

# Introducción a Técnicas de Segmentación de Células del Ensayo Cometa

Javier Luna-Gonzalez<sup>1,\*</sup>, Anabel Martín-Gonzalez<sup>1</sup>, Carlos Brito-Loeza<sup>1</sup>, Arturo Espinosa-Romero<sup>1</sup>, Elda Pacheco-Pantoja<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Computational Learning and Imaging Research, Facultad de Matemáticas, Universidad Autónoma de Yucatán, Anillo Periférico Norte, Tablaje Cat. 13615, CP. 97205, Mérida Yucatán México.

<sup>2</sup>Universidad Anáhuac Mayab, Carr. Mérida Progreso Km. 15.5, AP. 96, Cordemex, CP. 97310, Mérida, México

*Fecha de recepción: 21 de septiembre de 2018 — Fecha de aceptación: 22 de noviembre de 2018*

## Resumen

El ensayo cometa, o electroforesis unicelular en gel, ha sido un método de confianza para el estudio del daño de células de ácido desoxirribonucleico (ADN), y la evaluación de su capacidad regenerativa al ser expuestas a una degradación. Debido a su alto grado de confianza y efectividad en los resultados del ensayo cometa, múltiples áreas han optado por implementar el método en sus estudios; desde ensayos de genotoxicidad y ecotoxicología, hasta estudios de biomonitorio en humanos. Dichos resultados, son registrados en imágenes mediante microscopios, de las cuales es posible extraer la información para el análisis estadístico de estado del ADN. Durante las últimas dos décadas, la intervención de algoritmos y métodos computacionales para automatizar el proceso de segmentación de las células en el ensayo cometa ha ido en aumento, convirtiéndose en una importante área de investigación y desarrollo. Este artículo presenta los trabajos realizados sobre análisis computacional de los resultados del ensayo cometa, describiendo sus metodologías, principales avances y áreas de oportunidad.

**Palabras clave:** Ensayo cometa, análisis computacional, segmentación, extracción de información, células de ADN.

## Introduction to Segmentation Techniques of Comet Assay Cells

### Abstract

The comet assay (single-cell gel electrophoresis) has been a reliable method for the study of DNA damage of the cells and the evaluation of their regenerative capacity. Due to the high degree of confidence and effectiveness in the results of the comet assay, multiple areas have chosen to implement it in their studies; from essays of genotoxicity and ecotoxicology, to human biomonitoring studies. These results are registered in images through microscopes, from which it is possible to extract information for the statistical analysis of DNA status. During the last two decades, the algorithms and computational methods to automate the process of cell segmentation in the comet assay has been increasing, becoming an important area of research and development.

---

\*[jaavierlunaa@gmail.com](mailto:jaavierlunaa@gmail.com)

Nota: Este artículo de divulgación es parte de Ingeniería—Revista Académica de la Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Yucatán, Vol. 22, No. 3, 2018, ISSN: 2448-8364

This article presents the state of the art on computational analysis of comet assay results, describing their methodologies, main advances and opportunity areas.

**Keywords:** Comet assay, computational analysis, segmentation, information extraction, DNA cells.

## Introducción

El ensayo cometa se define como una prueba de laboratorio que estudia el daño del material genético en seres vivos infringido por diferentes agentes químicos, físicos y biológicos (Rodríguez-Rey et al., 2016, Klaude et al., 1996, Fairbairn et al., 1995, McKelvey-Martin et al., 1993). Es un procedimiento confiable para la detección y evaluación de la capacidad regenerativa en el ADN, lo cual se visualiza al teñir, con materiales fluorescentes, las células procesadas por el ensayo cometa. El material genético expuesto se adhiere al

colorante, permitiendo analizar los resultados del experimento mediante un microscopio con cámara integrada.

Como resultado del ensayo cometa, existen dos partes fundamentales que se podrían presentar en la estructura de las células de ADN procesadas (ver Figura 1): un núcleo, denominado cabeza del cometa, que contiene todo el material genético que resistió al daño inducido durante la prueba; y una cola, denominada cola del cometa, que representa la porción desplazada del núcleo por no poseer la suficiente estabilidad genómica.

