



ARCHIVES OF ANATOMY

Official Journal of the Portuguese Anatomical Society (SAP/AAP)

ISSN 2183-329X, vol 8, nº2, 2019

Editor-in-Chief

Jorge Fonseca (Portugal, IUEM), jorgedafonseca@hotmail.com

Associate Editors

Paula Proença (Portugal, ICBAS), pferreir@icbas.up.pt

Paulo Vera-Cruz (Portugal, FCMUNL), p_vera_cruz@hotmail.com

Portuguese Anatomical Society (SAP/AAP)

President

Ivo Furtado (Portugal, FCV-UMa)

Vice-president

Pedro Oliveira (Portugal, IUEM/FMUL)

Secretary

Lia Neto (Portugal, FMUL)

Secretary

Diogo Casal (Portugal, FCMUNL)

Tesoureira

Alexandra Brito (Portugal, FFUL)

ARCHIVES OF ANATOMY EDITORIAL BOARD

ALESSANDRO RIVA (ITÁLIA)	FILIPE CASEIRO ALVES (PORTUGAL)	MARIA DULCE MADEIRA (PORTUGAL)
ALOIS LAMETSCHWANDTNER (AUSTRIA)	FRIEDRICH PAULSEN (ALEMANHA)	NALINI PATHER (AUSTRÁLIA)
ANTOINE DHEM (BÉLGICA)	GARETH JONES (NOVA ZELÂNDIA)	NUNO SOUSA (PORTUGAL)
ANTÓNIO CARLOS MIGUÉIS (PORTUGAL)	GIOVANNI ORLANDINI (ITÁLIA)	PIERRE SPRUMONT (SUIÇA)
ANTÓNIO JOSÉ GONÇALVES FERREIRA (PORTUGAL)	GORDANA TEOFILOVSKI-PARAPID (SÉRVIA)	RICARDO JORGE LOSARDO (ARGENTINA)
ANTÓNIO SILVA BERNARDES (PORTUGAL)	GUIDO MACCHIARELLI (ITÁLIA)	RICHARD HALTI CABRAL (BRASIL)
ANTÓNIO SANTOS SILVA (PORTUGAL)	JOÃO GOYRI-O'NEILL (PORTUGAL)	RICHARD SMITH (BRASIL)
ANTÓNIO SOUSA PEREIRA (PORTUGAL)	JOÃO BRITO PATRÍCIO (PORTUGAL)	ROLANDO CRUZ GUTIERREZ (COSTA RICA)
ARTUR ÁGUAS (PORTUGAL)	JOHN FRAHER (IRLANDA)	SERAFIM CRICENTI (BRASIL)
BEAT RIEDERER (SUIÇA)	JOSÉ ANTÓNIO ESPERANÇA PINA (PORTUGAL)	SUSANA BIASSUTO (ARGENTINA)
BERNARD MOXHAM (REINO UNIDO)	JOSÉ CARLOS PRATES (BRASIL)	TATSUO UCHIKI (JAPÃO)
BEVERLEY KRAMER (RSA)	JOSE LUIS BUENO Y LÓPEZ (ESPAÑHA)	TELMA MASUKO (BRASIL)
CARLOS ZAGALO (PORTUGAL)	LUTZ VOLLRATH (ALEMANHA)	STEPHEN CARMICHAEL (EUA)
DAVID BRYNMOR-THOMAS (REINO UNIDO)	MARIA AMÉLIA FERREIRA (PORTUGAL)	UDO SCHUMACHER (ALEMANHA)
DIOGO PAIS (PORTUGAL)		VINCENT DELMAS (FRANÇA)
ERDOGAN SENDEMIR (TURQUIA)		WITOLD WOZNIAK (POLONIA)
ERICH BRENNER (ÁUSTRIA)		YASUO UCHIYAMA (JAPÃO)

Editorial – Archives of Anatomy, vol. 8, nº2

Jorge Fonseca (Editor-in-Chief de Archives of Anatomy)
jorgedafonseca@hotmail.com

Caros Colegas

Este é o segundo número de 2019 dos nosso Archives of Anatomy. O primeiro foi dedicado à publicação dos resumos da nossa Reunião Científica da Sociedade Anatómica Portuguesa de 25 de maio. Para este número, trazemos dois artigos originais da autoria de dois grupos de brilhantes participantes na nossa reunião.

Um dos artigos, replicando as propriedades da barreira hematoencefálica *in vitro*: ações da hidrocortisona e/ou tensão de cisalhamento, é um interessantíssimo estudo usando células endoteliais como modelo *in vitro* da barreira hematoencefálica proveniente do grupo da Faculdade de Farmácia de Lisboa, da Professora Alexandra Brito. Os autores, Ana Rita Garcia, Joana Godinho-Pereira, Inês Figueira, Rui Malhó e Maria Alexandra Brito, demonstram brilhantemente como a utilização de hidrocortisona ou shear stress num modelo celular da barreira hematoencefálica aumenta a sua relevância por aproximação às propriedades fisiológicas da barreira.

O segundo artigo vem do Laboratorio Neuromorfología, Sección de Investigación, Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina da Universidad Nacional Autónoma de México. Os nossos colegas da UNAM não apenas abrilhantaram nossa reunião, como tiveram agora a gentileza de nos enviar um brilhante artigo focando a utilidade do uso das novas tecnologias na nossa atividade docente. O artigo, intitulado Nuevas tecnologías aplicadas al estudio de la anatomía digital. Proyecto HDM (Human Dissection Models). Experiencia de 5 años. é da autoria de Herrera Vázquez Ismael, Reyes González Juan Pablo, Valle Torres Cesar Joel, Soto Ulloa Víctor, sendo uma leitura apaixonante para quem se interessa pelo ensino das ciências morfológicas.

A todos os nossos colegas desejo magníficas leituras até ao 12th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy, a que se juntará a 54^a Reunião Científica da Sociedade Anatómica Portuguesa / 7^a Reunião Científica da Associação Anatómica Portuguesa, a nossa reunião internacional em Tavira, entre 25 e 27 de Junho, cujo programa também divulgamos.

Até breve,
Jorge Fonseca

Replicating the blood-brain barrier properties in an *in vitro* model: effects of hydrocortisone and/or shear stress

Improved *in vitro* blood-brain barrier model

Replicando as propriedades da barreira hematoencefálica *in vitro*: ações da hidrocortisona e/ou tensão de cisalhamento

Otimização dum modelo *in vitro* da barreira hematoencefálica

Garcia, A.R.^{1*}, Godinho-Pereira, J.^{1,2*}, Figueira, I.^{1,2}, Malhó, R.³, Brito, M. A. ^{1,4,†}

¹Research Institute for Medicines (iMed.ULisboa), Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal; ²Faculty of Pharmacy Association for Research and Development (Farm-ID), Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Lisbon; ³BioISI, Instituto de Biossistemas e Ciências Integrativas, Faculty of Sciences, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal; ⁴Department of Biochemistry and Human Biology, Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal.

*Equal contribution

[†]Corresponding author:

Prof. Dr. Maria Alexandra Brito
Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa
Av. Prof. Gama Pinto
1649-003 Lisboa
Portugal
Tel: +351 217946449
E-mail: abrito@ff.ulisboa.pt

Reasons for submission and surplus of the publication of the present article Brain microvascular endothelial cells (BMEC) form the anatomic basis of the blood-brain barrier (BBB), a complex structure with a key role in the pathogenesis of several brain disorders and that represents a major obstacle for the treatment of neurological diseases. Confluent monolayers of BMEC have been used as a simplified *in vitro* model of the BBB, although such cultures do not fully recapitulate the barrier tightness features observed *in vivo*. Moreover, they usually do not consider the effect of shear stress on endothelial properties or, if so, they rely in sophisticated and expensive systems that are not available in most of the laboratories. By demonstrating that exposure of BMEC cultures to hydrocortisone or orbital rotation induces endothelial features that better resemble the *in vivo* condition, the present article opens new opportunities for *in vitro* studies relying in the core of the BBB anatomy.

RESUMO

A barreira hematoencefálica (BHE) desempenha um papel fundamental nas patologias encefálicas, constituindo um obstáculo à entrega de fármacos. As células endoteliais da microvasculatura cerebral, consideradas a base anatómica da BHE, expressam receptores de glucocorticoides, cuja interação com os seus ligandos (ex. hidrocortisona) induzem a expressão de proteínas juncionais. Estas células são também continuamente sujeitas a tensão de cisalhamento (*shear stress*), resultante do fluxo sanguíneo, que promove o alongamento/alinhamento das mesmas. Monocamadas confluentes de células endoteliais têm sido utilizadas como modelo simplificado da BHE que, contudo, não recapitulam totalmente as propriedades fisiológicas *in vivo*. Tal levou-nos a estabelecer um modelo *in vitro* melhorado da BHE contemplando a ação da hidrocortisona e/ou do *shear stress*. Células endoteliais, b.End5, foram cultivadas e expostas a hidrocortisona e/ou valores fisiológicos de tensão (laminar/não pulsátil). Foram também realizadas culturas em membranas semipermeáveis a fim de medir a resistência elétrica transendotelial, indicador das propriedades de barreira. A expressão e distribuição das proteínas juncionais (β -catenina e integrina- $\beta 4$) e do citoesqueleto (F-actina e cinase da cadeia leve da miosina, MLCK) foram avaliadas por imunofluorescência. Observou-se que as células expostas a hidrocortisona formam uma barreira com maior resistência elétrica, corroborado pelo aumento de expressão da β -catenina. Sob tensão, as células exibiram uma morfologia alongada e orientada, bem como um aumento de F-actina, MLCK e β -catenina. Contudo, não se observou sinergismo nas características endoteliais pela ação combinada dos estímulos. Assim, a utilização de hidrocortisona ou *shear stress* num modelo celular da BBB aumenta a sua relevância por aproximar das propriedades fisiológicas.

Palavras-chave: barreira hematoencefálica, células endoteliais, *shear stress*, hidrocortisona, modelo *in vitro*, resistência elétrica transendotelial

ABSTRACT

The blood-brain barrier (BBB) plays a key role in brain pathology, namely by representing an obstacle to drug delivery to brain. Brain microvascular endothelial cells (BMEC), the anatomic basis of the BBB, express glucocorticoid receptors that upon binding of their ligands, like hydrocortisone, lead to upregulation of junctional proteins and restricted permeability. Moreover, they are continuously subjected to shear stress due to blood flow, which promotes cell elongation and alignment, as well as expression of endothelial markers. Confluent monolayers of BMEC have been used as a simplified *in vitro* BBB model, although they do not fully recapitulate the *in vivo* properties. This prompted us to establish an improved *in vitro* BBB model that integrates the action of shear stress and/or hydrocortisone to mimic the *in vivo* situation. To this end, the b.End5 endothelial cells were cultured and exposed to hydrocortisone and/or physiological shear stress (laminar/non-pulsatile). Simultaneously, b.End5 were plated onto semi-permeable membranes and transendothelial electrical resistance, an indicator of barrier properties, was measured. Cell expression and distribution of junctional (β -catenin and $\beta 4$ -integrin) and cytoskeleton (F-actin and myosin light chain kinase, MLCK) proteins were

evaluated by immunofluorescence. Hydrocortisone treatment improved barrier tightness corroborated by β -catenin overexpression. Under shear stress, cells exhibited an elongated and oriented morphology, as revealed by increased F-actin, MLCK and γ -catenin labelling. However, when the stimuli were applied simultaneously, no synergistic effect was observed. In conclusion, the use of hydrocortisone or shear stress in a cellular model of the BBB improves its relevance by approaching the physiological properties.

