

Tipo de artículo: Artículo original
Temática: Procesamiento de Imágenes
Recibido: 16/09/2019 | Aceptado: 20/11/2019

Software de procesamiento de imágenes de microarreglos para diagnósticos

Diagnostic microarray images processing software

Lorena Díaz Mora^{1*}, Mirtha Irizar Mesa¹

¹ Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría", CUJAE. Calle 114 # 11901 / Ciclovía y Rotonda, Marianao, Habana. CUBA. lorena@cemat.cujae.edu.cu; mirtha@automatica.cujae.edu.cu

*Autor por correspondencia: lorena@cemat.cujae.edu.cu

Resumen

La tecnología de microarreglos se ha incrementado exponencialmente en los últimos años, siendo muy utilizada para cuantificar los niveles de expresión de los genes. El análisis de las imágenes de microarreglos es una de las herramientas necesarias para evaluar gran cantidad de datos biológicos simultáneamente. El presente trabajo propone un software de procesamiento de imágenes de microarreglos como parte de un ensayo para el diagnóstico molecular de la Fibrosis Quística, que permitirá identificar las mutaciones, más frecuentes en Cuba y América Latina, del gen. Este software consta de tres etapas: pre-procesamiento y grillado, segmentación y extracción de características. Las pruebas funcionales realizadas con un conjunto de imágenes obtenidas de diversos ensayos avalan el correcto funcionamiento del software para el diagnóstico de esta enfermedad.

Palabras clave: microarreglos para diagnóstico, procesamiento de imágenes, grillado, segmentación, extracción de intensidad.

Abstract

Microarray technology has increased exponentially in the last years, being very used to quantify gene expression levels. Microarray image analysis is one of the necessary tools to evaluate vast amount of biological data simultaneously. This work proposes an image processing software like part of an experiment for molecular diagnosis of Cystic Fibrosis, which will identify the mutations, more frequent in Cuba and Latin America, of the Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. This software consists of three stages: pre-processing and gridding, segmentation and feature extraction. The functional tests carried out with a group of images obtained from diverse diagnostic experiments; they endorse the correct operation of the software for disease diagnosis.

Key Words: *Microarray for diagnosis, image processing, gridding, segmentation, intensity extraction.*

Introducción

Los microarreglos son en la actualidad una poderosa herramienta de análisis de expresión de genes debido al mayor número de secuencias que se pueden analizar por prueba, constituyendo una ventaja con respecto al resto de las técnicas convencionales, en las cuales solo se pueden analizar un número limitado de genes de manera simultánea, debido a que en la mayoría de los casos se requiere montar un experimento por cada gen a estudiar. De esta forma, existen microarreglos tanto de proteínas como de ADN (Allanki & Dixit, 2017).

Un ensayo de un microarreglo para diagnóstico, es una técnica que consiste en la adsorción de biomoléculas sobre un soporte sólido formando una matriz. Dichas biomoléculas se incuban con la muestra a analizar, donde se produce el reconocimiento y unión con las moléculas complementarias (Salem & Bahari, 2017). A continuación, la reacción es revelada con el uso de marcadores fluorescentes, generalmente de cianina, Cy3 (rojo) y Cy5 (verde), los cuales tienen emisiones en los rangos de 510-550 nm y 630-660 nm, respectivamente. Posteriormente, se obtiene la imagen a través de un lector y las herramientas bioinformáticas permiten interpretar y analizar los resultados (Binti, 2015).

Para un típico procedimiento, se producen dos archivos de imagen, uno para cada tinte fluorescente. Estas imágenes son los datos crudos del experimento. Por tanto, se hace necesario un correcto análisis de las mismas, el cual consta de tres etapas: pre- procesamiento y grillado, segmentación y extracción de características (Salem & Bahari, 2017) (Shao, Li et al., 2019) (R.M. Farouk & SayedElahl, 2019).

En aras de aprovechar las potencialidades que brinda la tecnología de microarreglos de ADN para diagnóstico, en el centro de Inmunoensayo (CIE), ubicado en La Habana, Cuba, se desarrolla la Tecnología Suma (Sistema Ultra Micro Analítico) como parte indispensable de las estrategias del Ministerio de Salud Pública para brindar métodos diagnósticos con la mejor calidad a un costo mínimo y proporcionar una herramienta ideal para los programas de salud basados en pesquisajes masivos.