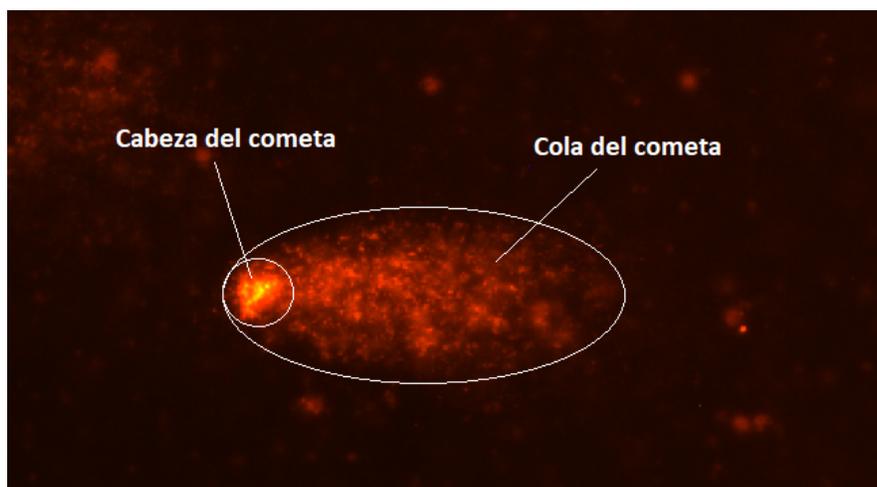


Figura 1. Estructura de una célula procesada con el ensayo cometa

El ensayo cometa ha tenido un gran impacto en áreas como la biomédica y la genómica, actuando como biomarcador en el análisis y estudio de enfermedades degenerativas, tales como el cáncer, diabetes, osteoporosis, enfermedad de Alzheimer, entre otros (Rojas et al., 1999, Collins, 2004, Wasson, 2008,

Dusinska y Collins, 2008, Olive, 2009, Jha, 2008, Anderson et al., 1998, Cortés-Gutiérrez et al., 2011). Es un proceso en el cual las células adquieren la característica de heterogeneidad que permite el estudio del comportamiento individual de estas. El cálculo de parámetros y medidas de los cometas

formados sobre las imágenes obtenidas a través del microscopio (Ashby et al., 1995, Kumaravel et al., 2007), permiten generar análisis estadísticos de las propiedades de los cometas y su posible relación con enfermedades o agentes patógenos.

Durante las últimas dos décadas, los trabajos que proponen métodos para la automatización de la detección de regiones de interés en imágenes, así como su respectivo cálculo de parámetros, han ido en aumento (Barber et al., 2001, Barber et al., 2000, Kim et al., 2001), generando sistemas que han permitido procesar los resultados de manera rápida y eficiente. Estos sistemas varían en sus funcionalidades y características de uso, pero es posible clasificarlos en dos categorías principales: automáticos, los cuales no necesitan la intervención del usuario para realizar tanto la segmentación de los cometas, como la extracción de sus propiedades; y semi-automáticos, los cuales necesitan el apoyo del usuario para realizar la segmentación correspondiente.

En el presente artículo se proporciona una revisión profunda de los diversos métodos y algoritmos implementados en los últimos años para la segmentación de células del ensayo cometa y la extracción de sus parámetros. Así mismo, se realiza un esquema comparativo de todos los trabajos expuestos, señalando sus contribuciones, áreas de oportunidad y resultados de cada uno.

### **Sistemas automáticos de procesamiento de imágenes del ensayo cometa**

Dentro de los trabajos de procesamiento automático de las imágenes de células del ensayo cometa, han surgido diversos métodos y propuestas de algoritmos para obtener