Keywords: Blood-brain barrier, endothelial cells, shear stress, hydrocortisone, *in vitro* model, transendothelial electrical resistance

INTRODUCTION

The blood-brain barrier (BBB) is a dynamic and complex structure that separates the central nervous system (CNS) from the peripheral blood circulation (1). The BBB ensures a constant internal environment inside the brain to safeguard normal cerebral functions, maintaining brain homeostasis. Brain capillaries that compose the BBB are primarily formed by a continuous and single layer of brain microvascular endothelial cells (BMECs), considered the anatomic basis of the BBB (1, 2). Among the most relevant features of BMEC are the elaborate junctional complexes, including adherens junctions (AJs), between adjacent cells, and hemidesmosomes, between the abluminal surface of endothelial cells and the basement membrane (3, 4). These features ensure the integrity of the endothelium and the restricted passage of substances between the blood and brain. The impairment of BBB functionality has been associated with several CNS disorders (5-7). Moreover, since the BBB prevents the passage of more than 98% of small therapeutic molecules, it is considered a primary obstacle for drugs to exert their pharmacological actions inside the brain (8). All these reasons make the BBB one of the most important targets for scientific studies of the CNS.

It is well known that BMECs are continuously exposed to shear stress (SS), which is created by the blood flow over the luminal surface of blood vessel (9). In this regard, the SS is considered a mechanical stimulus that can modulate important cellular functions, e.g., proliferation, apoptosis, migration and permeability, by activating mechanosensors, intercellular signalling, gene expression, cell morphology and structural remodelling (9). Within the cerebral microvasculature, BMECs are subjected to physiological SS, around a magnitude of 1.5 dyn/cm² (10, 11). The most noticeable effect of SS is a transition from a cobblestone morphology to an elongated spindle-like morphology of the cells, together with defined cell alignment in the flow direction (9). It is also known that alterations in cell morphology are directly correlated with changes in cytoskeleton protein's expression (12).

Moreover, changes in tight and adherens junctions, as well as in transporter proteins expression induced by SS, have been demonstrated (13), promoting increased BBB tightness and restricted permeability, as well as remodelling of focal adhesion protein's expression, which are composed by integrins complexes (14). Although the

effect of SS on endothelial biology has been extensively studied, cell line diversity makes the endothelial response to this stimulus variable and unpredictable.

In vitro BBB models are valuable supporting tools that can precede and complement animal and human studies for the understanding of CNS diseases' development and progression, as well as for the assessment of BBB permeation ability of drug candidates. However, these systems do not fully recapitulate the *in vivo* anatomo-physiological complexity of the BBB (15). In this regard, some chemical and mechanical stimuli have been studied for the optimization of BBB models. Hydrocortisone, a glucocorticoid, was reported to reinforce BBB properties in porcine cerebral capillary endothelium, inducing a more differentiated BBB phenotype (16). The increased tightness effects of hydrocortisone treatment were also demonstrated in the murine cerebrovascular endothelial cell line (cEND) (17) and in human endothelial cell lines such as HBMEC/ci β (18) and hDMEC/D3 (19). Undeniably, SS and glucocorticoids effects on endothelial cellular function and barrier tightness should be considered for the improvement of *in vitro* BBB models to better recapitulate *in vivo* properties.

The purpose of the present study was to develop an enhanced *in vitro* model of the BBB relying on the use of BMEC exposed to mechanical and/or chemical stimuli such as SS and hydrocortisone, respectively, characterizing its morphological and functional properties alterations and establishing the corresponding improvements. The results obtained herein showed an enhancement of junctional proteins expression and decreased BBB permeability by hydrocortisone, whilst protein relocation and morphological changes in endothelial cells, as well as increase of AJs' protein expression that were observed when SS was applied. However, the simultaneous exposure to both stimuli did not promote any synergistic effects in the specific properties of BBB endothelial cells. Collectively, this study reveals that the properties and function of BBB *in vitro* models may be improved by either hydrocortisone or SS.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture Conditions

The mouse BALB/c brain endothelioma cell line b.End5 (ECACC) was used as a simplified BBB endothelium *in vitro* model. b.End5 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Biochrom AG), 1% non-essential amino acids (NEAA, Biochrom AG), 2 mM L-glutamine (Biochrom AG), 1mM sodium pyruvate (Biochrom AG) and 1% antibiotic-antimycotic solution (SigmaAldrich) and maintained at 37°C in a humid atmosphere enriched with 5% CO₂. For immunostaining purposes, b.End5 were seeded at a density of 5x10⁴ cells/mL on coverslips coated with rat tail collagen I (Corning Costar Corp.) using 24-well plates and treated after 48 h in culture. For integrity/permeability studies, cells were seeded on 12-well plates polyester Transwell® inserts (0.4 µM, Corning), also coated with rat tail collagen I, at a density of 8x10⁴ cells/insert and treated after 4 days in culture.

Cell Treatment conditions

Hydrocortisone Treatment

For hydrocortisone treatment, a 25 mM stock solution of hydrocortisone (Sigma-Aldrich) was prepared in absolute ethanol. Confluent monolayers of b.End5 were incubated with 550 nM hydrocortisone, or no addition (control), for 48h at 37°C in DMEM. After the incubation period, endothelial monolayers were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich) in phosphate-buffered saline (PBS) for immunocytochemistry.

Shear Stress Application

Confluent monolayers of b.End5 were exposed to laminar non-pulsatile SS, achieved by orbital rotation, as previously described (20, 21), using an orbital shaker (Grant Bio Orbital shaker PSU-10i, Grant Instruments, Cambridge Ltd) positioned inside the incubator.

The SS applied was estimated using the following equation:

$$\tau_w = \alpha \sqrt{\rho \eta (2\pi f)^3}$$

where τ_w is the SS value (dyn/cm^2), α is the orbital radius of rotation of the shaker (0.5 cm), ρ is the density of the culture medium (1.01 g/cm^3), η is the medium viscosity (0.0075 dyn/cm^2 at 37°C), and f corresponds to rotations per second (rps) (20, 21). Physiological magnitudes of shear stress such as 1.5 dyn/cm^2 , have been reported (10, 11) and were used in our assays, corresponding to rotational frequency of 1.67 rps (100 rpm). Control assays were performed in parallel in which b.End5 cells were kept in static conditions (0 dyn/cm^2). The progressive ramping was made with a 0.17 rps (10 rpm) increase every 30 min. Shear stress conditions were maintained for 48 h.

Immunofluorescence

b.End5 cells were stained for junctional proteins (β -catenin and β 4-integrin), and cytoskeleton proteins (F-actin and MLCK). Cells were fixed with 4% PFA for 20 min at room temperature.

Following fixation, cells were washed three times with PBS and then permeabilized with 0.3% Triton X-100 (VWR International), for 5 min, and blocked with 3% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich), for 60 min. Cells were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies and thereafter with the corresponding secondary antibodies for 60 min at room temperature (complete antibodies information is provided in Table 1). Both primary and secondary antibodies were diluted in blocking solution. Nuclei were counterstained with Hoechst dye 33342 (Thermo Fisher; diluted 1:1000 in PBS), for 10 min at room temperature. Between incubations, cells were washed three times with PBS. Cells were examined using an Olympus BX60 microscope and Hamamatsu's image acquisition and analysis software.

Table 1. Summary of the antibodies and experimental conditions used for immunofluorescence analysis.

Target Protein	Primary Antibody	Dilution	Secondary Antibody	Dilution
β -catenin	Thermo Fisher Scientific, #71-2700, Rabbit	1:100	Thermo Fisher Scientific, #A21428, Goat Anti-Rabbit Alexa Fluor 555	1:500
$\beta 4$ Integrin	Santa Cruz Biotechnology, #sc-514426, Mouse	1:50	Thermo Fisher Scientific, #A11001 Goat Anti-Mouse Alexa Fluor 488	1:500
MLCK	Thermo Fisher Scientific, #PA515177, Rabbit	1:100	Thermo Fisher Scientific, #A21428, Goat Anti-Rabbit Alexa Fluor 555	1:500
F-actin	-	-	Abcam, #ab17675, Rabbit	1:1000

MLCK, myosin light chain kinase.

Post-acquiring treatment data analysis was performed using ImageJ software (NIH, USA) and Icy software (Pasteur Institute and France BioImaging, France), for the measuring of proteins intensity and cells elongation evaluation, respectively. For cells' elongation evaluation, four b.End5 cells per image were outlined with the polygon tool of Icy software.

Transendothelial Electrical Resistance

For assessment of barrier tightness of endothelial cell cultures, transendothelial electrical resistance (TEER) readings were performed using an End Ohm™ chamber coupled to an EVOMX resistance meter (World Precision Instruments, Inc., USA). Readings were collected 4, 6, 8, 11 and 14 days after b.End5 cells seeding and TEER was calculated as percentage of variation from average control readings, after deducting the values of empty insert and the value multiplied by the area of the insert (1.12 cm^2). The results are expressed as $\Omega \times \text{cm}^2$.

Statistical Analysis

The results presented are the average values of at least two independent experiments and are represented as the means \pm SEM. Differences amongst treatments were detected using GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, CA, USA). Statistically significant differences were considered when $p < 0.05$.

RESULTS

Hydrocortisone induces brain endothelial cells tightness

TEER is a widely accepted quantitative measure of junctions' integrity in confluent endothelial cell cultures. In general, elevated TEER values reflect an increased tightness and low permeability of the barrier (1, 22). In an effort to clarify the biological response of b.End5 cells to hydrocortisone treatment, TEER of b.End5 cells monolayers was determined along time (Figure 1). Our results revealed that b.End5 cells cultured in the presence of the glucocorticoid hydrocortisone presented higher TEER values, particularly at 8 days after cells seeding ($p < 0.05$, relatively to control).

These findings indicate that hydrocortisone is a glucocorticoid that can improve barrier features of b.End5 cells through increased tightness.

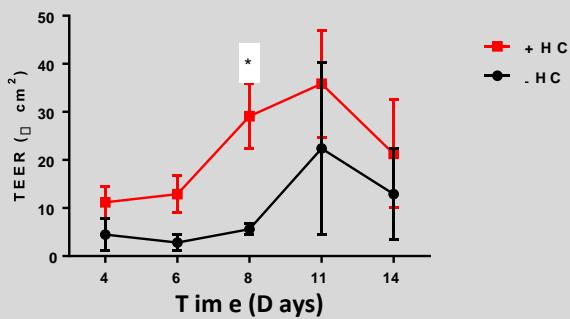


Figure 1. Hydrocortisone (HC) induces barrier tightness in b.End5 cells. Transendothelial electrical resistance (TEER) in b.End5 cell monolayers in response to 550 nM HC treatment (+HC) along time comparatively to untreated control (- HC). Growth medium was replenished every 2-3 days and TEER readings were performed at 4, 6, 8, 11 and 14 days after cells seeding, using EVOMX resistance meter (World Precision Instruments, Inc., USA). Data are given as means \pm SEM ($n = 2$). Statistical significances are denoted as * $p < 0.05$ relatively to control.

Hydrocortisone stimulates adherens junction's formation

The AJ protein β -catenin is known to be a key mediator of endothelial barrier sealing and maintenance (23). To assess the changes in the mouse brain endothelium AJ induced by hydrocortisone treatment, b.End5 cells were cultured in the presence of hydrocortisone (or no addition; control) and examined by immunocytochemistry for alterations in β -catenin expression (Figure 2). The results showed that the hydrocortisone-supplemented cell culture medium led to an increase of the β -catenin fluorescence intensity (1.7-fold, $p < 0.001$ from control), which was more predominant at the cell membrane level (Figure 2A-C). These results suggest that SS promotes AJ formation in b.End5 cells monolayers (Figure 2D), which may be related to barrier function improvement upon hydrocortisone treatment.

