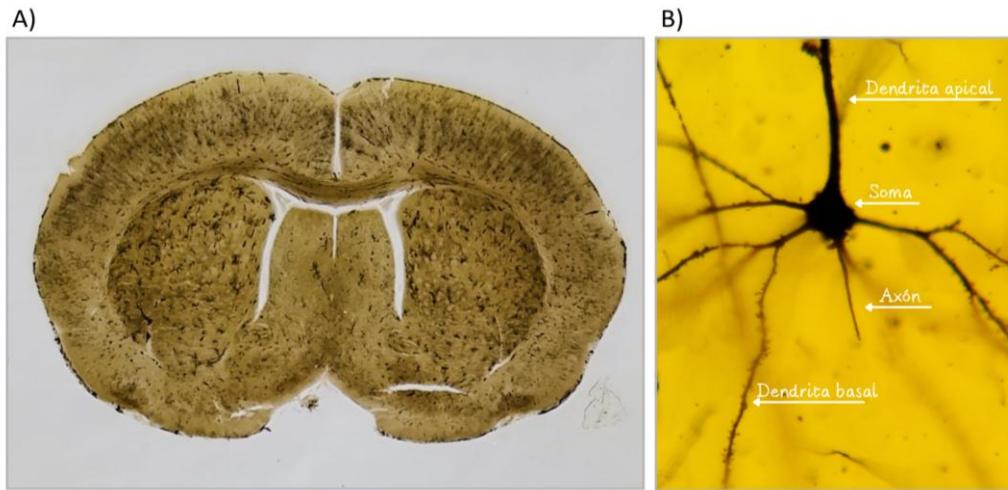


Figura 1. En la imagen A) se observa un corte transversal del cerebro de una rata, teñido con la técnica Golgi-Cox, misma que permite visualizar las diferentes regiones cerebrales desde una vista panorámica a 2x, en B) se muestra la microfotografía de una neurona piramidal de la corteza cerebral de la rata, a 40x, teñida con el mismo método, pueden identificarse claramente sus componentes esenciales.

Fuente: Material propio generado durante el verano.

Corteza cerebral y plasticidad

El cerebro es un órgano sumamente complejo que está presente tanto en seres humanos como en animales superiores o más complejos, está constituido por millones de células con características y funciones especializadas, principalmente neuronas y células gliales, que permiten llevar a cabo procesos complejos como el movimiento y la sensopercepción; además, la corteza cerebral del cerebro humano, en comparación con el de otros mamíferos, ha evolucionado de tal manera que hoy en día se le atribuyen funciones complejas como el pensamiento, el razonamiento, el lenguaje y la toma de decisiones (Di Bella *et al.*, 2024).

La corteza cerebral es una capa delgada que rodea la superficie de los hemisferios cerebrales, en esta lámina cortical se pueden encontrar varias clases de neuronas o células no nerviosas que están reunidas a lo largo de seis capas en la rata y en el humano, cada una de estas capas están ordenadas de forma paralela y son numeradas desde la superficie externa del cerebro hasta la sustancia blanca (Miyashita, 2022). A continuación (Figura 2), se resumen los tipos de capas y las células más destacadas en cada una: la capa I (denominada molecular) es donde residen principalmente los axones, dendritas y terminales de axones de las neuronas. En la capa II y III predominan las células nerviosas de forma piramidal, sus axones se proyectan hacia otras áreas corticales y en la profundidad de la capa III las neuronas suelen ser de mayor tamaño. La capa IV (granular) contiene un mayor número de neuronas esféricas pequeñas y también neuronas piramidales. En la capa V hay células nerviosas en forma piramidal que suelen ser de un mayor tamaño que las de la capa II/III. Por último, en la capa VI (multiforme o polimórfica) las neuronas tienen forma variada, proyectando sus axones también a otras áreas corticales (Miyashita, 2022).

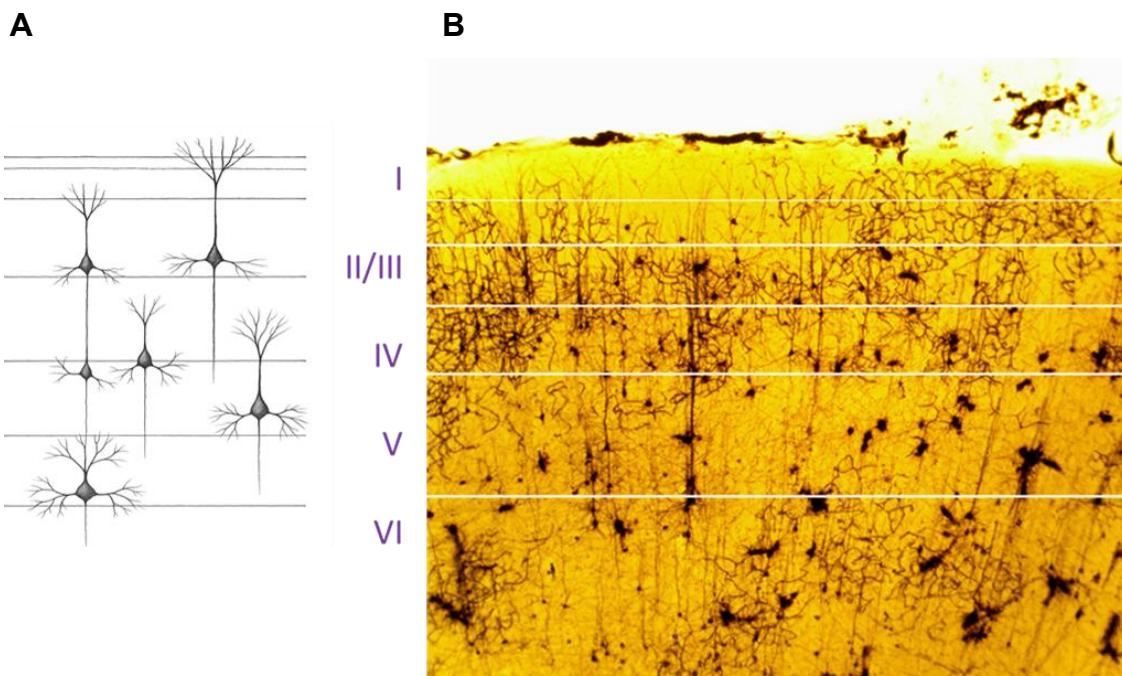


Figura 2. En A se ilustran las seis capas de la corteza cerebral, la presencia de neuronas en ellas, su forma y tamaño relativo, en B se muestra una microfotografía a 4x de un corte transversal del cerebro de la rata teñido con el método Golgi-Cox

Fuente: Material propio generado durante el verano, el dibujo fue realizado usando IA a partir de la microfotografía.