sistemas confiables que permitan realizar el cálculo de parámetros de forma más rápida. Böcker et al., (1999) presentan un sistema integrado de software y hardware para procesar, segmentar y clasificar, de forma automática, imágenes de células del ensayo cometa basando su análisis en técnicas de morfología matemática. Además, proponen un método de cómputo paralelo para acelerar el procesamiento de las imágenes. Dividen su desarrollo en tres etapas que operan de manera paralela y sincronizada. La primera etapa se denomina *searching and autofocus*, que opera sobre el módulo de autoenfoco del microscopio y se encarga de localizar las áreas más luminosas de la laminilla del microscopio, suponiendo que estas son las áreas que contienen células del ensayo cometa. La siguiente etapa, *grabbing and administration*, adquiere las imágenes de los cometas y las almacena en la unidad de procesamiento central de la computadora. En la última etapa, *recognition and analysis*, el sistema realiza un filtrado de las imágenes adquiridas mediante morfología matemática y corrección de sombreado; y realiza la segmentación de los cometas en dos etapas: la primera consiste en umbralizar globalmente la imagen para determinar la cantidad de ruido que permanece en ella; posteriormente umbraliza adaptivamente, esto es, determina un valor de umbral mediante histéresis (Zamperoni, 1991). Su sistema presenta una especificidad de 92.7% y sensibilidad del 95.2% para identificar cometas de un conjunto de 500 imágenes de células del ensayo cometa; sin embargo, este software no realiza reconocimientos de cometas que presentan demasiada degradación (Figura 2a) o están traslapados con otros cometas (Figura 2b).

