

PROYECTO ACHINUMET – MERCK SERONO

**ECOGRAFÍA DE MUSLO COMO MÉTODO DE EVALUACIÓN DE
CALIDAD MUSCULAR**

Natalia Jara C, Sandra Henríquez P, Gladys Barrera A.

Laboratorio Envejecimiento y Enfermedades Crónicas Asociadas a la Nutrición

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA)

Universidad de Chile

Mayo 2016

INTRODUCCIÓN

Con el envejecimiento se produce sarcopenia, pérdida de masa y disminución de la función muscular, lo que va acompañado con pérdida de la funcionalidad [1]. Ésta es la pieza clave en el desarrollo de fragilidad en los adultos mayores y un determinante importante de morbimortalidad y resultados adversos como discapacidad y pérdida de la independencia [2-5]. Junto a la disminución de masa muscular, también se afecta significativamente la calidad de este tejido, produciéndose además de atrofia miofibrilar, infiltración grasa (asociada en forma directa al grado de obesidad [6] y a la edad[1]) y aumento del contenido de agua, lo que disminuye su capacidad de contracción [3]. La alteración de la calidad muscular es un evento de relevancia mayor en relación al envejecimiento, ya que está presente no solo a medida que aumenta la edad, sino también en enfermedades que generan envejecimiento prematuro, como diabetes mellitus y obesidad, entre muchas otras [4]. Así, se ha evaluado que en presencia de diabetes hay una mayor pérdida de masa magra tanto en hombres como en mujeres, lo que pone en especial riesgo a los sujetos diabéticos a medida que envejecen [7]. Junto a esto, se hipotetiza que un mayor contenido de grasa intramiocelular, se correlaciona con disfunción metabólica a nivel muscular, insulino resistencia y desarrollo de diabetes tipo 2 [8-10]. Para poder evaluar e investigar en relación a la sarcopenia, deben existir métodos confiables en cuanto a medición tanto de atrofia como de disminución de la calidad muscular. Estos dos parámetros han sido estimados con espectroscopía por RMN que es considerada el gold standard [11-13], pero es de alto costo para ser utilizado como método de rutina. Se ha utilizado también la medición con TAC [14, 15], validándose como un método cuantitativo de calidad muscular e infiltración grasa. En un estudio de Goodpaster et al [14], se comparó la medición del coeficiente de atenuación por TAC (que representa la composición de los tejidos, mientras menor el valor en el músculo, mayor contenido de grasa) con biopsias musculares, y se observó una correlación inversa y significativa entre estas ($r = -0.58$, $P 0.019$), concluyendo que el coeficiente de atenuación se relaciona al contenido lipídico muscular, constituyendo un método alternativo y no invasivo de evaluación. De todas maneras es de relevancia encontrar un método que tenga menor costo y pueda ser utilizado tanto en clínica como en investigación de una manera más accesible. En este intento se ha encontrado la ecotomografía como método de determinación tanto de área [16], como de infiltración grasa muscular [3, 17]. En un estudio de Ville y cols. [12] se comparó la resonancia nuclear magnética con ultrasonido en cerdos determinando el contenido graso intramuscular, pero no se compararon ambos métodos directamente y se evaluaron distintas variantes genéticas por lo que la variabilidad fue muy alta en la muestra (48%). En humanos hay estudios en que se analiza el contenido de grasa intramuscular tanto con resonancia magnética [13], como por TAC [14, 15] y ultrasonido [2, 3, 17, 18], pero no hay trabajos en que se comparen estos métodos entre sí. La literatura es escasa en relación a la medición de estos parámetros y fragilidad en adultos mayores, o su relación con insulino resistencia o disminución de la funcionalidad muscular. Fukumoto [3], describe la relación entre la disminución de la masa (estimada a través de medición de área muscular por ecografía) y funcionalidad muscular, así como la asociación entre esta última e infiltración grasa muscular medida por este mismo método. En este trabajo, donde se evaluaron únicamente mujeres, se describe una correlación significativa entre la fuerza de cuádriceps con infiltración grasa ($r = -0.40$, $p 0.01$) y con área muscular ($r = 0.47$, $p 0.01$), independiente de la edad e IMC. No se encontró relación entre la ecogenicidad muscular (cantidad de grasa intramiocelular) y el porcentaje de masa grasa o el IMC, concluyendo que la estimación de estos parámetros por ecotomografía es un método valioso, cuya relación con otros parámetros es necesario continuar investigando. Junto a estas evaluaciones, se han estimado valores de referencia de ambos parámetros, en distintas poblaciones [2, 3, 17]. La medición de la masa muscular se ha realizado evaluando el diámetro transversal del músculo recto femoral (área), teniendo como valores de referencia de 3.5 a 4 cm según si se ha evaluado en mujeres u hombres respectivamente [2, 3]. La calidad muscular, medida como la ecogenicidad del músculo, ha sido cuantificada en 25 – 30 dB [2] en hombres y mujeres respectivamente en el músculo recto femoral, hasta niveles de 90 – 98 dB en otros estudios [3], valores diferentes debido a que la técnica de medición ecográfica utilizada en cada trabajo fue distinta. En éstos, se ha evaluado que ambos parámetros cambian en función de la edad [3, 17], la masa muscular disminuye casi linealmente tanto en hombres (desde los 30 – 40 años) como en mujeres (desde los 20 años), mientras que la calidad disminuye (aumenta la ecogenicidad) a medida que aumenta la edad también casi en forma lineal en ambos sexos [2].