La corteza cerebral representa una de las regiones más plásticas del encéfalo, con una capacidad notable para modificar sus conexiones sinápticas, su arquitectura neuronal y la eficiencia de sus redes funcionales a lo largo del desarrollo y en respuesta a la experiencia. Esta plasticidad se manifiesta particularmente durante la infancia y adolescencia, etapas donde ocurren procesos clave como la proliferación y poda sinápticas, la mielinización y la reorganización funcional. Durante la pubertad, por ejemplo, se observa una reestructuración intensiva en áreas como la corteza prefrontal, la cual se vincula directamente con la maduración de funciones ejecutivas, emocionales y sociales (Juraska, 2024), y por supuesto procesos más complejos como el pensamiento y el lenguaje.

Los mecanismos de plasticidad cortical implican tanto cambios estructurales como funcionales. Estructuralmente, se ha observado que las neuronas piramidales de la capa V en la corteza motora presentan un incremento en la complejidad de su arborización dendrítica y en la densidad de espinas, lo que refleja una mayor capacidad de integración sináptica (Benedetti *et al.*, 2020), aunque lo mismo puede decirse de cualquier otra neurona del sistema nervioso. Funcionalmente, esta maduración permite una mejora en el control motor, la coordinación y el aprendizaje de habilidades específicas. Desde un punto de vista molecular, la expresión de genes regulados, por ejemplo, por el factor transcripcional SATB2 (proteína de unión a secuencia rica en AT especial 2) se ha identificado como esencial para coordinar procesos como la axogénesis, la formación de sinapsis y la plasticidad sináptica en la corteza cerebral en desarrollo (Guo *et al.*, 2023). SATB2 actúa como un organizador de la cromatina y regula la expresión génica necesaria para establecer circuitos neuronales adecuados, especialmente en las regiones somatosensoriales y frontales.

La plasticidad cortical no solo es esencial en etapas del desarrollo, sino que también se mantiene en el adulto en forma de neuroplasticidad adaptativa. Esta permite reorganizar circuitos tras lesiones cerebrales, incorporar aprendizajes complejos o responder a experiencias sensoriales y cognitivas. De esta manera, la corteza cerebral se posiciona como una estructura altamente maleable y crítica para la adaptación del individuo en contextos variables, sustentando su rol central en la cognición, el comportamiento y la memoria. Además, la maduración estructural de las neuronas piramidales de la capa V en la corteza motora se correlaciona con el incremento de la complejidad dendrítica y la densidad de espinas, lo cual refleja un perfeccionamiento funcional en la comunicación intracortical (Benedetti *et al.*, 2020).

Tinción de Golgi-Cox

El método de tinción Golgi-Cox ha sido empleado para el estudio y análisis de la morfología neuronal, incluyendo el soma, el axón y las dendritas, así como las espinas dendríticas (Zaqout & Kaindl, 2016). Esta tinción, además de permitirnos observar la neurona en tres dimensiones y con su completa estructura, también nos permite estudiar las alteraciones en la plasticidad sináptica, las cuales pueden estar asociadas a la propia experiencia, a los cambios que surgen durante el neurodesarrollo, o alguna alteración en el comportamiento, mismos que se pueden expresar en el tejido humano o en modelos animales; un ejemplo claro de ello es el estudio que se realizó en un modelo animal para observar el efecto de la clozapina en un tratamiento de esquizofrenia, el cual demostró que había hipertrofia neuronal y una disminución de la espinogénesis en zonas del cerebro como la corteza prefrontal (PFC) y en el núcleo accumbens (NAc), todo esto mediante análisis morfológico de tipo cuantitativo de la neurona (Bringas *et al.*, 2012).

Material y métodos

Organismos

Se emplearon ratas adultas de la cepa Sprague-Dawley machos y hembras, n=4, de 350 gr, mantenidas con libre acceso a agua y alimento, en un ciclo de luz oscuridad 12/12, en el Bioterio del Campus Celaya-Salvatierra de la Universidad de Guanajuato (Figura 3).



Figura 3. Ratas de la cepa Sprague-Dawley adultas con libre acceso a agua y alimento.

Tinción y revelado del tejido

En el presente estudio los estudiantes trabajaron con preparaciones histológicas permanentes, por lo que para este procedimiento en específico no se usaron animales. Para cuantificar una neurona con el análisis de Sholl se debe contar con preparaciones histológicas de cortes de tejido cerebral de rata teñidas con la técnica de Golgi-Cox u otras variantes de la misma, usando un protocolo estándar, para mayor detalle sobre ésta pueden revisarse trabajos de nuestro grupo (Bringas *et al.*, 2012; Penagos-Corzo *et al.*, 2015; Zaldivar *et al.*, 2024). Se resume a continuación: 1) se extrajo tejido cerebral de rata anestesiada a partir de una perfusión cardíaca con solución salina al 0.9%, 2) se colocó el tejido en solución de Golgi-Cox, previamente preparada, para su impregnación, se hizo un cambio de solución a las 24 horas y luego se mantuvo en total oscuridad por 14 días, 3) el tejido se colocó durante 3-5 días en una solución con sacarosa al 30%, 4) empleando un vibratomo se hicieron cortes transversales de 150 micrómetros, 5) los cortes se colocaron en portaobjetos para posteriormente pasarlo por el tren de revelado, que consistió en: agua bidestilada (H_2O_b) por 1 minuto, hidróxido de amonio por 25 minutos, 10 lavados en H_2O_b , fijador de Kodak por 25 minutos, etanol al 50% por 1 minuto, etanol al 70% por 1 minuto, etanol al 96% por 5 minutos, etanol al 100% por 10 minutos, segundo paso en etanol al 100% por 10 minutos y finalmente 15 minutos en xileno. Posteriormente los cortes se montaron colocando una capa de resina sintética y un cubreobjetos para resguardar los cortes, se dejaron secar por al menos 2 semanas antes de visualizarlos al microscopio.

