

# Procesamiento de imágenes biomédicas para el estudio de la influencia de la radiación electromagnética GSM sobre células madre neurales

Carlos Platero<sup>1</sup>

Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Industrial (UPM), c/ Ronda de Valencia, 3, 28012 Madrid<sup>1</sup>,  
[cplatero@elai.upm.es](mailto:cplatero@elai.upm.es)

Ángeles Trillo<sup>2</sup>, Alejandro Úbeda<sup>2</sup>

Servicio de Bioelectromagnetismo – Investigación, Hospital Ramón y Cajal, 28034 Madrid<sup>2</sup>,  
[angeles.trillo@hrc.es](mailto:angeles.trillo@hrc.es), [alejandro.ubeda@hrc.es](mailto:alejandro.ubeda@hrc.es)

## Resumen

*Este trabajo describe un sistema de procesamiento de imágenes digitales para la enumeración de núcleos de células madre neurales. El principal objetivo es contar el número de núcleos celulares en una imagen, proveniente del microscopio, y cuántos de ellos contienen una determinada proteína receptora, R1, en su citoplasma. Con este fin se ha diseñado un conjunto de algoritmos para una eficiente segmentación de las células. Transformaciones no lineales en las imágenes de color junto a técnicas de descomposición del histograma en distribuciones cuasi normales marcan la etapa de preprocesado y umbralización. El postprocesado exige un tratamiento morfológico con elementos estructurantes en forma ovalada. Además, para resolver el problema de solapamiento de los núcleos se ha empleado información de los contornos celulares que ha mejorado los resultados del tradicional algoritmo ‘watershed’, ampliamente utilizado en el solapamiento de las células.*

**Palabras Clave:** Procesamiento del color. Umbralización automática. Segmentación de núcleos celulares.

## 1 INTRODUCCIÓN

En la controversia sobre los posibles efectos adversos de la exposición ambiental a microondas de uso en la telefonía móvil, el aspecto sanitario de mayor interés es, con diferencia, el de los potenciales efectos cancerígenos de estas señales. En la determinación del potencial carcinógeno de las emisiones de telefonía móvil, los estudios in vitro sobre células potencialmente sensibles son cruciales para la identificación de los mecanismos de la respuesta celular. El presente estudio describe el desarrollo de un algoritmo capaz de valorar potenciales respuestas celulares relacionadas con el proceso cancerígeno

tras la exposición in vitro a señales GSM. El estudio biomédico se ha enfocado en la expresión de la proteína receptora R1 de las células madre neurales procedentes de sistema nervioso de rata. Una expresión anormal de la proteína R1 en los cultivos tratados sería indicativa de una potencial acción adversa de la señal GSM sobre el metabolismo celular.

Las células madre neurales fueron expuestas a RF de 1800 MHz; señal GSM-Basic con tasa de absorción específica (SAR) 2 mW/g. Las condiciones de exposición-control se llevaron a cabo en un sistema [14] que consiste en dos cámaras de resonancia situadas en el interior de un incubador de CO<sub>2</sub>. Cada cámara (WG1 y WG2) está provista de una antena emisora unida a un generador externo que estimula al azar, una u otra, según un protocolo doble ciego. Al final de la exposición de la radiación no ionizante se realizaron análisis de inmunocitoquímica. La valoración de las respuestas se realizó mediante el estudio de las imágenes digitales provenientes de una etapa de microscopía.

El procesamiento digital tiene como objetivo contar aquellos núcleos celulares en cuyo citoplasma correspondiente aparece la proteína receptora R1, respecto del total de núcleos en la muestra. Se pretende automatizar esta contabilidad por doble motivo. En primer lugar, el volumen de las imágenes necesarias para demostrar la hipotética relación causa-efecto es tan alto que exige de una puesta algorítmica. En segundo lugar, se pretende eliminar, en todo lo posible, la subjetividad y la eficiencia limitada del propio analizador humano.

La organización de esta ponencia está realizada como sigue. En la sección 2, se presenta un breve estado de las técnicas del procesamiento de imágenes biomédicas relacionadas con el escenario de cuerpos biológicos celulares. El tercer párrafo se destina a la descripción de las algoritmias de la Visión Artificial empleadas para contar núcleos celulares y la expresión de la proteína receptora R1. En la sección 4, los resultados experimentales son presentados,

reflejando una comparativa entre los distintos algoritmos desarrollados y la numeración manual. Por último, en 5 se reflejan las conclusiones de este trabajo.

