

Automatización de la Prueba HLA Mediante Análisis de Imágenes de Gel de Electroforesis Empleando Visión Artificial

HLA Test Automation By Means of Gel Electrophoresis Images Analysis Using Computer Vision

Esmeide Leal¹, Nallig Leal².

1. MSc en Ingeniería de Sistemas. Profesor Asistente. Universidad Autónoma del Caribe
Grupo Productos Informáticos Inteligentes. esleal@uac.edu.co

2. MSc en Ingeniería de Sistemas. Profesor Asociado. Universidad Autónoma del Caribe
Grupo Productos Informáticos Inteligentes. nleal@uac.edu.co

Recibido 7/05/2010, Aceptado 25/06/2010

RESUMEN

El gel de electroforesis es una poderosa herramienta que permite a los científicos estudiar las moléculas de ADN. La electroforesis es una técnica que emplea enzimas para cortar las moléculas de ADN en fragmentos de diferentes tamaños; dichas enzimas, cortan las moléculas en lugares específicos, y los fragmentos resultantes, son separados de acuerdo a su tamaño usando una corriente eléctrica. La prueba de histocompatibilidad o prueba HLA (Human Leukocyte Antigen), la cual se apoya en el proceso de electroforesis, sirve para la determinación del fenotipo de un individuo, lo que permite, entre otras cosas, establecer el grado de compatibilidad entre personas para un trasplante de órganos, pruebas de paternidad, entre otros. La prueba de HLA es realizada con base en el análisis de imágenes de gel de electroforesis, imágenes que son bajas en contraste y muy ruidosas, además de presentar notables variaciones en la intensidad de los niveles de gris de una imagen a otra; estas variaciones, pueden afectar el proceso de interpretación de la imagen, produciéndose así fallas en el resultado de la prueba de HLA. Este artículo describe un método que combina técnicas de visión artificial y la red neuronal de pulso acoplado (PCNN), para la lectura automática de imágenes de gel de electroforesis. El método fue implementado en un sistema informático que al actuar en conjunto con los expertos realizadores de la prueba de HLA, logró una mayor precisión en la obtención de la clasificación fenotípica de un individuo.

Palabras Clave: Gel de electroforesis, HLA, Visión Artificial, PCNN, Clasificación Fenotípica.

ABSTRACT

Gel electrophoresis is a powerful tool that enables scientists to study DNA molecules. The electrophoresis technique uses enzymes to cut the DNA molecules into fragments of varying size. The enzyme cut the DNA molecules at specific places, and the resulting fragments are separated according their size, using an electrical flow. Histocompatibility test or HLA test (Human Leukocyte Antigen), which is based on the electrophoresis process, allow to know the phenotype of an individual, this is useful to establish the compatibility level between two persons for transplantation, paternity test, etc. HLA test is based on gel electrophoresis images analysis, such images are low in contrast, noisy, and can significantly vary their pixel intensity levels from one image to another. These images features can affect its interpretation process, taking place errors in the HLA test results. This paper describes a method that uses computer vision techniques and the pulsed coupled neural network (PCNN), for automating gel electrophoresis images analysis (interpretation). The method was implemented in a computer system, and working along with experts in HLA test, shows high levels of precision for establishing the phenotype classification of an individual by analyzing gel electrophoresis images.

Key words: Gel electrophoresis, HLA, Computer Vision, PCNN, Phenotype Classification.

1. Introducción

El incremento en el nivel de automatización del secuenciamiento del ADN por electroforesis es un importante y bien documentado reto en el proyecto de genoma humano [1]. Varios avances hacia este fin han sido realizados, incluyendo muchos desarrollos notables en instrumentos de secuenciación basados en fluorescencia [2][3][4][5]. Los sistemas de secuenciamiento basados en fluorescencia permiten el acoplamiento de la separación electroforética, detección de fragmentos y análisis de imágenes sin la intervención humana. Este nivel de automatización es realizado por software de alto rendimiento que como en el caso del análisis de la prueba HLA, es factible de desarrollar e implementar.