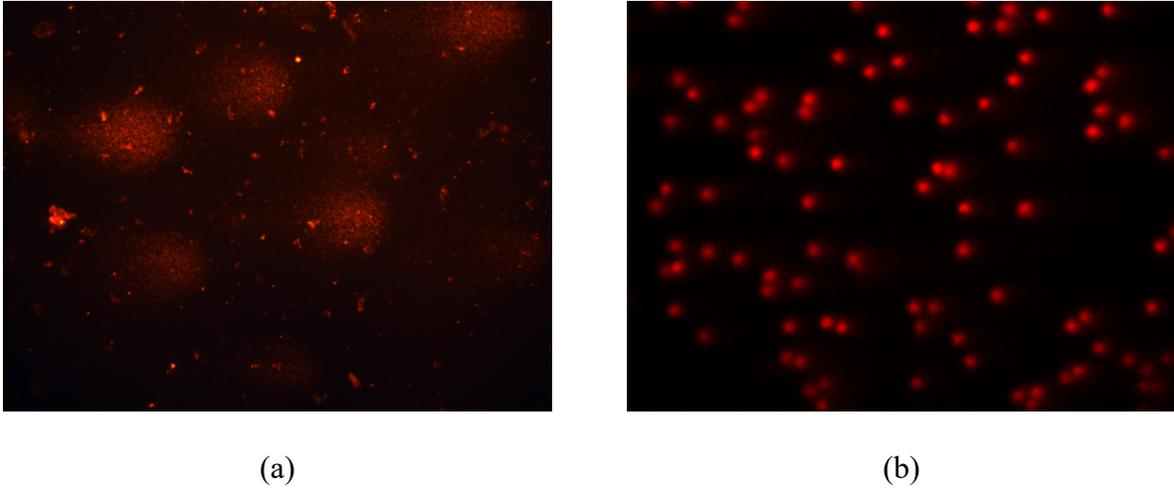


Figura 2. Ejemplos de cometas: a) altamente degradados, b) traslapados

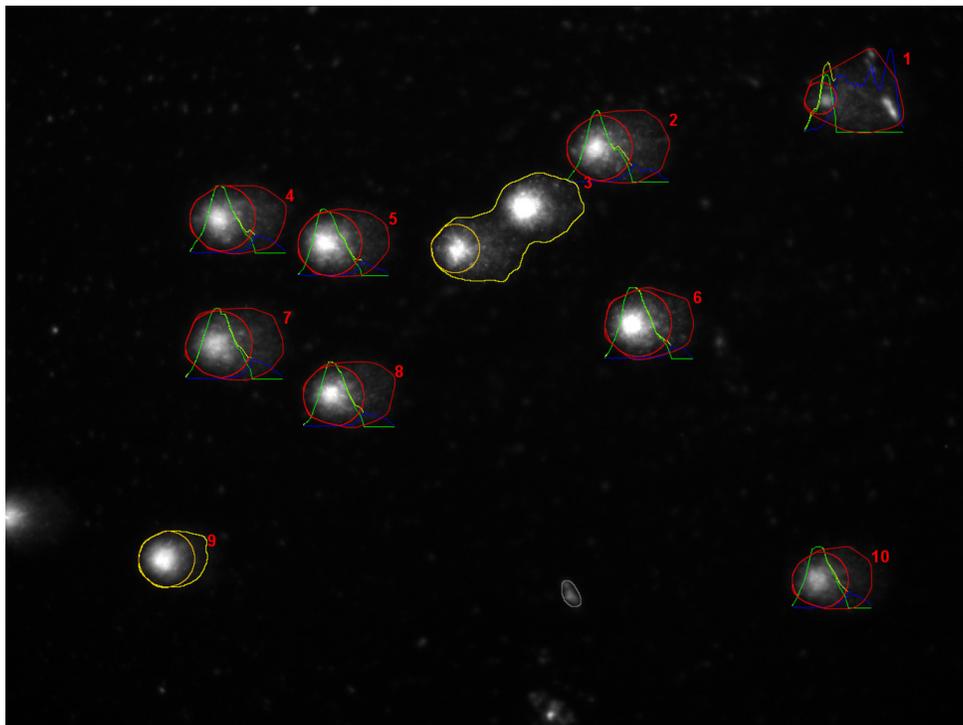


Figura 3. Cometas procesados por el *OpenComet*

Gyori et al. (2014), proponen una herramienta de libre licencia para la detección automática de las células procesadas por el ensayo cometa

llamada *OpenComet*. El software procesa imágenes en escala de grises con células del ensayo cometa (ver Figura 3). Si la imagen es

a color (múltiples canales), el sistema utiliza la imagen correspondiente al canal de luminosidad que posea mayor información debido a que se deduce que las zonas más iluminadas de la imagen representan las porciones de ADN de las células. El software realiza un filtrado de ruido y una corrección global del fondo de la imagen para proceder con una umbralización adaptativa por el método de Huang (Huang y Wang, 1995), el cual determina el valor óptimo de umbral al minimizar la medida de difusión en la imagen. Posteriormente, se obtiene una imagen binaria tomando como referencia el valor de umbral encontrado en el paso anterior; se aplica filtrado de morfología matemática; y se eliminan las zonas muy pequeñas que se clasifican como ruido en la imagen. Para identificar a los cometas traslapados asumen dos hipótesis: la primera propone que los cometas forman regiones convexas, es decir, que no poseen irregularidades al aplicarles algoritmos de *Convex Hull* (Acharya et al., 2005); la segunda indica que los cometas son simétricos debido a la naturaleza de la

aplicación del ensayo cometa, y suponen que los cometas tienen una orientación con respecto al eje horizontal de la imagen. Una vez identificadas las regiones de cometas individuales y las regiones de cometas con traslapes, segmentan las cabezas de los cometas individuales con la principal suposición de que el área de la cabeza de los cometas es la que posee mayor luminosidad. Debido a la naturaleza de la prueba y de los resultados de las células, es posible que los cometas presenten severo daño en el material genético de las células, lo que se visualiza en un cometa sumamente fragmentado y posiblemente con mayor luminosidad en la región de su cola. En estos casos, los autores toman una segunda suposición: analizar el perfil del cometa para encontrar el límite entre la cabeza y la cola del cometa. Primero, aplican la suposición de la región más luminosa y prosiguen con el análisis del perfil. En su primer método examinan cada cometa para encontrar el umbral  $T^*$ , que segmenta la región con el conjunto de píxeles de mayor intensidad, mediante la siguiente fórmula:

$$T^* = \arg \min_T \left( \sum_{(x,y) \in C} I(P(x,y) > T) \right) > 0.95|C|$$

donde  $P(x,y)$  es la intensidad en escala de grises en la coordenada  $(x,y)$  de la imagen,  $C$  es el conjunto de píxeles que pertenecen al cometa,  $|C|$  es el número de píxeles en el cometa; por último,  $I$  es la función que retorna 1 si su

argumento es verdadero, y 0 de lo contrario. Para calcular el centro de masa  $(x_c, y_c)$  de la cabeza del cometa, primero se obtiene el valor de la coordenada del eje horizontal de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$x_c = \sum_{(x,y) \in C} I(P(x,y) > T^*) xP(x,y)$$

