

Diseño de una metodología basada en imagen para el análisis de la arquitectura muscular

Ángel Heras¹, Ana Pérez Ruíz^{2,3}, Gloria Abizanda^{2,3}, Begoña Calvo^{1,4}, Jorge Grasa^{1,4}

¹Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A)
Universidad de Zaragoza, Mariano Esquillor s/n, 50018, Zaragoza, Spain.

Tel. +34-976762707, e-mail: aheras@unizar.es

²Programa de Medicina Regenerativa, Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA), Universidad de Navarra (UNAV), Spain

³Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Spain

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red bioingeniería, Biomateriales y Nanociencia (CIBER-BBN), Spain

Resumen

La simulación computacional de la respuesta activa y pasiva del músculo esquelético, mediante elementos finitos, requiere definir con exactitud la orientación de las fibras musculares, pues se relaciona directamente con la fuerza desarrollada por el tejido (Kumagai 2000). En este trabajo se presenta una metodología para determinar la orientación de las fibras musculares de los músculos del manguito rotador de ratón.

Material y métodos

Los valores de los ángulos de penación de las fibras musculares de los músculos en estudio, infraespinoso y supraespinoso se han obtenido a partir del tratamiento de imágenes de alta resolución adquiridas mediante el uso de microscopía. A continuación, se detalla el proceso seguido hasta obtener el campo de puntos y vectores de los ángulos de las fibras musculares.

Obtención de muestras e imágenes

Se aisló la articulación del hombro de tres ratones adultos *wild type* (C57BL/6J) (n=3), siguiendo la normativa vigente (RD 53/2013). Se obtuvo la unidad hueso-tendón-músculo, en este caso, húmero-tendones supra e infraespinoso-músculos supra e infraespinoso. De este modo, los músculos de interés, supra e infraespinoso, se mantuvieron en su posición nativa sobre la escápula (Figura 1. a), conservando su tensión natural al estar conectados a los tendones y éstos, a la cabeza del húmero. Las muestras se analizaron en el microscopio multifotón Zeiss LSM 880 NLO. De esta manera, mediante epifluorescencia se distinguen las fibras musculares por la emisión de fluorescencia ($\lambda=488\text{nm}$; verde), mientras que el hueso de la escápula y los tendones se distinguen por la generación de señales de segundo armónico. Cada bloque en estudio se analizó en distintas

profundidades que proporcionan las imágenes de la distribución tanto de tejido blando (orientaciones de las fibras musculares del infraespinoso y el supraespinoso) como de tejido duro, separados en dos canales (verde/blanco). Ver Figura 1.b).

Procesado de imágenes para la obtención de los ángulos de penación

De cada muestra se analizó un corte inferior, un corte intermedio y un corte superior. Para procesar las imágenes se utilizó el programa Fiji (Schindelin 2012) para análisis de archivos del tipo ImageJ. En primer lugar, se aplicó la opción *Tubeness* del complemento *Analyze*, el cual se encuentra como una función de Fiji. La imagen resultante proporciona una distinción clara entre las diferentes fibras musculares. Se modificó su aspecto a estructuras tubulares sin alterar la geometría (Figura 1.c), lo que permite poder utilizar otras funciones del programa. Posteriormente se aislaron las imágenes de los infraespinosos y de los supraespinosos de los distintos bloques y se binarizaron. La siguiente función que se aplicó se trata de *Vector Field*, implementado dentro de *OrientationJ* (Rezakhaniha 2012). Una vez se termina el análisis, se muestra el campo de vectores. De este modo se obtienen tanto las coordenadas como los ángulos de las fibras con los que se trabajará posteriormente. Siguiendo este procedimiento se puede lograr una parametrización total de las orientaciones de las fibras musculares.

Análisis de las orientaciones de fibras

Para cada músculo se distinguieron cinco regiones distintas donde se analizó la orientación de las fibras en los cortes seleccionados (Figura 1.d). Se realizó un análisis estadístico para comprobar si los vectores de cada región, en cada corte, seguían una distribución normal. Se llevó a cabo el análisis

estadístico de Kolmogorov-Smirnov mediante el programa *Matlab*.

Conclusiones

Tras analizar todas las regiones anteriormente detalladas sobre los músculos, se comprobó que la metodología proporciona de manera precisa las orientaciones de las fibras a lo largo de la geometría del tejido. Además, la técnica permite caracterizar de forma automatizada cómo la arquitectura muscular cambia de la región distal a la proximal en la inserción con el tendón. Esta distribución permitirá en un futuro implementar un modelo de comportamiento anisótropo utilizando el método de los elementos finitos.

