

Deconvolución Ciega de Señales de Tiempo de Vida Fluorescente para la Caracterización Química de Muestras

R. Salinas-Martínez^{1,*}, D. U. Campos-Delgado^{1,**}, Elvis Durán², Javier A. Jo², F. J. Sánchez-González¹

¹Posgrado en Ingeniería Electrónica, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P., S.L.P., México

²Departamento de Ing. Biomédica, Texas A&M University

* ricas_rsm@hotmail.com, ** ducd@fciencias.uaslp.mx

Resumen— La imagenología microscópica de fluorescencia de tiempo de vida (FLIM, por sus siglas en inglés) es una metodología que permite la caracterización química de tejido biológico. Esta técnica permite un diagnóstico temprano y no-invasivo asociado con diversas patologías. En este trabajo, se propone una estrategia para la deconvolución ciega de datos FLIM, utilizando un modelo multi-exponencial y un enfoque de mínimos cuadrados alternados (MCA), que permite estimar la respuesta al impulso fluorescente (RIF) en cada punto espacial del tejido y la excitación láser del equipo experimental, también llamada respuesta del instrumento (RI). La metodología propuesta se evalúa con base de datos sintéticas, y con un conjunto de muestras de tejidos de la cavidad bucal. Los resultados confirman que la aproximación de la RI es adecuada, y garantizan que las RIF's tengan el perfil monotónicamente decreciente asociado al fenómeno de fluorescencia.

Palabras clave—Deconvolución ciega, fluorescencia, optimización

I. INTRODUCCIÓN

La fluorescencia es una metodología que permite cuantificar la información química asociada a muestras de tejido. En específico, la imagenología microscópica de fluorescencia de tiempo de vida (FLIM, por sus siglas en inglés) cuenta con aplicaciones muy extensas en la biología y el estudio clínico [1,2]. La metodología FLIM se basa en capturar la respuesta fluorescente (RF) de un tejido estimulado a una cierta longitud de onda, con la finalidad de evaluar la emisión óptica de fluoróforos sintéticos o endógenos [3]. Esta técnica permite un diagnóstico temprano y no-invasivo asociado con diversas patologías que modifican la composición química del tejido, como lo son enfermedades cardiovasculares y dermatológicas, pre-cáncer y displasia, entre otras [4-8]. En este contexto, es necesaria una etapa inicial de procesamiento en la que se aisle el efecto de la excitación láser o respuesta del instrumento (RI), y posteriormente identificar la respuesta al impulso fluorescente (RIF) en cada punto espacial de la muestra. El modelo de observación de la RF se asume como la respuesta de un sistema lineal e invariante en el tiempo a la entrada de excitación láser. Este proceso de identificación de la RIF es conocido en la literatura como deconvolución [1].

Es posible encontrar dos tendencias principales en los algoritmos de deconvolución reportados en el estado del arte, ambas emplean modelos basados en combinaciones lineales de múltiples exponenciales o de funciones base de Laguerre [9-11]. En el primer enfoque se estiman los escalamientos y las constantes de tiempo de cada exponencial utilizando una estrategia de mínimos cuadrados no-lineales. Por otro lado, cuando se usa la base de las funciones de

Laguerre, se estiman los coeficientes de la base para aproximar la medición del decaimiento fluorescente utilizando una aproximación de mínimos cuadrados. Además, en este enfoque, dado que la RIF debe mostrar un comportamiento monotónicamente decreciente en el tiempo [11], es necesario incluir restricciones sobre la segunda o tercera derivada para garantizar que se cumpla esta condición. Estos procesos asumen que la RI es conocida, lo cual no siempre es posible o se necesita de un pre-proceso de sincronización temporal en cada muestra espacial. Dada esta desventaja, en este trabajo se propone una metodología que estime simultáneamente la RI y las RIF's de manera conjunta, y a este problema lo definimos como deconvolución ciega. En nuestra propuesta, se asume un modelo de múltiples exponenciales considerando un enfoque local, en el cual la estimación de las constantes de tiempo se hace en cada punto espacial de la muestra. El esquema propuesto se valida con bases de datos sintéticas FLIM, y muestras de tejido de la cavidad bucal con distintos diagnósticos médicos.