En un intento por comprobar la replicabilidad de estos datos, nuestro grupo evaluó la cantidad y calidad muscular de un pequeño grupo de sujetos el año 2011. Se seleccionó a 20 sujetos de sexo masculino (16 menores de 50 años, y 4 mayores de 60 años) que contaban con medición de grasa intramiocelular por espectroscopía/RMN. Se les realizó ecografía muscular, y medición de fuerza y funcionalidad muscular. Los resultados obtenidos fueron alentadores en

relación a la ecografía, el aumento de la ecogenicidad muscular de cuádriceps, cuantificado con este método, se relacionó directamente con la edad de los participantes (r 0.68, p 0.0008), e inversamente con la fuerza muscular del cuádriceps y dinamometría de mano (r -0.43, p 0.052 y r -0.57, p 0.008 respectivamente). Debido a la escasa información en la literatura, a lo relevante que nos parece poder cuantificar tanto la sarcopenia como la alteración de la calidad muscular y a los alentadores resultados obtenidos en nuestra evaluación inicial, planteamos este trabajo de investigación para poder evaluar y validar la ecografía, en un mayor número de sujetos, como método de medición de calidad y área muscular; comparándola con la tomografía computada como estándar de oro [11, 13-15], debido a la dificultad y alto costo de la RMN. Un segundo punto se refiere a la evaluación de la relación entre área, calidad y funcionalidad muscular en este grupo de sujetos chilenos.

El objetivo de este estudio es validar la ecografía muscular como instrumento para medir área y calidad muscular y evaluar su asociación con funcionalidad muscular, en hombres y mujeres de diferentes grupos etáreos.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la concordancia entre área y calidad muscular medida a través de ecografía y tomografía axial.
2. Demostrar la relación entre calidad muscular medida por ecografía y TAC con fuerza muscular de cuádriceps, en hombres y mujeres autovalentes.
3. Evaluar la relación entre área muscular medida por ecotomografía y TAC con fuerza muscular de cuádriceps, en hombres y mujeres autovalentes.

METODOLOGÍA

Se seleccionaron 66 sujetos de la comunidad, de ambos sexos, 49 sujetos menores de 60 años y 17 sujetos mayores de 60 años, con IMC entre 20 y 35 kg/mt², que cumplieran criterios de inclusión y exclusión (antecedentes de Diabetes Mellitus 2, historia de cirugía en extremidades inferiores, patología muscular o neurológica que produzca alteraciones musculares y poder caminar sin asistencia, uso de fármacos como corticoides, diuréticos y estatinas). A todos los participantes se les explicó la finalidad del estudio, y leyeron y firmaron el consentimiento informado aprobado por el comité de ética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos.