La coordenada  $y_c$  en el eje vertical  $y$ , se toma de la línea central del cometa. La región de la cabeza se obtiene al definir una circunferencia alrededor de  $(x_c, y_c)$  con radio igual a la distancia desde el centro de masa hasta el último punto a la izquierda de la cabeza. Como

se había mencionado anteriormente, para cometas con alto daño en su ADN, su región con mayor luminosidad probablemente se sitúe en la cola del cometa, por lo que se aplica el análisis del perfil del cometa. Esto se realiza mediante la sumarización de la distribución de

la intensidad de los pixeles  $p(x)$  a lo largo del eje horizontal aplicando la siguiente ecuación:

$$p(x) = \frac{1}{h} \sum_{y=t}^{t+h} P(x, y), x \in \{1, \dots, w\}, (x, y) \in C$$

Por último, realizan una extracción de parámetros (ver Tabla 1) sobre los cometas segmentados. Su sistema obtiene al final una sensibilidad del 97.6% y una especificidad del 92.7% de un conjunto de 234 imágenes obtenidas de ensayos cometas realizados a células musculares de ratas. No obstante, para que su desempeño sea correcto, su sistema

requiere que las imágenes posean ciertas condiciones; una de éstas se refiere a la orientación de los cometas, la cual siempre debe estar definida de izquierda a derecha; por otro lado, el sistema es muy sensible a ruido en la imagen y manchas en las laminillas del microscopio.

Tabla 1. Parámetros extraídos por el *OpenComet*

Parámetros	Descripción
Área	Número de pixeles dentro de la región (cometa, cola y cabeza)
Longitud	Longitud en pixeles (cometa, cola y cabeza)
Contenido de ADN	Suma de la intensidad de los pixeles dentro del área de la región (cometa, cola y cabeza)
Intensidad Promedio	Contenido de ADN dividido entre su área (cometa, cola y cabeza)
% de ADN	Porcentaje del contenido de la región (cabeza o cola) en razón al contenido del cometa
Momento de Cola	Longitud de la cola multiplicado por el porcentaje de ADN de la cola
Momento Olive	Producto del porcentaje de ADN de la cola por la distancia entre los centroides de la cabeza y la cola

En 2003, Vojnovic et al., desarrollaron un sistema con alta sensibilidad y rendimiento, capaz de procesar imágenes del ensayo cometa a razón de un cometa por segundo. Su método comienza con obtener una imagen

$I_{normalizada}$ , que comprende una normalización y corrección de los niveles de grises de la imagen de entrada  $I_{cometa}$ , de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$I_{normalizada} = [(I_{cometa} - I_{negro}) / (I_{blanco} - I_{negro})]p$$

donde  $I_{blanco}$  es una imagen muestra de la fluorescencia del microscopio,  $I_{negro}$  es la correspondiente imagen muestra oscura, y  $p$  es el pico de intensidad de  $I_{blanco}$ . Para localizar las regiones de interés, se aplica una umbralización a los cometas para obtener una imagen binaria de las regiones más luminosas. Suponiendo que los cometas representan

dichas regiones, el valor del umbral corresponde a un 20% del pico máximo en el histograma de la imagen de entrada. Este proceso de segmentación por umbralización arroja una imagen con cometas completos, es decir, cabeza y cola. Para separar estas áreas recurren a algoritmos binarios de *region growing*. Las regiones de interés demasiado

grandes son generalmente rechazadas, asumiendo que pertenecen a cometas con traslape. Para delimitar la cabeza de los cometas utilizaron el algoritmo CHARM (*Compact Hough And Radial Map*), que mezcla la transformada compacta de Hough para segmentar circunferencias con la delineación de la región segmentada mediante la orientación de los píxeles de los bordes de la cabeza, los cuales se obtienen a través de máscaras de Sobel (Sobel 2014). En su sistema definen el cálculo de tres parámetros: momento Kent del cometa (Kent et al., 1995), porcentaje de ADN en la cabeza y la cola, y la longitud de la cola.

