

RELACIÓN POROSIDAD DESCALCIFICACIÓN EN MUESTRAS OSEAS EMPLEANDO PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Fernando Ireta M¹. Eduardo Morales S². Adrián González P¹. Bárbara González R¹
Jesús Martínez P¹. F. Israel Ireta Muñoz¹. Rogelio Castro S¹.

¹División de Ingenierías campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato
Carretera Salamanca-Valle de Santiago Km 3.5+1.8, Salamanca, Gto. Mexico
Tel: (464) 6479940 ext: 2351 Fax: ext:2311

²Cicata IPN Qro., Instituto Politécnico Nacional
Cerro Blanco No. 141 Col. Colinas de Cimatario, Querétaro, Qro. México
Tel: (442)2290804

fireta@ugto.mx

RESUMEN

La técnica de Tomografía de Impedancia Eléctrica (TIE) en su aplicación para determinar la relación de porosidad con la pérdida de calcio en muestras óseas descalcificadas, es necesario relacionar el porcentaje de porosidad con la pérdida de calcio; que a su vez es proporcional a la impedancia eléctrica. Por tanto se reporta la técnica aplicada en la descalcificación y el empleo de procesamiento de imágenes para determinar la porosidad a fin de obtener la grafica de porosidad contra perdida de calcio, dado que en trabajos anteriores la porosidad se determina empleando métodos químicos, y la descalcificación por medio de contraste de imágenes empleando rayos X y ultrasonido. El objetivo de este proyecto es comprobar que es factible emplear el procesamiento de imágenes y relacionarlo con la perdida de calcio lo cual es un método más económico que los empleados con rayos X y ultrasonido, ya que en un proyecto futuro este dato es necesario para relacionarlo con la osteoporosis como lo interpreta un medico en un estudio de Rayos X o ultrasonido.

Palabras Clave: porosidad, descalcificación, óseas

ABSTRACT

To determinate porosity's relation of calcium loss in the electric impedance tomography technical, in bones samples is necessary to relation the porosity with the calcium loss which is proportional with electric impedance; however this decalcification technology is applied in image processing to determine the porosity and to obtain a porosity graphic versus loss calcium. The objective of this project is to verify that it is feasible to use image processing and relate to the loss of calcium which is more economical than employees with X-rays and ultrasound method, so we will be able to relation this behavior with osteoporosis person in a future project.

Keywords: porosity, decalcification, bones

1. INTRODUCCIÓN

En la División de Ingenierías de la Universidad de Guanajuato se desarrolla la técnica del empleo de espectroscopia y tomografía de impedancia eléctrica aplicada al estudio de muestras óseas, las cuales son descalcificadas en forma controlada, a fin de que este proceso simule el proceso de descalcificación que es la osteoporosis en huesos; dicha enfermedad ocasiona que al perder los seres humanos un porcentaje de calcio en los huesos, estos se vuelven más frágiles ocasionando que el hueso se haga más poroso perdiendo resistencia mecánica y aumentando el riesgo de sufrir fracturas conforme se incrementa los años de vida, por tanto es importante relacionar la perdida de calcio con la osteoporosis.

Se han realizado estudios en los cuales se relaciona este porcentaje de porosidad con la perdida de calcio en muestras óseas de forma indirecta empleando la técnica de ultrasonido[5] relacionando el BMD(bone mineral density) con el contraste de la imagen, o empleando rayos X y el nivel de DXA(dual energy x-ray absorptiometry) [6] que son estudios costosos por los equipos empleados

1.1 Preparación de muestras

Se cortaron 30 muestras de aproximadamente 1mm de espesor de hueso de puerco de la parte superior de la pierna, ya que el hueso de puerco es lo más parecido al hueso humano [1] la Figura 1(a) muestra una de ellas, dicha muestra hay que limpiarla quitándole los residuos de carne y cartílago para someterlos a un proceso de limpieza con agua durante varios días en la Figura 1(b) se aprecia la muestra ya limpia, a continuación se someten a un proceso controlado de descalcificación con una solución acida a diferentes intervalos de tiempo, al finalizar se retira la muestra y en el vaso de precipitado quedara el calcio mezclado con la solución descalcificante.