## 2 PROCESAMIENTO DE IMÁGENES BIOMÉDICAS RELACIONADAS CON ESCENARIOS CELULARES

Aunque todavía el 70% de las imágenes biomédicas son todavía radiografías, cada vez hay un mayor incremento en todos los ámbitos de las Ciencias de la Salud del uso de imágenes digitales para un posterior tratamiento y almacenamiento: radiografías digitales, tomografías, resonancias magnéticas, ultrasonido, medicina nuclear y angiografía de substracción digital, entre otras, que ocupan el 30% restante[10][12]. En los últimos años se ha asistido a un cambio sustancial en la forma de adquirir y manejar este tipo de información. Aunque el procesamiento de imágenes digitales y todo lo que circunda alrededor de ello, lleva ya más de 20 años implementándose en la industria y en la actualidad son rutinarias en el campo del control de calidad de los productos, en el ámbito de la Biomedicina está mucho menos implantada. Sin embargo, en estos momentos se está aplicando las potencialidades de la Visión por Computador a muchas problemáticas de la Medicina y la Biología. De esta forma y centrándose en el procesamiento de imágenes con escenarios celulares biológicos, se podrían citar los siguientes avances.

Los métodos en inmunocitoquímica hacen posible crear marcajes específicos que muestran la presencia, la forma y la distribución de proteínas, enzimas, neurotransmisores, receptores de membrana, etc., en células y tejidos [7][8].

La cuantificación de señales de fluorescencia FISH (*Fluorescence In Situ hybridization*), es capaz de rendir información en temas tan dispares como la determinación de la cantidad relativa de oncogenes en procesos tumorales relacionados con cáncer de mama, o bien en la determinación del quimerismo alcanzado por un paciente tras trasplante. El diagnóstico de los procesos carcinogénicos se ha visto notablemente favorecido tras la aplicación de estas técnicas [16][11].

El cartografiado de secuencias específicas de DNA sobre genomas de distintas especies, se ha visto notablemente mejorado en sus niveles de resolución gracias a la utilización del análisis digital de imagen [6][9][17]. Sondas de ADN con marcado

fluorescente permiten conocer tanto el daño genético como determinar secuencias del genoma humano, ya que al hibridar éstas dentro de un cromosoma, el resultado es una emisión de irradiación dentro del espectro visible. Su intensidad es proporcional al número de hibridaciones realizadas.

Incluso, partículas biológicas de mínimo tamaño, como son los virus, pueden resolverse, analizarse y cuantificarse a través de información generada desde microscopia óptica [5]. El nivel vírico de las células puede ser determinada por la relación entre un gen patrón y los virus depositados en ella. Ambos tipos son marcados por fluorocromos de diferentes niveles de longitud de onda dentro del espectro visible.

## 3 ALGORITMIA PARA LA NUMERACIÓN DE NÚCLEOS CELULARES Y DE LA PROTEÍNA RECEPTORA R1

En la figura 1 se muestra una imagen adquirida a través del microscopio procedente de una de las cámaras de ensayo. Se observan las células madre neurales. En color azul intenso aparecen los núcleos celulares y sus ramificaciones citoplasmáticas, aunque éstas últimas de menor intensidad en el color pero claramente distinguible por su contorno. Por las

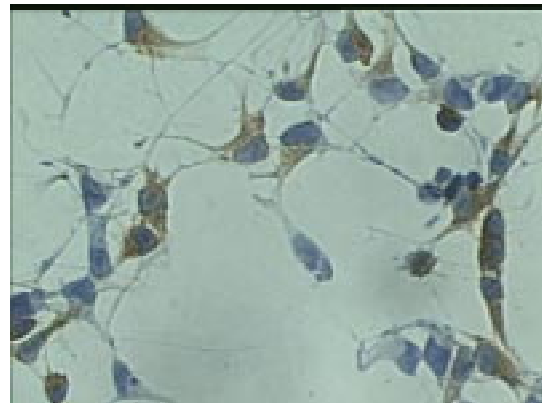


Figura 1. Células madre neurales

técnicas de inmunomarcaje, la proteína receptora R1 aparece de color marrón.