Se les realizaron los siguientes procedimientos:

1. Antropometría: Medición de peso, talla, cálculo de IMC.
2. Fuerza muscular: se midió fuerza de ambos cuádriceps en una mesa de cuádriceps adosada a un transductor conectado a un computador. Se registró la fuerza máxima de 3 mediciones en cada extremidad. La fuerza muscular se expresó como valores absolutos (kg) y corregido por talla (kg/mt).
3. Área y calidad muscular con ecografía: Se midió con Ecógrafo Logiq e, General Electric. Con transductor fijado a frecuencia de 8 MHz y ganancia de 58 dB.
 - a. Se tomaron 3 imágenes consecutivas en el punto medio del muslo (medido entre espina ilíaca superior y borde superior de rótula) con sujeto acostado, en ambas piernas.
 - b. Estas imágenes fueron guardadas y analizadas posteriormente con programa Adobe Photoshop, donde se midió la altura del musculo recto femoral y la ecogenicidad de éste por histograma, escala de grises en rango de 0 a 255, a menor valor mayor contenido de agua, a mayor valor mayor contenido lipídico. Esta medición reproduce la descrita en diferentes trabajos [2,3,18].
 - c. Se analizaron las mismas imágenes 2 veces por el mismo observador y 3 veces por observadores distintos. El coeficiente de variación para las mediciones de ecogenicidad fue de 1.6 a 2.6% para cada observador. El coeficiente de correlación intraclase fue de 0.99, e interclase de 0.83.
4. Área y calidad muscular con tomografía computarizada: Éstas fueron realizadas en Clínica Alemana de Santiago.

a. Área muscular: Se midió el área transversal en ambos muslos, en un corte de 10 mm en el punto medio (punto de medición de ecografía muscular). El tejido adiposo subcutáneo fue separado del muscular para el análisis del área muscular, a través del dibujo de contornos determinados por la fascia profunda.

b. Coeficiente de atenuación muscular: Sujeto en decúbito supino, se realizó un corte transversal de 10 mm en ambas piernas en el punto medio entre la cresta ilíaca superior y la rótula. Se excluyó el tejido adiposo intermuscular para la medición. Se cuantifica en unidades Hounsfield [14,15], cuyo valor para lípidos se encuentra entre - 10 y -120 HU y entre +30 y + 50 HU para músculo y partes blandas. Es así como se espera un valor más bajo mientras más contenido lipídico tiene el tejido muscular.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se guardaron los datos en una planilla Excel, que una vez recolectados fueron analizados con programa Stata 12 para Windows. Se evaluaron las distintas variables según su distribución (normal o no normal) conforme al test de Shapiro Wilks. Las variables con distribución normal se analizaron con test de comparación de medias o ANOVA; las de distribución no normal, con test no paramétricos (Kruskall Wallis). Se realizó además correlación entre las variables con coeficiente de Pearson o Spearman según distribución. Para evaluar concordancia entre severidad de infiltración grasa muscular medida con ecografía y TAC se utilizaron test de Concordancia de Lin y de Bland y Altman.

Tamaño muestral

Debido a que no existen estudios en los que se analice la concordancia entre ecografía y TAC en cuanto a calidad muscular, se decidió estimar el tamaño muestral en base a la correlación observada entre ecogenicidad muscular (infiltración grasa) y fuerza muscular ($r = - 0.40$) [3]. Para encontrar una asociación similar, se necesitarán 62 sujetos, con un poder de 90% y un error menor al 5%.

RESULTADOS

Se obtuvo una muestra de 66 sujetos, 49 menores de 60 años, con un promedio de edad de 48 ± 9 años y 17 mayores de 60 años con un promedio de edad de 63 ± 4 años (60 – 74 años), todos adultos sanos, a los que se les realizaron pruebas de fuerza muscular, ecografía de recto femoral y TAC de muslo. Datos demográficos separados por edad y sexo se muestran en la Tabla 1. Datos de fuerza y resultados de ecogenicidad y densidad medida por Ecografía y TAC de muslo, respectivamente en tabla 2.