Análisis de Sholl

Para realizar el dibujo de una neurona se colocó una laminilla o preparación permanente con tejido cerebral impregnado con Golgi-Cox en un microscopio trinocular (Omax M83EZ), con cámara digital (Omax, 14 megapíxeles), al que se le adaptó otra cámara lúcida óptica (Olimpus), y utilizando el objetivo 40x se localizó una neurona, en este caso una de tipo piramidal de la corteza cerebral de la capa II/III de la rata, que contaba con una estructura completa, estaba aislada y bien teñida, lo cual se identificó enfocando para observar la integridad de la célula (Figura 4). Una vez elegida la neurona, se visualizó a través del microscopio y mediante la cámara lúcida adaptada a dicho microscopio se observaron ambas imágenes (neurona, papel y lápiz) a través de los oculares, permitiendo “calcar” la célula sobre el papel blanco colocado bajo el extremo de la cámara lúcida, donde se ubica el espejo de la misma (Figura 5), para obtener un dibujo completo de la estructura se enfocó la neurona poco a poco para así trazar las dendritas que van emergiendo del soma (Figura 6). Se inició el trazo desde el soma hasta obtener todo el dibujo de la primera dendrita, denominada de 1er orden, luego esta puede bifurcarse dando origen a dendritas de 2do orden, y así sucesivamente hasta terminar con esas ramas. Posteriormente, siguiendo el orden de las manecillas del reloj, se procedió a trazar la dendrita siguiente, de 1er orden y sus ramificaciones. Se dibujó el árbol dendrítico derivado de la dendrita apical (la que se orienta hacia el borde de la corteza cerebral) y también el árbol dendrítico basal, que se extiende de manera lateral, en general opuesto a la apical y hacia la proyección axonal. Se tuvo en cuenta que la orientación de las neuronas en la corteza es radial (semejante a la disposición de los rayos de una bicicleta), de modo que, dependiendo de la región de estudio, pudieron apreciarse en diferente posición, ya fuera vertical, horizontal o invertidas, además de la colocación del tejido en la laminilla. Adicionalmente se adquirieron fotografías digitales a diferentes magnitudes y enfoque, para mostrar claramente la estructura neuronal.

Consideraciones éticas: el presente estudio es parte del protocolo aprobado en la convocatoria CIIC246-2023, que cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Guanajuato, asentado en el acta número CEPIUG-A09-2023. El código asignado por el CICUALUG al proyecto es: CEPIUG-P47-2023, de enero de 2024.

Resultados

Neuronas teñidas con Golgi-Cox

Se obtuvieron previamente de 8-10 láminas de cada cerebro de rata, cada una con 2-6 cortes histológicos, con los cuales se trabajó en la visualización, captura de imágenes y medición de la longitud dendrítica total de 100 neuronas, sin distinción de hemisferio, ni sexo del animal. En párrafos previos, la figura 1 muestra un corte transversal del cerebro de la rata, teñido con el método Golgi-Cox, en una vista panorámica a 2x, donde se observan diferentes regiones cerebrales gracias al gradiente que genera la tinción. Todas las neuronas empleadas reunieron los requisitos necesarios para ser incluidas en el estudio, en breve: 1) que su estructura esté completa, 2) bien teñidas y 3) aisladas. Lo anterior permitió descartar segmentos pertenecientes a otras neuronas, minimizar la dificultad de identificación de los diferentes componentes y evitar confusión por entrelazamiento de la arborización con otras neuronas vecinas. Si bien en algunos casos fue difícil cumplir todos los criterios con exactitud, la identificación fue clara, dada la experiencia que gradualmente se fue adquiriendo. Esto puede apreciarse en la figura 4, donde se presentan microfotografías señalando inicialmente la región: en A) una neurona a 4x (encerrada en recuadro), luego se visualiza a 10x en B) y a 40x en C).

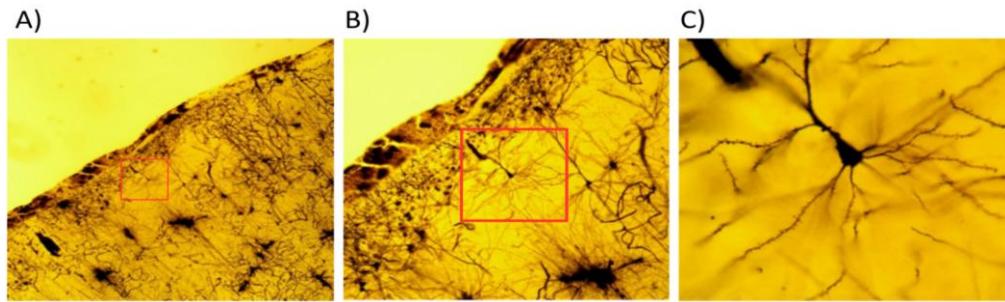


Figura 4. En A) se presenta una fotomicrografía de un corte histológico de corteza cerebral teñido con la técnica Golgi-Cox con un objetivo de 4X donde puede apreciarse un conjunto de neuronas en capa II. En B) se observa la misma zona de la corteza, pero con un objetivo de 10X, permitiendo observar con más claridad una neurona piramidal aislada y bien teñida. Finalmente, en C) se observa la misma neurona a 40X con su estructura claramente visible, donde varias ramas dendríticas emergen del soma formando hacia arriba el árbol dendrítico apical, mientras que hacia abajo se ubica el axón, estructura fina y delgada, junto con el árbol dendrítico basal. También, pueden apreciarse claramente espinas dendríticas.