El desarrollo del gel de electroforesis como método de separación y análisis del ADN ha influenciado significativamente el proceso alcanzado en biología molecular en los últimos 20 años. La electroforesis es un método para separar moléculas con base en su tamaño, su carga eléctrica y otras propiedades físicas. El proceso de electroforesis es una técnica en la cual las macromoléculas de ADN son forzadas a desplazarse a través de un gel, el cual es un coloide en forma sólida, influenciado por una carga eléctrica. Existe dos tipos de matrices de gel, agarosa y poliacrilamida, estas son las más usadas en el proceso de electroforesis, el cual toma una mezcla de moléculas de ADN de diferentes tamaños, y las separa en fragmentos llamados bandas.

En el proceso de electroforesis, las muestras de ADN son cortadas por enzimas específicas, en segmentos de diferente tamaño, luego se colocan en pozos separados y alineados en el gel de agarosa y a continuación se les induce una corriente eléctrica, que desplaza las muestras en dirección horizontal (carriles). Un tinte fluorescente es usado para marcar las posiciones de las bandas de ADN en el gel, el cual es entonces fotografiado (Figura 1); para proveer un registro permanente (imagen de gel de electroforesis) de la prueba de electroforesis [6].

En años recientes un número de sistemas de software han sido desarrollados para la digitalización de fotografías de gel de electroforesis, para su posterior proceso y análisis de las imágenes para producir una información final de la movilidad de los fragmentos; esto es, las posiciones de las bandas en cada uno de los carriles dadas por el peso molecular (pares de base del ADN).

Normalmente, las imágenes obtenidas del gel de electroforesis son ruidosas, bajas en contraste y poco uniformes, características poco deseables que dificultan la lectura de las mismas, lo cual eventualmente puede causar errores en el resultado final (clasificación del ADN). La visión por

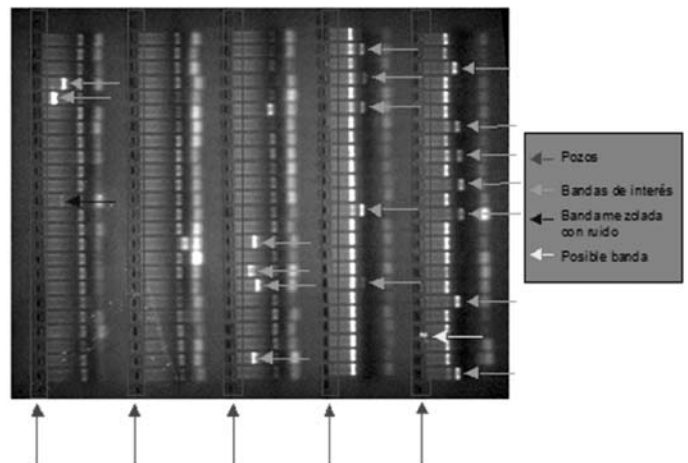
computador ofrece técnicas que permiten eliminar tales características, facilitando el proceso de interpretación de la imagen a los realizadores de la prueba de HLA, de igual manera, dotan la imagen con las condiciones requeridas para lograr una buena segmentación que permita a un sistema analizador de imágenes, interpretar en forma adecuada la información presente en ésta.

Este artículo presenta un método, validado en un sistema informático, para la automatización de la lectura de imágenes de gel de electroforesis, basado en visión artificial y redes neuronales. El método se compone de tres fases. La primera, emplea técnicas de procesamiento digital de imágenes encaminadas a eliminar características como bajo contraste, ruido y distribución no uniforme de los niveles de intensidad, entre otras. La segunda fase utiliza un tipo especial de red neuronal llamada Pulsed Coupled Neural Network o PCNN, encargada de la extracción de los objetos que portan la información de interés presente en la imagen. La tercera y última fase, consta de un modulo de interpretación que realiza la lectura de la imagen de gel de electroforesis procesada para entregar la clasificación del fenotipo del individuo.

2. Clasificación Fenotípica

Para determinar la clasificación fenotípica de un individuo humano, el personal experto encargado de realizar tal clasificación, debe analizar las imágenes de electroforesis. La figura 1 muestra una imagen de gel de electroforesis, luego de haber sido capturada por medio de una cámara CCD. La electroforesis es un proceso electroquímico que pretende "revelar" las características genéticas de un individuo obtenidas mediante pruebas especializadas de laboratorio.