	Menores 60 años		Mayores de 65 años	Significancia
	Mujeres	Hombres	Mujeres	
N	36	13	17	
Edad (años)	52 (50 – 55)	46 (33.5 - 48.8)	62 (61 - 63.9)	todos \neq p menor a 0.006
IMC (kg/mt ²)	29.6 (28.3 - 31.1)	29.4 (27.9 - 30.2)	29.9 (28.6 - 31.9)	NS
Fuerza máxima cuádriceps derecho (kg)	306 \pm 51	423 \pm 78.6	303.7 \pm 63.4	b \neq a y c p 0.000
Fuerza máxima cuádriceps izquierdo (kg)	316 \pm 56	430 \pm 88.4	310 \pm 54.6	b \neq a y c p 0.000
Fuerza máxima mano derecha (kg)	23 \pm 4.2	43.7 \pm 7.7	24.6 \pm 4.8	b \neq a y c p 0.000
Fuerza máxima mano izquierda (kg)	21 \pm 4.3	40.8 \pm 8.1	22.2 \pm 4.1	b \neq a y c p 0.000
Densidad RF derecho (unidades escala de grises)	80 \pm 15.8	56 \pm 13.2	91.8 \pm 15	todos \neq p menor a 0.03
Densidad RF izquierdo (unidades escala de grises)	81 \pm 14.7	58.5 \pm 8.8	93.4 \pm 12.6	todos \neq p menor a 0.01
Altura RF derecho por Ecografía (mm)	19.6 \pm 3.3	26.3 \pm 4.3	18.9 \pm 2.5	b \neq a y c p 0.000
Altura RF izquierdo por Ecografía (mm)	19.7 \pm 2.85	28 \pm 4.1	19.4 \pm 2.6	b \neq a y c p 0.000
Densidad muslo por TAC (unidades Hounsfield)	47.9 \pm 4.05	51 \pm 3.7	45 \pm 4.4	b \neq c p 0.001
Área muscular por TAC (cm ²)	8.2 \pm 2.3	15.7 \pm 3.8	7.6 \pm 1.3	b \neq a y c p 0.000
Altura muscular por TAC (mm)	23 \pm 3.0	30 \pm 3.4	24 \pm 3.4	b \neq a y c p 0.000

Tabla 1: Datos demográficos, de fuerza muscular, resultados ecográficos y de TAC de cada grupo separado por sexo. Se expresa en mediana e intervalo de confianza en caso de distribución no paramétrica y promedio y desviación estándar en caso de distribución paramétrica.

Datos ecográficos:

Los datos en hombres jóvenes muestran mayor masa muscular (estimada por altura) y menor ecogenicidad. En mujeres se observa una disminución de la masa muscular con respecto a los hombres, pero sin variación por edad en este grupo. Con respecto a la ecogenicidad se observa un aumento continuo a medida que aumenta la edad.

Datos Tomográficos:

En cuanto a la altura y área muscular medida por TAC se observan los mismos resultados que obtenidos por ecografía en hombres jóvenes, esto es, hay mayor masa y mejor calidad muscular.

En el grupo de mujeres se mantiene la masa muscular a pesar de la edad y en este caso no se observa disminución significativa de la calidad muscular.

Relación entre edad y pérdida de fuerza y calidad muscular:

En el gráfico 1 y 2 se observa la relación lineal entre el aumento de la edad y la pérdida de fuerza y calidad muscular, medido tanto por ecografía, como por TAC.

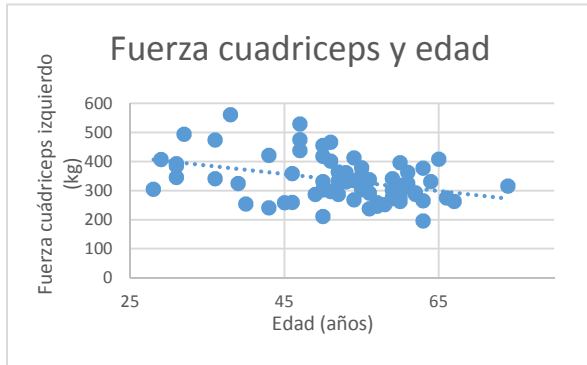


Gráfico 1: Relación entre edad en años, y fuerza de cuádriceps izquierdo (en kilos) en el grupo completo. $r -0.38$, $p 0.01$

