

USO DE MAPAS DE DISTANCIA EN LA SEGMENTACIÓN DE IMÁGENES PROVENIENTES DE GELES DE ADN

MIGUEL ÁNGEL SOTAQUIRÁ GUTIÉRREZ

Profesor

Departamento de Ingeniería Eléctrica y Electrónica

Universidad del Norte

e-mail: miguel_sotaquirá@yahoo.com

ARTURO PLATA GÓMEZ

Profesor

Escuela de Física

Universidad Industrial de Santander

e-mail: aplata@uis.edu.co

JAIME GUILLERMO BARRERO PÉREZ

Profesor Asociado

Escuela de Ingenierías Eléctrica, Electrónica y de Telecomunicaciones

Universidad Industrial de Santander

Grupo CEMOS (Grupo de Investigación en Control Electrónico Modelado y Simulación)

e-mail: jbarrero@uis.edu.co

RESUMEN

El análisis de geles de ADN es de gran importancia en estudios de genética poblacional y en el diagnóstico de enfermedades de carácter genético. El objetivo principal de dicho análisis consiste en la estimación del tamaño (medido en pares de bases) de todos o algunos fragmentos de ADN presentes en el gel, procedimiento que hasta el momento es llevado a cabo de forma manual en el Laboratorio de Genética de la UIS.

El presente artículo describe un método, basado en técnicas de procesamiento digital de imágenes, que permite automatizar los procesos de segmentación y detección de bandas (o fragmentos de ADN) en la imagen digital correspondiente, haciendo uso de procedimientos como el cálculo de la autocorrelación y los mapas de distancia. Se trata de un procedimiento nuevo, más robusto y preciso en comparación con trabajos anteriores y que ofrece además un desempeño igual, y en algunos casos superior, al ofrecido por algunos sistemas de carácter comercial.

PALABRAS CLAVE: Geles de ADN, electroforesis, mapas de distancia, autocorrelación, procesamiento digital de imágenes.

ABSTRACT

DNA gels analysis plays an important role in the genetics of population and genetic disorders diagnosis studies. The main purpose of this procedure is to determine the size (measured in base pairs) of every fragment, or at least some of them, of DNA present in the gel, a process which until now, is carried out manually in the Genetics Laboratory of the Universidad Industrial de Santander.

This paper describes a procedure, based on digital image processing techniques, that leads to segmentation and bands (DNA fragments) detection on the digital image, previously acquired, with the help of procedures such as autocorrelation and distance maps estimation. This procedure is a completely new approach to DNA electrophoresis gels analysis; the algorithm is more robust and precise than previous works developed, and it also offers the same (and sometimes better) performance offered by some commercial software evaluated.

KEY WORDS: DNA gels, electrophoresis, distance maps, autocorrelation, digital image processing.

INTRODUCCIÓN

Un gel de ADN se obtiene tras exponer fragmentos, de diferente tamaño, de una molécula de ADN a la acción de un campo eléctrico de determinada intensidad. El movimiento de los fragmentos se lleva a cabo a través de una sustancia gelatinosa que, precisamente, favorece su desplazamiento. Como resultado, los fragmentos serán organizados de acuerdo, entre otros parámetros, a su tamaño molecular[1] (así, en la Figura 1 los fragmentos de mayor tamaño se encuentran cerca del eje x y aquellos de menor tamaño están en la parte inferior de la imagen). La electroforesis es por tanto un procedimiento que permite separar los fragmentos de ADN presentes en una muestra determinada y organizarlos de forma descendente (de arriba hacia abajo) de acuerdo a su tamaño.

Se distinguen dos parámetros de interés en un gel de ADN: los carriles, correspondientes a las "columnas" presentes en la imagen, y que para el caso de la Figura 1 son siete en total, y las bandas, aquellos rectángulos de tonalidad brillante, presentes en todos y cada uno de los carriles.

El laboratorio de Genética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, cuenta con equipo especializado en llevar a cabo el proceso de electroforesis. En este caso, el análisis de los resultados observados en los geles de ADN es de utilidad en variedad de investigaciones: el diagnóstico de enfermedades o el desarrollo de nuevos tratamientos para las mismas, así como la determinación de los segmentos de ADN (genes) que están involucrados en el desarrollo de una enfermedad. El proceso llevado a cabo tras obtener el gel de ADN consiste en determinar el tamaño (medido en cantidad de pares de bases) de uno o más fragmentos presentes en él. Para ello, se introduce una muestra estándar, donde el tamaño de todos y cada uno de los fragmentos presentes en la misma es conocido (en el caso de la Figura 1, la muestra estándar corresponde al primer carril, al lado izquierdo de la imagen). Posteriormente, se exponen las muestras (gel) a la acción del campo eléctrico para así adquirir una imagen completamente digital (similar a la de la Figura 1). Finalmente, y de manera completamente manual, se estima la ubicación (coordinada y) del fragmento, o fragmentos, de interés y se determina su tamaño aproximado con base en la ubicación de los fragmentos (bandas) en el carril estándar (aquellas bandas del carril estándar que posean una coordenada y y cercana al fragmento de interés, permitirán obtener el tamaño aproximado del mismo).