En la siguiente serie de fotomicrografías (Figura 5) se presentan varias neuronas de tipo piramidal de la corteza cerebral de la rata, visualizadas a 40x y a diferentes enfoques, de modo que puede apreciarse los árboles dendríticos apical y basal de cada una, que fueron el objeto de estudio de este trabajo; además, también se observa el soma y el axón. Puede constatarse que las neuronas elegidas se encuentran aisladas, bien teñidas y completas, lo que facilita la identificación de sus procesos (prolongaciones) para ser dibujados con la mayor fidelidad. En todas ellas se observa la presencia de espinas dendríticas, elementos clave en la plasticidad sináptica fina, son las pequeñas protuberancias que se ven sobre las dendritas y que son mejor visualizadas a 100x, aquí pueden apreciarse claramente en la neurona 3 enfoque 1, en la dendrita basal a la izquierda (en torno a las 7-8 según las horas del reloj). Este tema puede revisarse en otros trabajos de nuestro grupo (Bringas *et al.*, 2012; Penagos-Corzo *et al.*, 2015; Zaldivar Verdier *et al.*, 2024).

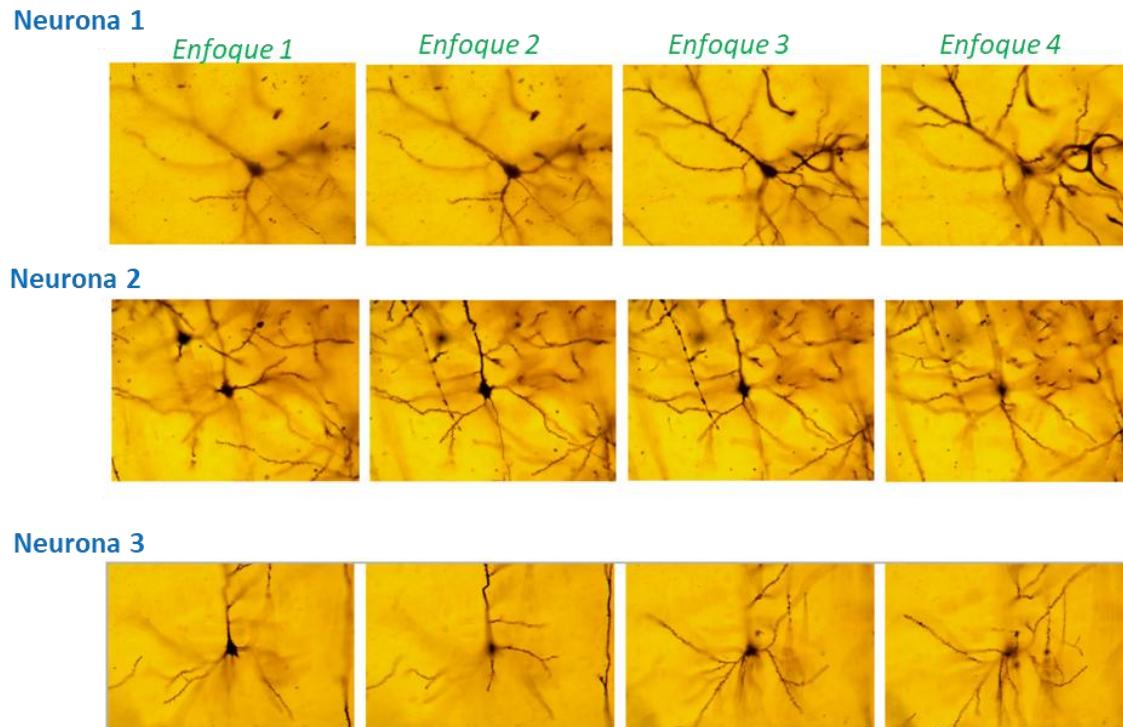


Figura 5. Se presenta una serie de microfotografías donde se observa a 40x una neurona piramidal de la corteza cerebral con su estructura completa gracias a los diferentes enfoques que permite el microscopio. Pueden observarse además la presencia de espinas denríticas.

Dibujos de neuronas

Considerando los criterios previos, se dibujaron 100 neuronas, principalmente de corteza cerebral de la rata. En la figura 6 se aprecia la neurona a 40x y su correspondiente trazo bidimensional en papel. Se muestra la cámara lúcida acoplada al microscopio óptico, que permitió visualizar a través de los oculares tanto la neurona como la hoja y el lápiz, de ese modo se logró “calcar” la neurona, como ha sido descrito previamente. Las imágenes fueron adicionalmente visualizadas y capturadas a través de la cámara digital a una resolución de 4K, usando el programa Toupview 2022.

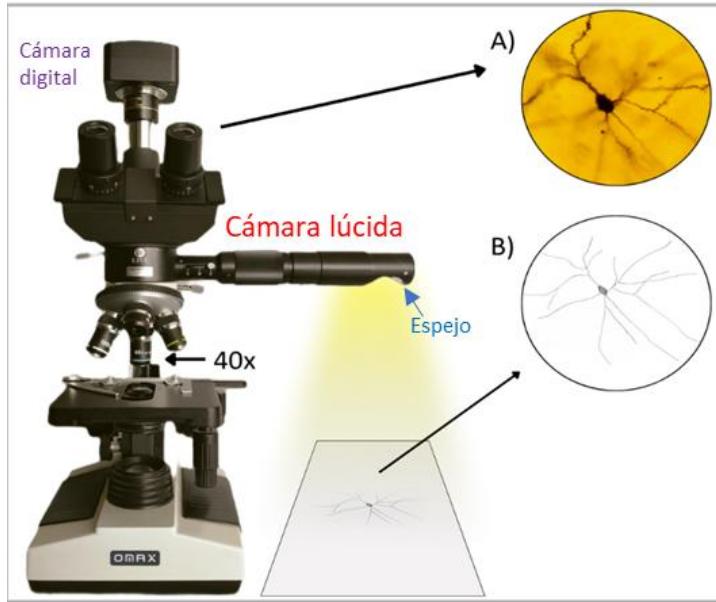


Figura 6. Obtención del dibujo a mano de una neurona. En A) se observa una neurona piramidal en tejido cerebral impregnado con Golgi-Cox. visualizada con un objetivo de 40x, en B) se muestra el dibujo de la neurona realizado a mano sobre papel y con ayuda de la cámara lúcida acoplada al microscopio (tubo lateral), lo que se logra usando los diferentes enfoques que permiten visualizar la estructura tridimensional y plasmarla en un trazo bidimensional.