Figura 1. Imagen de gel de electroforesis
Figure 1. Electrophoresis gel image



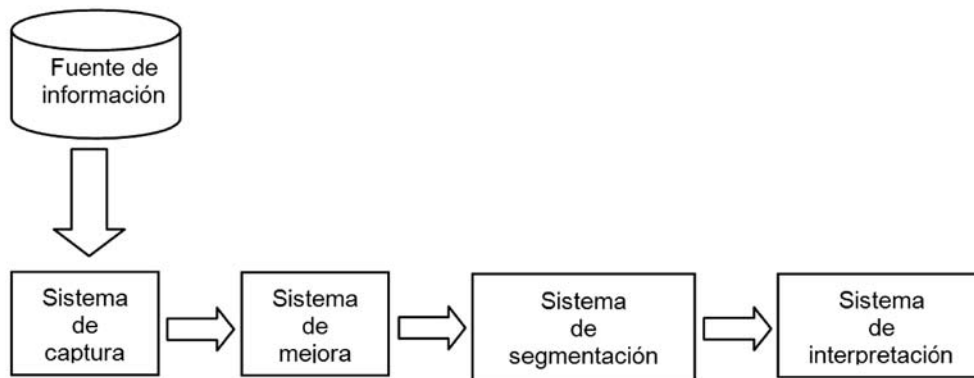
El personal encargado de clasificar estas imágenes, debe identificar los pozos localizados en ellas, al igual que cada una de las bandas de interés. Los pozos hacen referencia a los lugares en los cuales son sembrados los fragmentos de ADN. Las bandas de interés son aquellos fragmentos de ADN que han sufrido un mayor desplazamiento a partir del sitio donde fueron sembrados, y con las cuales se entrará a determinar la clasificación fenotípica del individuo. En la figura 1 las flechas rojas señalan los pozos de la imagen y las flechas verdes indican las bandas de ADN que más han migrado desde el punto donde fueron sembradas.

El objetivo de este trabajo es desarrollar una método que se base en el uso de técnicas de procesamiento digital de imágenes y redes neuronales artificiales para diseñar un sistema computacional que realice de forma automática el proceso de clasificación fenotípica a partir de la lectura de las imágenes de gel de electroforesis.

3. Método para la determinación automática del fenotipo de un individuo a partir de la lectura de imágenes de gel de electroforesis

Todo sistema informático posee una estructura (arquitectura) bien definida en la cual se fundamenta su funcionamiento; es la coherencia de dicha estructura la que determina el buen desempeño o no de estos sistemas. Un sistema informático que pretenda llevar a cabo la automatización de un proceso de clasificación mediante el análisis de imágenes, debería poseer una estructura que se deba a la división del problema en sus puntos críticos, de tal forma que se pueda atacar en cada uno de ellos, mediante el empleo de técnicas específicas, los problemas fundamentales que presenten. Un sistema de análisis de imágenes digitales debería poseer una arquitectura que presente características similares a las que se muestran a continuación [2].

Figura 2. Arquitectura de un sistema de procesamiento de imágenes digitales.
Figure 2. Digital image processing system architecture



Nuestro trabajo abarca principalmente las etapas de mejora, segmentación e interpretación de la imagen, fundamentales en la obtención del resultado final que es la clasificación fenotípica del individuo.

A. Fase de mejora

En el proceso de electroforesis se utilizan reactivos que tienen la finalidad de hacer visibles los fragmentos ampliados de ADN o ARN (fragmentos también conocidos como bandas) presentes en el gel de agarosa; el uso de tales reactivos introduce ruido en la imagen, el cual se comporta en algunos casos, de la misma manera que lo hace la información de interés (bandas) aportada por los fragmentos ampliados de ADN o ARN, y en otros, imposibilita la extracción de ésta, es decir; cuando las bandas son tenues (presentan un nivel de gris muy bajo) se ven afectadas por

el ruido introducido, hasta el punto de confundirse con el fondo de la imagen, lo cual impide su detección.

Otra característica no deseable de las imágenes de gel de electroforesis, tiene que ver con la poca uniformidad de las bandas; estas, muestran gran variabilidad en sus niveles de gris, presentándose altas intensidades en el interior y bajas en la periferia. Esta carencia de uniformidad hace más difícil que la técnica empleada para segmentar la imagen produzca buenos resultados.