La información cromática de las imágenes de estudio hace fácilmente separable, el fondo, los núcleos y el marcaje específico para R1. El alto valor de tono (*hue*) del azul oscuro y en menor medida del azul claro, junto al nivel bajo de tono del marcaje R1, requiere de una transformación de RGB a HSV. En la figura 2 se muestra los resultados de este cambio.



Figura 2 Rodaja tona de la transformación de RGB a HSV

Con el objeto de poder separar el fondo de la imagen respecto de los núcleos y de los citoplasmas marcados se procede a la umbralización a partir del histograma de la imagen transformada. La figura 3 a) muestra un histograma en el cual se puede apreciar los tres grupos de información de la imagen: marcaje, fondo y núcleos. Sin embargo, una determinación de los umbrales de forma automática a través de características estadísticas de estos grupos no es posible de momento. El histograma no se ajusta a ningún modelo de función de distribución fácilmente parametrizable.

Siguiendo la línea de *Chang et al*[3], se propone caracterizar el histograma como la superposición de tres funciones de distribución normal, correspondiente a cada uno de los grupos definidos, caracterizados por sus medias y varianzas ( $m_1, \sigma_1^2$ ), ( $m_2, \sigma_2^2$ ) y ( $m_3, \sigma_3^2$ ), junto con sus respectivas proporciones,  $P_1$ ,  $P_2$  y  $P_3$ . De manera que la estimación de estos parámetros conduzca a que:

$$h(i) \approx \sum_{j=1}^3 \frac{P_j}{\sqrt{2\pi}\sigma_j} \exp\left\{-\frac{1}{2}\left(\frac{i-m_j}{\sigma_j}\right)^2\right\} \quad (1)$$

siendo  $i$  el nivel de gris de la imagen y  $h(i)$  la cuantificación del histograma. A partir de esta aproximación se buscará los dos umbrales óptimos que sean capaces de separar los tres grupos,  $t_1$  y  $t_2$ .

Tal cual se ha mostrado en la figura 3 a), el histograma no sigue fielmente la expresión (1). Por tanto, se requiere filtrarlo antes de ser decompuesto. Con este fin se procede a suavizar el histograma a través de un FIR de Gauss.

Sea un FIR de orden  $par$  y simétrico, esto es, de fase lineal o no dispersivo, y cuya secuencia de ponderación coincide con los coeficientes de la máscara de convolución, quedará definido por ser de Gauss en la forma:

$$b_k = \left(1 - \cos\left(\frac{\pi k}{p}\right)\right) \quad k = 0, 1, \dots, p, \dots, 2p \quad (2)$$

donde  $2p$  es el orden del filtro y el índice del filtro causal,  $k$ , va desde 0 hasta el índice del filtro. Los coeficientes tienen simetría alrededor del valor de  $p$ . Al convolucionar el histograma con la máscara definida, el resultado muestra una mayor aproximación a la expresión del modelo, (1). Sin embargo, presenta un desfase en la dirección de la propagación del filtro como consecuencia de la fase lineal de éste. Por dicho motivo, se vuelve a procesar la salida con el retardo incluido, de manera que en el conjunto total, el desfase sea nulo:

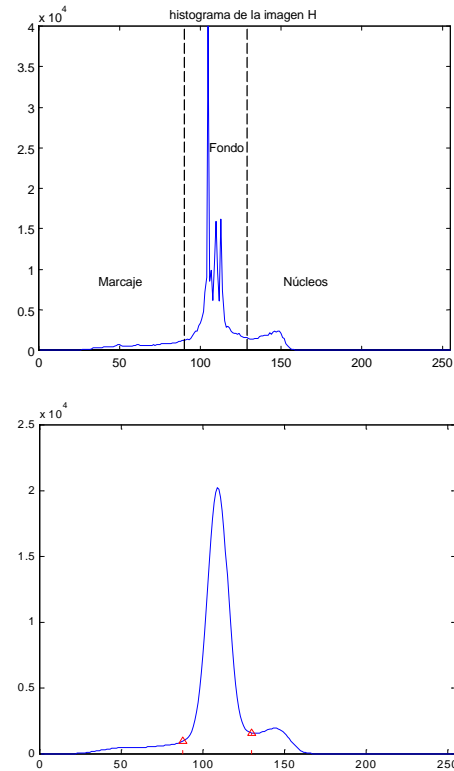


Figura 3: Histograma de la imagen transformada a) original, b) filtrada

$$\tilde{H} = H \otimes B_G \quad (3)$$

siendo  $H$  el histograma de la imagen transformada,  $B_G$  la máscara de convolución de Gauss,  $\tilde{H}$  el histograma procesado y  $\otimes$  el operador convolución discreta con desfase nulo.

