

DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA BASADA EN IMAGEN MÉDICA 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

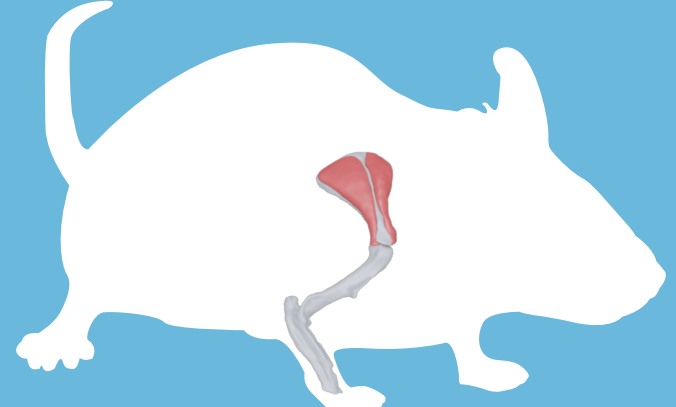
INTRODUCCIÓN

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, ya que la disposición de éstas se relaciona directamente con la fuerza desarrollada por el tejido [1]. En este trabajo se presenta una metodología que permite determinar la orientación de las fibras musculares a partir de imágenes de alta resolución de los músculos infraespinoso y supraespinoso del manguito rotador de ratón.

En primer lugar se aisló el manguito rotador de tres muestras de ratón. Después se observó bajo microscopio confocal para obtener imágenes de alta calidad de las orientaciones de las fibras. Dichas imágenes se procesaron para poder parametrizar las orientaciones de las fibra y se analizaron estadísticamente los valores de los ángulos de fibras de las diferentes muestras para estudiar la similitud entre las diferentes muestras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras



Ratón adulto wilde type (C57BL/6J)