Las técnicas del procesamiento digital de imágenes, ofrecen una amplia variedad de operaciones que tienen como objetivo reducir el ruido presente en la imagen; sin embargo, cada imagen presenta características muy particulares, las cuales dependen del proceso al que fueron sometidas antes de ser capturadas, como por ejemplo el dispositivo

de captura y otros factores que pueden afectar la calidad de la imagen. Por esta razón cada tipo de imagen requiere el uso de filtros específicos que mejor se acomoden al problema en particular. Los filtros de media, mediana y gaussiano, muy utilizados para la eliminación de ruido en las imágenes, aplicados sobre las imágenes de gel de elec-

troforesis, mostraron no ser efectivos; en cambio la operación morfológica de apertura generó buenos resultados. La apertura resulta de la combinación de dos operaciones morfológicas, la erosión y la dilatación. La dilatación de escala de grises de f por b , representada por $f \oplus b$, se define como:

$$(f \oplus b)(s, t) = \max \{ f(s - x, t - y) + b(x, y) \mid (s - x), (t - y) \in D_f, (x, y) \in D_b \} \quad \text{Ecuación (1)}$$

donde D_f y D_b son los dominios de f y b , respectivamente. En la ecuación 1, b es el elemento estructura del proceso

morfológico. La erosión de una imagen de escala de gris, se representa por $f \ominus b$, y se define como:

$$(f \ominus b)(s, t) = \min \{ f(s + x, t + y) - b(x, y) \mid (s + x), (t + y) \in D_f; (x, y) \in D_b \} \quad \text{Ecuación (2)}$$

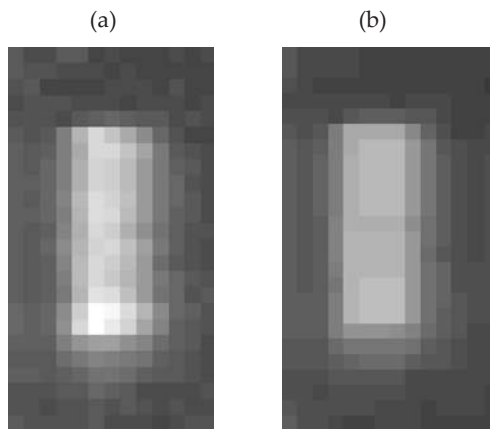
donde D_f y D_b son los dominios de f y b , respectivamente. La apertura de una imagen f por el elemento estructura b (o sub imagen), se representa por $f \circ b$.

$$f \circ b = (f \ominus b) \oplus b \quad \text{Ecuación (3)}$$

Se observa que simplemente una apertura es una erosión de f por b , seguida de una dilatación del resultado por b [7] [8].

La figura 3a es una banda extraída de una imagen original de gel de electroforesis, la figura 3b muestra los resultados luego de la aplicación del filtro de apertura. Se puede apreciar claramente que la banda preserva en general su brillo y forma, además de presentar una distribución más uniforme de las intensidades de los niveles de gris de los pixeles que los conforman.

Figura 3. Bandas de ADN. a) Banda con niveles de gris no uniformes. b) Bandas luego de la apertura morfológica
Figure 3. Fragments of DNA. a) Fragment with non uniform gray levels. b) Fragment after applying morphological aperture