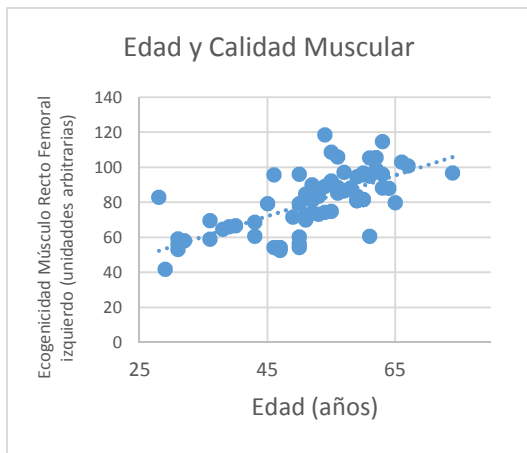


Gráfico 2: Relación entre edad en años y calidad muscular (en unidades arbitrarias de ecogenicidad) en el grupo completo. $r 0.67$, $p 0.000$.

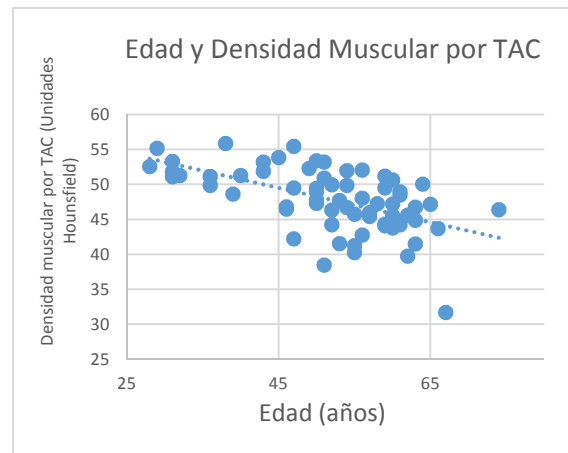


Gráfico 3: Relación entre la edad en años y calidad muscular (en Unidades Hounsfield por TAC) en el grupo completo. $r -0.56$, $p 0.000$.

En la tabla 2 se observan los coeficientes de correlación entre la fuerza de cuádriceps y de mano y las mediciones de ecogenicidad (calidad) muscular por ecografía y TAC. Se puede apreciar que a pesar de ser todas significativas en el grupo completo, los valores obtenidos por ecografía tendrían mejor correlación. Al analizar la distribución de la fuerza muscular según la calidad de este medido por ecografía, observamos que a pesar de no ser todos significativamente diferentes si se observa una tendencia clara hacia la disminución de la fuerza a medida que se deteriora la calidad muscular (gráfico 4). La misma tendencia, pero en menor grado se observa al analizar la calidad muscular por TAC.

	Densidad RF derecho	Densidad RF izquierdo	UH muslo	Area muscular por TAC
Fuerza máxima cuádriceps derecho	-0.43 P 0.0002	-0.47 P 0.0001	0.32 P 0.008	0.35 P 0.0036
Fuerza máxima cuádriceps izquierdo	-0.44 P 0.0002	-0.50 P 0.0000	0.36 P 0.0027	0.39 P 0.0011
Fuerza máxima mano derecha	-0.57 P 0.0000	-0.58 P 0.0000	0.38 P 0.0013	0.63 P 0.0000
Fuerza máxima mano izquierda	-0.60 P 0.0000	-0.62 P 0.0000	0.42 P 0.0004	0.61 P 0.0000

Tabla 2: Correlación y significancia entre variables ecográficas, tomográficas y de fuerza en el grupo completo.