II. METODOLOGÍA

Con la intención de modelar los datos de las imágenes FLIM, es necesario asumir que cada medición de los decaimientos fluorescentes son el resultado de la convolución entre el perfil de excitación láser o RI, y la RIF. En esta formulación, se asume que la información FLIM de una muestra de tejido se encuentra discretizada con un periodo de muestreo T , sobre el dominio espacial de K puntos de la base de datos [12], y considerando una ventana de L muestras temporales de la RF [13]. Bajo esta perspectiva, en el modelo de observación, la l -ésima muestra del decaimiento fluorescente en el k -ésimo punto espacial $y_k[l]$ está dada por la ecuación:

$$y_k[l] = u[l] * h_k[l] + v_k[l] \quad \forall k \in [0, K-1]$$

$$= \sum_{j=0}^l u[l-j] h_k[j] + v_k[l] \quad \forall l \in [0, L-1] \quad (1)$$

donde $u[l]$ y $h_k[l]$ denotan la RI y la RIF del tejido, respectivamente, $*$ indica la operación de convolución y $v_k[l]$ representa el ruido en la observación.

Para restringir el espacio de búsqueda se deben considerar las siguientes suposiciones en el planteamiento del problema:

- A) La RI $u[l]$ es común en todos los K puntos espaciales de la base de datos, sus muestras son no-negativas y la intensidad acumulada de sus muestras generan la unidad, es decir

$$\sum_{l=0}^{L-1} u[l] = 1 \quad \& \quad u[l] \geq 0 \quad \forall l \in [0, L-1] \quad (2)$$

- B) La RIF $h_k[l]$ en el k -ésimo punto espacial e instante de tiempo l se puede representar como una combinación

lineal de N funciones exponenciales en tiempo discreto más un término general de polarización.

La Fig. 1 muestra la interacción entrada-salida en el modelo de observación.

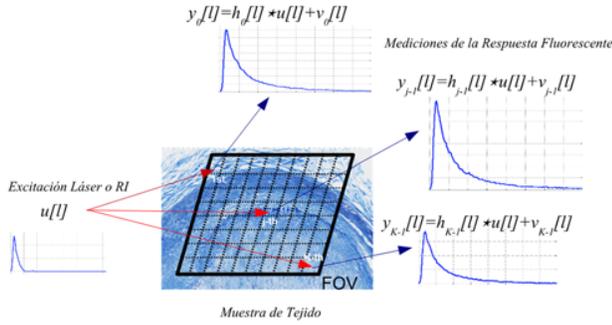


Fig. 1. Modelo de observación de los datos FLIM.

El modelo de observación en (1) se escribe en notación vectorial como

$$\mathbf{y}_k = \mathbf{U}\mathbf{h}_k + \mathbf{v}_k \quad \forall k \in [0, K-1], \quad (3)$$

donde

$$\mathbf{y}_k = [y_k[0] \quad y_k[1] \quad \dots \quad y_k[L-1]]^T \in \mathbb{R}^L$$

$$\mathbf{U} = \begin{bmatrix} u[0] & 0 & \dots & 0 \\ u[1] & u[0] & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ u[L-1] & u[L-2] & \dots & u[0] \end{bmatrix} \in \mathbb{R}^{L \times L} \quad (4)$$

$$\mathbf{h}_k = [h_k[0] \quad h_k[1] \quad \dots \quad h_k[L-1]]^T \in \mathbb{R}^L$$

$$\mathbf{v}_k = [v_k[0] \quad v_k[1] \quad \dots \quad v_k[L-1]]^T \in \mathbb{R}^L$$

Estimación de las respuestas al impulso fluorescente

La suposición B) permite caracterizar la RIF en el k -ésimo punto espacial en función de los coeficientes de escalamiento $\{c_{k,n}\}_{n=0}^N$ y las constantes de tiempo $\{\tau_{k,n}\}_{n=1}^N$ de la siguiente manera:

$$h_k[l] = c_{k,0} + \sum_{n=1}^N c_{k,n} e^{-\frac{l}{\tau_{k,n}}} \quad \forall l \in [0, L-1] \quad (5)$$

donde los parámetros característicos del modelo $\{c_{k,n}\}_{n=0}^N$, $\{\tau_{k,n}\}_{n=1}^N \in \mathbb{R}$ se seleccionan de manera que el error cuadrático medio entre la predicción del modelo en (1) y la medición del decaimiento fluorescente $y_k[l]$ sea lo más pequeño posible [11]. Al considerar las L muestras temporales disponibles, la expresión en (5) se puede escribir en notación vectorial como