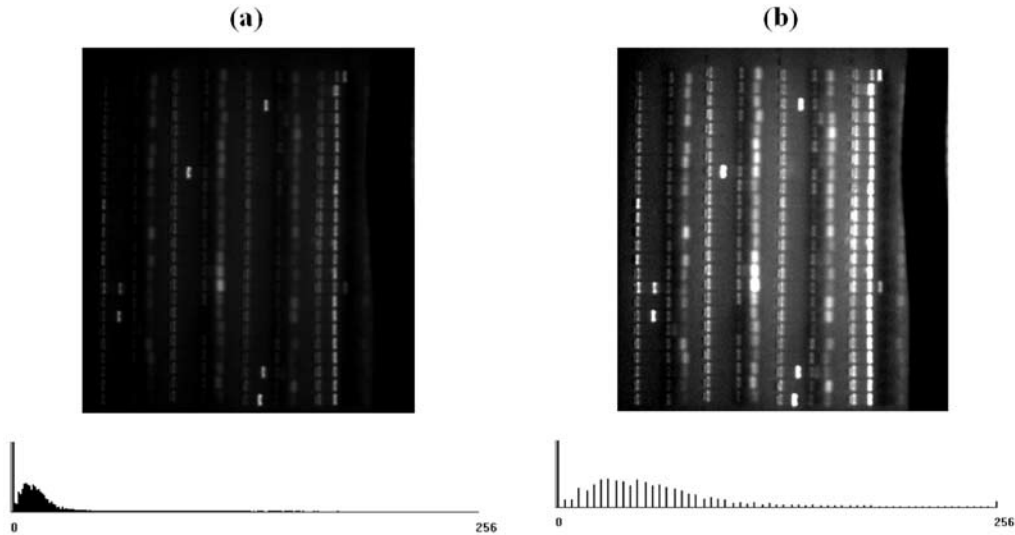
Otra característica presente en muchas de las imágenes en tratamiento, es el bajo contraste. Cuando se está tratando con imágenes de niveles de gris, se puede inferir a partir de su histograma como es la distribución de sus niveles de gris. Se empleó un método de estiramiento del histograma que logra redistribuir las intensidades de los niveles de gris, de forma que imágenes bien contrastadas no sufran una variación significativa en la distribución de sus niveles de gris, mientras que en las imágenes de bajo contraste

se logre una buena distribución en las intensidades de sus niveles de gris.

La figura 4a muestra una imagen original de bajo contraste con su respectivo histograma. La figura 4b muestra el resultado obtenido después de aplicar el método de estiramiento del histograma a la imagen original; se aprecia claramente la notable mejoría de la imagen, mejoría que se ve reflejada en la buena distribución de las intensidades de sus niveles de gris, tal como lo ilustra su histograma.

Figura 4. Imagen de gel de electroforesis con contraste bajo. a) Imagen original con bajo contraste. b) Imagen restaurada por medio de estiramiento del histograma

Figure 4. Electrophoresis gel image in low contrast. a) Original image in low contrast. b) Restored image by histogram stretching



B. Fase de segmentación

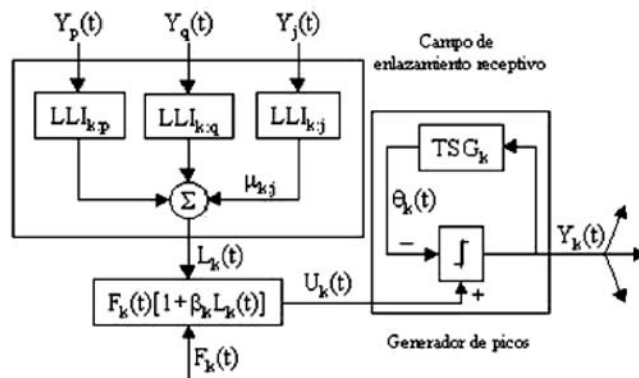
La segmentación automática es una de las tareas más difíciles del procesamiento de imágenes. Esta etapa del proceso determina el eventual éxito o fracaso del análisis de un problema determinado; de hecho, la segmentación rara vez llega a alcanzar una solución completamente satisfactoria; es por ello, que se debe tener cuidado al escoger los parámetros y las técnicas que sirvan para aumentar el grado de exactitud en la obtención de una segmentación robusta. En la literatura sobre redes neuronales, se encuentra que se han incorporado y adaptado modelos de redes neuronales artificiales (RNA), para el procesamiento digital de imá-

genes, como lo son las redes de Hopfield y Backpropagation en el reconocimiento y la PCNN en la segmentación. Esta última posee características muy apropiadas para la segmentación de imágenes y basa su funcionamiento en el estudio de la corteza visual de los gatos.

Pulse Coupled Neural Network (PCNN)

Esta red es un procesador de propósito general que tiene la habilidad de extraer de una imagen características tales como textura, contorno (bordes), además de suavizar y segmentar la imagen (siendo

Figura 5. Arquitectura de una neurona de pulso acoplado
Figure 5. Pulsed coupled neuron architecture



esta última su característica más potente). La arquitectura de una neurona de la red PCNN es mostrada en la figura 5. A continuación se explica cada uno de los elementos que componen la neurona

- 1) Campo receptivo de alimentación: cada neurona N_k recibe una entrada externa $F_k(t)$, la cual equivale al valor de la intensidad de cada pixel.
- 2) Actividad interna: La entrada de enlazamiento L_k , modula la entrada de alimentación de una forma no lineal para producir la actividad interna de la neurona

$$U_k(t) = F_k(t)(1 + \beta_k L_k(t)) \quad \text{Ecuación (4)}$$

$$L_k(t) = \sum u_{ij} y_j(t) * v_i \exp(-t / \tau_i) \quad \text{Ecuación (5)}$$

Donde, β_k es el coeficiente de enlazamiento de la neurona N_k . El coeficiente de enlazamiento proporciona un medio simple y efectivo de control de la influencia de la entrada de enlazamiento de la red, en la actividad interna de la neurona.