La rapidez de la umbralización se basa en considerar que el índice del máximo valor del histograma procesado corresponde con la estimación máximo verosímil de la media del fondo:

$$\hat{m}_{fondo} = \lfloor j | \max(\tilde{h}(j)) \rfloor \quad (4)$$

A partir de esta estimación, se va abrir una ventana simétrica que permita conocer el intervalo de distribución del fondo. La apertura de esta ventana va a depender de la medida del sesgo,  $\beta$ .

Este parámetro se define como una relación entre el segundo y tercer momento central de un conjunto de muestras:

$$\beta = \frac{\mu_3}{\sqrt{\mu_2^3}} \quad (5)$$

donde  $\mu_x^y$  representa el momento central y elevado a  $x$ .  $\beta$  tiene la propiedad de indicar si hay sesgo a la izquierda o a la derecha respecto a la media. Si  $\beta > 0$  significa que la distribución está escorada a la izquierda, en cambio, cuando  $\beta < 0$  indica sesgo de la distribución a la derecha. Para una distribución normal  $N(m, \sigma^2)$ , al ser una función par alrededor de la media, los momentos centrales impares serán nulos,  $E\{(x - \hat{m})^3\} = 0$ . Por tanto, el sesgo será nulo para distribuciones normales.

La técnica de umbralización aquí propuesta se basa en crear una ventana simétrica alrededor de la estimación  $\hat{m}_{fondo}$  y computar el sesgo, de forma que

su valor absoluto sea menor a un determinado valor. Por tanto, sea la ventana  $w_l$ , definida en el intervalo  $[\hat{m}_{fondo} - l, \hat{m}_{fondo} + l]$ , se calcula el sesgo a partir de las siguientes expresiones:

$$\hat{m}_{w_l} = \frac{\sum_{i \in w_l} i \tilde{h}(i)}{\sum_{i \in w_l} \tilde{h}(i)} \quad \mu_n(w_l) = \frac{\sum_{i \in w_l} (i - \hat{m}_{w_l})^n \tilde{h}(i)}{\sum_{i \in w_l} \tilde{h}(i)} \quad (6)$$

$$\beta(w_l) = \frac{\mu_3(w_l)}{\sqrt{\mu_2^3(w_l)}}$$

el valor de  $l$  irá desde uno hasta alcanzar un intervalo tal que:

$$w^* = \lfloor [\hat{m}_{fondo} - l^*, \hat{m}_{fondo} + l^*] | \beta(w_l^*) < umbral \rfloor \quad (7)$$

los valores extremos del intervalo definirán los umbrales de separación entre el marcaje y el fondo,  $t_1 = \hat{m}_{fondo} - l^*$ , y el fondo con los núcleos,  $t_2 = \hat{m}_{fondo} + l^*$ . En la figura 4 se muestra el procesamiento del histograma y los umbrales seleccionados según el algoritmo propuesto.

Sin embargo, tal cual se contemplan en las figuras 4.a) y 4.b), los resultados de la umbralización no son definitivos. Por ello, se aborda, a continuación, la problemática del número de núcleos totales y luego

se analiza el algoritmo de las presencias de la proteína R1.