$$\mathbf{h}_k = \mathbf{H}(\boldsymbol{\tau}_k)\mathbf{c}_k \quad \forall k \in [0, K-1],$$

donde

$$\mathbf{H}(\boldsymbol{\tau}_k) = \begin{bmatrix} 1 & e^{-\frac{0}{\tau_{k,1}}} & \dots & e^{-\frac{0}{\tau_{k,N}}} \\ 1 & e^{-\frac{1}{\tau_{k,1}}} & \dots & e^{-\frac{1}{\tau_{k,N}}} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & e^{-\frac{L-1}{\tau_{k,1}}} & \dots & e^{-\frac{L-1}{\tau_{k,N}}} \end{bmatrix} \in \mathbb{R}^{L \times (N+1)}$$

$$\mathbf{c}_k = [c_{k,0} \quad c_{k,1} \quad \dots \quad c_{k,N}]^T \in \mathbb{R}^{N+1}$$

$$\boldsymbol{\tau}_k = [\tau_{k,0} \quad \tau_{k,1} \quad \dots \quad \tau_{k,N}]^T \in \mathbb{R}^N$$

De esta manera, el modelo de observación en (1) se puede escribir como:

$$\mathbf{y}_k = \mathbf{U}\mathbf{H}(\boldsymbol{\tau}_k)\mathbf{c}_k + \mathbf{v}_k \quad \forall k \in [0, K-1]. \quad (6)$$

Asumiendo que se conoce la RI $u[l]$ y que la incertidumbre en (6) tiene una distribución Gaussiana en la que cada muestra es independiente entre sí, el problema de estimación en el k -ésimo punto espacial se define como un problema de optimización de mínimos cuadrados [14]:

$$\min_{\mathbf{c}_{k \geq 0}} \frac{1}{2} \|\mathbf{y}_k - \mathbf{U}\mathbf{H}(\boldsymbol{\tau}_k)\mathbf{c}_k\|^2,$$

cuya solución se obtiene implementado la metodología de región de confianza, siguiendo un planteamiento de Levenberg-Marquardt [15].

Estimación de la Excitación Láser o RI

En esta etapa, las RIF's \mathbf{h}_k en (3) se asumen conocidas y se estima la excitación láser o RI $u[l]$. En las aplicaciones FLIM, la RI $u[l]$ se implementa como un pulso muy estrecho por lo que muchas de sus muestras son cero. En este contexto, sólo se necesitan calcular las primeras \hat{L} muestras ($\hat{L} < L$). De esta manera, se puede parametrizar \mathbf{U} en (4) por \hat{L} matrices toeplitz $\mathbf{U}_l^p \in \mathbb{R}^{L \times L}$ como [15]:

$$\mathbf{U} = \sum_{l=0}^{\hat{L}-1} \theta_l \mathbf{U}_l^p,$$

donde $\theta_l = u[l]$ representa la l -ésima muestra de la excitación láser o RI.

Por último y asumiendo nuevamente que los términos de incertidumbre en (3) tienen una distribución Gaussiana y son independientes, se plantea un problema de estimación por mínimos cuadrados con restricciones [14]

$$\min_{\{\theta_l\}} \frac{1}{2} \sum_{k=0}^{K-1} \left\| \mathbf{y}_k - \sum_{l=0}^{\hat{L}-1} \theta_l \mathbf{U}_l^p \mathbf{h}_k \right\|^2 \quad (7)$$

tal que

$$\sum_l \theta_l = 1 \quad \& \quad \theta_l \geq 0 \quad \forall l \in [0, L-1].$$

La solución a (7) se obtiene resolviendo un sistema de $L+1$ ecuaciones lineales siguiendo el enfoque sugerido en [15].

III. ALGORITMO DE DECONVOLUCIÓN CIEGA

En esta sección se describe el algoritmo iterativo para realizar la deconvolución ciega de mediciones FLIM. El enfoque descrito en la sección anterior para calcular las constantes de tiempo, los escalamientos y la aproximación de la RI se denominará como deconvolución ciega conjunta por mínimos cuadrados no-lineales (BDENLSJ, por sus siglas en inglés). En este trabajo se propone utilizar dos procesos de mínimos cuadrados alternados (MCA) dentro del esquema global de estimación. Al formular el proceso de búsqueda como un problema de optimización convexo, es posible garantizar convergencia local, por lo que es indispensable seleccionar de manera adecuada las condiciones iniciales.