- 3) Generador de pulsos: el generador de pulsos consiste en una función generadora de impulsos y un generador de señal de umbral. El generador de señal de umbral, denotado por TSG_k , da como salida la señal de umbral $\theta_k(t)$. Cada vez que la neurona de pulso acoplado pulsa, su generador de señal de umbral es cargado a un valor predeterminado V_k , indiferente del valor de la señal de umbral antes de que la neurona pulsara. Se asume que el valor de V_k es más grande que cualquier valor posible de la actividad interna de la neurona. Asumiendo dos pulsaciones de la neurona N_k en T_1 y T_2 , la operación del generador de la señal de umbral es descrita por la siguiente ecuación:

$$\theta_k(t) = \begin{cases} V_k, & \text{para } t = t_1 \\ V_k \cdot \exp(-(t-t_1)/\tau_1), & \text{para } t_1 < t < t_2 \\ V_k, & \text{para } t = t_2 \end{cases} \quad \text{Ecuación (6)}$$

donde τ_k es la constante de decaída de tiempo de TSG_k

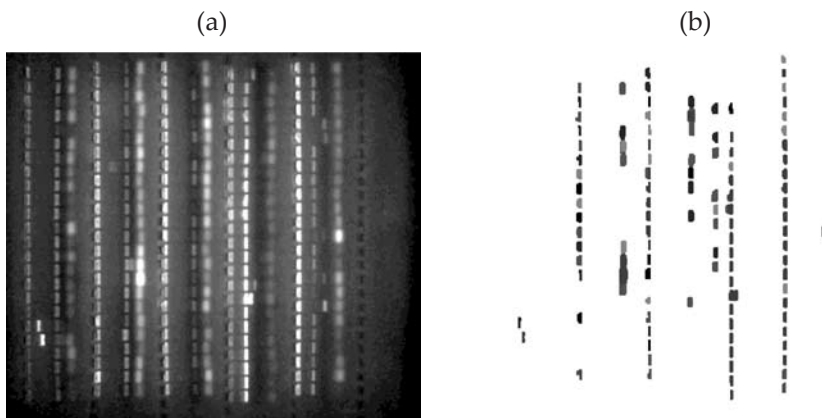
El estado de activación de la neurona N_k es Y_k , y su valor está determinado por la siguiente expresión:

$$Y_k = \begin{cases} 1 & \text{si } U_k > \theta_k \\ 0 & \text{en otros Casos} \end{cases} \quad \text{Ecuación (7)}$$

En la red PCNN sucede un fenómeno, conocido como fenómeno de captura; gracias a este fenómeno, se lleva a cabo la segmentación de la imagen. Una neurona que pulsa en un tiempo t , puede capturar a las neuronas vecinas si el aporte que ésta les brinda (por medio de la entrada de enlazamiento), es lo suficientemente grande como para aumentar su actividad interna de tal modo que sobrepase su valor umbral. La neurona o neuronas capturadas pulsan y a su vez envían señales de enlazamiento a sus neuronas vecinas, posiblemente capturando a otras neuronas y así sucesivamente hasta que el enlazamiento que aportan las neuronas que han pulsado no contribuye a incrementar la actividad interna de las neuronas vecinas. Todo este proceso se da instantáneamente, de forma que las neuronas correspondientes a regiones de la imagen con pixeles de intensidad similar, que pulsen al mismo tiempo, identifican los objetos presentes en la imagen [9]

La figura 6 ilustra la forma como opera la red PCNN aplicada sobre una imagen de gel electroforesis. Esta imagen fue previamente tratada con los filtros de mejora mencionados anteriormente (Estiramiento del histograma y Apertura).