La aplicación de  $t_2$  produce el solapamiento, a veces,

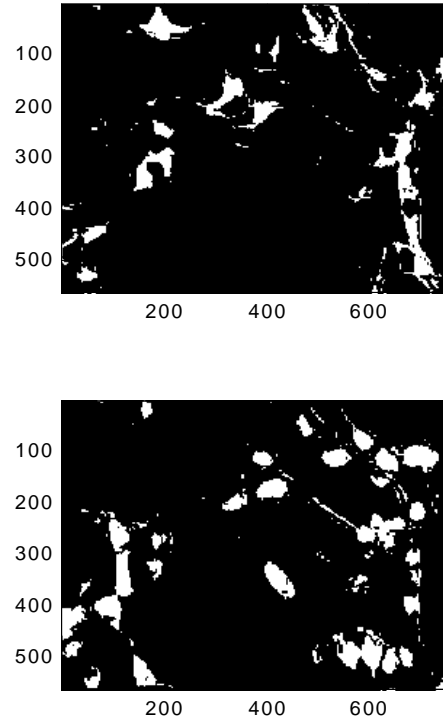


Figura 4. Resultados de la umbralización automática, a) Marcaje R1, b) Núcleos

de los núcleos celulares y la presencia de ruido. Un suavizado morfológico eliminará el ruido. En cambio, para la separación de los núcleos se han probado distintas técnicas. Es usual y clásico emplear el algoritmo 'watershed'[1] para la separación de las células o de cuerpos biológicos solapados[13][4]. Otra algoritmia probada ha sido el uso de operaciones morfológicas con elemento estructurante en forma ovalada. No obstante, los mejores resultados se han conseguido al emplear la información de los contornos de los núcleos.

En la detección de los contornos de los núcleos se probaron varias técnicas, desde las máscaras de Sobel hasta los métodos de Canny[2], pasando por la laplaciana de Gauss y el zero-crossing. Todos ellos se presentaron ruidosos y poco eficientes. En cambio, el gradiente morfológico, al emplear un elemento estructurante simétrico, no tiene direcciones privilegiadas en la detección de los bordes. Después de depurar los contornos, resultó inmediato la separación de los núcleos solapados. Una substracción binaria con saturación entre los núcleos y los contornos rompía con los problemas de solapamiento.

Problemas adicionales se han presentado con la apoptosis (muerte celular programada), las cuales no hay que contarlas. Aparecen en estado más embrionario, menor tamaño el núcleo y sin casi citoplasma. El color del núcleo es más oscuro en el azul. Se ha resuelto por tamaño, por nivel de gris en el verde del RGB respecto a la media y la desviación típica de los núcleos etiquetados y por la falta de citoplasma.

La segunda etapa trata de contar aquellos núcleos que han sido marcados, esto es, que presentan en su contorno citoplasmático la proteína receptora R1. Tras la eliminación de los puntos espurios procedentes del umbral  $t_1$ , se procedió a una dilatación binaria de las membranas, acompañada con una intersección de los núcleos resultantes de la etapa anterior. Estas operaciones generan las semillas de crecimiento condicional que resultarán la contabilidad de aquellos núcleos con presencia en su citoplasma de la proteína R1.

En la figura 5.a) se muestra los resultados de contabilizar los núcleos y en 5.b) el subconjunto de aquellos que tienen asociada la proteína inmunomarcada.

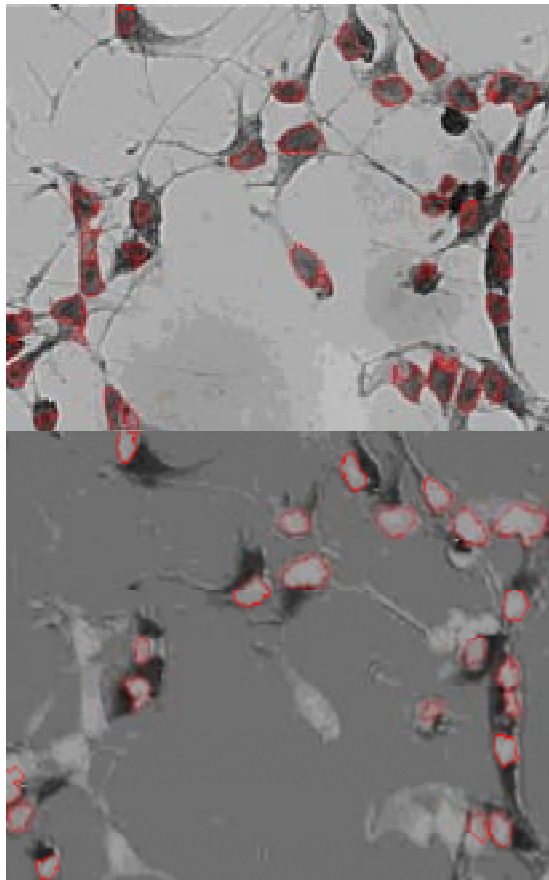


Figura 5. a) Núcleos totales contados por el algoritmo presentado b) Núcleos seleccionados con presencia de proteína R1

## 4 RESULTADOS EXPERIMENTALES

Los datos analizados son imágenes procedentes de las células madre neurales depositadas en las cámaras WG1 y WG2, de las cuáles no se conoce cuáles han servido para el control y cuáles para la exposición, esto es, no se conoce en qué cámara se irradió la señal GSM-Basic.