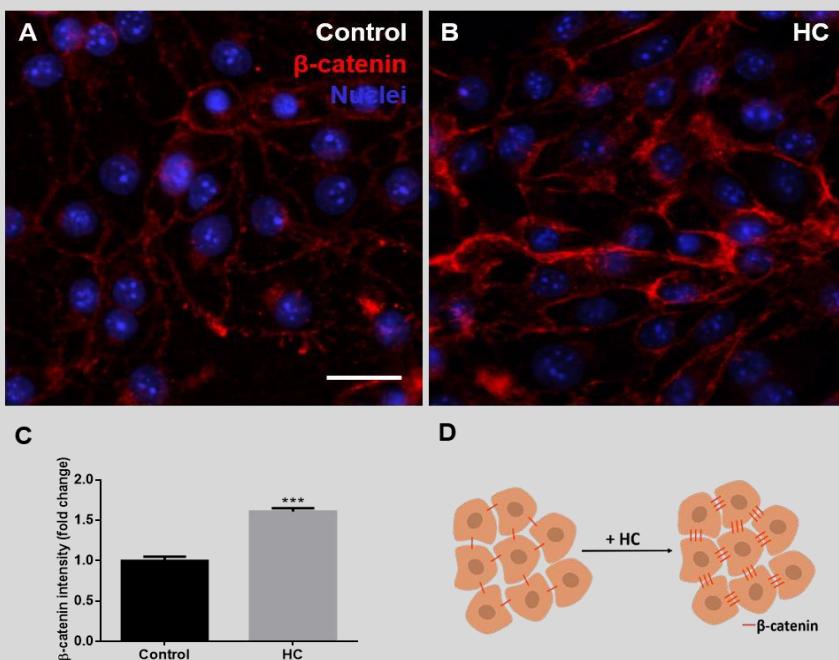


Figure 2. Hydrocortisone (HC) promotes adherens junction's formation.

Immunocytochemistry of β -catenin in absence (control; A) or presence of HC (500 nM) (B). Nuclei were stained with Hoechst 33342. Scale bar: 20 μ m. Quantification of β -catenin fluorescence mean intensity (C) was performed. Data are given as means \pm SEM ($n=2$). Statistical significances are denoted as *** $p<0.001$ relatively to control. (D) Schematic representation of HC effect in b.End5 cell monolayer, which leads to increased expression of β -catenin.

Shear stress promotes *in vivo*-like barrier properties

In an *in vivo* context, as a consequence of blood flow, BMECs are continuously subjected to physiological SS in the order of 1.5 dyn/cm² (10, 11). However, the biological response to this mechanical stimulus remains unclear in cell culture systems and particularly for the b.End5 cell line. The effect of physiological SS (1.5 dyn/cm²) in such endothelial monolayers was investigated after 48 h of orbital rotation by immunocytochemical analysis of the junctional proteins, β 4-integrin and β -catenin (Figure 3), and of cytoskeleton-associated proteins, F-actin and MLCK (Figure 4). Morphology, proteins expression and subcellular distribution were evaluated. Our results of the junctional proteins revealed that cells exposed to SS exhibited no significant alterations in β 4-integrin protein fluorescence mean intensity, relatively to unsheared control cells (static, 0 dyn/cm²) (Figure 3A and B). In contrast, an increased fluorescence intensity of β -catenin labelling in b.End5 cells was observed (1.2-fold from unsheared control, $p<0.01$) (Figure 3C-E). Similar to hydrocortisone effects, it was also observed an alteration in the distribution of β -catenin in the presence of SS: with SS, this AJ protein was mainly found at the cell border (Figure 3C and D). In terms of cell morphology, sheared b.End5 cells revealed a significant increase in cell alignment and elongation ($p<0.001$, Figure 3F). Overall, these results suggest that SS improve b.End5 cell alignment and elongation, with increased β -catenin expression (Figure 3G).

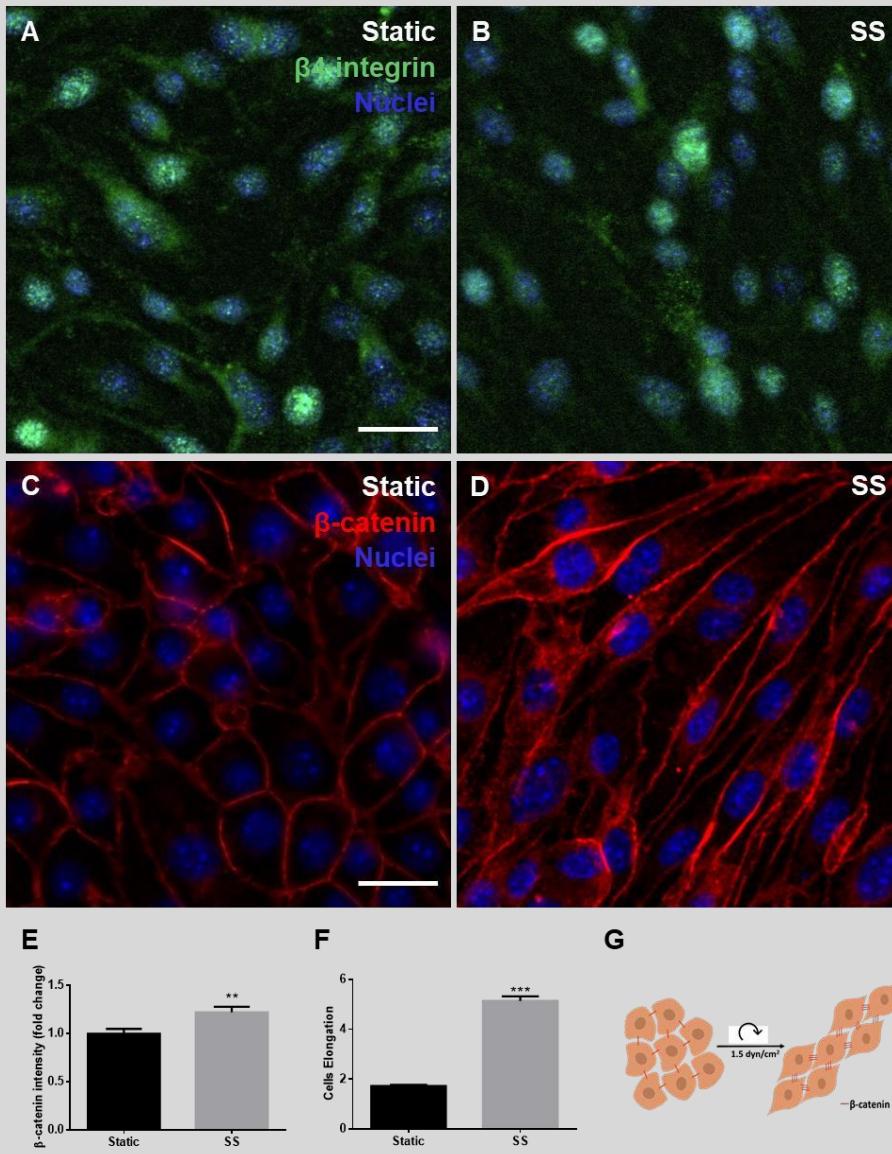


Figure 3. Shear stress (SS) promotes endothelial markers protein expression. Immunocytochemistry of β₄-integrin (A, B) and β-catenin (C, D) in confluent b.End5 monolayers under static (A, C) and physiological SS conditions (1.5 dyn/cm²) (B, D). Nuclei were stained with Hoechst 33342. Scale bar: 20 μm. Quantification of β-catenin fluorescence mean intensity (E) and cell elongation (F) was performed. Data are given as means ± SEM (n=5). Statistical differences are denoted as **p<0.01 or ***p<0.001 relatively to static conditions. (G) Schematic representation of SS effects in b.End5 cells, which leads to increased expression of β-catenin and cell's elongation.

Our results revealed that sheared cells also exhibited an increase in F-actin (1.9-fold, p<0.001) and MLCK (1.1-fold, p<0.05) fluorescence intensity in comparison with static conditions (Figure 4A-F). Another interesting observation was the redistribution of MLCK, from the nucleus to the cytosol induced by SS (Figure 4C and D). Like for β-catenin, an increased alignment and elongation were also observed based on MLCK evaluation and quantification (p<0.001, Figure 4G), when compared to unsheared control cells. Altogether, these findings suggest that SS is a mechanical stimulus that can improve barrier properties by promoting the localization of the AJ protein β-catenin at the plasma membrane and enhancing endothelial features such as cells elongation and alignment.

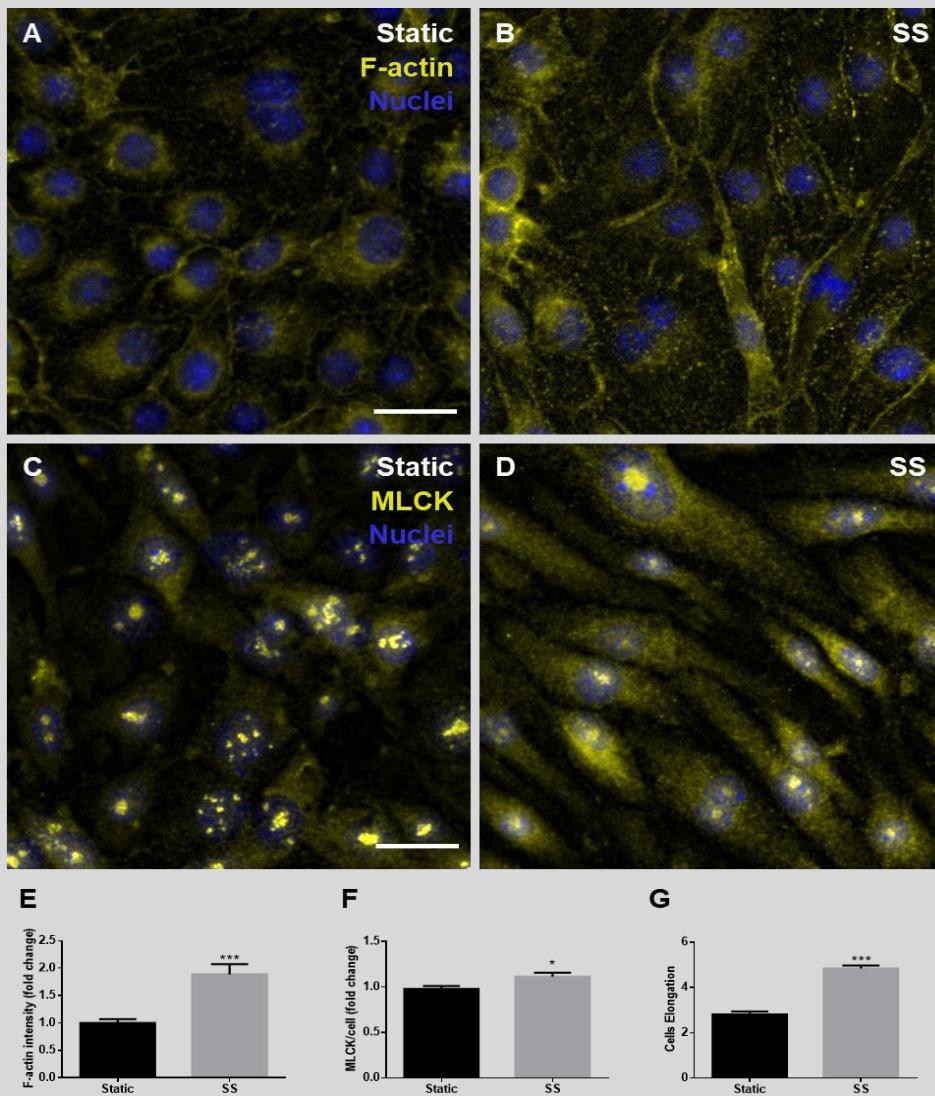


Figure 4. Shear stress (SS) induces cell's elongation and alignment. Immunocytochemistry of F-actin (A, B) and MLCK (C, D) in confluent b.End5 monolayers under static (A, C) and physiological SS conditions (1.5 dyn/cm^2) (B, D). Nuclei were stained with Hoechst 33342. Scale bar: $20 \mu\text{m}$. Quantification of F-actin fluorescence mean intensity (E), MLCK total intensity per cell (F) and cell elongation (G) was performed. Data are given as means \pm SEM ($n \geq 3$). Statistical significances are denoted as * $p < 0.05$ or as *** $p < 0.001$ relatively to static conditions.