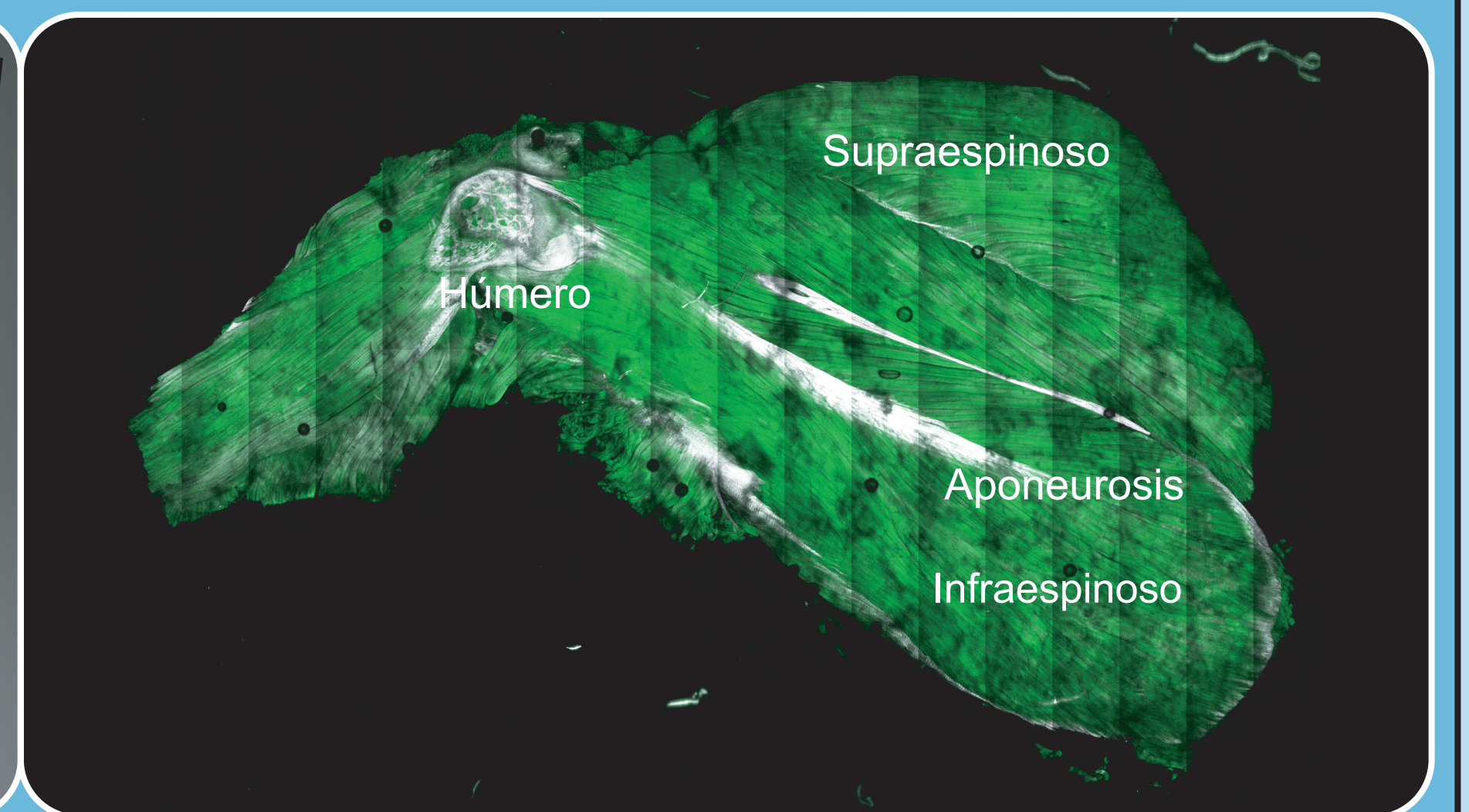
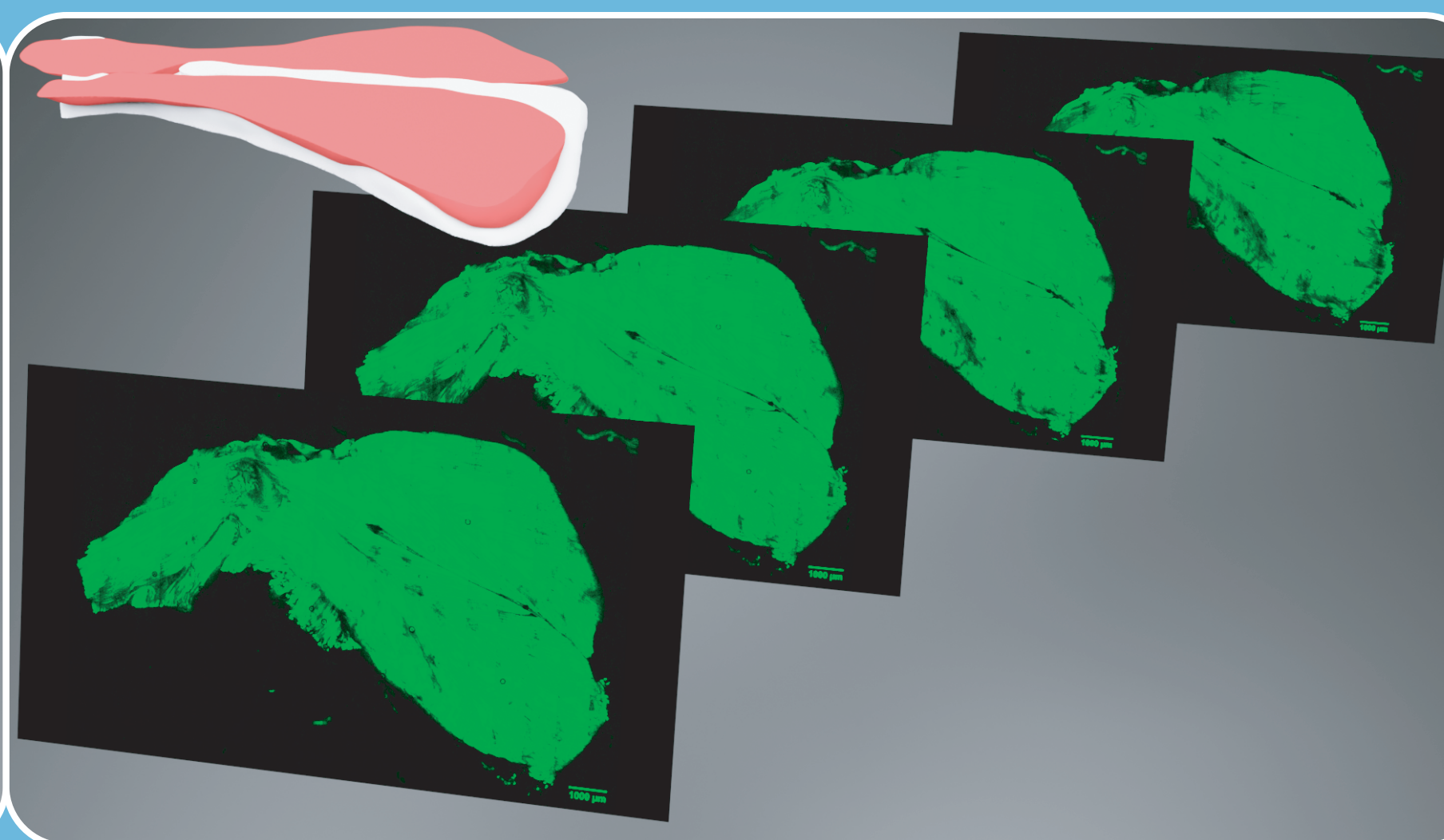
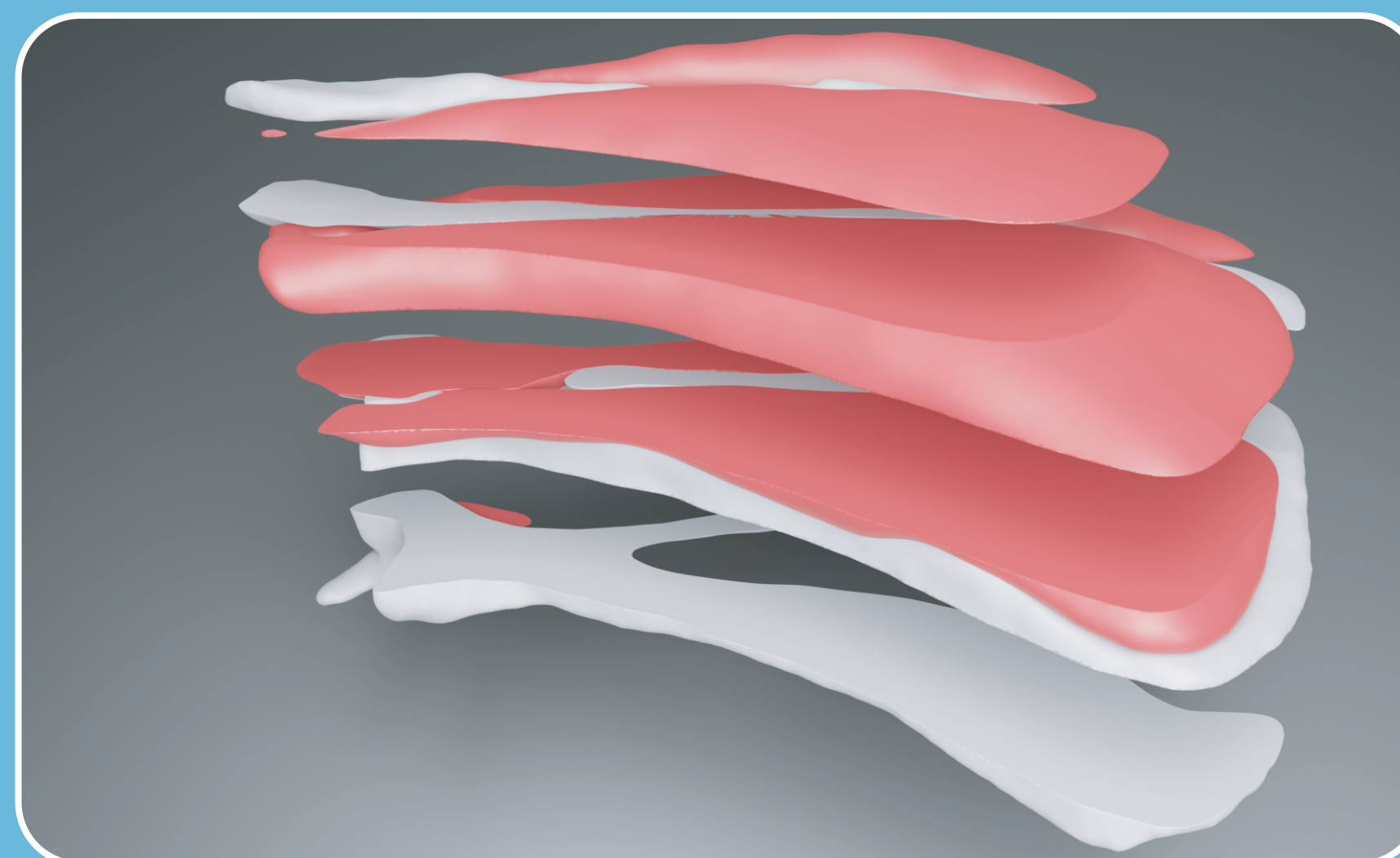
- Se aisló la articulación del hombro de tres ratones adultos wilde type (C57BL/6J) (n=3), siguiendo la normativa vigente (RD 53/2013)
- Se diseccionó el húmero, la escápula y los músculos supra e infraespinoso. Los músculos de interés se mantuvieron en su posición nativa sobre la escápula, manteniendo su tensión natural al estar conectados a los tendones y éstos, a la cabeza del húmero
- Las muestras se fijaron en 4% paraformaldehído durante 48 horas
- Posteriormente se descalcificaron durante 72 horas
- Las muestras se embebieron en gelatina y se tallaron en vibratomo en secciones de aproximadamente 300-500 μm^2 , obteniendo entre 5-7 bloques de cada muestra en estudio