Se parte de un total de 16 imágenes por cada cámara y por cada jornada de experimento. Por cada imagen se añade un informe de la contabilidad manual de los números de núcleos totales y de la enumeración de núcleos que tienen en su citoplasma correspondiente la presencia de la proteína R1. El conteo es realizado siempre por la misma persona.

Los resultados sobre un experimento, que ha servido como elemento conductor de la mejora algorítmica, quedan reflejados en la tabla 1. En la primera columna aparece la referencia de la imagen en su correspondiente cámara (WG1 o WG2). La segunda fila muestra el número de núcleos contados manualmente. Las tres siguientes reflejan los resultados de los distintos algoritmos ensayados: mediante operaciones morfológicas exclusivamente, empleando el algoritmo *watershed* y por último, la aplicación de la información de los contornos.

WG1	Manual	Morfología	<i>Watershed</i>	Morfología+ contorno
2	23	22	20	22
3	31	28	19	27
4	41	34	34	36
5	34	30	36	28
6	26	19	24	26
7	40	35	29	33
8	9	11	14	10
9	22	24	22	24
10	42	40	46	36
11	29	25	23	23
12	27	28	14	26
13	42	34	46	36
14	34	30	21	29
<b>Total</b>	<b>400</b>	<b>360</b>	<b>348</b>	<b>356</b>

Tabla 1. Comparación entre los distintos algoritmos en la numeración de los núcleos de la cámara WG1

WG2	Manual	Morfología	Watershed	Morfología+ contorno
1	33	26	42	32
2	23	14	25	23
3	16	15	28	18
4	15	11	43	13
5	21	19	22	19
6	10	10	17	12
7	10	12	18	13
8	14	12	28	14
9	13	16	21	17
10	15	10	33	14
11	19	24	34	26
12	15	21	27	23
13	25	24	31	28
14	21	19	33	21
15	15	16	19	15
16	13	13	13	14
<b>Total</b>	<b>278</b>	<b>262</b>	<b>434</b>	<b>302</b>

Tabla 2. Comparación entre los distintos algoritmos en la numeración de los núcleos de la cámara WG1.

Los resultados indican que en el conjunto del experimento, la diferencia entre el algoritmo propuesto y la contabilidad manual es de un 3%, en cambio con los procedimientos clásicos van desde el 8% al 15%.

Un buen acierto en la enumeración de los núcleos conducirá también a un buen resultado del número de núcleos cuyo citoplasma correspondiente presenta la proteína. En la tabla 3 se comparan los resultados manuales con el algoritmo propuesto. La diferencia

WG1	Manual	Dilatación condicional	WG2	Manual	Dilatación condicional
2	14	13	1	19	22
3	14	19	2	15	14
4	18	28	3	11	10
5	14	14	4	13	10
6	14	13	5	10	11
7	11	19	6	5	5
8	6	5	7	4	4
9	10	16	8	12	11
10	16	24	9	8	8
11	11	15	10	12	11
12	11	17	11	11	14
13	22	25	12	3	1
14	18	23	13	12	19
<b>Tot.</b>	<b>179</b>	<b>231</b>	14	14	19
			15	9	8
			16	5	6
			<b>Tot.</b>	<b>163</b>	<b>173</b>

Tabla 3. Comparación entre la contabilidad manual y el algoritmo propuesto respecto a núcleos asociados a presencia de R1.

es de un 18%.

El desarrollo de estos algoritmos ha sido llevado con 'Image Processing Toolbox' de MATLAB y con 'SDC Morphology Toolbox'[15].

## 5 CONCLUSIONES

El presente trabajo presenta un conjunto de propuestas algorítmicas, basadas en Visión Artificial, para la enumeración de núcleos celulares y cuántos de ellos tienen asociada la presencia de una determinada proteína en su citoplasma.

En primer lugar, son presentadas las transformaciones de RGB a HSV para mejorar la separación entre el fondo, los núcleos y el marcaje inmunocitoquímico.