Hydrocortisone and shear stress have no synergistic effect on improving BBB properties Since we found that both hydrocortisone and SS promote BBB endothelial properties, the effect of a dual stimulation in b.End5 cells monolayers was investigated by immunocytochemical analysis of the junctional protein, β -catenin (Figure 5). The results showed that, after 48h of orbital rotation, using both physiological SS (1.5 dyn/cm^2) and hydrocortisone supplemented medium (550 nM), b.End5 cells exhibited an increase in β -catenin fluorescence intensity (1.5-fold, $p < 0.001$) compared with control, but no differences were observed when comparing with the individual stimuli (Figure 5A-E). In terms of cell shape, the dual stimulation did not contribute for morphological cell alterations, from a cobblestone to spindle-

like morphology transition, as it was notorious only with SS (Figure 5C-D and F). Overall, our results suggest that the hydrocortisone and SS stimulation combined does not promote a synergistic response as compared with each stimulus alone, and consequently their combination does not improve BBB endothelial properties.

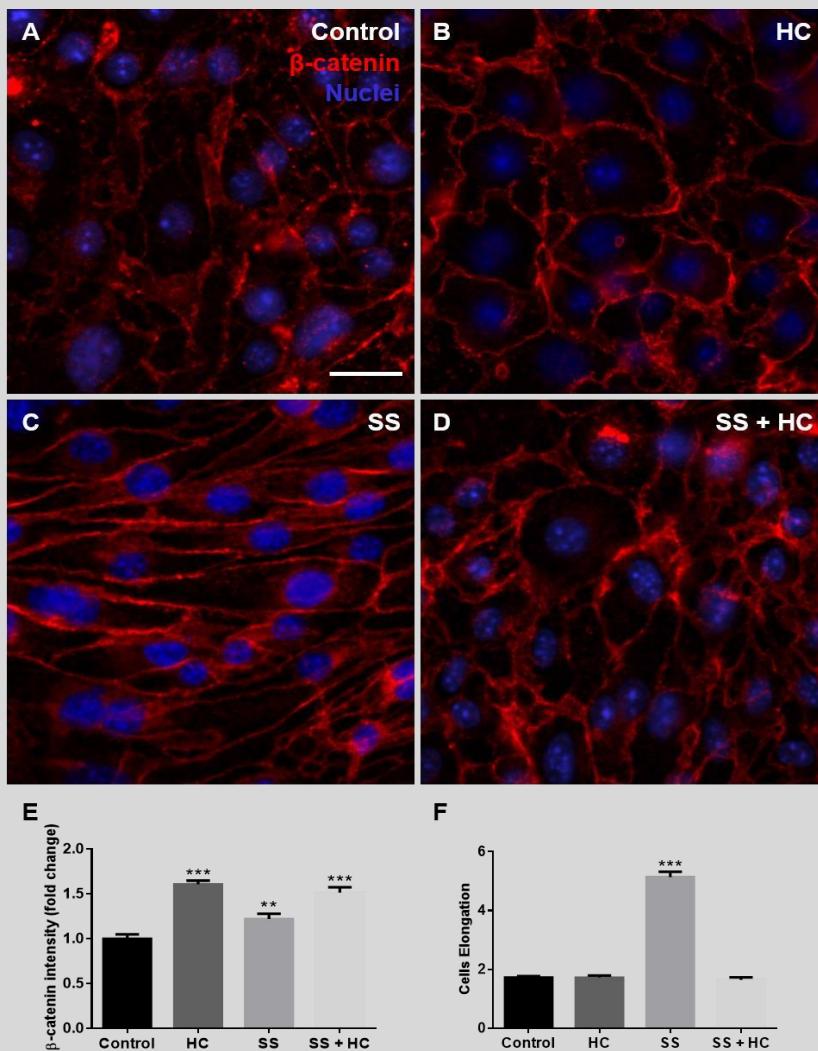


Figure 5. Hydrocortisone (HC) and shear stress (SS) combination does not promote a synergistic effect in improving the properties of the blood-brain barrier *in vitro* model. Immunofluorescence analysis of β -catenin was performed in confluent *b.End5* monolayers cultured under static conditions/control (A), treated with 550 nM hydrocortisone (B), subjected to physiological SS (1.5 dyn/cm^2) (C), or treated with 550 nM hydrocortisone and subjected to physiological SS (1.5 dyn/cm^2) (D). Nuclei were stained with Hoechst 33342. Representative images are shown. Scale bar: 20 μm . Quantification of β -catenin fluorescence intensity (E) and of cell elongation (F) was performed. Data are given as means \pm SEM ($n \geq 2$). Statistical differences are denoted as ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ relatively to control.

DISCUSSION

The BBB is considered one of the main and most complex obstacles to the treatment of brain pathologies. Although several BBB *in vitro* models are already known, all of

them have the common problem of not fully recapitulating the BBB properties *in vivo* (15, 24).

Such observation is the main motivation for the constant study and optimization of *in vitro* models in order to make them as robust and as physiologically relevant as possible. Thus, in the present study, we used hydrocortisone treatment and/or SS application as a methodology to optimize a simplified *in vitro* BBB model composed by the mouse brain microvascular endothelial cell line, b.End5, to better recapitulate BBB features. This approach is based on the suggestion that the *in vitro* BBB function can be improved and reinforced by mechanical (SS) and by chemical factors (*i.e.* hydrocortisone) (25).

The effect of hydrocortisone treatment on b.End5 monolayers integrity was evaluated by TEER readings. Our results demonstrated that hydrocortisone treatment in b.End5 cells monolayers can promote increased barrier tightness, which is in accordance with the observations for other endothelial cell lines (18, 26). On the other hand, it is well known that hydrocortisone is a ligand of the glucocorticoid's receptor and that the interaction between them stimulates its translocation to the nucleus, where activated glucocorticoid receptor modulates gene expression (27). Allied to this fact, changes in BMEC junctional proteins' expression through metabolic or cellular mediators can play a role in this regulation, leading to dynamic changes in BBB properties (18). In this context, our findings demonstrated that hydrocortisone treatment promoted the up-regulation of β -catenin expression in b.End5 cells, mainly at membrane level. These results are consistent with previous data obtained from human BMEC/ci β , which showed that junctional proteins such as vascular endothelial (VE)cadherin, β -catenin and zonula occludens (ZO)-1 were localized at membrane level in cells cultured with hydrocortisone (18, 28).

Besides glucocorticoids potential towards the BBB, BMEC in brain capillaries are continuously exposed to SS provided by the blood flow (13). *In vitro* BBB models have evolved significantly over the last three decades, from the static monocultures to dynamic multicellular flow-based systems (29). Based on this, it is now accepted that exposure of endothelial cells to physiological SS is required for the brain vascular endothelium to properly differentiate and maintain a BBB phenotype, as SS not only modulates endothelial morphology, but also cellular function and physiological responses (30). Although endothelial cell cultures under SS have been performed, they usually rely on expensive and sophisticated devices (31, 32) that are not frequently available in a standard laboratory and that may be limiting for high-throughput experiments. Moreover, the reflex of SS in BBB endothelial features remains mostly uncharacterized.

Previous studies have reported the involvement of α 1 and α 3-integrins in mechanotransduction caused by SS. In fact, Urbich *et al.* have shown that laminar SS can promote cellular adhesion via integrins and through ERK1/2 pathway, in HUVECs (33), while Tzima *et al.* reported the activation of α 3-integrin and its involvement in cell alignment, as a consequence of SS application (34). In our study, we show no alterations in β 4-integrin expression and its cellular localization in endothelial cells,

despite of the clear morphological changes observed in cell alignment. To our knowledge, our work is the first to characterize α 4-integrin in BMEC under physiologic SS. Based on our results, we may hypothesize that different integrins may present distinct roles in cell adhesion to the basement membrane, and not all may be associated or modulated by SS.

In contrast, the analysis of β -catenin labelling in b.End5 cells, under physiological SS, revealed an increase of the AJ expression, particularly in cell border. The results obtained in the present work are corroborated by previous ones demonstrating that the staining of β catenin, as well as of VE-cadherin and α -catenin, are concentrated at the cell periphery under SS conditions (35, 36). Importantly, it is well established that β -catenin is the central mediator of the canonical signalling cascade and functions as an adhesion molecule at the plasma membrane (37). Its involvement has been mainly described in the Wnt/ β -catenin signalling pathway, which in the absence of Wnt stimulation, β -catenin is constitutively targeted for degradation (38). In this sense, it is conceivable that SS can act as a stimulus for the activation of this pathway, thus preventing the degradation of this protein. Alterations in TEER values by SS were not evaluated in the present study based on previous descriptions that orbital rotation in transwell insert systems induces turbulence effects and basolateral shearing (20), being the degree of agitation unproportionable between apical and basolateral compartments (39).

Regarding cell morphology, under static conditions (0 dyn/cm^2) we observed that endothelial cells were randomly aligned and generally polygonal, whereas under physiological SS (1.5 dyn/cm^2) (10), b.End5 cells presented an elongated morphology and aligned into a certain direction. Accordingly, the cytoskeleton of cells undergoes a rearrangement, with increased F-actin expression, as well as its organization mainly in the longitudinal direction of the cell (40). Our findings are consistent with previous results obtained for confluent monolayers of bovine aortic endothelial cells (BAEs), human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and primary baboon artery endothelial cells (BAECs), once all of them undergo a transition from cobblestone morphology to an elongated spindle-like morphology and alignment in the direction of flow (41-44). So far, only the human brain microvascular endothelial cell line (HBMEC) seems to resist elongation and alignment under this mechanical condition *in vitro* (45). Such results were corroborated by our own unpublished ones, using HBMEC, showing that such cells do not acquire the elongated phenotype and present signs of stress through the appearance of stress fibres.

MLCK, a cytoskeleton associated protein, have been described to be linked with cellular motility, migration and remodelling, through its action on phosphorylating the myosin light chain (MLC) (46, 47). Birukov et al. have shown that, under SS, there is an increase of MLC phosphorylation, which is regulated via MLCK and Rho kinase, and when these kinases are inhibited, the SS-mediated F-actin rearrangement and MLC phosphorylation was attenuated (48). This observation is in line with our data, pointing to an increase of MLCK in b.End5 in SS condition, which in turn is in agreement with the observed increased F-actin as well as the elongation of the cells promoted by the cytoskeleton rearrangement.

Finally, when both stimuli (hydrocortisone and SS) were jointly applied to b.End5 cells monolayers, we observed that the β -catenin fluorescence intensity increased comparatively to control, but there were no noticeable differences comparing with the application of each individual stimulus. Also, regarding cell morphology, the dual stimulation does not contribute for the expected cell alteration from a cobblestone to spindle-like morphology transition, as it was notorious only with SS. Our findings suggest that the combined stimulation with hydrocortisone and SS does not promote a synergistic response and does not improve barrier properties, as observed for each individual stimulus. This fact may result from the fact that the two stimuli present distinct cellular targets, acting virtually as conflicting forces: while SS is a mechanical stimulus that mainly influences cell morphology, hydrocortisone is considered a chemical stimulus that usually acts on favouring junctional proteins expression. Thus, b.End5 cells do not respond in a higher extent to both stimuli when applied at the same time. Based on our work, we provide strong evidence that remodelling of the BMECs adhesion complex might be a general feature underlying the hormone-mediated improvement of BBB unique qualities. Moreover, SS seems to be the stimulus that not only promotes the strengthening of junctional complexes, but also approximates endothelial cell morphology to the BBB endothelium *in vivo* features. Overall, both individual stimuli have shown to improve the properties of the BBB *in vitro* model and can bring it closer to the physiological context.

CONCLUSION

Our results point to the conclusion that either hydrocortisone treatment (chemical stimuli) or SS application (mechanical stimuli) can clearly improve b.End5 barrier anatomical features. Nevertheless, SS seems to be able to replicate it in greater magnitude, boosting this BBB cell model closer to physiological parameters and more representative for future studies.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by UID/DTP/04138/2019 and PTDC/MED-ONC/29402/2017 by FCT (Portugal). We also acknowledge Faculty of Sciences of the University of Lisbon's Microscopy Facility, a node of the Portuguese Platform of BioImaging (PPBI-POCI-01-0145-FEDER-022122).