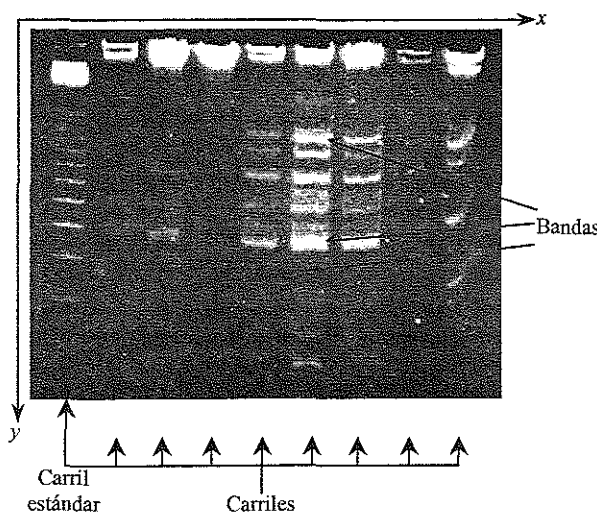


Figura 1. Un gel de ADN típico y sus características de interés.

Dentro del trabajo realizado se diseñó un sistema computacional semiautomático que permite la adquisición de la imagen junto con la posterior estimación del tamaño de todos y cada uno de los fragmentos presentes en el gel, para lo cual se utilizaron técnicas de procesamiento digital de imágenes. A continuación se describe el algoritmo implementado en la etapa central del análisis, involucrada en la estimación del tamaño de los fragmentos: la segmentación de carriles y la detección de bandas. El método implementado es nuevo, en comparación con aquellos que tradicionalmente se usan en la segmentación de la imagen.

ALGORITMOS UTILIZADOS CONVENCIONALMENTE EN LA SEGMENTACIÓN DE LA IMAGEN

La etapa de segmentación consiste básicamente en determinar la frontera entre uno y otro carril. Para ello, se calcula la proyección de la imagen sobre el eje horizontal [2],[3],[4],[5],[6], tal como se ilustra en la Figura 2.

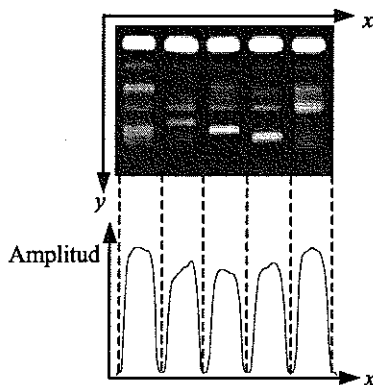


Figura 2. Un gel de ADN y su correspondiente proyección sobre el eje x .

Se observa una perfecta coincidencia entre los mínimos locales de la proyección y la ubicación de la frontera entre uno y otro carril. De esta forma, y tras la aplicación de un algoritmo detector de mínimos (basado, por ejemplo, en el uso de primeras o segundas derivadas), es posible estimar la posición correcta de dichos mínimos locales (es decir, su coordenada x). El método usado en la estimación de la proyección sobre el eje horizontal consiste en la simple suma por columnas de la imagen original.

La siguiente etapa, detección de las bandas, consiste en evaluar la proyección de cada carril sobre el eje vertical. Tal como lo ilustra la Figura 3, los máximos locales de dicha proyección tienen una correspondencia uno a uno con las bandas en cada carril. En contraste con la segmentación

de carriles, la obtención de las bandas requiere el cálculo de la proyección a partir de la suma por filas de la imagen correspondiente a cada carril.

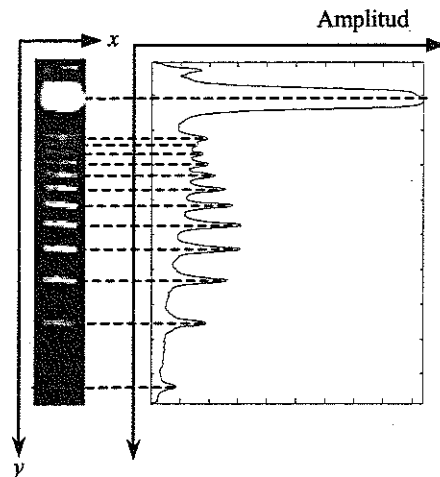


Figura 3. Un carril y su correspondiente proyección sobre el eje y .