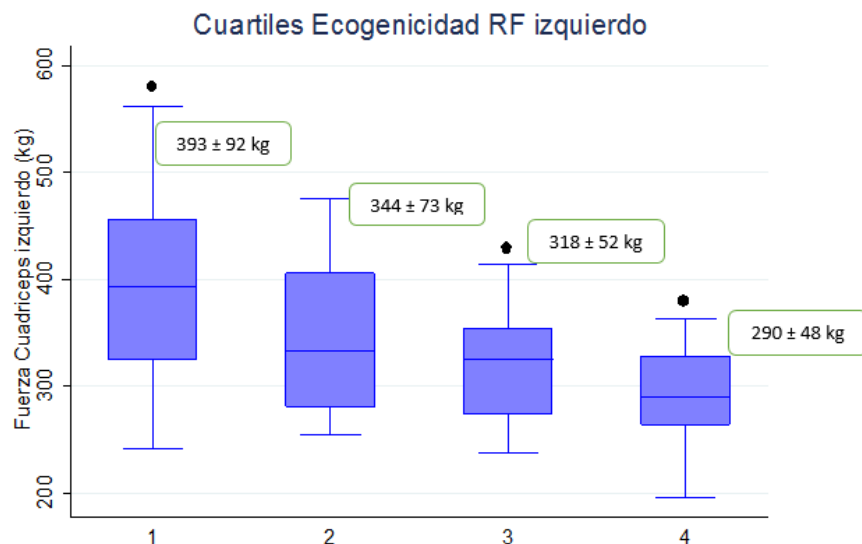


Gráfico 4: Ecogenicidad de RF izquierdo en cuartiles (1er cuartil: 56 ± 5.4 , 2do cuartil: 75 ± 4.8 , 3er cuartil: 87 ± 4.1 , 4to cuartil: 102 ± 7.1) comparado con fuerza de cuádriceps izquierdo. * $p < 0.01$.

Concordancia entre Ecografía y TAC:

En la tabla 3 se observa como la relación entre ambas mediciones de calidad muscular son significativas. Para confirmar esta relación se evaluó la concordancia entre ambas mediciones, para la medición de calidad muscular se transformaron los valores a Zscore, de esta manera los coeficientes de concordancia de Lin y Bland y Altman son mostrados en tabla 4.

	UH	Altura muscular por TAC	Área muscular por TAC
Densidad RF derecho	-0.54 P 0.000	-0.38 P 0.001	-0.56 P 0.000
Densidad RF izquierdo	-0.56 P 0.000	-0.42 P 0.0004	-0.56 P 0.000
Altura RF derecho	0.52 P 0.000	0.55 P 0.000	0.73 P 0.0000
Altura RF izquierdo	0.46 P 0.0001	0.57 P 0.000	0.65 P 0.0000

Tabla 3: Correlación y significancia entre variables ecográficas y por TAC.

		Densidad muscular por TAC en Unidades Hounsfield (Zscore)	Altura muscular por TAC (mm)
Coefficiente de Lin Bland y Altman	Densidad muscular Recto Femoral Izquierdo por ecografía (Zscore)	Rho 0.54 (0.37 – 0.71) p 0.000 0.0 ± 0.95 (-1.8 – 1.8)	-
Coefficiente de Lin Bland y Altman	Altura RF izquierdo (mm) por ecografía	-	Rho 0.50 (0.36 – 0.64) p 0.000 3.58 ± 3.5 (-3.3 – 10.4)

Tabla 4: Coeficiente de Lin y de Bland y Altman para la comparación entre Calidad Muscular medida por Ecografía y TAC (transformadas a Zscore), y la altura muscular medida por Ecografía muscular.

DISCUSIÓN

En este grupo de sujetos de diferente sexo y edad podemos observar una débil relación entre la medición de densidad muscular por Ecografía y Tomografía axial computarizada. La concordancia entre ambas no es la esperada (coeficiente de Lin menor a 0.8, pero Bland y Altman igual a 0), a pesar de ser la TAC el estándar de oro en la literatura.

No queda clara la causa de la falta de efecto mostrado, probablemente se debe a que la fuerza y función muscular está determinada por múltiples factores y no solo el envejecimiento o el sexo, ha sido reportado que la sarcopenia explicaría solo un 8% de la disminución de la fuerza en adultos mayores [19]. También queda por demostrar que es el que observamos con el aumento de la ecogenicidad o la disminución de la densidad muscular por TAC. ¿Es sólo aumento del contenido lipídico? ¿es aumento del contenido de colágeno?, y por otra parte ¿es el aumento del contenido lipídico siempre causal del deterioro de la fuerza muscular?

Sabemos que con el envejecimiento disminuye el contenido de agua y el turnover proteico, aumenta la fibrosis y el contenido lipídico de la célula muscular [20], también sabemos que por ejemplo en el grupo de deportistas el contenido lipídico también está aumentado y no en detrimento de la función si no muy por el contrario, como reserva energética [21].