Obtención de las imágenes de alta calidad

Se realizó inmunofluorescencia de cada bloque de 300-500 μm^2 utilizando el anticuerpo Distrofina, marcador específico de las fibras musculares y se observó cada uno con el microscopio multifotón Zeiss LSM 880 NLO

El microscopio proporciona las imágenes de la distribución tanto de tejido blando como de tejido duro, separados en dos canales (verde/blanco). De cada corte se obtienen múltiples imágenes a distintas profundidades

Con 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

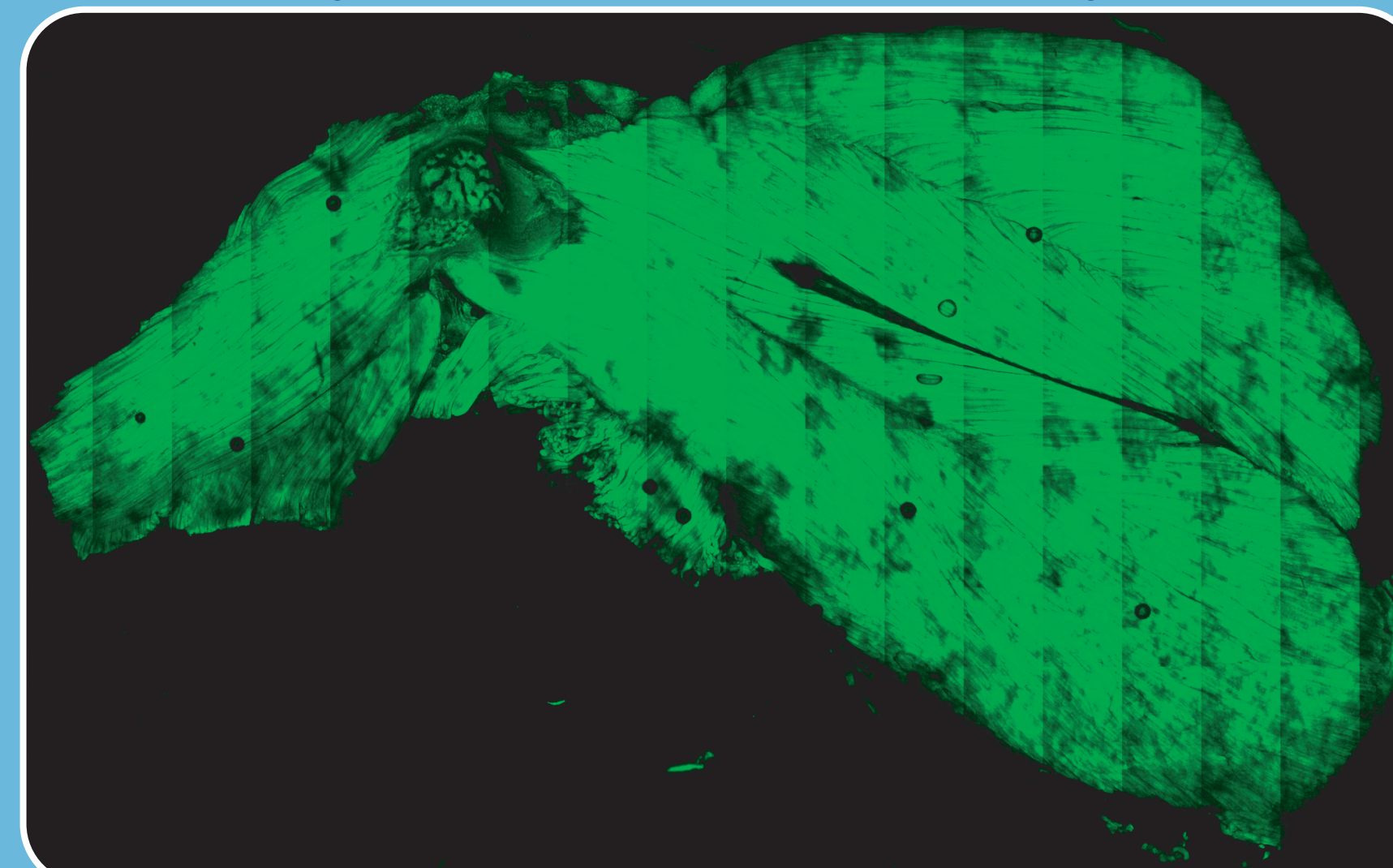


Procesado de imágenes para la obtención de los ángulos de penación

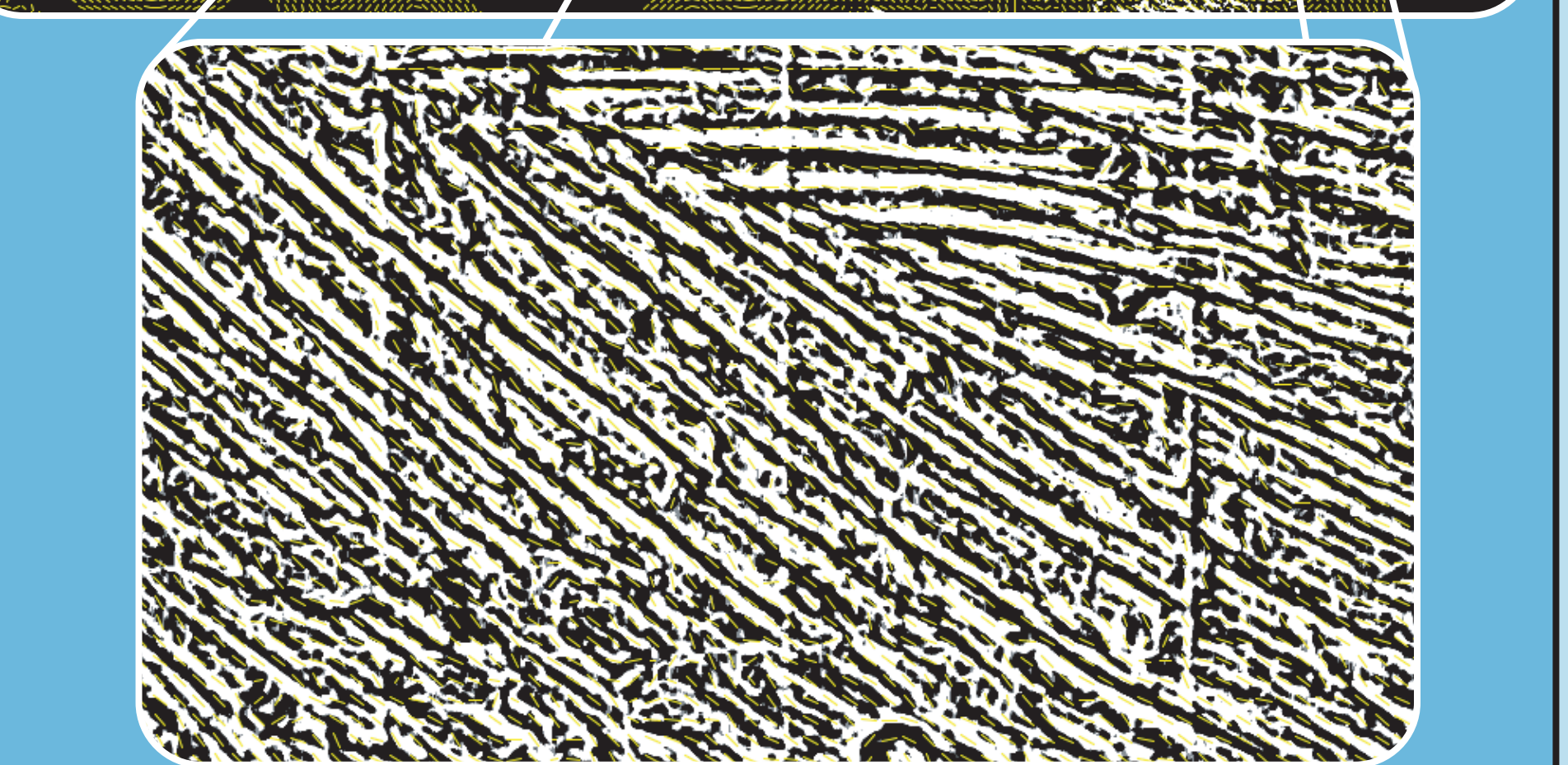