Es precisamente el cálculo de estas proyecciones, sobre los ejes horizontal (x) y vertical (y), la que impone ciertas restricciones sobre la imagen original, restricciones que desmejoran el desempeño y precisión de dichos algoritmos. Esto se debe esencialmente a que la preparación del gel, llevada a cabo por personal del laboratorio, es completamente manual y, por tanto, es imposible asegurar que el 100% de los experimentos arrojen como resultado carriles completamente verticales (y , por tanto, bandas completamente horizontales), lo cual implica que:

- La suma por columnas de la imagen, involucrada en la segmentación de carriles, requiere que la orientación de los mismos sea completamente vertical, de lo contrario la proyección arrojará resultados erróneos, como la desaparición de algunos mínimos locales y por tanto la incorrecta segmentación de los carriles.
- La suma por filas de la imagen correspondiente a cada uno de los carriles, y que es útil en la determinación de la ubicación de las bandas, requiere que estas tengan una orientación perfectamente horizontal, requisito que impone, al igual que en el caso anterior, restricciones sobre la orientación de la imagen (se debe tener en cuenta que la orientación de los carriles es perpendicular a la de las bandas: si los carriles dejan de ser completamente verticales, se puede inferir que las bandas no poseen una orientación perfectamente horizontal).

Se concluye entonces que la incorrecta estimación de los ejes principales de la imagen (que a partir de ahora serán designados como x' , y') puede arrojar resultados erróneos en la etapa de detección de bandas y, por consiguiente, el tamaño de los fragmentos de ADN no será estimado adecuadamente. Se hace necesario entonces determinar la correcta orientación de dichos ejes. Esta orientación fue obtenida por medio del uso de la imagen de autocorrelación[7] y un procedimiento iterativo que permite el cálculo de la orientación del eje x' con respecto al eje x convencional, tal como se ilustra en la Figura 4:

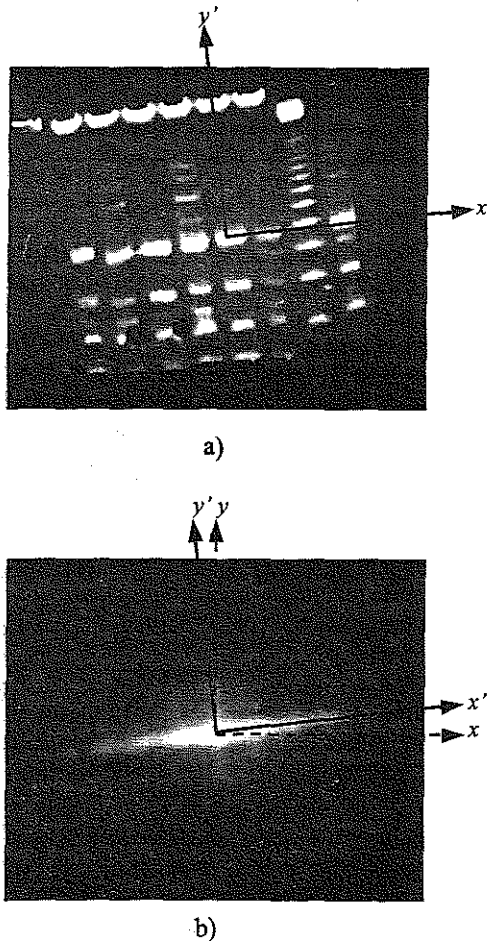


Figura 4. Un gel de ADN (a) y su imagen de autocorrelación (b), ilustrando la relación existente entre sus ejes principales (x' , y') y los ejes cartesianos convencionales (x , y)

El conocimiento de la orientación correcta de los ejes principales de la imagen permite evaluar de forma adecuada las proyecciones sobre los ejes x' e y' (los ejes principales de la imagen), necesarias en la segmentación de los carriles y la detección de las bandas. Es esta etapa, junto con la estimación de los ejes principales de la imagen, la que marca una diferencia notable con respecto a los trabajos realizados hasta el momento.

MAPAS DE DISTANCIA

Son útiles en la estimación de la proyección de la imagen sobre los ejes x' e y' . Se pueden definir de la siguiente manera: dada una imagen binaria con valor 0/1 (que recibe el nombre de marcador), la transformada de distancia aplicada a dicha imagen binaria resulta en una imagen en escala de grises, donde cada pixel representa la mínima distancia entre el fondo (pixel con valor 0) y el pixel con valor 1 más cercano[8]. Así por ejemplo, si en la Figura 5 se asume que la imagen binaria tiene un tamaño 10×10 y que el marcador es la línea diagonal de color negro, entonces la distancia mínima existente entre el pixel de tonalidad gris y dicha línea es la ilustrada:

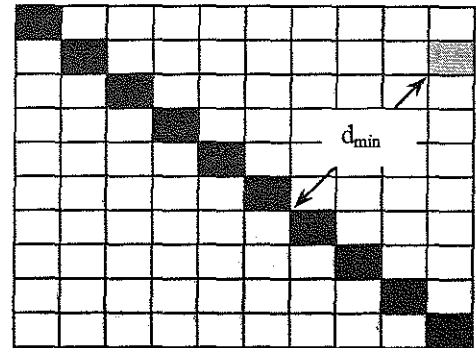


Figura 5. Ilustración del concepto "distancia mínima" existente entre un punto de la imagen y el marcador.