Se ha evaluado en distintos trabajos en los últimos años el rol de la ecografía en determinar la calidad muscular, obteniéndose en todos resultados similares a los nuestros, asociaciones significativas, pero no excepcionales, a pesar de tener algunos de ellos una muestra mayor de pacientes [1, 2, 22, 23].

Lo que si queda claro con este estudio es que el rol de la tomografía axial y de la ecografía parece ir perdiendo fuerza como predictores de la funcionalidad muscular, que es lo que buscamos como objetivo ya que esto serviría para aplicarlo a la población general o de adultos mayores para prevenir envejecimiento y fragilidad, enfocándonos dados los escasos recursos en la población más susceptible de caídas.

Tanto hombres como mujeres disminuyen estas características al envejecer, como ha sido demostrado en algunos trabajos [22, 23, 24, 25], relacionándose claramente a una disminución de la fuerza y funcionalidad muscular.

Otro punto a evaluar es si estamos midiendo la calidad y fuerza muscular en los músculos correctos, se sabe que la fuerza de agarre de mano es predictor de morbimortalidad tanto en sujetos ambulatorios como hospitalizados [26, 27], no así la fuerza de cuádriceps. En nuestra muestra obtuvimos resultados similares al gráfico 4 con la fuerza de agarre de mano, y asociaciones similares. Según Addison [28], los músculos glúteos, tendrían mayor relación con la marcha y estabilidad, y principalmente los abductores estarían más asociados con las caídas en el adulto mayor. Por otro lado, la ecogenicidad del musculo vasto lateral sería el determinante de la fuerza muscular del cuádriceps, más que el recto femoral [25].

En resumen, en este trabajo no queda demostrado una buena concordancia entre la Ecografía y el TAC. Si queda claro que la calidad muscular objetivada por imágenes no determina en su totalidad la funcionalidad muscular. Queda pendiente para futuros estudios establecer si lo observado en imágenes es sólo contenido lipídico, porque al parecer estaríamos determinando una composición muscular diferente solamente.