En la figura 7, se muestra el trazo a lápiz de una neurona, seguido del dibujo de una neurona diferente, esta segunda célula ha sido coloreada para identificar las diferentes dendritas en función de su orden, para analizar nivel y tipo de arborización de las neuronas, y con ello estudiar la complejidad de sus conexiones o alguna posible alteración en las mismas, y su proximidad al soma. La flecha amarilla en A muestra la dirección del trazo al realizar el dibujo.

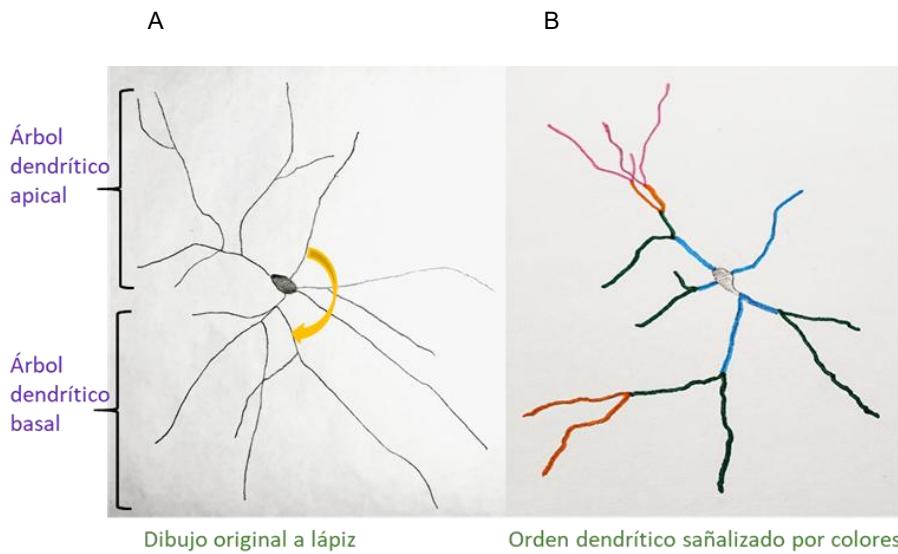


Figura 7. Dibujos de diferentes neuronas piramidales obtenidos con cámara lúcida, a 40x, las llaves a la izquierda señalan la extensión de los árboles dendríticos apical (superior) y basal (inferior). En B, se muestra una neurona coloreada para identificar las dendritas de 1er orden (azul), 2do orden verde oscuro), de 3er orden (naranja) y de 4to orden (rojo).

Plantilla de Sholl

Para la elaboración de la plantilla se utilizó una microregla de 1 cm de longitud con divisiones estandarizadas (OMAX), con una distancia entre la menor división igual a 10 μm . La regla se observó en el microscopio trinocular a 4x, 10x y 40x, adquiriendo fotomicrografías empleando la cámara digital del microscopio (Figura 8).

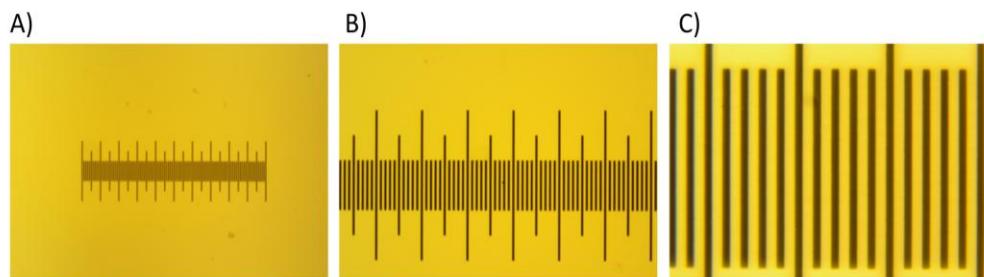


Figura 8. Fotomicrografías observadas a diferentes magnificaciones, en a) se observa a 4x, en b) a 10x, finalmente en c) con un objetivo de 40x.

Mediante una cámara lúcida acoplada al microscopio, se trazó en papel la distancia mínima entre dos de los segmentos visualizados de la regla, obteniendo así una medida estándar de 3 milímetros (mm) de separación (Figura 9, B).