Entre los programas de Pesquisa Neonatal que se desarrollan en el centro, se encuentra un proyecto encaminado al Diagnóstico molecular de la Fibrosis Quística (FQ). Esta es una enfermedad causada por una mutación en un gen llamado regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (*CFTR*, por sus siglas en inglés), que afecta al organismo de forma generalizada causando muerte prematura (Galvina, Clarke, Harvey, & Amaral, 2004).

Esta es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, es decir, que los pacientes pueden tener dos mutaciones: una del alelo paterno y otra del alelo materno. De acuerdo a cómo se presentan estas mutaciones, existen las siguientes clasificaciones: portador sano o paciente heterocigótico: un solo alelo mutado, heterocigóticos compuestos: dos

mutaciones diferentes, una en cada parental, por lo tanto es un paciente enfermo y por último, paciente homocigótico: contiene la misma mutación en los dos parentales y no se expresa este gen de forma normal(Armas et al., 2019).

La prueba del sudor constituye el estándar de oro para el diagnóstico confirmatorio de FQ, mientras que el análisis genético se utiliza en la detección prenatal y preconcepcional de portadores con el fin de identificar el riesgo de tener un hijo con FQ. Teniendo en cuenta su utilidad el análisis genético debería incluirse en el diagnóstico de rutina(Armas et al., 2019).

Para que nuestro sistema de salud cubano disponga de este ensayo se necesita realizar procesos de síntesis de oligonucleótidos, placas Greiner, un robot dispensador de microarreglos y un lector con LEDs de alto brillo para la excitación de los microarreglos de los oligonucleótidos dispensados.

El logro de todos estos elementos facilitaría la detección temprana de los niños que presentan esta enfermedad, incidiendo en la disminución de la mortalidad de estos y permitiría obtener una tecnología propia del país que nos dotaría de independencia y sería más económica pues en el mercado internacional, un test (ADN) de FQ para una persona ronda los 900 dólares.

Por tales motivos, el siguiente trabajo presenta el *software* desarrollado con la finalidad de automatizar el lector de Microarreglos con LEDs de alto brillo, diseñado en el CIE, que permitirá capturar y procesar las imágenes de microarreglos de oligonucleótidos, resultantes de los ensayos para el diagnóstico de la FQ. Este *software* reconocerá las mutaciones del gen *CFTR* y logrará diferenciar entre el alelo normal (marcado con Cy5) y el mutado (marcado con Cy3) detectando si los pacientes son portadores sanos, heterocigóticos compuestos u homocigóticos.

Materiales y métodos

El procesamiento de las imágenes de microarreglos constituye el punto de partida para el posterior análisis biológico de los datos. Por tal motivo, es necesario realizar su implementación en una aplicación computacional que contenga las tres etapas fundamentales para el análisis de las imágenes.

Primeramente, la etapa de pre- procesamiento y grillado realiza un algoritmo inicial con la implementación de filtros, operaciones morfológicas, normalización, etc., que permite reducir los ruidos y enriquecer la calidad de la imagen(González, 2010). A continuación, se ejecuta el proceso de grillado que consiste en la asignación de coordenadas a cada uno de los puntos en la imagen. Este procedimiento puede ser de forma manual, semi-automática o automática.

Muchos artículos han sido publicados presentando diferentes técnicas de grillado (Rueda y Rezaeian, 2011) (Ahmad, Bahari, & Yusoff, 2014).

En esta investigación, se implementa un método de grillado que se basa fundamentalmente en el cálculo de la proyección horizontal y vertical de la imagen, así como el centro de masa de sus puntos (Binti, 2015).

Otro elemento importante y de los más desafiantes lo constituye la segmentación de las imágenes como procedimiento para agrupar los píxeles con características similares, separando los píxeles considerados como señales de aquellos que son fondo en las imágenes (Torres, 2014).