### **Sistemas semi-automáticos de procesamiento del ensayo cometa**

Dentro de los trabajos que presentan sistemas de procesamiento semi-automático para las células del ensayo cometa, se encuentra el sistema propuesto por Kiziltan y Yurtcu (Kiziltan y Yurtcu, 2015), quienes comparan su desempeño contra los resultados del software de libre licencia *CometAssay*. Su programa fue desarrollado en Borland Delphi en su versión 6.0, y ejecutado en Microsoft Windows 98 y superiores. Las imágenes de entrada deben estar en formato JPEG. Mediante la interfaz gráfica, el usuario tiene la opción de realizar calibración métrica, ajustar el valor de umbral del color de la imagen y la resolución angular/radial de la misma. Después, el usuario debe evaluar la imagen para determinar los objetos que son cometas y descartar las estructuras que no lo son. Una vez identificados los cometas, el usuario debe dar clic en el centro de la cabeza y la cola del cometa, de esta forma, el software realiza una segmentación automática de ambas regiones de interés mediante el algoritmo de mapeo radial. El algoritmo utiliza los valores de umbral y resolución predefinidos por el usuario para evaluar los bordes de la cabeza del cometa. Si el usuario no queda satisfecho con la segmentación realizada, este tiene la opción de

reajustar manualmente la región segmentada con las herramientas de reajuste de formas. Para cada cometa procesado, el software calcula los parámetros especificados por el usuario, y según los autores, tres parámetros son aceptados como buenos indicadores de daño en el ADN, los cuales son: porcentaje de ADN en la cola, momento de cola y momento Olive (Olive y Banáth, 2006). Los demás parámetros computados para los cometas, cabezas y colas son: área, longitud, contenido de ADN y porcentaje de contenido de ADN. Para validar su segmentación, analizaron 20 cometas en su sistema y en el *OpenComet*, donde la segmentación de este último era menos uniforme que su sistema propuesto. Concluyen con que sus resultados fueron bastante similares respecto a los del *OpenComet*, conjeturando que los sistemas automáticos y los semi-automáticos proporcionan resultados similares y de confianza para su posterior tratamiento estadístico, según lo requiera el investigador que esté trabajando con el ensayo cometa y su propósito.

Helma et al., (2000), desarrollaron un sistema de dominio público basado en los sistemas comerciales de análisis de imágenes del ensayo cometa con el propósito de generar una herramienta sin licencia comercial que estuviera al alcance de los investigadores. La interfaz gráfica de su programa le permite al usuario discriminar los resultados de sus análisis, determinando cuál de los cometas fueron correctamente segmentados y cuales regiones segmentadas son incorrectas o no corresponden a cometas propiamente. Para realizar la segmentación de los cometas, el software comienza con definir automáticamente un umbral para distinguir entre los objetos de la imagen y su fondo, valor que es posible ajustar mediante las herramientas interactivas del programa. Cabe recalcar que los cometas son analizados uno por uno, es decir, de acuerdo con las regiones que el umbral haya detectado, se procesan en

ventanas separadas los cometas encontrados. Una vez seleccionado un cometa a analizar, se localiza el centro de su cabeza, el cual se asume que debe estar ubicado en el punto máximo de intensidad. Para ello ubican las regiones que estén entre un 80% y 100% del nivel máximo de intensidad del cometa, para después quedarse con el área más grande de píxeles encontrados en este rango de valores. Es importante señalar que cuando existe un gran daño en el ADN de las células (la cabeza no necesariamente es la región con mayor luminosidad), el software no trabaja de manera apropiada.

Por otro lado, Lee et al., (2018) desarrollaron *HiComet*, un sistema para la detección de células en el ensayo cometa con una mínima intervención por el usuario, definiendo el valor para la umbralización de los cometas. La característica principal de su método es que procesan los cometas de las imágenes sin importar la cantidad de cometas que existan en ella, su localización o estado del cometa, con lo que lo hace un sistema muy robusto. Para segmentar y clasificar los cometas, dividen su método en cuatro secciones. El preprocesamiento incluye un suavizado de la imagen de entrada, mediante filtros espaciales de promedio o mediana. La etapa de binarización consiste en extraer todas las regiones de interés de la imagen analizando el