2. DESARROLLO

Para simular el proceso de descalcificación se empleó una solución que ataque el calcio, la solución usada para llevar a cabo la descalcificación es una solución ácida[2], la cual debe cumplir que no resulte ser muy agresiva con el hueso. Esta característica fue encontrada en una solución compuesta de ácido clorhídrico (HCl) y formol a las siguientes concentraciones:

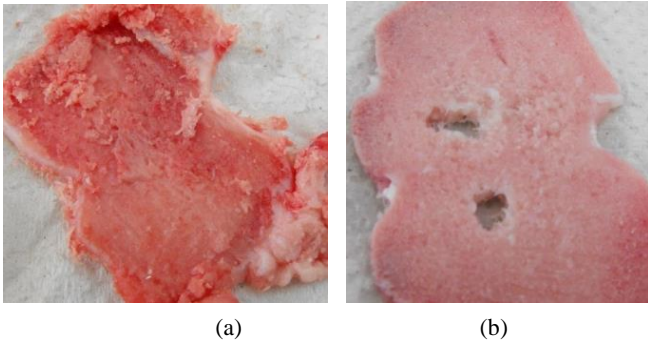


Figura 1. Muestra de hueso(a), muestra limpia(b)

10% en volumen de Formol (CH_2O) = 10 ml

0.01% de HCL (concentrado) = .002 ml

esta solución se distribuyó por igual cantidad en 30 vasos de precipitado, el procedimiento para la descalcificación fue:

- Se dejó una muestra sin descalcificar (0%),
- Cada muestra se dejó descalcificando 6 horas más que su predecesora hasta completar 30 muestras, la última tendría 180 hrs de descalcificación.

Cada muestra al finalizar el proceso de descalcificación fue lavada con agua destilada y sometida a un proceso de secado a la temperatura de 25 °C en la Figura 2(a) se aprecia la muestra antes del proceso de descalcificación y en la Figura 2(b) después de 30 horas de descalcificación en donde se ve el incremento del tamaño en los poros del hueso.

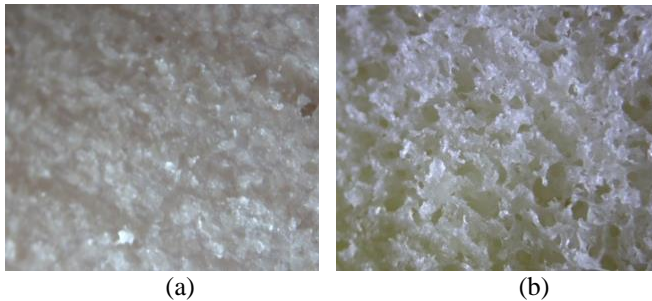


Figura 2. Muestra de hueso antes de descalcificar (a), después de 30 hrs de descalcificación (b)

2.1 Cálculo del calcio perdido por muestra

Una vez obtenidas las muestras descalcificadas, la pérdida de calcio fue cuantificada mediante el análisis químico del residuo de la solución descalcificante, la cual contiene iones de calcio (Ca^{+2}), se toma una cantidad medida de la solución que contiene los iones de calcio, se agregan tres

gotas de ácido clorhídrico concentrado al 98 %, luego se añaden gotas de rojo de metilo hasta que se viere el color a rojo en la solución. Después esta es calentada a 30 °C, y se agregan alternativamente una gota de oxalato de amonio y otra de amoniaco hasta que la solución viere de color rojo al amarillo. El objetivo de calentar la solución a 30 °C es para evaporar el amoniaco y con ello se forme el cloruro de calcio. Seguidamente, se deja enfriar la solución durante dos horas, al término de este tiempo se forma un precipitado de oxalato de calcio, mostrado en la Figura 3.