Esta distancia puede ser medida con base en diferentes métricas, de las cuales las de uso más extendido son:

$$\text{City - Block} \quad d_{min} = |x_1 - y_1| + |x_2 - y_2|$$

$$\text{Chessboard} \quad d_{min} = \max\{|x_1 - y_1|, |x_2 - y_2|\}$$

$$\text{Euclidiana} \quad d_{min} = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2}$$

donde se asume que (x_1, y_1) son las coordenadas de un punto cualquiera de la imagen y (x_2, y_2) son las coordenadas de un punto que pertenece al marcador y que a la vez es el más cercano a (x_1, y_1) . Las dos primeras métricas (City-Block y Chessboard) arrojan como resultado una distancia entera, mientras que la métrica Euclidiana permite obtener una distancia que, por lo general, es un número irracional.

La mayor parte de los algoritmos implementados hacen uso de una técnica de tratamiento de imágenes conocida como Morfología Matemática[9]. Para el caso del algoritmo implementado, la métrica usada es City-Block (por razones que se expondrán más adelante).

SEGMENTACIÓN DE CARRILES Y DETECCIÓN DE BANDAS CON BASE EN LOS MAPAS DE DISTANCIA

Si bien la proyección de carriles y bandas perfectamente verticales y horizontales puede ser calculada como la simple suma por columnas y filas, se puede preguntar ¿cómo evaluar dicha proyección cuando los carriles dejan de ser completamente verticales? Para ello es necesario evaluar dos mapas de distancia, cada uno de ellos con base en dos marcadores, que serán imágenes binarias correspondientes a líneas rectas paralelas a los ejes principales de la imagen: x' e y' . Se describen a continuación las características de los mapas de distancia utilizados, junto con el algoritmo

implementado en la evaluación de la proyección sobre el eje x' (útil en la segmentación de los carriles).

CARACTERÍSTICAS DE LOS MAPAS DE DISTANCIA UTILIZADOS

En el trabajo desarrollado se obtuvieron dos mapas de distancia, correspondientes precisamente a dos marcadores: uno paralelo al eje x' y el otro paralelo al eje y' . Con propósitos puramente ilustrativos se asumirá un marcador como el de la Figura 5 (en este caso el marcador es una imagen binaria con una línea diagonal) donde se ilustran además sus respectivos mapas de distancia con las diferentes métricas descritas anteriormente.

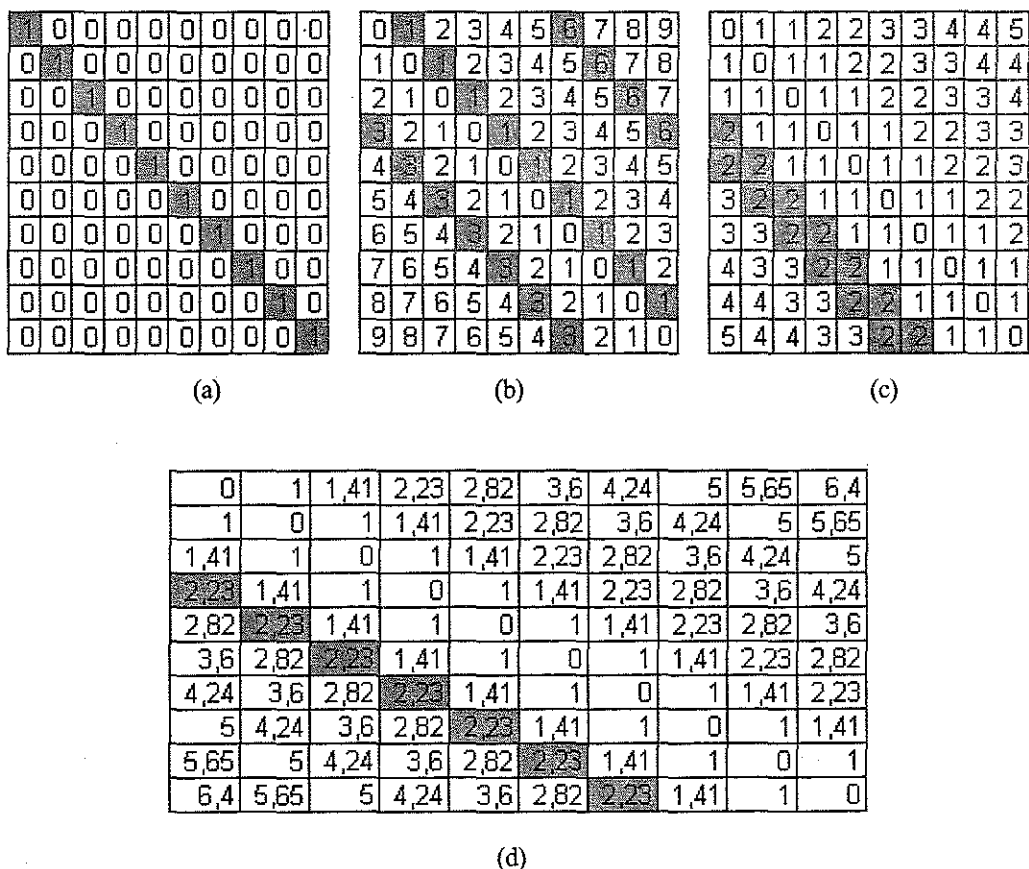


Figura 6. Un marcador (a) y sus correspondientes mapas de distancia usando diferentes métricas: b) City-Block, c) Chessboard, d) Euclidian.