histograma de la imagen y ubicando el punto de localización del primer valle en él. La etapa de filtrado y corrección de traslapes incluye la eliminación de los falsos positivos detectados en la sección anterior. Para separar los cometas con traslape, utilizan una secuencia de algoritmos: parten de la máscara obtenida en los pasos anteriores, aplican la transformada de distancia para detectar múltiples zonas de intensidad, seguido de una transformada de ondícula, para finalmente aplicar una transformación divisoria y obtener regiones separadas de los cometas con traslape. Ellos suponen que las imágenes estarán muy bien definidas y que los traslapes entre cometas serán notorios, lo que no es cierto en la mayoría de los casos, pues las imágenes de cometas presentan bastante ruido en ellas y es casi imposible detectar las líneas divisorias entre los cometas, además de que éstas son muy irregulares. En su última etapa, caracterización y clasificación, extraen los parámetros de los cometas segmentados, incluyendo áreas, cabezas, colas y momentos de cola. Su sistema fue probado con 35 imágenes del ensayo cometa, previamente verificados por expertos en el área, reportando un promedio de 8 a 56 cometas por imagen. Para evaluar sus segmentaciones calcularon su precisión y exhaustividad (recall) con las siguientes ecuaciones:

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP}$$

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN}$$

donde *TP* y *TN* se refieren al número de píxeles que fueron clasificados como cometas y fondo, respectivamente, de manera correcta según las muestras base verificadas por los expertos; mientras que *FP* y *FN* corresponden a píxeles mal clasificados, ya sea como cometas o como fondo, respectivamente.

Su etapa de binarización la compararon con el método de *Otsu*, *K-means* y *GraphCut*, obteniendo un 92% de exhaustividad, mientras que los otros métodos obtuvieron un 77%, 76% y 71%, respectivamente en la misma medida de evaluación. Por lo demás, su sistema pudo clasificar un 90% de los cometas no traslapados de manera correcta en una de las imágenes.

## Discusión

En la Tabla 2 se presenta un resumen de los métodos descritos en las secciones anteriores.

Se muestran los autores, el año de sus publicaciones, respectivos algoritmos empleados a lo largo del desarrollo de su sistema, y comentarios extras referentes a sus sistemas.

Tabla 2. Comparativa de métodos propuestos para la segmentación de células del ensayo cometa

<b>Autor</b>	<b>Algoritmo de Segmentación</b>	<b>Tipo de Sistema</b>
Böcker et al., (1999)	Umbralización adaptativa Histéresis	Automático
Helma et al., (2000)	Umbralización	Semi-automático
Vojnovic et al., (2003)	Umbralización <i>Region Growing</i> CHARM	Automático
Dehon et al., (2004)	Ajuste de curvas	Automático
Sansone et al., (2012)	Filtros Gaussianos Agrupamiento difuso	Automático
Gyori et al., (2014)	Umbralización adaptativa Morfología matemática Convex Hull Análisis de perfiles	Automático
Ganapathy et al., (2016)	Agrupamiento difuso	Automático
Kiziltan y Yurtcu (2015)	Mapeo radial	Semi-automático
Lee et al. (2018)	Umbralización adaptativa Transformada de distancia Transformada de ondícula Transformación divisoria	Semi-automático

Los diferentes métodos y técnicas que se han propuesto han dado buenos resultados, así como acentúan muchos retos dentro del proceso, donde los principales son la segmentación de los cometas con traslape, el ruido que genera el hardware donde se toman las fotografías y el mismo ruido que viene incluido en las imágenes debido a la naturaleza de la muestra. La comparativa entre métodos automáticos y semi-automáticos, indica que ambos enfoques tienen desempeños muy buenos, segmentando de forma correcta y extrayendo los parámetros necesarios, con altos porcentajes de precisión y sensibilidad en sus evaluaciones.

## Conclusión

El ensayo cometa es un proceso de laboratorio confiable, rápido y flexible que permite detectar el daño a nivel molecular de los organismos a través del análisis de sus células individuales. Su implicación en las diversas áreas de la biomédica y la genómica ha desencadenado una extensiva investigación para el desarrollo de algoritmos y técnicas que faciliten la detección de los cometas en imágenes del ensayo cometa y la extracción de sus parámetros. En general, los métodos de segmentación automáticos y semi-automáticos propuestos en el estado del arte muestran resultados satisfactorios de identificación y segmentación. Sin embargo, los resultados

arrojados por los métodos semi-automáticos cuentan con la intervención o ayuda del usuario. tienen un mejor desempeño debido a que

## Referencias

Acharya, T., K. Ray, A., and Gallagher, A. (2005). Image processing: Principles and applications. 15:9901.