Figura 3. Precipitado de oxalato de calcio

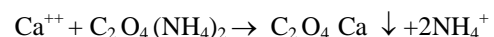
La solución de oxalato de calcio es filtrada con un filtro No. 40 con el objetivo de realizar una medición precisa, el papel de filtro que contiene al oxalato de calcio es colocado en un crisol y llevado al horno para calcinarse a una temperatura de 500 °C, y obtener carbonato de calcio la Figura 4(a) nos muestra el proceso de calcinación y la Figura 4(b) los residuos obtenidos.



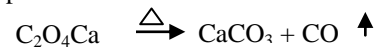
Figura 4. Proceso de calcinación(a), residuos de carbonato de calcio (b)

Las reacciones químicas para la obtención del carbonato de calcio son:

Reacción para obtener oxalato de calcio



Reacción para obtener el carbonato de calcio.



El proceso de cuantificación del calcio se realiza calculando la masa del crisol (vacío) el cual debe haber sido limpiado y secado hasta obtener su peso constante y después de la

calcinación, la diferencia entre ambas masas corresponde a la cantidad de carbonato de calcio. Para calcular la cantidad de calcio contenida en el carbonato de calcio, la masa obtenida de carbonato es multiplicada por un factor para calcio(1), el cual se calcula mediante la relación del peso atómico del calcio y el peso molecular del carbonato de calcio, de la forma siguiente:

$$\text{Factor}_{\text{Ca}} = \frac{\text{PM Ca}}{\text{PM Ca CO}_3} = \frac{40.08}{100.08} = 0.4005 \quad (1)$$

Por ejemplo para la muestra M6 después de la calcinación y descontando el peso del crisol se obtienen 0.0777 g de CaCO_3 , para determinar la cantidad de calcio se multiplica por el factor calcio 0.4005 resultando 0.0311 g de Ca^{+2} en la tabla I se muestra la masa de calcio perdida para cada una de las muestras usadas.

Como se puede observar a medida que aumenta el tiempo de descalcificación aumenta la cantidad de calcio cuantificada en cada muestra ósea, la muestra 1 tuvo menor tiempo de exposición que la muestra siguiente y así sucesivamente.

3. POROSIDAD EN MUESTRAS OSEAS

Como se aprecia en la Figura 2(b) hay una gran cantidad de poros de diferentes tamaños distribuidos de forma no uniforme en toda la muestra, y como estas se emplearan para un estudio de espectroscopia es necesario uniformizar la porosidad, para tal efecto molió cada muestra en un mortero para tal fin y así obtener dichas muestras para los estudios de espectroscopia y determinación de porosidad.

De las diferentes técnicas empleadas para calcular la porosidad se empleo la técnica de análisis de imagen la cual consiste en obtener con cierto nivel de iluminación la imagen con un microscopio y aplicar diferentes filtros y niveles de umbral[3]

3.1 Filtrado para resaltar los poros

El tamaño de la imagen capturada con el microscopio se recorta a un valor de 770×670 pixeles, en tonos de gris donde se considera un valor de 0=negro y 255=blanco, en este método de procesamiento digital de imágenes, para resaltar los contornos de los poros, se emplea un filtro tipo Canny, el resultado de aplicar este filtro a la imagen original da como resultado una imagen en donde se resalta el contorno[4] de los poros, esto nos ayuda para determinar en que partes de la imagen tendremos poros Figura 5(a), en la imagen original convertida a niveles de gris y en base a las características morfológicas de la imagen se estima una imagen de fondo (background), con un nivel de iluminación el cual se resta de la imagen original para resaltar los poros, como es una imagen muy oscura, se incrementa su nivel de contraste con la función `imadjust` del software Matlab, la cual aumenta el contraste de la imagen mediante la saturación del 1% de los datos, dado que esta imagen es oscura para obtener una imagen en blanco y para apreciar los poros se ajustó esta imagen con un valor de nivel de umbral de 0.05(threshold) en el nivel de

gris, y la imagen resultante se muestra en la Figura 5(b), en la cual se aprecian los poros cuyos contornos se resaltaron en la Figura 6(a) con el filtro Canny, todas las imágenes se analizaron con los mismos ajustes.