Existen diferencias marcadas entre una y otra métrica. Para visualizar claramente este aspecto, se han sombreado algunas zonas de los mapas de distancia (Figuras 6b, 6c y 6d). Por ejemplo, en la Figura 6b, las zonas del mapa de distancia iguales a 6, 1 y 3 han sido sombreadas. Se puede apreciar que para cada uno de estos valores se tienen en últimas tres líneas paralelas al marcador inicial (cada una

correspondiente a un valor diferente: 6, 1 y 3). No ocurre lo mismo en la Figura 6c, donde zonas del mapa con el mismo valor (en este caso la zona sombreada corresponde a ubicaciones iguales a 2) no necesariamente equivalen a una sola línea paralela al marcador (en lugar de ello, se trata de dos líneas paralelas al marcador). La Figura 6d permite observar que el mapa de distancias euclidianas genera

grupos de líneas paralelas al marcador inicial; la diferencia en este caso con respecto a la métrica *City-Block* radica en que cada línea corresponde a un número irracional dentro del mapa de distancias.

Se concluye entonces que, para el caso de la métrica *City-Block*, el mapa de distancias equivale a un grupo de líneas paralelo al marcador inicial, donde cada línea comparte el mismo valor entero. Se debe observar, sin embargo, que a lado y lado de la diagonal principal del mapa (con valores

iguales a cero) se tienen líneas de igual valor (observar por ejemplo que existe una línea con valores iguales a 1 por encima y por debajo de dicha diagonal). Se debe llevar a cabo un proceso de normalización, donde cada línea cuente con un conjunto único de valores. Para ello, se determina precisamente cuáles líneas están por debajo del marcador (en este caso la diagonal principal) y cuales están por encima del mismo. El proceso de normalización asigna un valor único a cada línea, de forma ascendente, tal como lo ilustra la Figura 7.

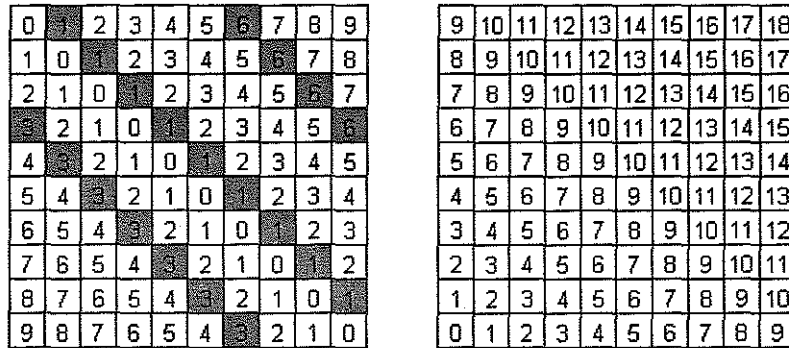


Figura 7. Mapa de distancias con métrica *City-Block* sin normalizar (izquierda) y normalizado (derecha)

CÁLCULOS DE LAS PROYECCIONES SOBRE LOS EJES X' E Y'

Se observa que el mapa normalizado posee líneas paralelas al marcador inicial, cada una de ellas con valores que van desde cero (en la esquina inferior izquierda) hasta un máximo determinado (en este caso 18, en la esquina superior derecha).

La segmentación de carriles requiere el uso del mapa cuyas líneas sean paralelas al eje y' . Dicha proyección es el resultado de un proceso iterativo, donde en cada iteración se toma una línea y se evalúa el valor máximo que la imagen del gel posee a través de ésta, algoritmo que esquemáticamente se ilustra en la Figura 8.