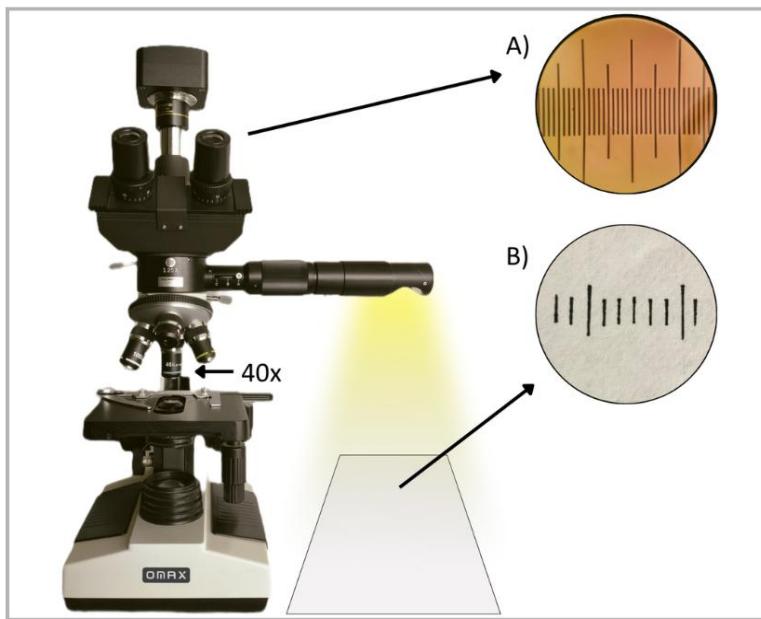


Figura 9. Obtención de la medición de la microregla con un microscopio óptico. En A) se observa la microregla con un objetivo de 40x en el microscopio y en B) el trazo manual de las divisiones de la microregla, que se obtuvo mediante la cámara lúcida adaptada al microscopio.

Una vez obtenida la medición estándar entre anillos, se utilizó el programa Toup View 2022, donde se trazaron una serie de 30 círculos concéntricos, numerados en orden creciente desde el soma hacia la periferia, con un radio inicial de 3 mm y una separación entre cada círculo también de 3 mm (Figura 10). Posteriormente, para medir la representación bidimensional de la complejidad tridimensional de la neurona, se colocó la plantilla de Sholl sobre el dibujo (Figura 10, B). colocando el soma en el primer círculo y se procede a cuantificar el número de veces que una dendrita intersecta cada círculo. Se inició contando todos los cruces de las dendritas de 1er orden con el segundo círculo, y se anota en una hoja de registro que posteriormente se captura en una base de datos en Excel (Figura 10, D), enseguida las intersecciones de las mismas dendritas de 1er orden, pero ahora con el tercer círculo y así hasta terminar con las dendritas de ese orden. Seguidamente se continúa con las dendritas de 2do orden, de manera semejante se registran en la base de datos, hasta concluir con las dendritas de mayor orden. Dicha base de datos cuenta con fórmulas que suman: 1) el total de cruces por número de orden y 2) total de cruces por anillo y 3) longitud total del árbol dendrítico registrado en la base de datos. Lo anterior nos da una estimación de la complejidad de la arborización de la neurona, tema a discutir en otro trabajo, empezando con el 2do., luego las que se presentan en el 3ro., y así sucesivamente. El número total de intersecciones obtenidas se multiplica por 10 para obtener el valor total de la longitud del árbol dendrítico en micrómetros.

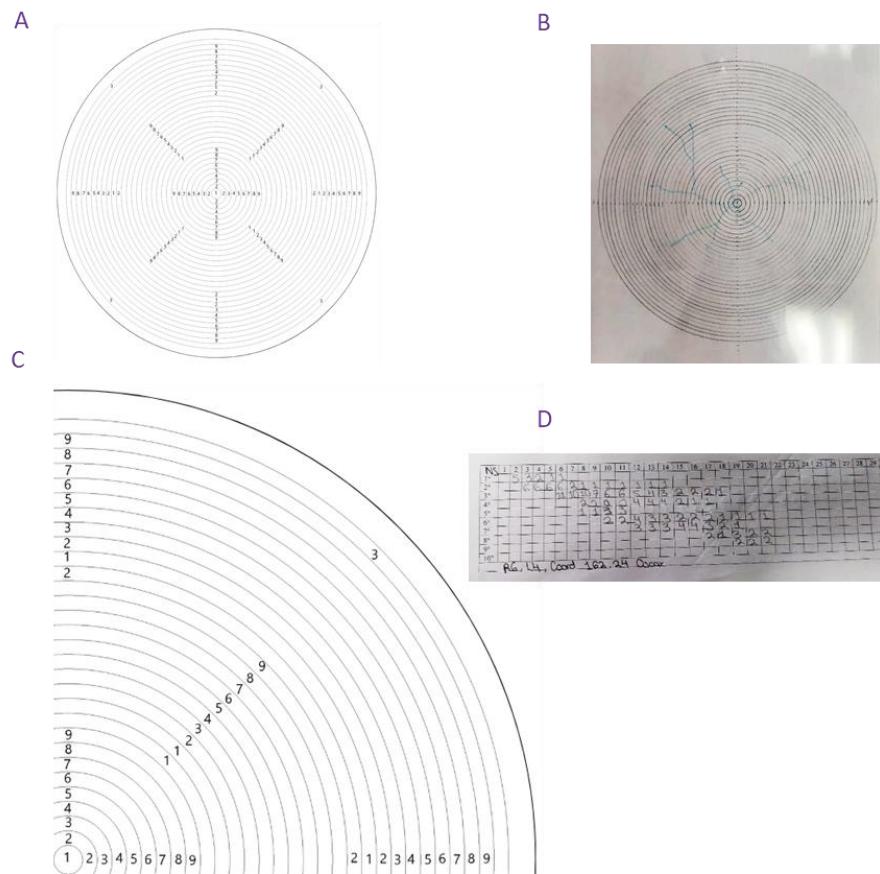


Figura 10. Plantilla de Sholl con 30 círculos concéntricos (A), para mayor claridad se coloca sólo un número en cada círculo (ver detalle en C), así en el segundo grupo de círculos el número 1 corresponde al anillo 11, equivalente a 110 micrómetros desde el soma, en el tercer grupo de círculos el número 2 corresponde al anillo 22, esto es 220 micrómetros desde el soma. En B se observa la plantilla sobre un dibujo ya iluminado para la cuantificación de cruces, y su correspondiente registro en la base de datos mostrada en D.

Cuantificación de la longitud dendrítica

Se cuantificaron 100 neuronas, distribuidas en diferentes regiones de la corteza cerebral de la rata: a) corteza motora, b) cortezas somatosensoriales, c) cortezas insulares y d) otras regiones corticales, todas ellas de las capas II/III, los resultados se resumen en la figura 12. La longitud está expresada en micrómetros (μm), y la longitud total de la gran mayoría de neuronas osciló entre 1,500 y 2,000 μm (Fig. 11). No se agrupó por región cerebral por no ser el objetivo de este trabajo.