Anderson, D., Yu, T., and McGregor, D. (1998). Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. pages 539-555.

Ashby, J., Tinwell, H., Lefevre, P., and Browne, M. (1995). The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. *Mutagenesis*, 10:85-90.

Barber, P., Vojnovic, B., Kelly, J., Mayes, C., Boulton, P., Woodcock, M., and Joiner, M. (2001). Automated counting of mammalian cell colonies. *Physics in Medicine & Biology*, 46:63.

Barber, P., Vojnovic, B., Kelly, J., R Mayes, C., Boulton, P., Woodcock, M., and Joiner, M. (2000). An automated colony counter utilising a compact Hough transform.

Böcker, W., Rolf, W., Bauch, T., Müller, W.-U., and Streer, C. (1999). Automated comet assay analysis. *Cytometry*, 35(2):134-144.

Collins, A. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. 26:249-61.

Cortés-Gutiérrez, E., Dávila-Rodríguez, M., Fernández, J., Lopez, C., Gosálbez, A., and Gosálvez, J. (2011). New application of the comet assay: Chromosome-comet assay. 59:655-60.

Dehon, G., Bogaerts, P., Duez, P., Catoire, L., and Dubois, J. (2004). Curve fitting of combined comet intensity profiles: A new global concept to quantify DNA damage by the comet assay. 73:235-243.

Dusinska, M. and Collins, A. (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23 3:191-205.

Fairbairn, D., Olive, P., and O'Neill, K. (1995). The comet assay: a comprehensive review. 339:37-59.

Ganapathy, S., Muraleedharan, A., Sathidevi, P., Chand, P., and Rajkumar, R. (2016). CometQ: An automated tool for the detection and quantification of DNA damage using comet assay image analysis. 133:143-154.

Gyori, B., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P., Hsu, D., and Clement, M.-V. (2014). OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. 2:457-65.

- Helma, C. and Uhl, M. (2000). A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. 466:9-15.
- Huang, L.-K. and Wang, M.-J. (1995). Image thresholding by minimizing the measures of fuzziness. 28:41-51.
- Jha, A. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. 23:207-21.
- Kent, C., Eady, J., Ross, G., and Steel, G. (1995). The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay. *International Journal of Radiation Biology*, 67:655-660.
- Kim, K., Jeon, J., Choi, W., Kim, P., and Ho, Y.-S. (2001). Automatic cell classification in human's peripheral blood images based on morphological image processing. 2256:225-236.
- Kiziltan, E. and Yurtcu, E. (2015). Semi-automatic scoring tool for comet assay. 9:27-33.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., and Ahnström, G. (1996). The comet assay: Mechanisms and technical considerations. 363:89-96.
- Kumaravel, T., Vilhar, B., P Faux, S., and Jha, A. (2007). Comet assay measurements: A perspective. 25:53-64.
- Lee, T., Lee, S., Sim, W. Y., Mi Jung, Y., Han, S., Won, J.-H., Min, H., and Yoon, S. (2018). HiComet: A high-throughput comet analysis tool for large-scale DNA damage assessment. 19.
- McKelvey-Martin, V., Green, M., Schmezer, P., Pool-Zobel, B., De Méo, M., and Collins, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. 288:47-63.
- Olive, P. (2009). Impact of the comet assay in radiobiology. *Mutagenesis*, 681:13-23.
- Olive, P. and Banáth, J. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocol*, 1:23-9.
- Rodríguez-Rey, A., Noris-García, E., and Fundora Torres, M. T. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35:184-194.
- Rojas, E., Lopez, M., and Mahara, V. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications. 722:225-54.
- Sansone, M., Zeni, O., and Esposito, G. (2012). Automated segmentation of comet assay images using gaussian filtering and fuzzy clustering. 50:523-32.
- Sobel, I. (2014). An isotropic 3×3 image gradient operator.

Vojnovic, B., Barber, P., Johnston, P., C Gregory, H., Marples, B., Joiner, M., and Locke, R. (2003). A high sensitivity, high throughput, automated single-cell gel electrophoresis ('Comet') DNA damage assay.

Wasson, G., McKelvey-Martin, V., and Downes, C. (2008). The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. 23:153-162.

Zamperoni, P. (1991). Methoden der digitalen bildverarbeitung.