REFERENCES

1. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev* 2010, 64: 328-63.
2. Abbott N. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inherit Metab Dis* 2013, 36: 437-49.
3. Blanchette M, Daneman R. Formation and maintenance of the BBB. *Mech Dev* 2015, 138: 8-16.
4. Yu Q, Tao H, Wang X, Li M. Targeting brain microvascular endothelial cells: a therapeutic approach to neuroprotection against stroke. *Neural Regen Res* 2015, 10: 1882-91. 5.

5. Janota C, Brites D, Lemere C, Brito MA. Glio-vascular changes during ageing in wild-type and Alzheimer's disease-like APP/PS1 mice. *Brain res* 2015, 1620: 153-68.
6. Abdulla W, Tripathi D, Ronaldson P. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 2018, 315: C343-C56.
7. Tiwary S, Morales J, Kwiatkowski S, Lang F, Rao G, McCarty J. Metastatic Brain Tumors Disrupt the Blood-Brain Barrier and Alter Lipid Metabolism by Inhibiting Expression of the Endothelial Cell Fatty Acid Transporter Mfsd2a. *Sci Rep* 2018, 8: 8267.
8. Mikitsh J, Chacko A. Pathways for small molecule delivery to the central nervous system across the blood-brain barrier. *Perspect in Med Chem* 2014, 6: 11-24.
9. Katt ME, Xu ZS, Gerecht S, Searson PC. Human Brain Microvascular Endothelial Cells Derived from the BC1 iPS Cell Line Exhibit a Blood-Brain Barrier Phenotype. *Plos One* 2016, 11: e0152105.
10. Rudolph H, Klopstein A, Gruber I, Blatti C, Lyck R, Engelhardt B. Postarrest stalling rather than crawling favors CD8(+) over CD4(+) T-cell migration across the blood-brain barrier under flow in vitro. *Eur J Immunol* 2016, 46: 2187-203.
11. Wimmer I, Tietz S, Nishihara H, Deutsch U, Sallusto F, Gosselet F, et al. PECAM-1 Stabilizes Blood-Brain Barrier Integrity and Favors Paracellular T-Cell Diapedesis Across the Blood-Brain Barrier During Neuroinflammation. *Front Immunol* 2019, 10: 711.
12. Sumpio B, Banes A, Buckley M, Johnson GJ. Alterations in aortic endothelial cell morphology and cytoskeletal protein synthesis during cyclic tensional deformation. *J Vasc Surg* 1988, 7: 130-8.
13. Cucullo L, Hossain M, Puvenna V, Marchi N, Janigro D. The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology. *BMC Neurosci* 2011, 12: 40.
14. Tzima E, del Pozo MA, Shattil SJ, Chien S, Schwartz MA. Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *EMBO J* 2001, 20: 4639-47.
15. Helms H, Abbott N, Burek M, Cecchelli R, Couraud P-O, Deli M, et al. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab* 2016, 36: 862-90.
16. Hoheisel D, Nitz T, Franke H, Wegener J, Hakvoort A, Tilling T, et al. Hydrocortisone Reinforces the Blood-Brain Barrier Properties in a Serum Free Cell Culture System. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 244: 312-6.
17. Förster C, Silwedel C, Golenhofen N, Burek M, Kietz S, Mankertz J, et al. Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. *J Physiol-London* 2005, 565: 475-86.
18. Furihata T, Kawamatsu S, Ito R, Saito K, Suzuki S, Kishida S, et al. Hydrocortisone enhances the barrier properties of HBMEC/ci beta, a brain microvascular endothelial cell line, through mesenchymal-to-endothelial transition-like effects. *Fluids Barriers CNS* 2015, 12.
19. Forster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* 2008, 130: 55-70.
20. Colgan O, Ferguson G, Collins N, Murphy R, Meade G, Cahill P, et al. Regulation of bovine brain microvascular endothelial tight junction assembly and barrier function by laminar shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, 292: H3190-7.
21. Hendrickson R, Cahill P, Sitzmann J, Redmond E. Ethanol Enhances Basal and FlowStimulated Nitric Oxide Synthase Activity In Vitro by Activating an Inhibitory Guanine Nucleotide Binding Protein. *J Pharmacol Exp Ther* 1999, 289: 1293.

22. Odijk M, van der Meer AD, Levner D, Kim HJ, van der Helm MW, Segerink LI, et al. Measuring direct current trans-epithelial electrical resistance in organ-on-a-chip microsystems. *Lab Chip* 2015, 15: 745-52.
23. Blanchette M, Daneman R. Formation and maintenance of the BBB. *Mech Dev* 2015, 138: 8-16.
24. Bagchi S, Chhibber T, Lahooti B, Verma A, Borse V, Jayant R. In-vitro blood-brain barrier models for drug screening and permeation studies: an overview. *Drug Des Dev Ther* 2019, 13: 3591-605.
25. Bicker J, Alves G, Fortuna A, Falcao A. Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review. *Eur J Pharm Biopharm* 2014, 87: 409-32.
26. Förster C, Burek M, Romero I, Weksler B, Couraud P-O, Drenckhahn D. Differential effects of hydrocortisone and TNF α on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood–brain barrier. *J Physiol* 2008, 586: 1937-49.
27. Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, et al. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol Cell Endocrinol* 2013, 380: 41-54.
28. Forster C, Silwedel C, Golenhofen N, Burek M, Kietz S, Mankertz J, et al. Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. *J Physiol-London* 2005, 565: 475-86.
29. Rochfort KD, Cummins PM. In Vitro Cell Models of the Human Blood-Brain Barrier: Demonstrating the Beneficial Influence of Shear Stress on Brain Microvascular Endothelial Cell Phenotype. Barichello T, *Blood-Brain Barrier*, Springer New York 2019, 71-98.
30. Palmiotti CA, Prasad S, Naik P, Abul KM, Sajja RK, Achyuta AH, et al. In vitro cerebrovascular modeling in the 21st century: current and prospective technologies. *Pharm Res* 2014, 31: 3229-50.
31. Griep LM, Wolbers F, de Wagenaar B, ter Braak PM, Weksler BB, Romero IA, et al. BBB ON CHIP: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate bloodbrain barrier function. *Biomed Microdevices* 2013, 15: 145-50.
32. Booth R, Kim H. Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μ BBB). *Lab Chip* 2012, 12: 1784-92.
33. Urbich C, Walter D, Zeiher A, Dimmeler S. Laminar Shear Stress Upregulates Integrin Expression. Role in Endothelial Cell Adhesion and Apoptosis. *Circul Res* 2000, 87: 683-9.
34. Tzima E, del Pozo M, Shattil S, Chien S, Schwartz M. Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *EMBO J* 2001, 20: 4639-47.
35. Noria S, Cowan DB, Gotlieb AI, Langille BL. Transient and steady-state effects of shear stress on endothelial cell adherens junctions. *Circ res* 1999, 85: 504-14.
36. Rami L, Auguste P, Thebaud NB, Bareille R, Daculsi R, Ripoche J, et al. IQ domain GTPase-activating protein 1 is involved in shear stress-induced progenitor-derived endothelial cell alignment. *Plos One* 2013, 8: e79919.
37. Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 2006, 16: 51-9.
38. Ma B, Hottiger MO. Crosstalk between Wnt/beta-Catenin and NF-kappaB Signaling Pathway during Inflammation. *Front Immunol* 2016, 7: 378.
39. Pardridge W. Introduction to the Blood-Brain Barrier: Methodology, Biology and Pathology. United States, Cambridge University Press 2006.
40. McCue S, Noria S, Langille B. Shear-Induced Reorganization of Endothelial Cell Cytoskeleton and Adhesion Complexes. *Trends Cardiovasc Med* 2004, 14: 143-51.

41. Kataoka N, Ujita S, Sato M. Effect of flow direction on the morphological responses of cultured bovine aortic endothelial cells. *Med Biol Eng Comput* 1998, 36: 122-8.
42. Blackman BR, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA, Jr. A new in vitro model to evaluate differential responses of endothelial cells to simulated arterial shear stress waveforms. *J Biomech Eng* 2002, 124: 397-407.
43. Simmers MB, Pryor AW, Blackman BR. Arterial shear stress regulates endothelial cell-directed migration, polarity, and morphology in confluent monolayers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, 293: H1937-46.
44. Ensley A, Nerem R, Anderson D, Hanson S, Hinds M. Fluid shear stress alters the hemostatic properties of endothelial outgrowth cells. *Tissue Eng Part A* 2012, 18: 127-36. 45.
45. Reinitz A, DeStefano J, Ye M, Wong A, Searson P. Human brain microvascular endothelial cells resist elongation due to shear stress. *Microvasc Res* 2015, 99: 8-18.
46. Shen Q, Rigor R, Pivetti C, Wu M, Yuan S. Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function. *Cardiovasc Res* 2010, 87: 272-80.
47. Goldman J, Zhong L, Liu S. Negative regulation of vascular smooth muscle cell migration by blood shear stress. *Am J Physiol-Heart C* 2007, 292: H928-H38.
48. Birukov KG BA, Dudek SM, Verin AD, Crow MT, Zhan X, DePaola N, Garcia JG. Shear stress-mediated cytoskeletal remodeling and cortactin translocation in pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, 26: 453-64.

Nuevas tecnologías aplicadas al estudio de la anatomía digital. Proyecto HDM (Human Dissection Models). Experiencia de 5 años.

Herrera Vázquez Ismael ^{1,2}, Reyes González Juan Pablo ^{1,2}, Valle Torres Cesar Joel ^{1,2}
Soto Ulloa Víctor ^{1,2}

¹Laboratorio Neuromorfología, Sección de Investigación, Departamento de Anatomía UNAM.

²Proyecto HDM, Departamento de Anatomía. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

RESUMEN

La disección como método para el aprendizaje del ser humano surgió a la par de la anatomía, de manera etimológica la palabra anatomía hace referencia directa al término en latín de disección, manteniéndose hasta nuestros días como la disciplina predilecta para el estudio de la estructura anatómica. Transformándose cada vez en una práctica poco habitual e incluso abandonada por algunas instituciones, motivado por los costos, dificultad de obtención y de mantenimiento de material cadáverico. En las últimas décadas el desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido la generación de alternativas para el estudio anatómico, que permitan al interesado un entendimiento objetivo de la estructura en una visualización desde cualquier ángulo deseado, generando una mejor compresión espacial de la disposición estructural anatómica, inconcebible de ser visto en una imagen de dos dimensiones, utilizados de manera tradicional como método didáctico complementario en los libros. Muchos de estos desarrollos tecnológicos no siempre representan con precisión la complejidad anatómica, lo que implica además un alto costo para el estudiante promedio, ya que requiere el respaldo institucional formal. En este trabajo presentamos la experiencia de 5 años en la creación de modelos anatómicos tridimensionales, generados a partir de la estructura per se, utilizando tecnologías de escaneo, reconstrucción, visualización e impresión 3D, aplicada a la creación de materiales virtuales con tecnologías de visión y manipulación vía internet, vista de relieve (anáglifo), realidad aumentada, realidad virtual, a través de una plataforma en internet, gratuita, intuitiva y de fácil acceso. Así como la reintegración del modelo virtual a un plano tangible, por medio de realidad mixta e impresión 3D es decir de nuevo a la realidad.

Palabras clave. Anatomía digital, impresión 3d, replicas anatómicas, modelo tridimensional, técnicas de estudio, plataforma online.

SUMMARY

The dissection as a method for learning arose along with anatomy, etymologically speaking the word anatomy makes direct reference to the Latin term of dissection, remaining to this day as the favorite discipline for the study of anatomical structure.