REFERENCIAS

1. Frontera, W.R., et al., Skeletal muscle fiber quality in older men and women. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000. 279(3): p.611-8.
2. Arts, I.M., et al., Normal values for quantitative muscle ultrasonography in adults. *Muscle Nerve*, 2009. 41(1): p. 32-41.
3. Fukumoto, Y., et al., Skeletal muscle quality assessed from echo intensity is associated with muscle strength of middle-aged and elderly persons. *Eur J Appl Physiol*, 2011. 112(4): p. 1519-25.
4. Rolland, Y., et al., Treatment strategies for sarcopenia and frailty. *Med Clin North Am*, 2011. 95(3): p. 427-38, ix.
5. Abe T, Ogawa M, Loenneke JP, Thiebaud RS, Loftin M, Mitsukawa N. Relationship between site-specific loss of thigh muscle and gait performance in women: the HIREGASAKI study. *Arch Gerontol Geriatr*. 2012 Sep-Oct;55(2):e21-5
6. Nijboer-Oosterveld, J., N. Van Alfen, and S. Pillen, New normal values for quantitative muscle ultrasound: obesity increases muscle echo intensity. *Muscle Nerve*, 2011. 43(1): p. 142-3.
7. Kim, T.N., et al., Prevalence and determinant factors of sarcopenia in patients with type 2 diabetes: the Korean Sarcopenic Obesity Study (KSOS). *Diabetes Care*, 2010. 33(7): p. 1497-9
8. Bosma, M., et al., Re-evaluating lipotoxic triggers in skeletal muscle: relating intramyocellular lipid metabolism to insulin sensitivity. *Prog Lipid Res*, 2011. 51(1): p. 36-49.
9. Haus, J.M., et al., Intramyocellular lipid content and insulin sensitivity are increased following a short-term lowglycemic index diet and exercise intervention. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011. 301(3): p. E511-6.
10. Ingram, K.H., et al., Intramyocellular lipid and insulin resistance: differential relationships in European and African Americans. *Obesity (Silver Spring)*, 2011. 19(7): p. 1469-75.
11. Perseghin, G., et al., Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes*, 1999. 48(8): p. 1600-6.
12. Ville, H., et al., An evaluation of ultrasound and nuclear magnetic resonance spectroscopy to measure in vivo intramuscular fat content of longissimus muscle of pigs. *J Anim Sci*, 1997. 75(11): p. 2942-9.
13. Weis, J., et al., Lipid content in the musculature of the lower leg: evaluation with high-resolution spectroscopic imaging. *Magn Reson Med*, 2005. 54(1): p. 152-8.
14. Goodpaster, B.H., et al., Skeletal muscle attenuation determined by computed tomography is associated with skeletal muscle lipid content. *J Appl Physiol*, 2000. 89(1): p. 104-10.
15. Lang, T., et al., Computed tomographic measurements of thigh muscle cross-sectional area and attenuation coefficient predict hip fracture: the health, aging, and body composition study. *J Bone Miner Res*, 2010. 25(3): p. 513-9.
16. Howe, T.E. and J.A. Oldham, The reliability of measuring quadriceps cross-sectional area with compound B ultrasound scanning. *Physiother Res Int*, 1996. 1(2): p. 112-26.
17. Delaney, S., et al., Assessing contractile ability of the quadriceps muscle using ultrasound imaging. *Muscle Nerve*, 2010. 42(4): p. 530-8.
18. Noorkoiv, M., K. Nosaka, and A.J. Blazevich, Assessment of quadriceps muscle cross-sectional area by ultrasound extended-field-of-view imaging. *Eur J Appl Physiol*, 2010. 109(4): p. 631-9.
19. Delmonico MJ, Harris TB, Visser M, Park SW, Conroy MB, Velasquez-Mieryer P, Boudreau R, Manini TM, Nevitt M, Newman AB, Goodpaster BH; Health, Aging, and Body. Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration. *Am J Clin Nutr*. 2009 Dec;90(6):1579-85
20. Irving BA, Robinson MM, Nair KS. Age effect on myocellular remodeling: response to exercise and nutrition in humans. *Ageing Res Rev*. 2012 Jul;11(3):374-89.
21. Gemmink A, Bosma M, Kuijpers HJ, Hoeks J, Schaart G, van Zandvoort MA, Schrauwen P, Hesselink MK. Decoration of intramyocellular lipid droplets with PLIN5 modulates fasting-induced insulin resistance and lipotoxicity in humans. *Diabetologia*. 2016 May;59(5):1040-8
22. Berger J, Bunout D, Barrera G, de la Maza MP, Henriquez S, Leiva L, Hirsch S. Rectus femoris (RF) ultrasound for the assessment of muscle mass in older people. *Arch Gerontol Geriatr*. 2015 Jul-Aug;61(1):33-8.
23. Fukumoto Y, Ikezoe T, Yamada Y, Tsukagoshi R, Nakamura M, Takagi Y, Kimura M, Ichihashi N. Age-Related Ultrasound Changes in Muscle Quantity and Quality in Women. *Ultrasound Med Biol*. 2015 Nov;41(11):3013-7
24. Wilhelm EN, Rech A, Minozzo F, Radaelli R, Botton CE, Pinto RS. Relationship between quadriceps femoris echo intensity, muscle power, and functional capacity of older men. *Age (Dordr)*. 2014 Jun;36(3):9625

25. Rech A, Radaelli R, Goltz FR, da Rosa LH, Schneider CD, Pinto RS. Echo intensity is negatively associated with functional capacity in older women. *Age (Dordr)*. 2014;36(5):9708
26. Humphreys J, de la Maza P, Hirsch S, Barrera G, Gattas V, Bunout D. Muscle strength as a predictor of loss of functional status in hospitalized patients. *Nutrition*. 2002 Jul-Aug;18(7-8):616-20
27. Volaklis KA, Halle M, Thorand B, Peters A, Ladwig KH, Schulz H, Koenig W, Meisinger C. Handgrip strength is inversely and independently associated with multimorbidity among older women: Results from the KORA-Age study. *Eur J Intern Med*. 2016 Apr 20
28. Addison O, Young P, Inacio M, Bair WN, Prettyman MG, Beamer BA, Ryan AS, Rogers MW. Hip but not thigh intramuscular adipose tissue is associated with poor balance and increased temporal gait variability in older adults. *Curr Aging Sci*. 2014;7(2):137-43.