Un método novedoso es propuesto para la umbralización de las imágenes transformadas. Se basa en la modelización del histograma como la combinación de tres distribuciones normales, correspondientes a cada uno de los grupos mencionados: marcaje, fondo, núcleos. Se emplea el sesgo muestral para la localización óptima de la ventana del fondo, obteniendo los núcleos y el marcaje.

Para la contabilidad de los núcleos y superar el inconveniente del solapamiento de éstos, se recurre a la información del contorno celular a través del gradiente morfológico, junto al postprocesado de la etapa de umbralización. La selección de los núcleos con presencia de proteína R1 asociada se ha basado en el crecimiento condicional de la intersección entre el marcaje y los núcleos.

## Agradecimientos

Este proyecto tiene financiación dentro de los proyectos precompetitivos de la Universidad Politécnica de Madrid.

El estudio biomédico incluido en este trabajo forma parte del Proyecto Europeo REFLEX (QLK4-CT-1999-01574).

## Referencias

- [1] Beucher, S., Meyer, F., (1993), *The morphological approach to segmentation: the watershed transformation*, Mathematical Morphology in Image Processing, 12, 433-481, Marcel Dekker, New York, 1993.
- [2] Canny, J., (1986), *A Computational Approach to Detect Edge*, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, PAMI 8, 6, 679-698.
- [3] Chang, J., Fan, K., Chang, Y., (2002), *Multi-modal gray-level histogram modeling and decomposition*, Image and Vision Computing 20 203-216.
- [4] Di Ruberto, C., Dempster, A., Khan, S., Jarra, B., (2002), *Analysis of infected blood cell images using morphological operators*, Image and Vision Computing, 20 122-146.
- [5] Gosálvez, J., Rodríguez, E., Bartolomé, J., Carreño, V.,(1998), *Relative quantification and mapping of hepatitis C virus by 'in situ' hybridization and digital image analysis*. Hepathology, 27: 1428-1435.
- [6] Helma, Chr., Uhl, M., (2000), *A public domain image-analysis for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay*, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 466, 9-15.
- [7] Kim, D., Gregory, C.W., Smith G.J., Mohler, J.L., (1999) Immunohistochemical quantitation of androgen receptor expression using color video image analysis, Cytometry, Jan, 35(1): 2-10.
- [8] Kraan, M.C., Haringman, J.J., Ahern, M.J., Breedveld, F.C., Smith, M.D., Tak, P.P., (2000) Quantification of the cell infiltrate in synovial tissue by digital image analysis. Rheumatology-Oxford. Jan, 39(1): 43-9.
- [9] Machado, A., Campos, M., Siquiera, A., Carvalho, O., (1997), *An Iterative Algorithm for Segmenting Lanes in Gel Electrophoresis Images*, IEEE.
- [10] Maintz, J., Viergever, M., (1998) *A survey of medical image registration*, Medical Image Analysis, Volume 2, Issue 1.
- [11] Mogilner, J., Eldar, S., Sabo, E., Hassoun, M., Attias, D.(2000), *Computer-assisted image analysis can aid the prognostication of advanced-Stage neuroblastomas*, Cancer Res. Clin. Oncol, 126:285-90.
- [12] Osborn, K., (2000), Medical Imaging on the internet, <http://www.tip.net.au/~kevosb/>.
- [13] Potocnik, B., Zazula, D., (2002), *Automated analysis of a sequence of ovarian ultrasound images. Part I: segmentation of single 2D images*, Image and Vision Computing, 20 217-225
- [14] Schuderer, J., Mertens, R., Oesch, W. Frauenknect, U. Kuster, N. (2001) Flexible and efficient in vitro exposure setup for risk assessment studies at 1800 MHz enabling any modulation scheme from sub-Hz up to 15 MHz and double blind protocols. Tewnty-third Annual BEMS Meeting, 26.
- [15] SDC Information System, (2002), *SDC Morphology Toolbox for MATLAB 5*, Naperville, USA.
- [16] Vukovic, V., Nicklee, T., Hedley, D.,(2000), *Microregional heterogeneity of non-protein thiols in cervical carcinomas assessed by combined use of HPLC and fluorescence image analysis*, Clin Cancer Res, 6:1826-32.
- [17] Watanabe, Y., Takahashi, K., (1998), *A Fast Structural Matching and Its Application to Pattern Analysis of 2-D Electrophoresis Images*, IEEE.