Conforme a lo reportado por nosotros en trabajos previos y otros grupos, la menor longitud dendrítica se encuentra en las dendritas de menor y mayor orden, concentrándose en los órdenes intermedios (Figura 11). Esto permite predecir alteraciones asociadas a modulación de las aferencias a la neurona, ya sean excitadoras, inhibidoras o moduladoras. Igualmente, contribuye a la comprensión de trastornos asociados a alteraciones en la arborización.

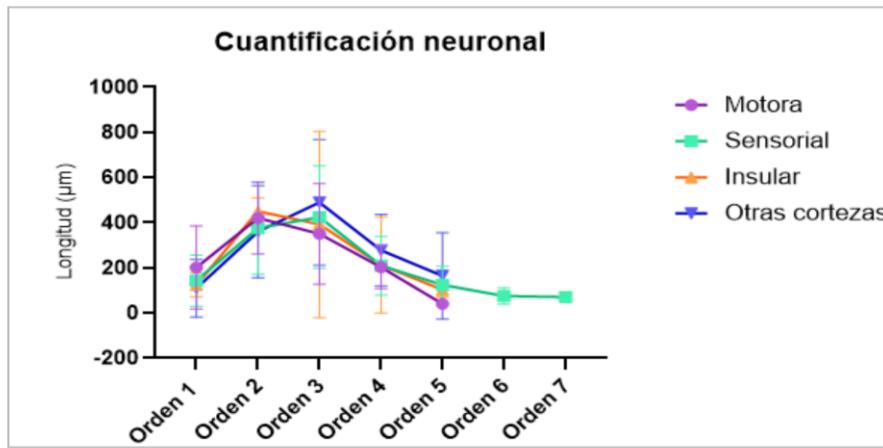


Figura 11. En la gráfica se observa la longitud de 100 neuronas en función a la cantidad de órdenes (bifurcaciones) identificadas en distintas regiones cerebrales. Así mismo se observa una tendencia general de mayor número de intersecciones cerca del soma, disminuyendo progresivamente conforme aumenta la distancia radial, esto es consistente con la organización típica de las neuronas piramidales, ya que la densidad de ramificación dendrítica es más alta en las regiones proximales y mediales, y disminuye hacia las regiones distales. El promedio de mayor longitud por número de orden muestra un pico en las dendritas proximales y mediales, particularmente en los órdenes 2 y 3, en torno a 300 y 400 micrómetros, evidenciando una mayor arborización en esas zonas. Adicionalmente se aprecia la presencia de una mayor bifurcación en neuronas sensoriales.

Variabilidad debida al error humano

La estructura de la neurona es compleja y puede presentarse variabilidad en el trazado, al considerar el observador un elemento como dendrita o no, o pertenecer a esa neurona o no, o simplemente el hecho de lo tenue que llega a ser la tinción en una dendrita o espina dendrítica dentro del complejo entrelazado neuronal, y puede obviarse y llevar a errores. Para apreciar esta influencia del error humano en la medición, 4 investigadores realizaron de manera independiente un análisis de Sholl y contaron el árbol dendrítico basal de las mismas neuronas piramidales (Figura 12). Esto permitió comparar los resultados de cada observador para determinar el grado de error introducido por la subjetividad durante el proceso de trazado manual de la neurona. Aquí es necesario señalar que aún en los más modernos, complejos y costosos equipos automatizados empleados para realizar esta tarea, el dibujo a mano alzada de la neurona continúa siendo realizado por el observador, así sea sobre una pantalla táctil que convierte el trazo en un dibujo digital que luego permite hacer mediciones automatizadas, rotaciones y otros análisis. Lo anterior por dos razones principales: a la fecha no hay un programa computacional que pueda diferenciar los elementos de una sola neurona sin error, y segundo porque las muestras histológicas son complejas en sí mismas y cada neurona y conjunto de neuronas son realmente difíciles de diferenciar y requieren en todo caso de un entrenamiento suficiente, a fin de garantizar un mínimo de errores y sobre todo la reproducibilidad de la medición. Este ejercicio nos permite identificar qué observadores apreciaron casi los mismos elementos, de tal manera que las diferencias entre sus mediciones son aceptables (Figura 12). Es muy importante tener presente que, a pesar de este error, cuando existen diferencias estadísticamente significativas éstas permanecen a pesar de esta circunstancia, la condición es que el trazo lo haga un observador experimentado.

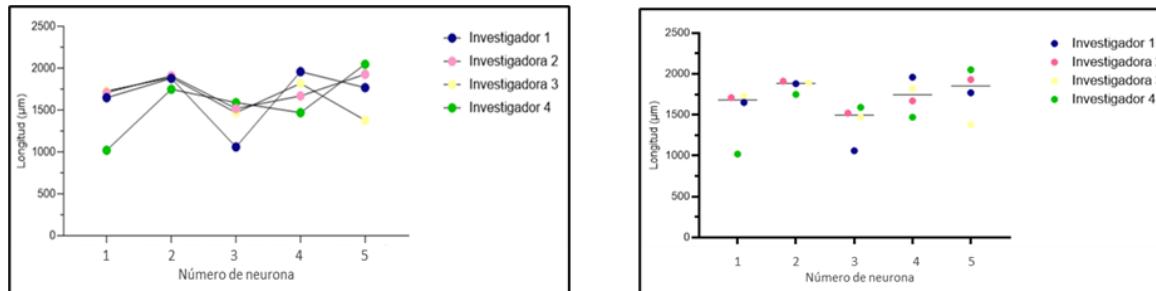


Figura 12. Dos formas de representar gráficamente la comparativa de las mediciones individuales de cuatro investigadores, reflejando variaciones en la percepción de la estructura de cada neurona. Aunque ambas gráficas representan lo mismo, se realizó como ejercicio estadístico.