Figura 6. Segmentación de una imagen de gel de electroforesis usando la PCNN
Figure 6. Electrophoresis gel image segmented by PCNN Network



La figura 6a presenta la imagen original y la figura 6b las primeras pulsaciones cuando esta imagen fue usada como entrada a la red. Se puede observar que las regiones más brillantes de la imagen son las que pulsaron primero, puesto que las neuronas correspondientes, poseen mayor actividad interna. Las partes de la figura 6b que poseen un mismo color indican que las neuronas correspondientes pulsaron en un mismo instante de tiempo. Las regiones identificadas con un mismo color y correspondientes a neuronas adyacentes, indican los objetos encontrados por la red.

C. Fase de interpretación

En el análisis de imágenes de gel de electroforesis, la tarea de interpretación automática está relacionada con la detección y determinación de la posición de los fragmentos ampliados (bandas de la imagen) de ADN o ARN. En el sistema de segmentación se etiquetó cada pixel de la imagen con una marca de tiempo, esta marca, indica el instante en el cual pulsó la neurona asociada a cada pixel. Una vez finalizado el proceso de segmentación de la imagen, lo que se obtiene no es más que una matriz de etiquetas como la mostrada en la figura 7. El sistema de reconocimiento se encargará de extraer los objetos de la matriz que de acuerdo a su morfología se puedan clasificar como bandas.

Figura 7. Representación de una matriz de etiquetas generada por la segmentación de la red PCNN.

Figure 7. Matrix of labels generated by PCNN Network

1	1	1	2	3	3	1	1	1
1	1	2	2	2	3	1	1	1
2	2	2	2	3	3	3	1	3
2	2	2	2	1	1	2	2	2
5	5	2	5	5	1	3	3	2
5	5	5	5	4	4	4	4	6

Para llevar a cabo el reconocimiento de los objetos como posibles bandas, se hizo uso del concepto de conectividad entre pixeles, concepto que permitió elaborar un algoritmo que recorre la matriz de etiquetas extrayendo cada uno de los objetos presentes en ésta, estos objetos a su vez son clasificados como bandas o no, de acuerdo a su morfología. Luego de haber extraído cada uno de los objetos de la matriz, entra en operación el procedimiento de reconocimiento de bandas. Estadísticamente se encontró que las bandas presentan las siguientes características morfológicas:

1. El área del objeto (cantidad de pixeles que lo conforman) debe estar en el rango [25,200] unidades.

2. La parte más ancha del objeto debe pertenecer al intervalo [2,10] unidades.
3. La parte más larga del objeto de pertenecer al rango [11,20] unidades.

Luego de determinar que objetos cumplen con las características de una banda, es necesario definir cuales son de interés. Se dice que unas bandas son de interés y otras no, porque dependiendo de la ubicación de éstas dentro de la imagen, algunas portarán información necesaria para la prueba, mientras que otras no, por lo que estas últimas no intervendrán en el proceso de clasificación.

Resultados

En síntesis, las pruebas experimentales que se realizaron durante el desarrollo del sistema, arrojaron como resultado la secuencia de pasos, mostrados en la figura 8a, que se deben seguir para lograr una buena aproximación al sistema automático de clasificación fenotípica de individuos, mediante el análisis de imágenes provenientes del proceso de electroforesis. La figura 8b muestra una imagen de gel de electroforesis clasificada mediante el sistema informático construido, a partir de la secuencia de pasos propuesta. Es importante anotar que la intervención del experto humano, en la supervisión de los resultados entregados por el proceso automático es de gran importancia para que el sistema adquiera total validez.