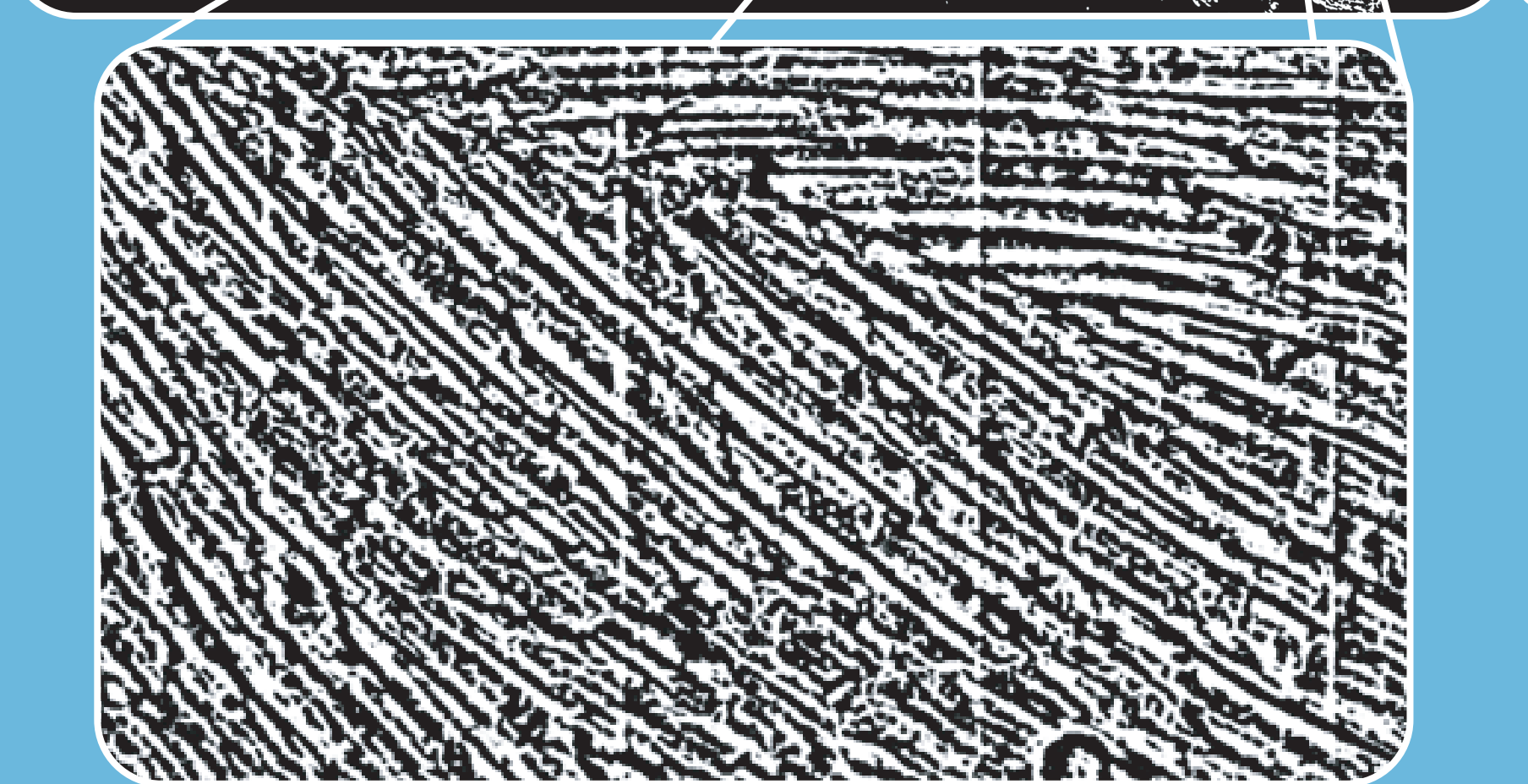
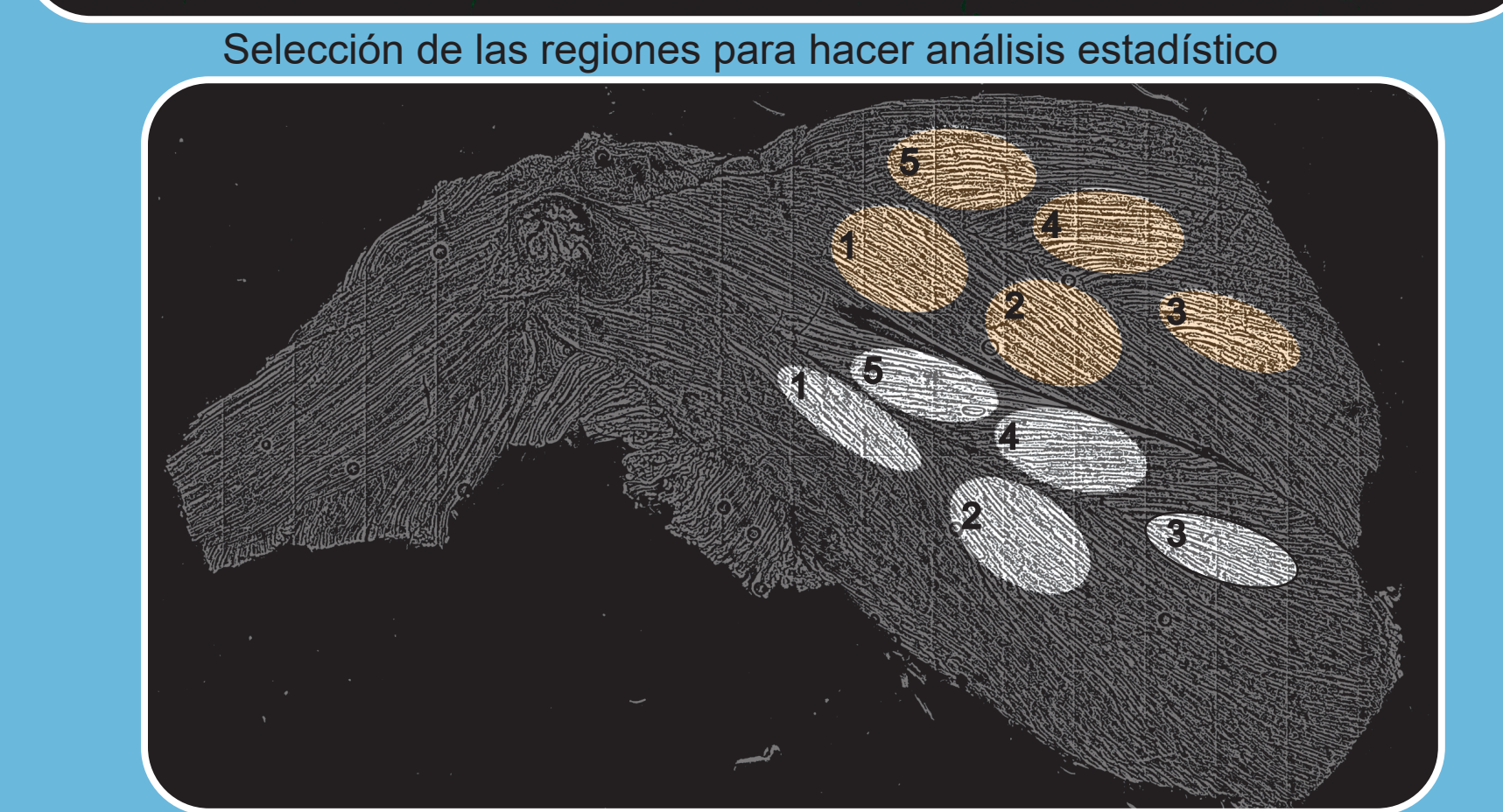
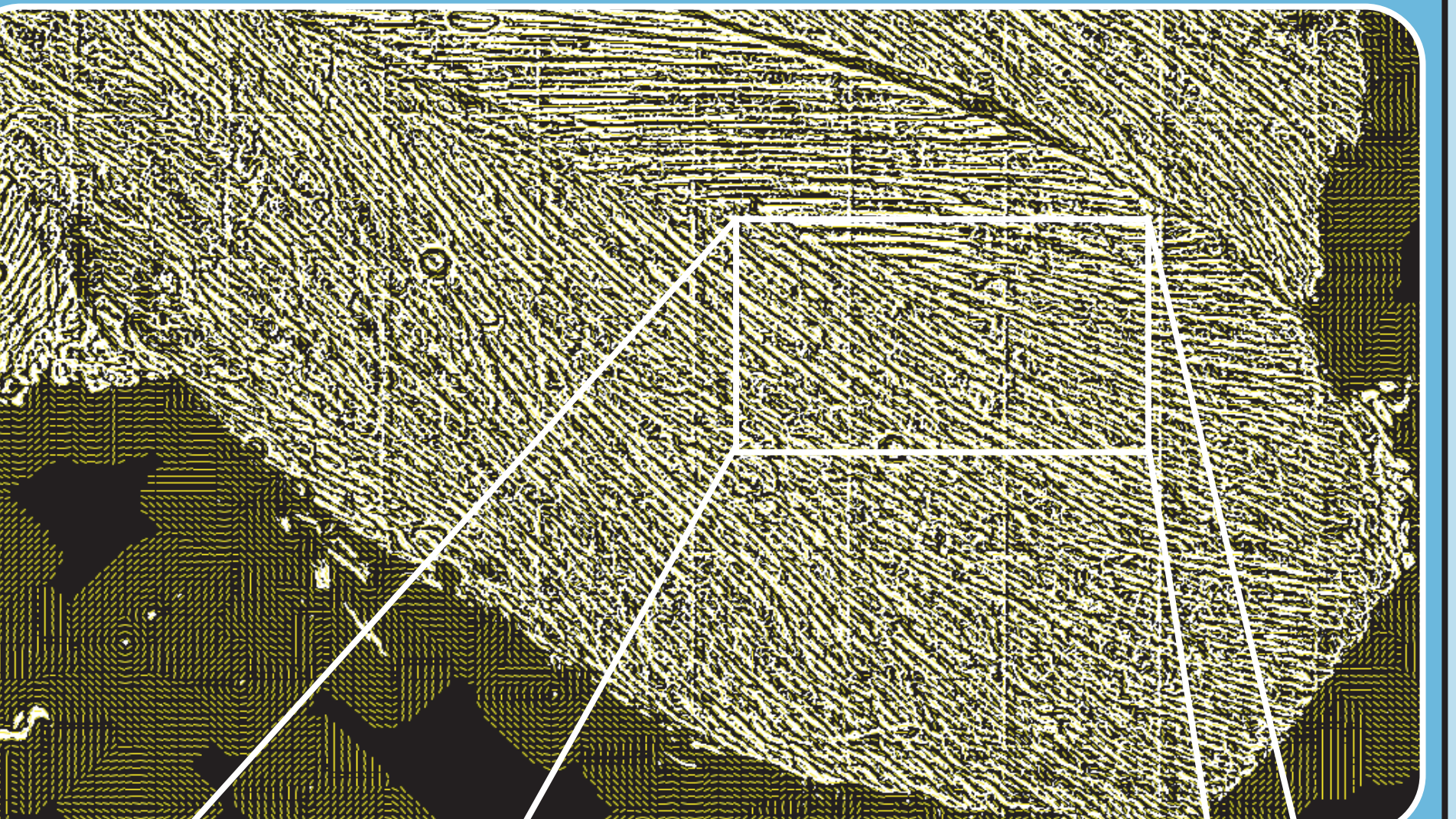
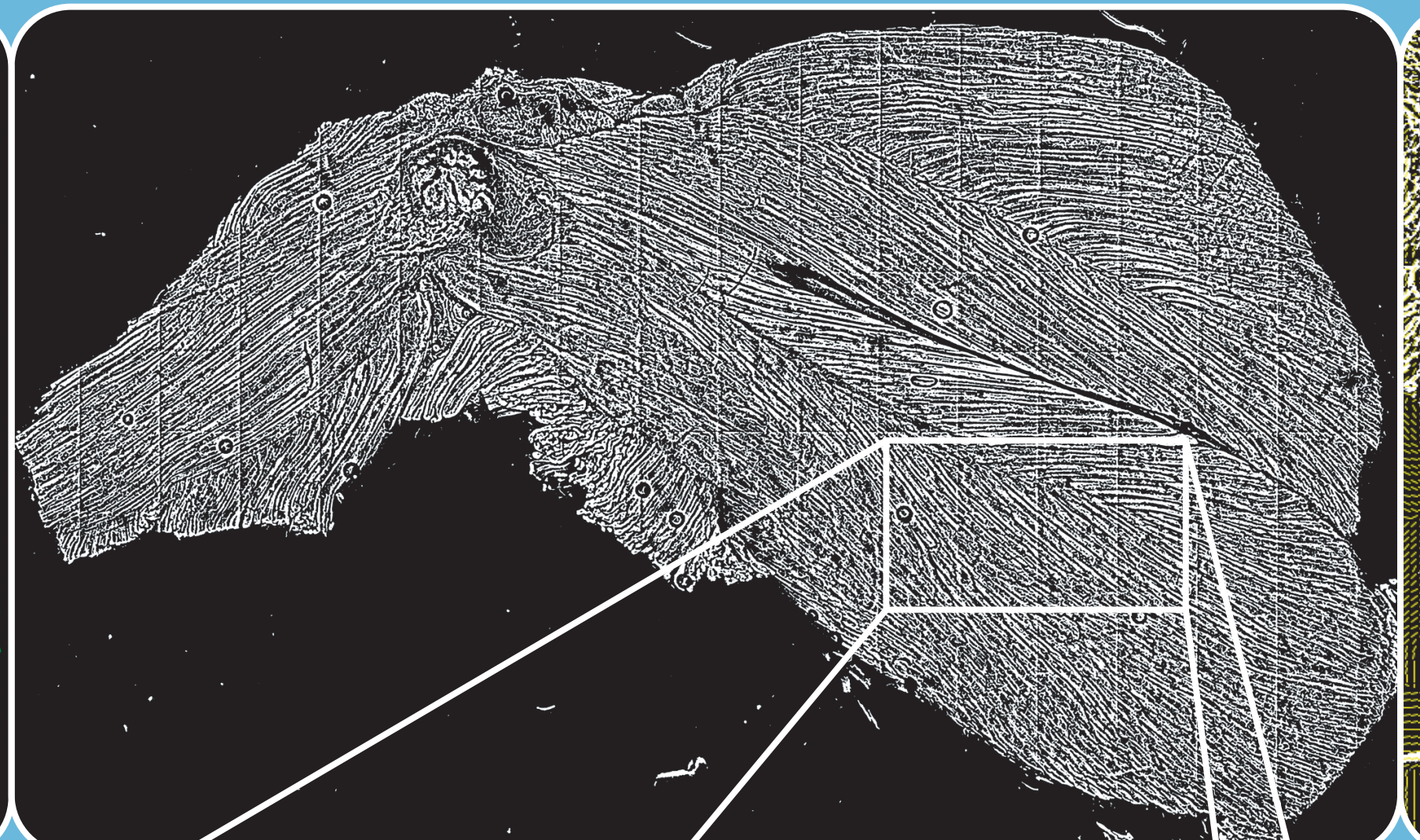
Las imágenes de tipo .czi se procesaron con el programa Fiji