Existen diferentes métodos de segmentación que pueden ser categorizados en los siguientes grupos principales de acuerdo a la geometría de los puntos que ellos producen:

- Círculo fijo o adaptable: Estos métodos son fáciles de implementar pero funcionan bien si todos los puntos son circulares y del mismo tamaño (Fouad, Mabrouk, & Sharawy, 2014).
- Métodos basados en umbral: Estos métodos pueden detectar con más precisión los puntos del microarreglo debido a que se adapta a sus formas reales. Ejemplo de ellos son: Crecimiento de regiones, método de umbralización global y local, *Marcov Random Field*, etc (R.M. Farouk & SayedElahl, 2019).
- Reconocimiento de patrones: Estos métodos se dividen en aprendizaje supervisado y no supervisado, y se basan en alguna medida de similitud entre los píxeles para realizar el agrupamiento. Son técnicas de segmentación más comunes que tienen la ventaja de no estar restringidas a una forma o tamaño particular de los puntos dentro de la imagen. Entre ellos se pueden citar: Máquinas de soporte vectorial, Redes Neuronales Artificiales, agrupamiento de K-medias, Media de *Fuzzy C* y Expectación-Maximización (Shao, Li, Zuo, Wu, & Liu, 2015).

Por último, la extracción de características tiene el propósito de obtener los niveles de expresión de los genes de acuerdo a los resultados obtenidos en los procesos anteriores. Es conveniente encontrar métodos de extracción de características que minimicen la pérdida de información (Wu, A. Su, & Billings, 2012).

Metodología Computacional

En una primera etapa de la investigación se estudiaron e implementaron varios algoritmos para analizar una imagen de microarreglos para diagnóstico, pasando por las tres etapas del análisis de la imagen.

Estas implementaciones (Fig.1) forman parte del *software* desarrollado para la comunicación con el Lector de Microarreglos con LEDs de alto brillo, diseñado con el objetivo de brindar una herramienta para la interpretación de los resultados por parte de los analistas y de los laboratorios donde se implemente la tecnología.

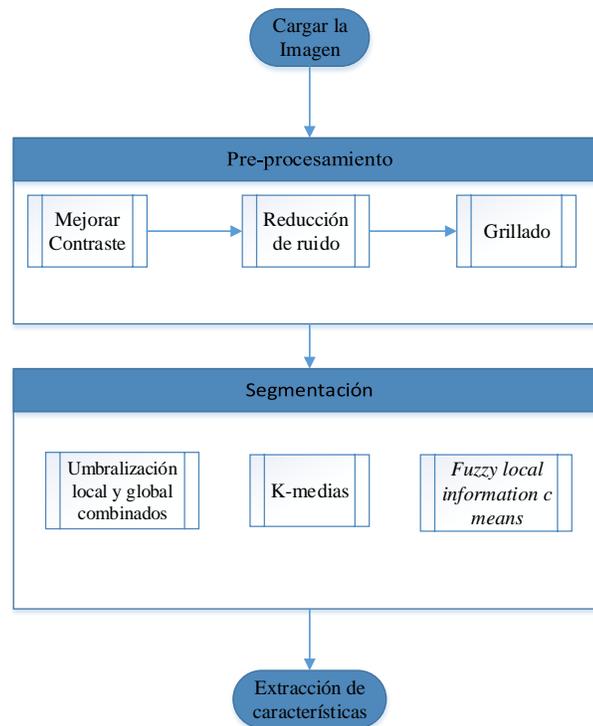


Figura 1. Diagrama de flujo del método propuesto

Una vez obtenida la imagen y separada en los dos canales (Fig.2), en la etapa de pre-procesamiento, se procede a realizar un ajuste de contraste para realzar la calidad de la imagen y ajustar sus valores de intensidad. Posteriormente, se aplica un filtro de mediana para reducir en las imágenes el ruido resultante de errores durante el proceso experimental.

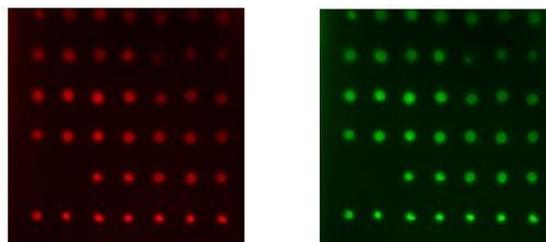


Figura 2. Imagen de un microarreglo en sus dos canales

A continuación, se realiza el proceso de grillado cuyo rol principal es dividir los puntos del microarreglo en áreas independientes. El siguiente algoritmo (Fig.3) ilustra su implementación de forma automática:

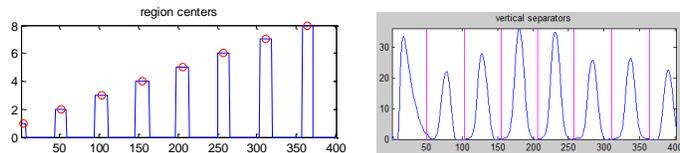
- Obtener la proyección horizontal y vertical de la imagen, a partir de (ec.1, 2) donde $g(x,y)$ es la imagen proveniente del filtrado anterior.

$$H(y) = \sum_{x=0}^{w-1} g(x,y) \quad (1)$$

$$V(x) = \sum_{y=0}^{h-1} g(x,y) \quad (2)$$

- Remover morfológicamente, a través de la transformación *top_hat*, el fondo de la intensidad de cada proyección.
- Localizar y segmentar los picos de cada región por umbralización.
- Determinar los centros de masa y la distancia entre los puntos.
- Obtener las coordenadas de ambos ejes así como el número de líneas para el grillado.
- Posicionar la rejilla conformada sobre la imagen original

a)



b)

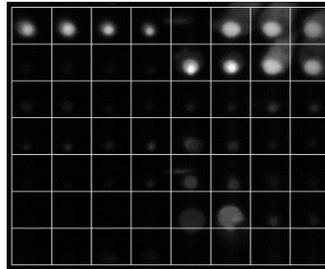


Figura 3. a) Cálculo de los centros de masa y la distancia entre puntos en la proyección vertical en una imagen de microarreglo b)

Imagen resultante del pre-procesamiento

La exactitud del método de grillado desarrollado en una imagen, teniendo el número total de puntos, puede ser calculado como:

$$A = \left(\frac{N_{Correct\ spots}}{N_{Total\ spots}} \right) * 100\%. \quad (3)$$

Donde $N_{Correct\ spots}$, $N_{Total\ spots}$ indican el número de puntos correctamente grillados y el total de puntos en la imagen respectivamente (Fouad et al., 2014).

En la etapa de segmentación se implementaron tres algoritmos y se deja a libre elección por parte del usuario cual es el más óptimo a utilizar según las necesidades presentes:

- Método por umbralización local y global combinados: El primer paso es ecualizar las diferencias de iluminación entre los puntos con la aplicación de una transformación logarítmica. A continuación se realiza la umbralización global sobre toda la imagen, la cual permite separar intensidades en dos picos en la imagen. La umbralización local se realiza sobre sub-imágenes y se determina un umbral para cada partición. Posteriormente, se combinan ambas imágenes, lo cual permite linealizar la intensidad de los puntos, obteniéndose mejores resultados. Además, se rellenan los huecos en los puntos para evitar la unión de unos con otros o mala detección de sus bordes(Fouad et al., 2014).

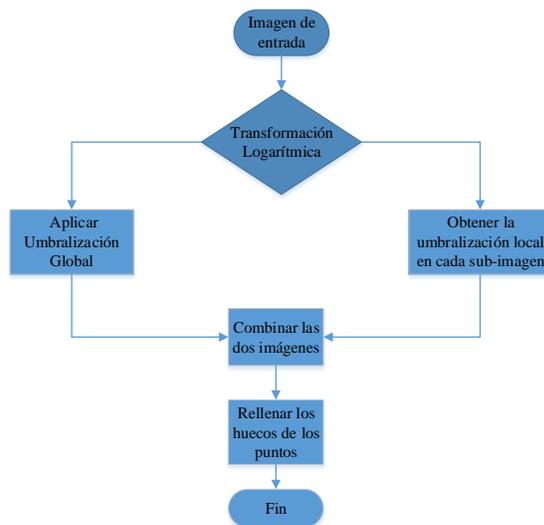


Figura 4. Diagrama de flujo de la Segmentación por umbralización

- *Agrupamiento por K-medias*: Los algoritmos de agrupamiento requieren de la inicialización de los centroides de los clústeres (SivaLakshmi & Malleswara, 2018), que en el caso de imágenes de microarreglos para diagnóstico serán sólo dos: Señal y Fondo. Mientras más representativos sean estos valores iniciales más rápido se obtendrá la convergencia de los algoritmos. Se propone considerar el píxel de mínimo valor de intensidad, como el representante del clúster que estará formado por los píxeles que clasificaremos como pertenecientes al Fondo y utilizar el píxel de máximo valor de intensidad, como representante del clúster que estará formado por los píxeles que clasificaremos como pertenecientes a la Señal. Esta propuesta es debido a que en la

metodología del dispensado de las matrices de microarreglos, en los centros de cada punto estará siempre el píxel de mayor valor de intensidad.