REFERENCIAS

[1]. KUMAGAI, K., et al. ISSN 8750-7587. 2000. Sprint Performance is Related to Muscle Fascicle Length in

Male 100-M Sprinters. *Journal of Applied Physiology*. 88(3), pp 811-816.

[2]. SCHINDELIN, J., et al. ISSN 1548-7091. 2012. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *NATURE METHODS*. 9(7), pp 676-682.

[3]. REZAKHANIHA, R., et al. ISSN 1617-7959. 2012. Experimental Investigation of Collagen Waviness and Orientation in the Arterial Adventitia using Confocal Laser Scanning Microscopy. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. 11(3-4), pp 461-473.

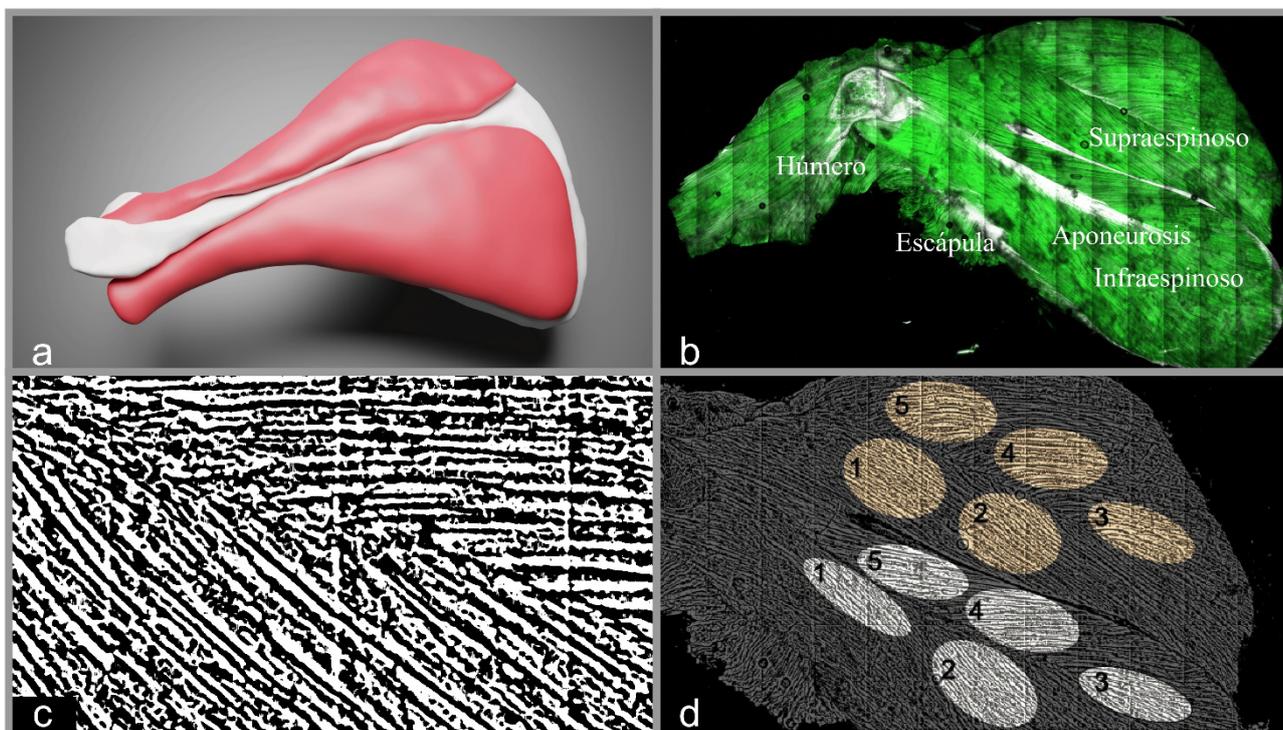


Figura 1. a) Representación del manguito rotador donde se muestran la escápula, el músculo infraespinoso y el músculo supraespinoso. b) Articulación del hombro de ratón visualizada mediante microscopía multifotónica y epifluorescencia. En blanco se distinguen las señales de segundo armónico y en verde la distrofina, pudiendo diferenciar los tejidos blandos y duros. c) Detalle del aspecto de las orientaciones de las fibras musculares una vez se aplica el complemento *Tubeness*. d) Esquema de las cinco regiones seleccionadas en el infraespinoso y el supraespinoso para el análisis estadístico.