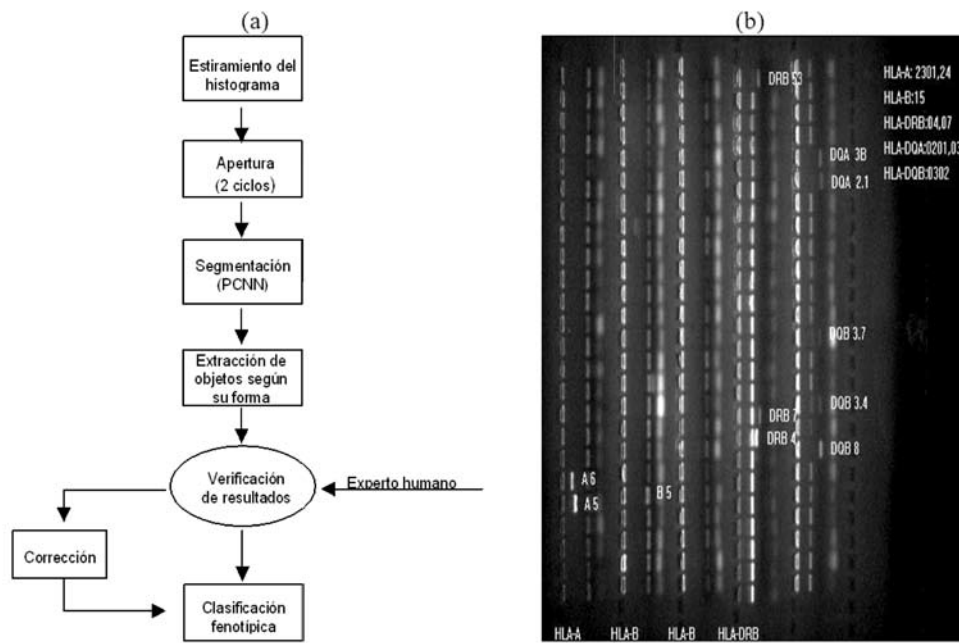
Conclusiones

Se logró establecer una secuencia de filtros capaz de proporcionarle, a las imágenes de gel de electroforesis, condiciones que permitan a un sistema informático de clasificación automática reconocer y ubicar las bandas desplazadas presentes en la imagen, las cuales determinan la clasificación fenotípica de un individuo.

Las investigaciones en el área del tratamiento digital de imágenes aplicadas a la inmunología, pueden aportar metodologías para el desarrollo de sistemas informáticos que agilicen el trabajo realizado por el personal médico. Son muchas las pruebas de laboratorio que involucran el análisis de imágenes para emitir diagnósticos, y que en muchos casos requieren tediosos procedimientos realizados en general de forma manual.

El empleo de tecnologías como las redes neuronales y técnicas de procesamiento digital de imágenes, han mostrado que su aplicación en el área de inmunología [10], proporcionan precisión y eficacia a las pruebas allí desarrolladas.

Figura 8. a) Diagrama de etapas del método propuesto. b) Imagen con la clasificación fenotípica.
 Figure 8. a) Proposed method stages. b) Classified image



Referencias

- [1] Watson, J.D. 1985. The Human Genome Project: Past, present, and future. *Science* 248: 44-48.
- [2] Smith, L.M., J.Z. Sanders, R.J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C.R. Connell, C. Heiner, S.B.H. Kent, and L.E. Hood. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321: 674-679.
- [3] Prober, J.M., G.L. Trainor, R.J. Dam, F.W. Hobbs, C.W. Robertson, R.J. Zagursky, A.J. Cocuzza, M.A. Jensen, and K. Baumeister. 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336-341.
- [4] Ansorge, W., B. Sproat, J. Stegemann, C. Schwager, and M. Zenke. 1987. Automated DNA sequencing: Ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 15: 4593-4602.
- [5] Brumbaugh, J.A., L.R. Middendorf, D.L. Grone, and J.L. Ruth. 1988. Continuous on-line DNA sequencing using oligodeoxynucleotide primers with multiple fluorophores. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 5610-5614.
- [6] Bajla I, Holländer I, Burg K. Improvement of Electrophoretic Gel Image Analysis. *Measurement Science Review*, Volume 1, Number 1, 2001.
- [7] González, C. Rafael; Woods, E. Richard. *Tratamiento digital de Imágenes*. Addison – Wesley Diaz de Santos, 1996.
- [8] Weeks, A. R. Jr. *Fundamental Electronic Image Processing*. SPIE Optical Engineering Press - IEEE Press. (1996)
- [9] Kuntimad, G; Ranganath, H. S. Perfect Image Segmentation Using Pulse Coupled Neural Networks. *IEEE Transaction on Neural Networks*, pag 591-598 Vol.10, No 3, May 1999.
- [10] Ye Xiang; Suen Ching Y; Charlet Mohamed; Wang Eugenia. A recent Development in Analysis of Electrophoresis Gels. *Vision Interface* pag 432- 438. 1999, Trois – Rivieres, Canada, 19 – 21 May.