Una de las bondades de la suposición B) es que la RIF no necesita restricciones en el decaimiento temporal durante el proceso de optimización. Por simplicidad, las muestras iniciales de la RI $\boldsymbol{\theta}^0 = [\theta_0^0 \quad \theta_1^0 \quad \dots \quad \theta_{L-1}^0]^T \in \mathbb{R}^L$ corresponden a un pulso cuadrado, el cual se utiliza para estimar \mathbf{c}_k y $\boldsymbol{\tau}_k \quad \forall k \in [0, K-1]$, y se generan las RIF's de todos los puntos espaciales de la muestra. Posteriormente, se calculan las muestras de la RI $\boldsymbol{\theta}$ utilizando las

RIF's estimadas previamente. Este proceso de estimación se alterna hasta conseguir una condición de convergencia. En la Fig. 2, se muestra de manera esquematizada el algoritmo BDENLSJ.

IV. VALIDACIÓN Y RESULTADOS EXPERIMENTALES

Al utilizar una RI medida experimentalmente, simular el número de fluoróforos presentes en una muestra, y al añadir dos tipos de ruido (Gaussiano y Poissoniano) que generalmente se presentan en mediciones de fluorescencia, se generaron bases de datos sintéticas (las cuales incluyen: RF's y RIF's) con las que se evaluó y validó el desempeño del algoritmo BDENLSJ. Las pruebas se realizaron tomando en cuenta distintos valores de la relación señal-a-ruido (SNR, por sus siglas en inglés) para el ruido Gaussiano, y de la relación señal pico-a-ruido (PSNR, por sus siglas en inglés) para el ruido Poissoniano. Para poder medir el desempeño del algoritmo BDENLSJ, se calculó el error porcentual con respecto de los siguientes parámetros: la respuesta fluorescente ($ERF=100 \times \sum_{k=0}^{K-1} \sum_{l=0}^{L-1} (y_k[l] - \hat{y}_k[l])^2 / \sum_{k=0}^{K-1} \sum_{l=0}^{L-1} y_k[l]^2$), la respuesta al impulso fluorescente ($ERIF=100 \times \sum_{k=0}^{K-1} \sum_{l=0}^{L-1} (h_k[l] - \hat{h}_k[l])^2 / \sum_{k=0}^{K-1} \sum_{l=0}^{L-1} h_k[l]^2$) y la respuesta al instrumento ($ERI=100 \times \sum_{l=0}^{L-1} (u[l] - \hat{u}[l])^2 / \sum_{l=0}^{L-1} u[l]^2$). Además, se evaluó la forma de la RI a partir del parámetro conocido como ancho completo en la mitad del máximo (*FWHM*, por sus siglas en inglés), el cual se define de la siguiente manera

$$FWHM = l_2 - l_1,$$

donde los índices de tiempo $0 < l_1 < l_{max}$ y $l_{max} < l_2 < L - 1$ cumplen

$$u[l_1] = u[l_2] = u_{max}/2,$$

considerando que

$$l_{max} = \arg \max_{l \in [0, L-1]} u[l]$$

$$u_{max} = \max_{l \in [0, L-1]} u[l].$$

La RI utilizada para generar la base de datos sintética tiene un valor de $FWHM = 1.5250$ ns. Además, para evaluar la forma monótonicamente decreciente de las RIF's estimadas $\hat{h}_k[l] \forall l \in [0, L - 1]$, se mide el tiempo de vida promedio $\hat{\tau}_k$ en cada punto espacial k [2]

$$\hat{\tau}_k = \frac{\mathbf{t}^T \hat{\mathbf{h}}_k}{\mathbf{1}_L^T \hat{\mathbf{h}}_k},$$

donde $\hat{\mathbf{h}}_k = [\hat{h}_k[0] \dots \hat{h}_k[L - 1]]^T \in \mathbb{R}^L$ representa la RIF estimada, y $\mathbf{t} = [0 \ T \ 2T \ (L - 1)T]^T \in \mathbb{R}^L$ un vector de muestreo temporal, con los que se genera un mapa de tiempo de vida promedio (MTVP); los cuales son indicativos del decaimiento temporal de la RIF en la muestra de tejido.