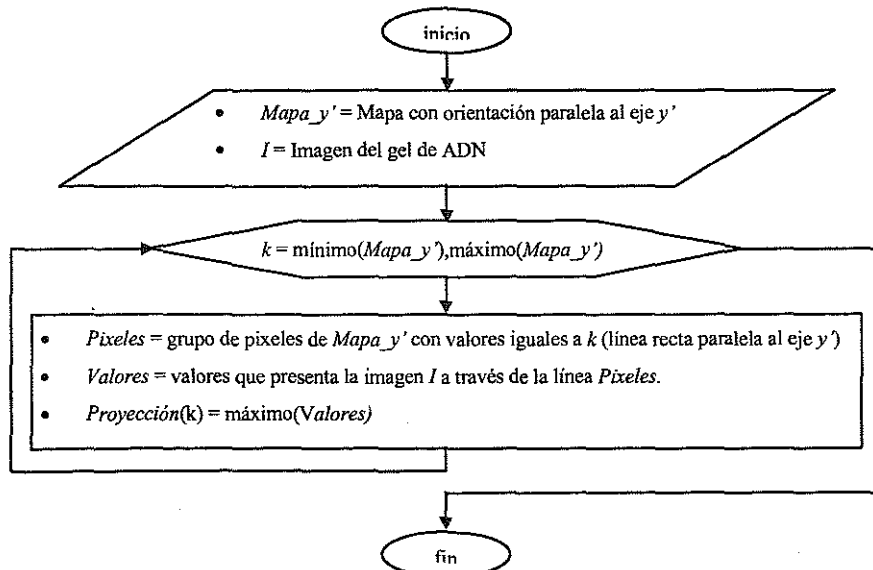
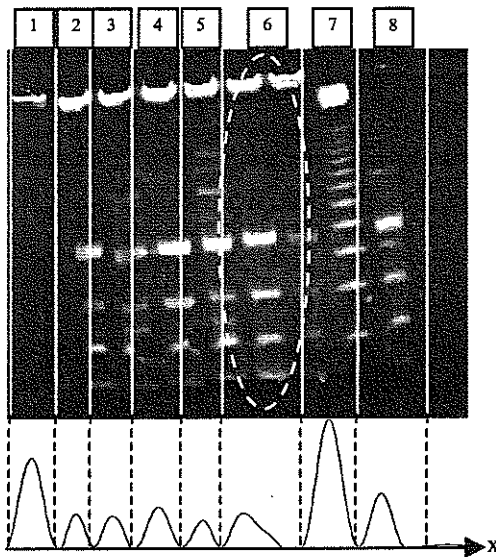


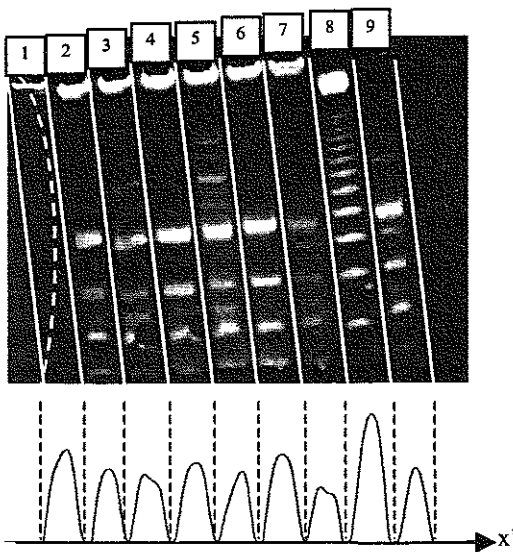
Figura 8. Algoritmo utilizado en el cálculo de la proyección de la imagen sobre el eje x' .

Por ejemplo, para el caso de la Figura 7 derecha, k varía entre 0 y 18 (que son los valores mínimo y máximo de ese mapa). Se tendrá por tanto un vector *Proyección* de tamaño $18-0+1 = 19$.

La Figura 9 ilustra la comparación entre dos métodos diferentes de evaluar la proyección, para una imagen determinada: a la izquierda está el resultado de evaluar la proyección sobre el eje x (método convencional), por medio de la suma por columnas; a la derecha está el resultado de aplicar el método descrito en el presente artículo.



a)



b)

Figura 9. Proyección de la imagen usando el método convencional (a), y teniendo en cuenta su orientación (b).

Para ilustrar las ventajas del método planteado sobre otros algoritmos convencionales, se ha marcado con una línea punteada la zona de la Figura 9a donde existe pérdida de información. En este lugar, y tras observar la proyección correspondiente, se concluye que la segmentación arroja resultados erróneos, puesto que la cantidad de carriles detectados (8 en total) es resultado de la pérdida de un mínimo local, producto de la evaluación de la proyección como la suma por columnas. En contraste, en la Figura 9b se observan perfectamente todos los mínimos locales y se tiene, por tanto, una adecuada segmentación de la imagen. Se observa además que el problema no sólo es la pérdida de un carril: aquellos que aparecen segmentados en realidad contienen información (bandas) proveniente de otros carriles.

Tras la correcta segmentación de los carriles, se procede a tomar uno a uno y se determina la ubicación de las bandas presentes en los mismos. Para ello, se hace uso del mapa con líneas paralelas al eje x' (que es precisamente la orientación de las bandas dentro de la imagen) y se sigue un procedimiento idéntico al usado en el caso de la estimación de la proyección sobre el eje x' .