En el caso de K-medias, se necesita además, establecer una medida de similitud o distancia a través de la función criterio que se muestra en la (ec.4) donde u_j es la media del clúster designado (Uslan & Bucak, 2010).

$$J_m = \sum_{i=1} \sum_{j=1} \|x_i - u_j\|^2 \quad (4)$$

El algoritmo es el siguiente:

1. Escoger K puntos como representantes de los clústeres iniciales.
2. Asignar cada dato al clúster más cercano, con el sentido de minimizar la diferencia entre el valor del dato y el centroide del clúster.
3. Recalcular la posición de los K centroides, una vez asignados los datos.
4. Repetir 2 y 3 hasta que todos los datos hayan sido clasificados.

Un valor absoluto de la diferencia entre dos funciones criterios consecutivas en este método, J_{m+1} y J_m , es el elemento buscado para minimizar iterativamente hasta la condición de parada, siendo menor que un parámetro ε_k determinado.

$$|J_{m+1} - J_m| \leq \varepsilon_k \quad (5)$$

- *Fuzzy local information c means (FLICM)*: Esta técnica es una versión modificada del *Fuzzy c means*, la cual utiliza una medida de similaridad *fuzzy* local, con el objetivo de garantizar la insensibilidad al ruido y la preservación de los detalles de la imagen. En este sentido, se adiciona un nuevo factor G_{ij} (ec.6) en la función objetivo del *Fuzzy c means*. Este factor incorpora un nivel local de grises y una información espacial local, controlando la influencia de los píxeles vecinos dependiendo de la distancia de estos con el píxel central.

$$G_{ij} = \sum_{i=N_k} \frac{1}{d_{kj}+1} (1 - u_{ij})^m \|x_i - c_j\|^2 \quad (6)$$

Donde el píxel k^{th} es el centro de la ventana local, j es el cluster de referencia y el píxel i^{th} pertenece al grupo de vecinos en la ventana alrededor del k^{th} píxel N_k . d_{kj} es la distancia Euclidiana entre los píxeles k y j , u_{ij} (ec.7) es el grado de membresía del píxel i^{th} en el cluster j^{th} , m es el exponente de peso de cada membresía y c_j es el centro del cluster j (ec.8) (V.G. & P., 2014).

$$u_{ij} = 1 / (\sum_{k=1}^c (d_{ij} + G_{ij}/d_{kj} + G_{kj})^{1/(m-1)}) \quad (7)$$

$$c_j = \frac{\sum_{i=1}^N (u_{ij})^m x_i}{\sum_{i=1}^N (u_{ij})^m} \quad (8)$$

$$J_m = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^c [u_{ij}^m d_{ij} + G_{ij}] \quad (9)$$

Algoritmo:

1. Asignar valores iniciales a los centroides c_j de cada clúster, al parámetro m y fijar una condición de parada ε .
2. Calcular u_{ij} según (ec.7).
3. Calcular los centroides c_j según (ec.8).
4. Evaluar en la función objetivo con (ec.9).
5. Repetir los pasos del 2 al 4 hasta que se cumpla que: $|J_{m+1} - J_m| \leq \varepsilon$ (10)

La expresión del gen en la imagen se obtiene en (ec.11) donde I_{cy3} e I_{cy5} corresponde a las intensidades de ambos canales (ec.12).

$$E = \log_2(I_{cy3}/I_{cy5}) \quad (11)$$

$$I_{cy3} = R_f - R_b ; I_{cy5} = G_f - G_b \quad (12)$$

Donde R_f , G_f representan la intensidad media de los pixeles clasificados señal y R_b , G_b representan la intensidad media de los pixeles clasificados como fondo en la imagen.

Para realizar un análisis comparativo de los procesos de segmentación realizados, se evalúa el error cuadrático medio normalizado como medida cuantitativa (ec.13).

$$NMSE = \frac{\sqrt{\frac{1}{MN} \sum_i^M \sum_j^N (x_{ij} - \bar{x}_{ij})^2}}{\sqrt{\frac{1}{MN} \sum_i^M \sum_j^N (x_{ij})^2}} \quad (13)$$

Donde M y N son las dimensiones de la imagen, x_{ij} , \bar{x}_{ij} son los pixeles originales y de los clústeres respectivamente. Un valor cercano a cero de $NMSE$ significa que la segmentación realizada presenta precisión, por lo cual es correcta.