Transforming each time into a practice that is mistakenly uncommon and even abandoned by some institutions, motivated by costs, difficulty in obtaining and maintaining cadaveric material. In recent decades the development of new technologies has allowed the development of alternatives for anatomical study, allowing the interested party an objective understanding of the structure in a visualization from any desired angle, generating a better spatial compression of the anatomical structural arrangement, inconceivable of being glimpsed in a two-dimensional image, used in a traditional way as a complementary didactic method in books. Many of these technological developments do not always represent the anatomical complexity successfully, also implying a high cost for the average student, and without having an accurate institutional regulation. In this work we present our 5 years experience in the creation of three-dimensional anatomical models, generated from the structure per se, using scanning, reconstruction, visualization and 3D printing technologies, applied to the creation of virtual materials with online viewer technologies , anaglyph, augmented reality, virtual reality, through an online platform, free, intuitive and easily accessible. As well as the reintegration of the virtual model to a tangible plane, through mixed reality and 3D printing.

Keywords. Digital anatomy, 3d printing, anatomical replicas, three-dimensional model, study techniques, online platform.

INTRODUCCIÓN

Los estudiantes aprenden y procesan información de muchas maneras diferentes. Entender los perfiles de estudio preferidos por los estudiantes es clave en el proceso de enseñanza, en anatomía macroscópica, indudablemente la parte visual juega un papel importante, (Quinn, 2017), exponiendo la preferencia de los alumnos por el uso de materiales visuales, solo superado por la enseñanza basada en información concreta.

El informe horizonte (The NMC Horizon Report: 2016 Higher Education Edition) que, producido conjuntamente por (New Media Consortium (NMC) y EDUCAUSE Learning Initiative (ELI), identifica y describe las seis tecnologías emergentes que tendrán un impacto significativo en la educación superior en los próximos cinco años (2016-2020). En el cual identifican de manera particular el desarrollo de tecnologías de realidad aumentada y virtual como una tendencia marcada por el rediseño de espacios de aprendizaje y evolución a enfoques de aprendizaje profundo en un plazo medio, esperado en 2 a 3 años. (Johnson, 2016)

La creciente prevalencia de la tecnología de tabletas móviles significa que las aplicaciones de software médico ("aplicaciones") juegan un papel cada vez más importante en la educación médica. Nuevas aplicaciones de anatomía de desarrolladores como Visible Body, 3D4 Medical y Pocket Anatomy les permiten a los estudiantes visualizar y manipular complejas estructuras anatómicas usando modelos 3D detallados. El único signo de interrogación permanece sobre el nivel de detalle y precisión de estas aplicaciones. (Lewis, 2014) que al ser realizados de manera completamente digital, no siempre muestran un apego completo a la estructura anatómica.

Si bien desde hace algunos años han surgido y evolucionado diversas tecnologías como foros anatómicos, plataformas en línea, aplicaciones para pc y dispositivos móviles, mesas digitales de disección, entre otras (Vidal Ledo, 2004), con el objetivo de implementar nuevas tecnologías en el estudio y enseñanza de la anatomía , en donde algunas de ellas incluso muestran materiales anatómicos imágenes, imágenes 3D, videos, tienen la desventaja de ser realizados fuera de instituciones que regulen su uso, altos costos de adquisición para estudiantes, profesores e instituciones, falta de apego a nominas anatómicas internacionales, o plataformas y sistemas de acceso restringido.

En este artículo presentamos la de 5 años en la creación y adaptación de nuevas tecnologías aplicadas al campo de la anatomía. La plataforma online gratuita (www.proyectoahdm.com) fue abierta a principios del 2015 tras dos años de planeación y desarrollo, obteniendo en el momento actual en promedio 100 mil visitantes mensuales de diversas partes del mundo, facilitado por su traducción automática a 8 idiomas, permitiendo a estudiantes y profesores una navegación intuitiva, sin necesidad de registro, descarga, visualización de publicidad o materiales ajenos a la plataforma, en un entorno online de conexión segura por protocolo HTTP mostrada por certificado de seguridad, adaptables con cualquier dispositivo, utilizando complementos tecnológicos económicos (lentes de cartón o cubos de papel) y con soporte técnico y científico las 24 hrs por medio de un chat directo. Dentro de la plataforma online se pueden visualizar modelos anatómicos tridimensionales, con una total semejanza a la estructura anatómica real, ya que son realizados bajo sistemas de escaneo de superficie (escáneres 3D, fotogrametría, laserometría), permitiendo con ello un estudio con modelos apegados a los obtenidos tras dedicados y estrictos proceso de disección, y no reconstruidos solamente de manera digital, en los cuales tomando en cuenta la variabilidad de cada pieza anatómica, disminuimos al máximo la posibilidad de errores anatómicos.

Una parte importante que fue extensamente trabajada por el equipo de trabajo de proyecto HDM, fue una vez desarrollados modelos tridimensionales en alta definición, y con el mayor número de estructuras posibles de mayor y menor tamaño en un mismo modelo, el desarrollo y adaptación de nuevas tecnologías que brindaran al interesado un enfoque innovador, de acceso a estos modelos, de tal manera que estudiantes, y profesores tuvieran la sensación de estar aprendiendo anatomía frente a una pieza real, aunque estuvieran en la comodidad de sus hogares sin implicación de altos costos económicos. Hoy en día se pueden acceder desde la plataforma en línea a diversos sistemas de visualización, tales como 3D anaglifo, en donde se puede aumentar la apreciación de una estructura 3d con mayor profundidad con la incorporación de lentes anaglifo, que pueden realizados incluso por los alumnos a muy bajos costos; realidad aumentada, en la cual utilizando smartphones, y descargando la aplicación gratuita para dispositivos Android e IOS, podrán visualizar los modelos 3d virtuales en un mundo real, generando una experiencia única de tener la disección 3d frente a uno mismo; realidad virtual, por medio de la plataforma online, accediendo desde un dispositivo móvil, incorporado a un sistema visor tipo cardboard, el cual puede ser de plástico rígido o incluso con materiales económicos como cartón, el usuario tendrá la impresión de aparecer en un mundo virtual, frente a la estructura anatómica, que puede recorrer en

sus 360 grados, acercarse o alejarse, controlando su movimiento de manera manual (botón) o incorporando sistemas complejos de navegación como bandas de pulso muscular; sensores de movimientos en donde es permisible la manipulación de modelos anatómicos, con el movimiento de nuestras manos, detectado por un Kinect; Realidad aumentada con multimarcador y realidad mixta en donde a través de la aplicación para Android, se transforma un cubo hecho con papel en una estructura anatómica tridimensional, totalmente rotatorio y manipulable para su observación en tres dimensiones combinando el mundo real con el virtual; impresión 3D, generando replicas anatómicas físicas de los modelos virtuales, monocromáticas, a bajo costo.

Uno de los puntos clave en proyecto HDM, fue la no necesidad de incorporar en el equipo expertos ingenieros, diseñadores, programadores, etc, de profesión, ya que todos los contenidos desde aspectos básicos hasta complejos de áreas como programación, diseño, escaneo, impresión 3d, entre otros fueron realizados por estudiantes de la carrera de medicina, médicos, y profesores de anatomía, desarrollando tecnologías de última generación sin aumento de costos, teniendo como ventaja principal la comprensión de los puntos débiles en el estudio y enseñanza de la anatomía, teniendo como punto central de partida, al alumno y proceso de aprendizaje en el ámbito anatómico, demostrando la posibilidad de que en un mundo globalizado en donde cada día se tiene mayor acceso a recursos, e información, se pueden crear materiales en favor de mejorar la calidad en la educación anatómica.

MATERIAL Y METODO

La adquisición de modelos tridimensionales se realizó a partir de la estructura anatómica tridimensional, se utilizaron diversas piezas anatómicas que comprenden de manera particular las secciones de cabeza y cuello, tórax, y miembro superior, para la obtención final de 50 piezas anatómicas, cada pieza siendo previamente tratada con el método de carbowax (Polietinil glicol), en cada una realizando una disección detallada desde los planos más superficiales hasta los más profundos de acuerdo a la sección trabajada, con la finalidad de obtener el mayor número de estructuras anatómicas visibles en cada modelo comparativo.

Escaneo 3D

Se procedió a la reconstrucción tridimensional de cada modelo, con diversos sistemas de escaneo 3D, la elección del sistema se realizó conforme a las características del modelo a digitalizar, tales como su tamaño, características de la superficie, necesidad de definición, numero de estructuras, recursos y tiempo disponible.

En la mayor parte de los trabajos publicados sobre reconstrucciones tridimensionales aplicados a diversos campos de estudio se utilizan tres tipos de sistema base: la fotogrametría, el uso de cámaras monocromáticas en combinación de proyectores para cálculo de colores, y laserometria, (Makitie AA, et al. 2016). La primera de ellas utiliza diversos softwares que permiten el cálculo de una geometría 3D generada como base en la reconstrucción a partir de imágenes tomadas en diversos ángulos. Esta técnica permite una gran calidad, además de generar modelos en 3D a color; sus inconvenientes es el costo del sistema, ya que se requiere una cámara fotográfica profesional o semiprofesional y las licencias del software, su principal limitación; el tiempo de

realización, la toma de fotografías y su post-procesamiento para la obtención del modelo 3D.

Para su utilización fueron electivas piezas anatómicas con una gran complejidad, variación de su geometría, y alto número de detalles, cada modelo fue colocado en un ambiente controlado de luz en un sistema giratorio de 360 grados, tomando fotografías con cámaras Nikon D5300 y D7000, el número de fotografías vario dependiendo la calidad, y características anatómicas de la pieza a digitalizar, obteniéndose en promedio de 500 a 10 000 fotografías de los diversos ángulos de la pieza. Las fotografías fueron procesados por sistemas de fotogrametría profesional instalados en equipos computacionales de al menos una tarjeta grafica GeForce GTX 680, procesador Intel core I7, con al menos 32 gigabytes de memoria RAM DDR4. Los modelos fueron exportados en formato obj, stl, fbx con sus respectivas texturas. El post procesamiento se realizó con software como 3dsmax, meshlab y Photoshop, para su limpieza.

El uso de laserometria es uno de los sistemas para modelado 3D más utilizados en el mundo, en diversas áreas de estudio, principalmente en la obtención de modelos a gran escala. Su principal ventaja se da en el rubro económico, ya que en el mercado global actual existen sistemas que incluso pueden ser colocados en teléfonos celulares o tabletas electrónicas. Estos sistemas funcionan lanzando un láser al objeto a digitalizar, un software incluido calcula la distancia del láser y genera un punto en un mapa tridimensional, logrando así una gran cantidad de puntos geométricos que después son unidos para generar una malla 3D y, finalmente, el modelo tridimensional. Sus desventajas apuntan a la gran cantidad de errores en la malla 3D que requieren de un arreglo digital en diversos softwares y que conlleven al aumento del tiempo de realización; estos errores obedecen a la dificultad de que el láser “toque” cada uno de los puntos de la superficie a escanear, generando huecos en la malla 3D.

Esta técnica fue elegida para piezas grandes, con pocos detalles, y poca variación en su estructura geométrica, cada modelo fue colocado en un ambiente controlado de luz, en un sistema controlado de 360 grados, con sistemas de referencia geométrica, utilizando una tableta Ipad air, conectado a un sistema isense de la marca 3D system, controlado por medio de una interfase Skanect para Windows, el escaneo de cada modelo tomo como máximo 4 hrs, y una resolución máxima de 1mm. Los modelos fueron exportados en formato obj, stl, ply con sus respectivas texturas. El post procesamiento se realizó con software como 3dsmax, meshlab y Photoshop, para su limpieza.

La fotometría estéreo, uno de sus principales sustentos se muestran en el artículo Efficient Field Capture of Epigraphy via Photometric publicado en 2006 por J. Paterson y K. Cain en el Institute for the Study and Integration of Graphical Heritage Techniques de Oxford 3D Technology. Fue generado inicialmente como una técnica de campo altamente portátil para estimar las normales de superficie, geometría y albedo de paredes y otras áreas de sitios arqueológicos usando conjuntos limitados de fotografías digitales. La geometría de la superficie y el albedo se extraen de los cálculos fotométricos, obteniéndose un modelo completo con color por vértice estimado, (J. Paterson et al, 2016); en otras palabras un sistema que permite la obtención de imágenes geométricas y fotogramétricas en un sistema portátil.