3.2 Determinación del porcentaje de porosidad

Para determinar el porcentaje de porosidad se empleo el siguiente programa implementado en Matlab:

```
% porosidad en muestras óseas
% la imagen es de 770X670 pixeles
close all;
%leer la imagen del archivo esta en color
im = imread('IM15.jpg');
figure(1),imshow(im)
I = rgb2gray(im); % convierte a gris (0 a 255)
figure(2),imshow(I)
```

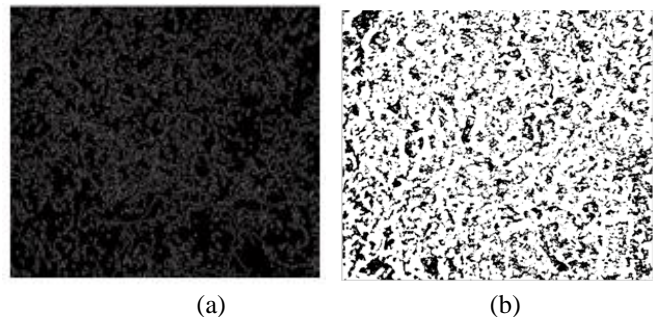


Figura 5. Aplicación filtro Canny(a), poros resaltados con valor de umbral de gris 0.05(b)

Tabla I. perdida de calcio de las 30 muestras

Muestra	Descalcificación (hrs)	Pérdida de Calcio (gr)
1	6	0.02366
2	12	0.0283
3	18	0.02895
4	24	0.02955
5	30	0.03003
6	36	0.0311
7	42	0.03183
8	48	0.03336
9	54	0.03348
10	60	0.0338
11	66	0.03396
12	72	0.034
13	78	0.0351
14	84	0.0352
15	90	0.03592
16	96	0.0368
17	102	0.0378

18	108	0.0384
19	114	0.0404
20	120	0.04101
21	126	0.0448
22	132	0.0451
23	138	0.0452
24	144	0.0469
25	150	0.04722
26	156	0.04804
27	162	0.04971
28	168	0.05102
29	174	0.05501
30	180	0.05603

```
%filtro canny
BW2 = edge(I,'canny');
figure(3),imshow(BW2)
% Display the Background as a Surface
background = imopen(I,strel('disk',15));
figure(4),imshow(background)
% resta original (I) de fondo (background)
% detectar lo superficial eliminando el fondo
I2 = imsubtract(I,background);
figure(6),imshow(I2)
I3 = imadjust(I2); % ajusta el nivel de gris
figure(7),imshow(I3);
%level = graythresh(I3);
%bw = im2bw(I3,level);
bw = im2bw(I3,0.05); % resaltar los poros
figure(8),imshow(bw)
b=bw
for i=1:1:670,
% Imagen de 393X476 (1,1) (770,1)
% coordenadas (1,670) (770,670)
d = sum(b(i,:)); db(i) = d; % suma una línea
end
T = sum(db)/1; %
T;
R=T*(100)/515900;
P=(100-R);
R;
P;
% 100% = 770X670=515,900.00
%por tanto los 1 (unos) de la matriz son:
% en % X=T(100)/515,900.00
% y la porosidad o (ceros) sera 100%-X%= % porosidad
```

En la Tabla II se dan los resultados del porcentaje de porosidad para las treinta muestras descalcificadas

4. Resultados

De los resultados de la Tabla I y II se obtiene la grafica de porcentaje de Porosidad contra perdida de calcio en gramos mostrada en la Figura 6.