RESULTADOS OBTENIDOS

Segmentación de carriles. El desempeño del algoritmo desarrollado se mide en términos de cuatro parámetros de interés, descritos a continuación junto con los valores promedio obtenidos para un grupo de 19 imágenes con diferentes orientaciones y características (contenido de bandas).

- Porcentaje de aciertos: corresponde a aquellos carriles segmentados correctamente. Está dado por la relación $(\text{total aciertos}/\text{número total de carriles}) \times 100\%$. Valor promedio obtenido: 92,64%
- Porcentaje de desaciertos: son aquellos carriles que no fueron segmentados. Se obtiene a partir de la relación $(\text{total desaciertos}/\text{número total de carriles}) \times 100\%$. Valor promedio obtenido: 2,09%
- Cantidad de falsos aciertos: aquellas zonas de la imagen que no corresponden a ningún carril y que sin embargo fueron segmentadas como uno de ellos. Valor promedio por imagen: 1,31 falsos aciertos/imagen.
- Cantidad de carriles segmentados parcialmente: es posible que el proceso de segmentación haya dado origen a uno de dos posibles efectos: la combinación de dos carriles en uno solo o la división de un carril en dos. Valor promedio por imagen: 0,21 carriles/imagen.

Los resultados son alentadores, si se tiene en cuenta que el desempeño es similar, e incluso superior, al de algunos sistemas de carácter comercial que fueron evaluados junto con el algoritmo descrito en el presente artículo.

Detección de Bandas. El objetivo consiste en demostrar la robustez del método a medida que la orientación de la imagen cambia, y comparar los resultados obtenidos con aquellos arrojados por los algoritmos convencionales (donde se asume que las bandas son completamente horizontales). Para ello se midió el porcentaje de aciertos

en cada uno de los casos, asumiendo bandas completamente horizontales (método convencional) y teniendo en cuenta su orientación (algoritmo descrito en el presente artículo), a medida que la orientación de la imagen (medida ésta como el ángulo existente entre el eje x' y el eje x convencional) varía gradualmente desde un rango de 0° hasta aproximadamente los 15° (que es la orientación que posee la imagen del gel de ADN en el peor de los casos).

La Figura 10 ilustra el resultado obtenido, donde el Método 1 hace referencia al algoritmo descrito con anterioridad, y el Método 2 tiene relación con el algoritmo de uso convencional en trabajos anteriores[2],[3],[4],[5],[6].

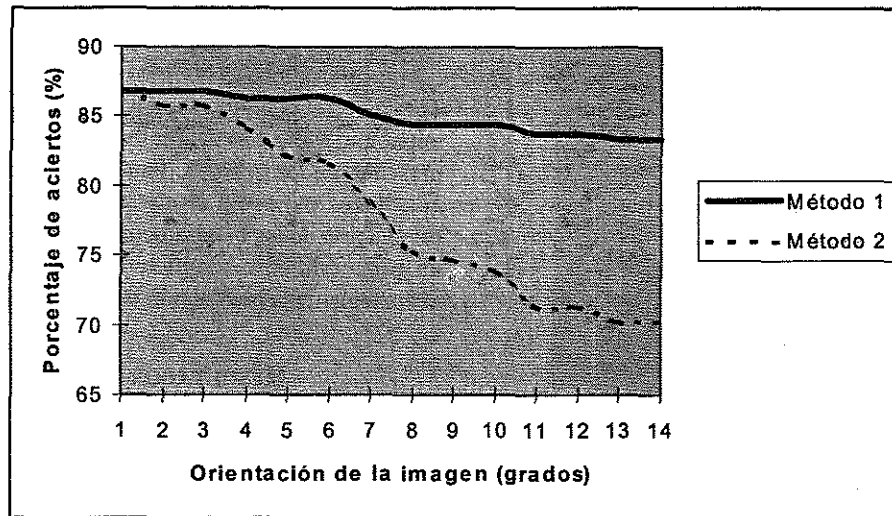


Figura 10. Desempeño de los métodos 1 y 2 para una imagen específica, en términos del porcentaje de aciertos.

Se observa la robustez del método desarrollado, en términos del alto grado de invarianza a la rotación, puesto que el porcentaje de aciertos permanece prácticamente constante (presentando un valor máximo de 87% y un valor mínimo

cercano al 84%) mientras que la variación de dicho porcentaje es dramática para el caso del Método 2 (con un porcentaje de aciertos entre el 70% y el 87%). Dicho comportamiento se analiza en la Figura 11.