Conclusiones

El presente trabajo muestra que el análisis de Sholl, usando una plantilla estandarizada de círculos concéntricos constituye una herramienta válida, precisa y replicable para la cuantificación de la longitud dendrítica en neuronas, en este caso células piramidales de la capa II/III de la corteza cerebral de la rata. A través del trazado manual de 100 neuronas teñidas con la técnica de Golgi-Cox, fue posible identificar patrones consistentes en la arborización dendrítica, destacando un mayor número de intersecciones en regiones cercanas al soma y una reducción progresiva en la periferia, este perfil de ramificación es coherente con la estructura de las neuronas piramidales reportadas en la literatura.

Si bien existen plantillas usadas por nosotros y otros grupos de investigación, el presente trabajo muestra en detalle cómo en cada laboratorio, con sus microscopios particulares, pueden crear su propia plantilla, ajustadas a sus equipos. En este caso, no solo permitió estandarizar el método de medición, sino que también redujo significativamente la variabilidad, optimizando la confiabilidad de los datos obtenidos. Esta herramienta representa un avance metodológico accesible y de bajo costo, que puede ser adoptado en estudios morfológicos tanto en contextos experimentales como clínicos, particularmente en investigaciones que buscan evaluar alteraciones estructurales asociadas a enfermedades neuropsiquiátricas o neurodegenerativas, así como para la comprensión de procesos normales como la plasticidad sináptica y el desarrollo cortical. Finalmente, esta técnica debería complementarse o integrarse a adicionales aproximaciones experimentales, en estudios con modelos animales o muestras humanas para correlacionar los patrones morfológicos con marcadores moleculares, conductuales o funcionales, profundizando así en la comprensión integral del sistema nervioso y los procesos cerebrales superiores.

Agradecimientos

El presente estudio contó con el apoyo de la Universidad de Guanajuato, convocatoria CIIC246-2023, así como de la Rectoría, de la División de Ciencias de la Salud en Ingenierías y del Departamento de Enfermería Clínica, todos del Campus Celaya-Salvaterra. Se agradece a la MC Lendy Yustin García Miranda por la revisión ortográfica, sintáctica y documental del documento”, y a la MED Reyna Nallely Sánchez González por las facilidades para acceder a equipo de laboratorio.

Referencias

- Benedetti, B., Dannehl, D., Janssen, J. M., Corcelli, C., Couillard-Després, S., & Engelhardt, M. (2020). Structural and Functional Maturation of Rat Primary Motor Cortex Layer V Neurons. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6101. <https://doi.org/10.3390/ijms21176101>
- Binley, K. E., Ng, W. S., Tribble, J. R., Song, B., & Morgan, J. E. (2014). Sholl analysis: A quantitative comparison of semi-automated methods. *Journal Of Neuroscience Methods*, 225, 65-70. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.01.017>
- Bringas, M. E., Morales-Medina, J. C., Flores-Vivaldo, Y., Negrete-Díaz, J. V., Aguilar-Alonso, P., León-Chávez, B. A., Lazcano-Ortíz, Z., Monroy, E., Rodríguez-Moreno, Á., 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>
- Carlson, N. R. (2006). *Fisiología de la conducta* (8.a ed.). Pearson Educación.
- Di Bella, D. J., Domínguez-Iturza, N., Brown, J. R., & Arlotta, P. (2024). Making Ramón y Cajal proud: Development of the cell identity and diversity in the cerebral cortex. *Neuron*, 112(13), 2091-2111. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2024.04.021>
- Gensel, J. C., Schonberg, D. L., Alexander, J. K., McTigue, D. M., & Popovich, P. G. (2010). Semi-automated Sholl analysis for quantifying changes in growth and differentiation of neurons and glia. *Journal Of Neuroscience Methods*, 190(1), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.04.026>

Guo, Q., Wang, Y., Wang, Q., Qian, Y., Jiang, Y., Dong, X., Chen, H., Chen, X., Liu, X., Yu, S., Zhu, J., Shan, S., Wu, B., Zhou, W., & Wang, H. (2023). In the developing cerebral cortex: axonogenesis, synapse formation, and synaptic plasticity are regulated by SATB2 target genes. *Pediatric research*, 93(6), 1519–1527. <https://doi.org/10.1038/s41390-022-02260-z>

Juraska, J. M. (2024). The last stage of development: The restructuring and plasticity of the cortex during adolescence especially at puberty. *Developmental psychobiology*, 66(2), e22468. <https://doi.org/10.1002/dev.22468>

Kutzing, M. K., Langhammer, C. G., Luo, V., Lakdawala, H., & Firestein, B. L. (2010). Automated Sholl Analysis of Digitized Neuronal Morphology at Multiple Scales. *Journal Of Visualized Experiments*, 45. <https://doi.org/10.3791/2354>

Miyashita, Y. (2022). Operating principles of the cerebral cortex as a six-layered network in primates: beyond the classic canonical circuit model. *Proceedings Of The Japan Academy Series B*, 98(3), 93-111. <https://doi.org/10.2183/pjab.98.007>

Penagos-Corzo, J. C., Bonilla, A., Rodríguez-Moreno, A., Flores, G., & Negrete-Díaz, J. V. (2015). Conditional self-discrimination enhances dendritic spine number and dendritic length at prefrontal cortex and hippocampal neurons of rats. *Synapse (New York, N.Y.)*, 69(11), 543–552. <https://doi.org/10.1002/syn.21847>

Zaldivar Verdier, A., Morales Galindo, I. X., León Ventura, F. A., Pacheco Avila, B. S., Juárez Cortes, E., & Negrete Diaz, J. V. (2024). Aplicación del método Golgi-Cox para la tinción de tejido cerebral. *Jóvenes en la Ciencia*, 28. <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/4295/3774>

Zaqout, S., & Kaindl, A. M. (2016). Golgi-Cox Staining Step by Step. *Frontiers In Neuroanatomy*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00038>