Este sistema fue utilizado para obtener modelos tridimensionales que requerían una superficie máxima de 180 grados, una alta definición, un tiempo corto para su realización, y poca o nula necesidad de un pos procesamiento, se aplicaron escáneres profesionales con sistemas de fotometría estéreo, obteniendo modelos tridimensionales de 180 grados que fueron exportados en formatos obj con texturas, y realizándose un post procesamiento con el software meshlab.

Plataforma online

Con la obtención de modelos tridimensionales, fue necesaria la creación de un sistema que permitiera su visualización online, de manera interactiva, intuitiva y gratuita. Se decidió por una construcción en sistema base de wordpress. Los modelos se cargaron a la plataforma de Sketchfab, inicialmente se requirió de un plugin para insertar los modelos 3D, a la plataforma online de HDM, con las siguientes actualizaciones se eliminó su necesidad.

Cada modelo se cargó en 3 variedades, la primera de visualización online con descripción de estructuras anatómicas y viñetas clínicas, visualización con sistema 3D anaglifo generando máscaras cian y magenta permitiendo una compatibilidad con visualización 3D en cualquier dispositivo, y adaptación para compatibilidad en sistemas de realidad virtual directamente desde el navegador.

Se incluyeron descripciones anatómicas, podcast, y un chat de asistencia directamente en la plataforma para solución de dudas técnicas y científicas las 24 hrs, con incorporación de sistema chatbot para respuestas automáticas.

Realidad aumentada

Para el diseño de realidad aumentada, cada modelo fue reprocesado para obtener un modelo bajo en polígonos preservando la calidad y detalle de los modelos, se cargó a la plataforma Augment, se generaron los marcadores necesarios para su reconocimiento, se cargaron en la plataforma online HDM, en formato pdf, para su fácil descarga y uso de realidad aumentada.

Realidad aumenta multimarcador

Se utilizaron modelos bajos en polígonos, en conjunto con sdk de realidad aumentada, en Android Studio, incluyendo sistemas de marcadores múltiples. Procesando una aplicación en formato apk estable.

Control de modelos sensor de movimientos

Se utilizó un Kinect de primera generación conectado a un PC portátil, con un adaptador Kinect para Windows, y los drivers correspondientes. Se utilizó Windows Kinect control para general una interfase de control para los modelos. Los modelos fueron cargados a programas de visualización 3D, como Photoshop y controlados por movimientos corporales en sistemas controlados de iluminación.

Realidad virtual controlada pulsos musculares

Se realizo la compatibilidad de los modelos con sistemas de realidad aumentada tipo cardboard, desde la plataforma online, Se generaron sistemas de posicionamiento del observados desde la plataforma de Sketchfab.

Con la incorporación directa a la plataforma de modelos anatómicos 3D aplicados a realidad virtual fue necesaria la incorporación de sistemas que permitieran su navegación en el mundo virtual. Se utilizo la pusera MYO band gesture control, conectada a un equipo Windows, por medio de bluetooth, el sdk de MYO, y el complemento global mause control, permitiendo controlar la posición del observador en el mundo virtual.

Impresión 3D

Se exploraron diversos equipos y sistemas de impresión 3D, se decidió por sistemas de modelado por deposición fundida, por su accesibilidad y menor costo. Se optimizaron los modelos 3d, para impresión con el software, estableciendo escalas, e integridad. Se utilizo el software slic3r en su edición prusa, para la generación del g-code, que permite dar las instrucciones a la impresora sobre las coordenadas y progreso de deposición de material de fundido. Se utilizaron materiales monocromáticos de uso común PLA. ABS materiales flexibles y materiales hidrosolubles para la construcción de los soportes, que a pesar de ser monocromáticos pueden ser aplicables a técnicas de coloramiento a posteriori como pintura hidrográfica (Zhang, 2015)

RESULTADOS

Se obtuvieron 50 modelos tridimensionales, que permiten una rotación de la estructura en modo tridimensional concediendo al observador una vista de cada componente en cualquier ángulo de visión mostrando una alta correspondencia con el modelo original de disección, preservando detalles estructurales, relación y color, en modelos de 190 grados, 270 grados y 360 grados. Cada modelo puede ser visto desde la plataforma online (www.proyectoohdm) compatible con cualquier dispositivo (Tablet, smartphone, computadora) optimizada con ancho de banda mayor para carga rápida de modelos 3D.

Cada modelo fue visualizable en cuatro variedades:

1. Modelos Anatómicos 3d descriptivos, con estructuras señalizadas y viñetas anatomo-clínicas de la estructura marcada. Aunado a descripciones texturales para brindar un contexto al modelo anatómico. Aplicados al área anatómica y embriológica.
2. Modelos Anatómicos 3D anaglifo, compatibles con cualquier dispositivo en conjunto con lentes anaglifo (color cian y magenta), generando en el observador una compresión de la profundidad magnificada.
3. Modelos anatómicos 3D en realidad virtual permitiendo al observador un recorrido en 360 grados en un mundo virtual para la observación de la estructura, controlado de manera manual o con la incorporación de bandas de pulso muscular.
4. Modelos anatómicos 3D en realidad aumentada, permitiendo al observador una observación de un modelo tridimensional incorporado al mundo real, generando

una mezcla de lo real y lo virtual, asemejando a sistemas holográficos, todo ello por medio de su dispositivo móvil, accediendo a cada modelo por medio del escaneo de marcadores.

La plataforma online, permite su traducción automática en 8 idiomas generando contenido comprensible en diversas territorios geográficos, de manera gratuita, sin necesidad de instalaciones o registros, autoadaptable a diversos dispositivos, recibiendo en promedio 100 mil visitas mensuales.

Los modelos anatómicos fueron además utilizados fuera de la plataforma en tres sistemas de visualización e interacción:

1. Modelos controlados con sensores de movimientos. Incorporando tecnologías de uso común, se permite la carga del modelo en software de visualización 3d compatible como Photoshop, conectado a un Kinect, facultando al observador un control rotatorio del modelo con la utilización de sus manos, permitiendo el uso de estos modelos anatómicos como referentes dentro de ambientes hostiles como quirófano.
2. Modelos multimarcador en realidad aumentada y realidad mixta. Utilizando 6 marcadores, construidos como imágenes amorfas, impreso en blanco y negro en cualquier tipo de papel, para construir un cubo de papel, el cual al ser reconocido por la aplicación ejecutada en Android permite la aparición del modelo 3d de manera envolvente al cubo, permitiendo la manipulación de la parte virtual en el mundo real a través del cubo de papel. El mismo sistema es aplicado en conjunción con el sistema de realidad virtual dividiendo la pantalla del dispositivo en dos partes generando una visión independiente para como ojo, dejando al observador con las manos libres permitiéndole una interacción mayor con el modelo anatómico.
3. Modelos impresos en 3D. Construidos en plástico de alta resistencia o plástico biodegradable, generando replicas anatómicas monocromáticas de alta resolución a escala o en tamaño real, de la estructura disecada, respetando detalles mayores y minúsculos de la estructura.

DISCUSIÓN

La disección como método para el aprendizaje surgió a la par de la anatomía, de manera etimológica la palabra anatomía hace referencia directa al término en latín de disección, manteniéndose hasta nuestros días como la disciplina predilecta para el estudio de la estructura anatómica. (García Barrios, 1999). La Anatomía moderna se inicia con la publicación de la obra “De humani corporis fabrica libri septem” en 1542, enseñando a los médicos que el cuerpo humano es el mejor de los libros para aprender anatomía (Montemayor, 1997). La actividad práctica, utilizando el cadáver humano como centro, constituye la única oportunidad que tiene el profesional sanitario en ciernes para confirmar empíricamente la situación de los órganos y sistemas corporales y su relación con la enfermedad y la muerte (Inzunza, 2008).

Estamos en una era de tecnologías educativas que se utilizan hoy en día. Por lo tanto, involucrar los enfoques modernos y alternativos en el proceso educativo es un elemento

esencial del sector educativo actual. La enseñanza de la anatomía tradicionalmente en cadáveres en las facultades de medicina es esencial porque brindan la oportunidad de conocer la estructura tridimensional y la diversidad del cuerpo. (Engin 2013). El desarrollo de nuevas técnicas tecnológicas aplicables al estudio y enseñanza de la anatomía deben tener como mínimo dos pilares fundamentales, el apego gráfico a la estructura real, para general material apegados a la norma anatómica internacional, con gran similitud visual a una disección anatómica, y la búsqueda de estrategias que permitan una interacción lo más real e intuitiva posible para el estudiante y al profesor, sin incrementar el coste para su uso.

El uso de tecnologías 3D aplicadas al campo del estudio anatómico ha sido previamente demostrado, incluso en el desarrollo de réplicas anatómicas por escaneo de superficie, tomografía e impresión 3D, con éxito manteniendo resultados con una gran semejanza al modelo base. (Inzunza, 2015). Los modelos anatómicos presentados en este trabajo muestran un alta correlación con los modelos anatómicos disecados a priori, realizados con diversas técnicas de escaneo y reconstrucción 3D, que permitieron la creación de modelos con definición cada vez mayor, incluso definiciones 4K y 8K. Modelos que al ser generados a partir de la estructura cadavérica permiten un nivel de detalle y precisión elevado, en donde tomando en cuenta la variabilidad anatómica de cada modelo, disminuimos la probabilidad de modelos anatómicos erróneos al máximo.

Un factor determinante en la utilización de nuevas tecnológicas, no es solo el desarrollo de contenido innovador, y útil para el interesado, sino además la forma en la que se le brinda acceso a ello, ya que aunque el contenido sea de gran calidad si el continente no lo es o simplemente no existe, el estudiante o profesor difícilmente podrá llegar al contenido, o lo utilizará de formas erróneas, provocando un rechazo en la implementación de alternativas tecnológicas. Al plantear esta situación, uno de los objetivos en el desarrollo del proyecto fue la implementación de tecnologías, innovadoras, recientes, variables, concediendo al interesado sistemas que permitan una visualización de la estructura anatómica lo más próximo al material cadavérico, desde cualquier parte que se encuentre, con equipos de alcance común como tabletas, computadores, Smartphone, adaptados a realidad aumentada, realidad virtual, anaglifo, sensores de movimientos, sistema multimarcador, realidad mixta e impresión 3D monocromática, sin que esto represente un aumento en los costos personales o institucionales.

El uso de plataformas online para el apoyo académico de los estudiantes y profesores en campos como la anatomía ha sido previamente evaluado obteniendo porcentajes altos de conformidad y aceptación, mejorando en forma inter institucional la enseñanza de la anatomía en la educación médica (Inzunza, 2017). La plataforma de proyecto HDM, brinda un escenario novedoso en que los estudiantes de diversos grados académicos pueden aprender y enseñar anatomía a partir de modelos tridimensionales generados a partir de la estructura misma presentados en diversas formas de visualización utilizando tecnología en constante desarrollo.

Como mencionamos anteriormente algunos recursos digitales ya existentes tienen la desventaja de ser realizados fuera de instituciones que regulen su uso, altos costos de

adquisición para estudiantes, profesores e instituciones, falta de apego a nominas anatómicas internacionales, requerimiento de equipos costosos para su uso, falta de compatibilidad con diversos dispositivos de uso común o plataformas y sistemas de acceso restringido en donde citando a Stephen Hawking, refiriéndose a la reciente publicación de su tesis doctoral “Cualquier persona, en cualquier parte del mundo, debe tener acceso libre y sin límites no solo a mi investigación sino a todos los trabajo sobresalientes que se han dado a través del entendimiento humano”, enfatizamos en la necesidad del libre acceso a nuevas tecnologías que permitan de manera regulada institucionalmente su utilización en cualquier parte del mundo por profesionales del área de áreas médicas y afines que requieran conocimiento anatómico para el ejercicio de la profesión pero también por áreas de pregrado, y áreas no afines, que le permitan al interesado encontrar información fidedigna y recursos de gran calidad, motivo por el cual se optó por una plataforma online sin restricción de acceso, con soporte las 24 hrs, de manera científica y técnica, retroalimentación por comentarios privados entre el equipo de realización y usuarios así como una constante actualización de materiales. Es de mencionar la cautela y seriedad en el uso de material cadáverico, regulado por las normas institucionales, bajo las recomendaciones y apoyo del departamento de anfiteatro y del programa de donación de cuerpos de la UNAM, manteniendo en todo momento el respeto y anonimato de los cuerpos utilizados, Uno de los retos que continúa latente es la incorporación de un mayor número de modelos, que permitan a la plataforma online abarcar la totalidad de estructuras del cuerpo humano, que aún se muestran escasas en algunas secciones corporales, promovido por el largo tiempo que representa la disección de alta calidad y el proceso de digitalización de cada modelo. Así como la incorporación de estas tecnologías a otros campos de estudio como la embriología, de los cuales ya se cuenta con los primeros modelos.