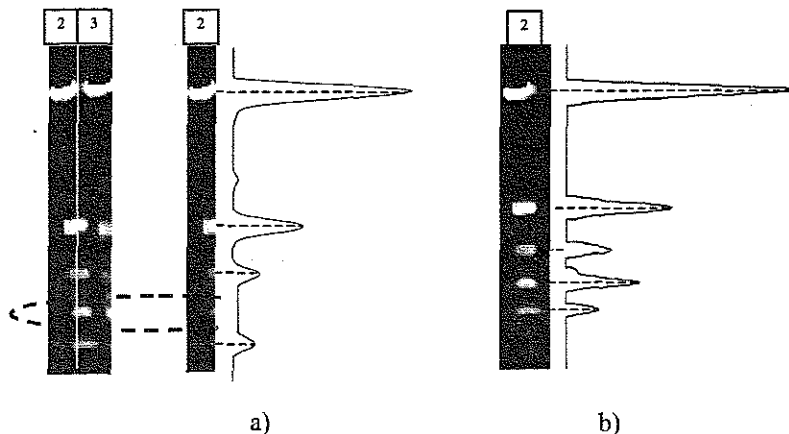


Figura 11. Un carril y su correspondiente proyección: a) Método convencional (carril con orientación vertical y bandas con orientación horizontal), b) Proyección evaluada teniendo en cuenta la orientación de la imagen.

Al analizar la zona encerrada por el óvalo de la Figura 11a, se encuentra que una banda del carril 2 ha sido completamente eliminada, producto de la incorrecta segmentación del mismo. Como resultado, ese máximo local, correspondiente a la banda eliminada, no estará presente en la proyección y por tanto la banda no será detectada. Ocurre lo contrario en la Figura 11b, donde todas las bandas presentes en el carril serán correctamente detectadas, puesto que no hay pérdida de información. Este fenómeno, la ausencia de bandas producto de la incorrecta segmentación de carriles, redundante en el porcentaje de aciertos del método convencional, tal y como se muestra en la Figura 10.

Es igualmente factible que se tenga el fenómeno inverso: en lugar de la eliminación de bandas presentes en un carril, su incorrecta segmentación puede originar bandas inexistentes en otros (como es el caso del carril 3 de la Figura 11). Es incluso factible que el término "carril" carezca de sentido para imágenes con orientaciones relativamente grandes (mayores o iguales a 10°). Se resalta entonces la importancia de estimar correctamente la orientación de la imagen, y de evaluar las proyecciones correspondientes con base en dicha orientación.

CONCLUSIONES

Se ha logrado implementar un método, basado en técnicas de procesamiento digital de imágenes, que permite obtener un desempeño adecuado y robusto en términos de porcentaje de aciertos en la etapa de detección de bandas de una imagen proveniente de un gel de ADN. Se han mostrado los beneficios y ventajas que ofrece el método descrito en comparación con aquellos implementados hasta el momento, donde se asumen imágenes ideales, en el sentido de que sus carriles son completamente verticales y sus bandas, por tanto, tienen una orientación perfectamente horizontal.

El método diseñado constituye el principal componente de un sistema computacional que permite la adquisición y análisis de una imagen proveniente de un gel de ADN, sistema que beneficia, en principio, al laboratorio de Genética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] WU, R.; GROSSMAN, L. y MOLDAVE, K. Recombinant DNA methodology. Primera Edición. Editorial Academic Press. San Diego, California. 1989. 760 p.
- [2] MACHADO, A. M.; CAMPOS, M. F.; SIQUEIRA, A. M. y CARVALHO, O. S. An iterative algorithm for segmenting lanes in gel electrophoresis images. Proceedings on the X Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing. Octubre 17 de 1997. Páginas 140-146.
- [3] AGARWAL, A.; SRINIVAS MANOHAR, C. y PUJARI, A. K. Identification of lanes and bands in DNA autoradiogram images. Proceedings of the RC-IEEE-EMBS & 14th BMESI. Febrero 18 de 1995. Páginas PS1-PS2.
- [4] YE, X.; SUEN, C. Y.; CHERIET, M. y WANG, E. A recent development in image analysis of electrophoresis gels. Vision Interface '99. Trois-Rivières, Canada, Mayo de 1999. Páginas. 432-438.
- [5] CHENG, W.Z.; YEN, K.S.; LIN, C.Y.; CHING, Y.T. y YANG, Y.L. Comparing lanes in the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) images. Proceedings of the 23rd annual EMBS International Conference. Estambul, Turquía, Octubre de 2001. Páginas 2911-2913.
- [6] BAJLA, I.; HOLLÄNDER, I.; BURG, K. y FLUCH, S. A novel approach to quantitative analysis of electrophoretic gel images of DNA fragments. Proceedings of the International Symposium on Biomedical Imaging. 2002. Páginas 899-902.
- [7] RUSS, J. C. The image processing handbook. Cuarta Edición. Editorial CRC Press & IEEE Press. Boca Raton, Florida. 2002. 744 p.
- [8] ZAMPIROLI, F. de A. y LOTUFFO, R. de A. Classification of the distance transformation algorithms under the mathematical morphology approach. Proceedings of the 13th Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing. 2000. Páginas: 292-299
- [9] HUANG, C.T. y MITCHELL, O.R. A Euclidean distance transform using grayscale morphology decomposition. IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence. Volumen 16, número 4. Abril de 1994. Páginas 443-448.