Complemento *Analyze-Tubeness* implementado en Fiji [2]

Complemento *Orientation-J-Vector Field* desarrollado por [3]



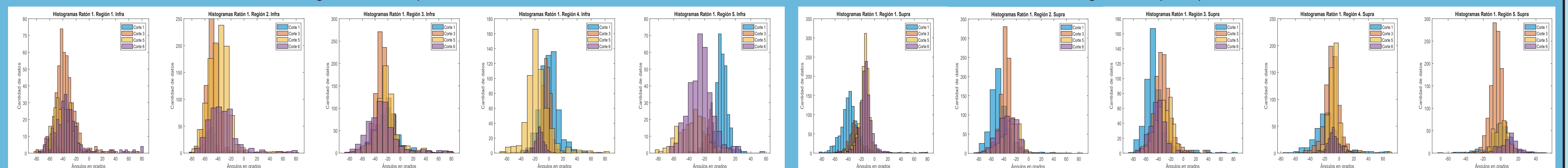
Selección de las regiones para hacer análisis estadístico



Análisis de las orientaciones de fibras

Histogramas infraespinoso ratón 1

Histogramas supraespinoso ratón 1



Se llevó a cabo el análisis estadístico de Kolmogorov-Smirnov mediante el programa Matlab para comprobar si todas las regiones seguían una distribución normal

CONCLUSIONES

- La metodología proporciona de manera precisa las orientaciones de las fibras a lo largo de la geometría del tejido
- Se caracteriza de forma automatizada cómo la arquitectura muscular cambia de la región distal a la proximal en la inserción con el tendón
- Las 90 regiones analizadas mediante el método de Kolmogorov-Smirnov siguen una distribución normal

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.

RECONOCIMIENTO

Proyecto PID2020-113822RB-C21 financiado por MCIN/ AEI/10.13039/501100011033.
Ángel Heras Sádaba fue apoyado por PRE2021-100677



✉ aheras@unizar.es
📷 @angelherasad_
🐦 @angelherasad_