Finalmente, reiteramos el compromiso del equipo de desarrollo, en pro de la educación médica y la innovación en nuevas técnicas de estudio, asequibles, regulables y de libre divulgación, siempre con objetivo central en el mejoramiento de calidad de aprendizaje, enseñanza de la anatomía y áreas afines, mostrándonos siempre a favor del trabajo colaborativo interinstitucional e invitando a cualquier interesado que comparta intereses afines, a la conjunción de esfuerzos, para el mejoramiento de estas herramientas, que si bien en ningún momento fueron desarrolladas como forma de sustitución de la disección anatómica, que hasta nuestros días continua y deberá continuar como principal forma de enseñanza anatómica, si brindan una alternativa eficaz y de gran calidad para complementarse o ser utilizada en instituciones donde no se cuenta con material cadáverico.

AGRADECIMIENTOS

Sketchfab, Inc.; Augment ; Dr Diego Pineda, Laboratorio de Anfiteatro, facultad de medicina, UNAM; Dr. Guillermo Amador; Espinoza Villanueva G., Laboratorio Neuro morfología, Facultad de medicina, UNAM ; Sánchez Bringas M.G, Campos Castolo E.M, Departamento embriología, Facultad de Medicina. UNAM; Departamento Anatomía, Facultad de medicina, UNAM; Dr William Ortiz Briseño, Facultad de medicina, Universidad Autónoma de Zacatecas; Sociedad Mexicana de Anatomía.

BIBLIOGRAFIA

1. Engin Kurt, S. Eray Yurkdakul, Adan ATAC, An overview of technologies used for anatomy education in terms of medical history. *Procedia Social and Behavioral Sciences* 103 109.115. 2013
2. García Barrios, Clara, Mejías Rodríguez, Idania, & Castillo del Río, Marieta. Origen e historia de la disección anatómica. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 1999
3. Inzunza, H. O. Competencias generales en medicina, rol de la anatomía. *Int. J. Morphol.*, 26(2):243-6, 2008
4. Inzunza, Oscar, Caro, Iván, Mondragón, Germán, Baeza, Felipe, Burdiles, Álvaro, & Salgado, Guillermo. Impresiones 3D, Nueva Tecnología que Apoya la Docencia Anatómica. *International Journal of Morphology*, 33(3), 1176-1182. 2015
5. Inzunza, Oscar, Neyem, Andrés, Sanz, María Eliana, Valdivia, Iván, Villarroel, Mauricio, Farfán, Emilio, Matte, Andrés, & López-Juri, Patricio. Anatomicis Network: Una Plataforma de Software Educativa basada en la Nube para Mejorar la Enseñanza de la Anatomía en la Educación Médica. *International Journal of Morphology*, 35(3), 1168-1177. 2017
6. J. Paterson & K. Cain. Efficient Field Capture of Epigraphy via Photometric Stereo. The 7th International Symposium on Virtual Reality, Archaeology and Cultural HeritageVAST . 2006
7. Johnson, L., Adams Becker, S., Cummins, M., Estrada, V., Freeman, A., and Hall, C. NMC Horizon Report: 2016 Higher Education Edition. Austin, Texas: The New Media Consortium. 2016
8. Lewis, T. L.; Burnett, B.; Tunstall, R. G. & Abrahams, P. H. Complementing anatomy education using three-dimensional anatomy mobile software applications on tablet computers. *Clin. Anat.*, 27(3):313-20. 2014.
9. Makitie AA, et al., Three-dimensional printing for restoration of the donor face: A new digital technique tested and used in the first facial allotransplantation patient in Finland, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2016
10. Montemayor, G. La Anatomía Humana y el Arte. Rev Vesalius Dep. Anatomía, Fac. Med. UANL, 1997.
11. Quinn, M. M., Smith, T., Kalmar, E. L. and Burgoon, J. M. What type of learner are your students? Preferred learning styles of undergraduate gross anatomy students according to the index of learning styles questionnaire. American Association of Anatomists. doi:10.1002/ase.1748. 2017
12. Vidal Ledo, María, Cañizares Luna, Oscar, Sarasa Muñoz, Nélida, & Santana Machado, Alfredo. Las nuevas tecnologías en la enseñanza y el aprendizaje de la Anatomía Humana. *Educación Médica Superior*, 18(4). 2004
13. Zhang, Yizhong et al. "Computational hydrographic printing." ACM Trans. Graph. 34. 131:1-131:11. 2015



Dear Colleagues and Friends,

On behalf of the Organizing Committee and the Portuguese Anatomical Society, it is an honour and pleasure to invite you to the 12th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy, our increasingly famous ISCAA!

This year the meeting will take place in the Sunny South of Portugal (Algarve), in the beautiful city of Tavira, from the 25th to the 27th of June 2020. In the last day of the congress, ISCAA will be joined by the Annual Meeting of the Portuguese Anatomical Society (SAP/AAP).

ISCAA is well known for its high-level scientific quality, being a perfect opportunity for students, doctors and researchers to present and discuss their valuable works.

This year ISCAA main lectures will focus on Innovation in Anatomy, News from Terminologia Anatomica, Criteria for Defining New Anatomical Structures and Medical Education.

The Symposium is also open for contributions on any aspect of human or veterinarian morphological sciences. Our Key scientific topics will be: Abdomen, applied anatomy in Imaging, Applied anatomy in Surgery, Central nervous system, Donation programs, Education, Embryology, Head and Neck, Heart, Locomotive system, Lymphatics, Pelvis, Peripheral nervous system, Spine, Techniques in Anatomy, Thorax, Miscellaneous and others.

Tavira has the perfect environment to make this congress an exceptional event: glorious weather, beautiful white sand beaches with migratory birds and sea life, typical cuisine and crafts, an historical centre with Moorish remnants, old churches, a Medieval castle, a 16th century Augustine Convent and a Roman bridge, cobbled streets and delightful

tiled houses with “scissor style” roofs and “trellis doors”. Only half an hour from Faro’s airport, and 2H30min by car from the capital, Lisbon.

In order to allow you to start preparing your participation, we kindly invite you to visit the ISCAA 2020 website at www.iscaa2020.com where you can find all the useful information.

We hope that the scientific and social program will be both stimulating and ambitious and that the 12th ISCAA will constitute an incubator for new ideas, for new projects and a unique opportunity to meet, share and discuss.

You cannot miss this meeting and we are looking forward to welcome you in Tavira!

Lia Lucas Neto, president of the Organizing Committee



IMPORTANT DATES:

- **Abstract submission deadline: 5 April 2020**
- **Notification of abstract acceptance: 8 May 2020**
- **Early Fee until: 31 March 2020**

12TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM CLINICAL AND APPLIED ANATOMY

THURSDAY, 25 JUNE

FRIDAY, 26 JUNE

SATURDAY, 27 JUNE



8h-9h

Registration Open

ISCAA - 25 & 26 June

SAP Members - 27 June

Morning Program



Registration Open
ISCAA

Rethinking Anatomy

"3D Printing in Clinical Anatomy - from teaching models to the operating room"
Mickael Bartikian

"The Human Body in Space - Anatomical changes in low gravity environments"
Edson Oliveira

"Simulation techniques for learning clinical anatomy"
Francisco Maio Matos

Coffee-Break (10h15–11h)



Registration Open
ISCAA

Round Table - Criteria to Define a New Anatomical Structure

Paul Neumann
Calvin Coffey

Coffee-Break (11h–11h30)

Round Table - Terminology

"News from FIPAT"
Paul Neumann

"Does a need of the variant anatomical nomenclature really matters?"
David Kachlik



12TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM CLINICAL AND APPLIED ANATOMY		
THURSDAY, 25 JUNE	FRIDAY, 26 JUNE	SATURDAY, 27 JUNE
<p>14h-15h</p> <p>Registration Open ISCAA</p>	<p>Lunch</p> <p>Operating Room "The mesenteric organ" Calvin Coffey</p> <p>"Hernia Surgery and the importance of Clinical-anatomical knowledge" René Fortelny</p>	
	<p>Round Table - Education "Teaching of anatomy in a PBL curriculum medical school" Isabel Palmeirim</p> <p>"The role of computer assisted learning in anatomy: how each learner footprint can help in learning anatomy" Amélia Ferreira / Bruno Guimarães</p>	
	<p>Applied Anatomy "Modern Translational Anatomy: Science-Education-Patients" Marko Konschake</p> <p>"Safe zone of injections in quadratus femoris for ischiofemoral impingement syndromes" Nihal Apaydin</p> <p>"Braquial Plexus Sheath: a clinical term with great consequences!" Georg Feigl</p>	
<p>15h-16h</p> <p>Registration Open ISCAA</p>	<p>Anatomical Theatre "Cadaver Donation Programs (NOVA medical school) and Human Cadaveric Advanced Courses" Diogo Pais / Nuno Domingues</p> <p>"How to improve the quality/durability of your cadavers - tips and tricks" Ana Raquel Henriques</p>	
	<p>Coffee-Break (16h–16h30)</p>	
	<p>Free Oral Communications</p>	
<p>16h-17h30</p> <p>Opening Ceremony (17h-17h30)</p>	<p>Publishing in Anatomy "Scientific and Medical Photography" José Paulo Andrade</p> <p>"Anatomical drawings: how important is a proper supervision of an experienced anatomist?" Georg Feigl</p> <p>"Clinical Anatomy - where to publish?" (to be confirmed)</p>	
	<p>Coffee-Break (16h–16h30)</p>	



Afternoon Program




THURSDAY, 25 JUNE
17h30-18h30
Opening Lectures

"Leonardo Da Vinci:
The first great anatomist?"
António Gonçalves Ferreira

"Anatomy and Imaging of
Parkinson's Disease – New advances"
Sofia Reimão

"Remembering Andreas Weiglein"
Georg Feigl

FRIDAY, 26 JUNE
Free Oral Communications
ISCAA Board Meeting
SATURDAY, 27 JUNE
ISCAA & SAP Awards

António Gonçalves Ferreira
Diogo Pais
Ivo Furtado

Closing Ceremony
Evening Program

**Welcome Reception
&
Cocktail**
18h30-23h
**City Walking Tour to Dinner
(18h30-19h30)**
Gala Dinner
Pousada Convento de Tavira

SAP General Assembly


Caros Associados,

Sáudo os Colegas e dou-lhes conhecimento de que a LIV Reunião Científica Anual da Sociedade Anatómica Portuguesa (SAP)/7^a Reunião Científica Anual da Associação Anatómica Portuguesa (AAP), terá lugar de 25 a 27 de junho de 2020, em Tavira, em conjunto com o 12Th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy.

Será um momento científico alto da Anatomia Portuguesa, que acolhe e promove um evento científico Internacional, e ao mesmo tempo uma oportunidade de partilha científica e convívio com os nossos colegas Anatomistas, não apenas Europeus, mas intercontinentais.

O dia 27 de junho, será um dia especialmente dedicado à SAP/AAP e no final haverá a Assembleia Geral de passagem de testemunho a uma nova Direcção a ser eleita para o mandato de 2020-2022.

Esperando de todos o melhor acolhimento desta iniciativa, aceitem as mais cordiais saudações,

Ivo Álvares Furtado, Presidente da Sociedade Anatómica Portuguesa (SAP/AAP)