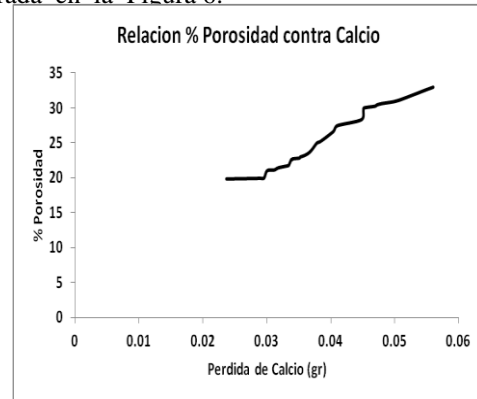


Figura 6. Grafica de porcentaje de porosidad contra pérdida de calcio dada en gramos

Tabla II. % de porosidad de las 30 muestras

Muestra	% Porosidad
0	19.5571
1	19.8564
2	19.9335
3	19.9534
4	19.9893
5	21.0384
6	21.1234
7	21.4567
8	21.7656
9	21.9324
10	22.6057
11	22.6123
12	22.7345
13	22.8456
14	22.9956
15	23.2369
16	23.7856
17	24.9834
18	25.2343
19	26.6543
20	27.4769
21	28.3423
22	29.6543
23	30.0231
24	30.2712
25	30.4563
26	30.6523
27	30.8965

28	31.2454
29	32.6513
30	32.9882

Proceedings of 2010 International Conference on Systems in
 Medicine and Biology, IIT Kharagpur, India

5. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos de la Figura 6 se concluye que se mantiene una relación aproximadamente proporcional y aproximadamente lineal del porcentaje de porosidad con respecto a la pérdida de calcio, se comprueba que es factible emplear la técnica de análisis de imágenes para determinar la porosidad ya que la aplicación de otro método es muy costoso y no se obtiene la pérdida en gramos del calcio de las muestras usadas en dichos estudios. Este resultado es importante porque la continuación de este proyectos seria obtener la relación matemática de pérdida de calcio con respecto al porcentaje de descalcificación y relacionarlo con la variación de impedancia eléctrica de la muestra ósea, para en un proyecto futuro encontrar la relación de estos valores con los datos que un medico puede interpretar de los obtenidos en un estudio de densitometria ósea por medio de ultrasonido o de rayos X, dado que los estudios realizados actualmente de ultrasonido y rayos X se realizan con personas de diferentes edades, para nuestro caso se simula la edad con el tiempo de descalcificación; por tanto en otro proyecto a futuro es necesario encontrar la relación tiempo de descalcificación porosidad con la edad de las muestras óseas en huesos humanos y determinar este parámetro.

6. Referencias

- [1] Guyton CA & Hall JH(2004): *Tratado de fisiología médica*, McGraw-Hill, 10ª, México,2004. ISBN 970-486-0322-2
- [2] Ramzi S.(1999): Cotran, Vinay Kumar: Robbins, Patología estructural y funcional, 6ta edición 1999, Mac Graw Hill Interamericana
- [3] Ireta Moreno F., “Determinación de porosidad en muestras óseas descalcificadas empleando análisis de imágenes”, Congreso Electro/ 2012, Chihuahua, Chihuahua.
- [4] J. Canny. A Computational Approach to Edge Detection, IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 8(6), pp. 679-698 (1986).
- [5] Samar Dev maletia, Kribakaran Venkatesan, Savita Rana, M. Anburajan. Screening Rural and Urban Indian Population for Osteoporosis Using Heel Ultrasound Bone Densitometer, International Conference on Communication Systems and Network Technologies (2011)
- [6] Shankar N., Sapthagirivasan V., Vijay A., Kirthika K., Anburajan M. Evaluation of Osteoporosis Using Radiographic Hip Geometry, Compared with Dual energy X-ray absorptiometry (DXA) as the Standard,