Resultados y discusión

Los métodos presentados fueron puestos a prueba en un grupo de 38 imágenes de pacientes con FQ enviadas por la Comisión Nacional FQ. De esta forma, se pudieron comprobar cada una de las etapas, obteniéndose los siguientes resultados:

- Se logró una exactitud del 96% en la fase de grillado en más del 50% de las imágenes analizadas.
- Los métodos de segmentación implementados arrojaron buenos resultados en su desempeño (Fig.5), destacándose el K-medias y el FLICM por tener los menores valores de NMSE y los menores tiempos de ejecución (Tabla 1), aunque la implementación de cualquiera de ellos permitió detectar las mutaciones presentes.



Figura 5. a) Punto original de una imagen de microarreglos b) segmentación por umbralización c) segmentación por K-medias. d) segmentación por FLICM

Tabla 1. Valores de NMSE y tiempo de ejecución de cada método.

Método	NMSE	Tiempo Medio (seg)
Umbralización	0.396	0.4
K-medias	0.307	0.1
FLICM	0.181	0.2

- Finalmente, la etapa de extracción de características reconoció 8 tipos de mutaciones del gen *CFTR* y los niveles de expresión de las mismas. Además, se pudo concluir que de ellos el 47% presentan la mutación F508. El 50% de los alelos afectados no se pudieron determinar pues no se corresponden a ninguna de las 33 mutaciones, con alta frecuencia a nivel mundial, detectadas (Tabla 2).

Tabla 2. Mutaciones detectadas en las muestras

Muestras	Alelos	Porcentaje de presencia de la mutación	Nivel de expresión de cada gen (%)
F508	21	47,36%	27,63%
I507	7	18,42%	9,21%
3120+1G>A	3	7,89%	3,94%

G85E	2	5,26%	2,63%
G542X	2	5,26%	2,63%
R553X	1	2,63%	1,31%
R1162X	1	2,63%	1,31%
N1303K	1	2,63%	1,31%
Sin mutaciones	12	31,57%	50,00%
Muestras evaluadas: 38			

Se puede concluir, que el *software* desarrollado permite a través de la ejecución de sus etapas, un procesamiento de las imágenes de microarreglos satisfactorio para su uso posterior por parte de los expertos. Se obtuvo la clasificación de los pacientes a través de la expresión de las mutaciones detectadas.

Por ejemplo, a partir de la comparación de una muestra normal marcada con Cy5 (Fig.6) con otras muestras mutadas marcadas con Cy3, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Portador sano con uno de sus alelos mutados con R334W y el otro con expresión normal (Fig.7 a)).
- Paciente heterocigótico compuesto, el cual presenta dos mutaciones en sus parentales, 3120+1G>A y F508, presentándose estos mismos genes en la muestra normal (Fig.7 b)).
- Paciente homocigótico debido a que contiene la misma mutación G542 en sus dos parentales, la cual no se expresa en la muestra normal (Fig.7 c)).

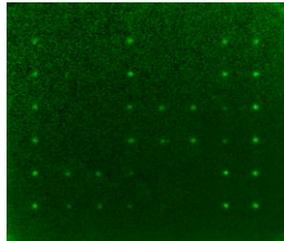


Figura 6. Imagen de un microarreglo marcado con Cy5 (muestra normal).

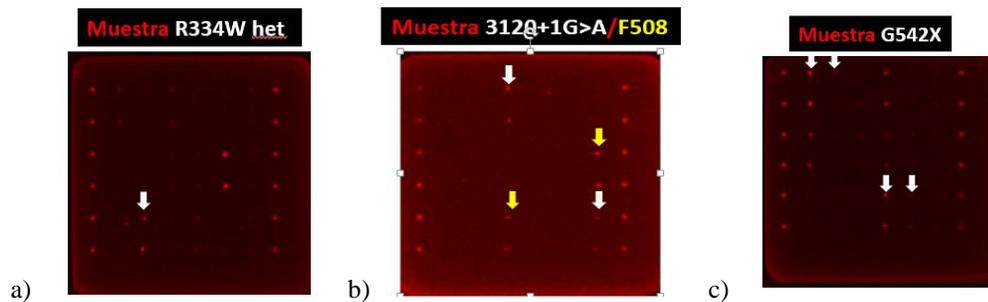


Figura 7. a) Paciente portador sano b) paciente heterocigótico compuesto c) paciente homocigótico

Conclusiones

La herramienta computacional diseñada permite realizar un estudio para evaluar cualitativamente por fluorescencia las mutaciones del gen *CFTR* más frecuentes en Cuba y América Latina, así como determinar dentro de un microarreglo si hay más de una mutación para un paciente determinado. La misma, cuenta con tres algoritmos de segmentación para separar los puntos de máxima intensidad de aquellos que presentan la mínima intensidad y son considerados fondo en las muestras. Estos algoritmos pueden ser empleados indistintamente por los expertos debido a que la implementación de cada uno de ellos permitió detectar las mutaciones presentes en las imágenes procesadas.

Actualmente, este *software* ha sido incorporado al Lector de Microarreglos con Leds de alto brillo diseñado, dotando al equipo de potencialidades y ventajas con respecto a versiones anteriores, para el método de diagnóstico de varias enfermedades simultáneamente y para la realización del monitoreo de los estadios de las mismas.

Referencias

- Ahmad, M., Bahari, A., & Yusoff, M. (2014). *A Study on Microarray Image Gridding Techniques for DNA Analysis*. Paper presented at the International Conference on Electronic Design Penang, Malaysia.
- Allanki, S., & Dixit, M. (2017). Analysis and modelling of septic shock microarray data using Singular Value Decomposition. *Journal of Biomedical Informatics*, Vol. 70, 77-84. doi:10.1016
- Armas, A., Figueredo, J. E., González, Y. J., Collazo, T., Santos, E. N., Barbón, C., . . . Melchor, A. (2019). Perfil de las mutaciones del gen *CFTR* en una cohorte de pacientes cubanos con fibrosis quística. *Genética Médica y Genómica* 3(3), 67-73.

- Binti, N. (2015). *An improved microarray image analysis architecture using mathematical morphology*. (Master of Information Technology), Universiti Tun Hussein Onn Malaysia,
- Fouad, I., Mabrouk, M., & Sharawy, A. (2014). Automatic and Accurate Segmentation of Gridded cDNA Microarray Images Using Different Methods. *Advances in Computing*, 4(2), 41-54. doi:10.5923/j.ac.20140402.02
- Galvina, P., Clarke, L. A., Harvey, S., & Amaral, M. D. (2004). Microarray analysis in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 3, 29–33. doi:10.1016/j.jcf.2004.05.006
- González, J. (2010). Análisis de Datos de Microarrays. *Informática Biomédica*.
- R.M. Farouk, & Sayed Elahl, M. A. (2019). Microarray spot segmentation algorithm based on integro-differential operator. *Egyptian Informatics Journal*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eij.2019.04.001>
- Salem, O., & Bahari, A. (2017). *Software profiling analysis for DNA microarray image processing algorithm*. Paper presented at the The 2017 IEEE International Conference on Signal and Image Processing Applications (IEEE ICSIPA 2017). <https://www.researchgate.net/publication/321412768>
- Shao, G., Li, T., Zuo, W., Wu, S., & Liu, T. (2015). A Combinational Clustering Based Method for cDNA Microarray Image Segmentation. *Plos ONE*, 10. doi:10.1371/journal.pone.0133025
- SivaLakshmi, B., & Malleswara, N. N. (2018). Microarray Image Analysis using k-means Clustering Algorithm. *International Journal of Research in Advent Technology*, Vol.6, No.12, 3796-3802.
- Torres, I. (2014). *“Microarrays” de ARN*. (Tesis de Fin de Grado), Universidad de Jaén España.
- Uslan, V., & Bucak, Đ. Ö. (2010). Microarray image segmentation using clustering methods. *Mathematical and Computational Applications*, 15(2), 240-247.
- V.G., B., & P., M. (2014). *Fuzzy clustering algorithms for cDNA microarray image spots segmentation*. Paper presented at the International Conference on Information and Communication Technologies (ICICT 2014). www.sciencedirect.com
- Wu, E., A. Su, Y., & Billings, E. (2012). Automatic Spot Identification for High Throughput Microarray Analysis. *J Bioengineer & Biomedica*, 1-9. doi:10.4172/2155-9538.S5-005