En la Tabla 1, se ilustra un promedio de los resultados cuantitativos obtenidos con tres fluoróforos ($N = 3$) utilizando 10 bases de datos sintéticas con dimensión 60×60 píxeles (es decir $K = 3,600$). Un ejemplo de los resultados obtenidos para el MTVP considerando los siguientes parámetros $T = 0.25$ ns, $N = 3$, SNR = 50 dB, PSNR = 30 dB, $K = 3600$ y $L = 186$, se ilustra en la Fig. 3.

También se evaluó el desempeño del algoritmo con una base de datos que incluye muestras de tejido de la cavidad bucal. Para cada tejido, la base de datos incluye las mediciones de las RF's y la RI experimental, la cual tiene una longitud de onda $\lambda = 452 \pm 22.5$ nm. Por último, incluye una estimación de las RIF's generadas

a través de la deconvolución con la RI medida utilizando la metodología multi-exponencial estándar. En la Tabla 2, se muestra el error porcentual que existe entre las estimaciones de los MTVP y el error porcentual entre la medida *FWHM* de la RI estimada con respecto de la información de la base de datos. En la Fig. 4 se visualiza la precisión con la que se estiman las RF y la RI para una muestra de tejido de la cavidad bucal, además, es posible estimar los MTVP sin la necesidad de medir y alinear la RI.

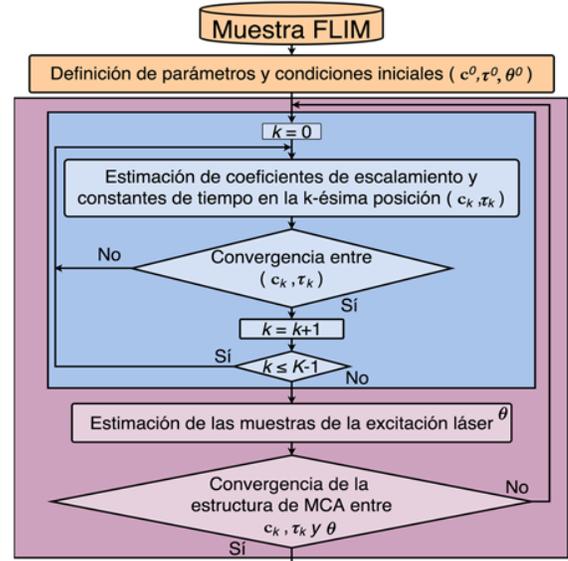


Fig. 2. Algoritmo de deconvolución ciega BDENLSJ

TABLA 1
RESULTADOS CUANTITATIVOS CON $N = 3$ PARA LA BASE DE DATOS SINTÉTICA.

SNR (dB)	PSNR (dB)	ERF (%)	ERIF (%)	ERI (%)	FWHM (ns)
40	20	18.90	16.94	17.44	1.6835
40	25	15.62	16.00	16.79	1.7126
40	30	14.44	14.94	15.70	1.7215
45	20	15.49	20.74	20.24	1.7994
45	25	10.96	15.18	15.92	1.7319
45	30	9.07	11.40	12.63	1.6826
50	20	14.06	14.40	15.56	1.6919
50	25	8.97	11.84	12.92	1.6683
50	30	6.46	10.59	11.93	1.6825

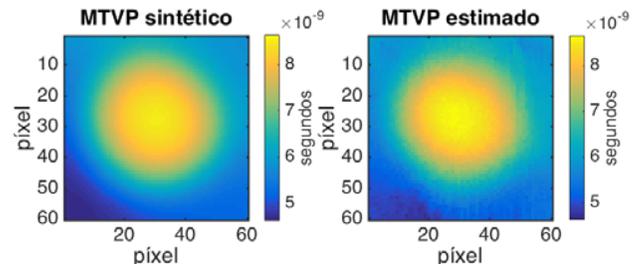


Fig. 3. Comparación entre el MTVP sintético y el MTVP estimado

TABLA 2
RESULTADOS CUANTITATIVOS CON $N = 3$ PARA LA BASE DE DATOS
CON MUESTRAS DE TEJIDO DE LA CAVIDAD BUCAL

Muestra	Error MTVP (%)	Error <i>FWHM</i> (%)
49 base	21.72	6.05
49 lesión	27.80	7.09
62 base	20.95	10.07
62 lesión	27.37	0.54
65 base	14.93	19.24
65 lesión	25.65	17.68
69 base	22.46	7.48
60 lesión	20.42	13.48
82 base	14.46	18.09
82 lesión	24.23	13.77

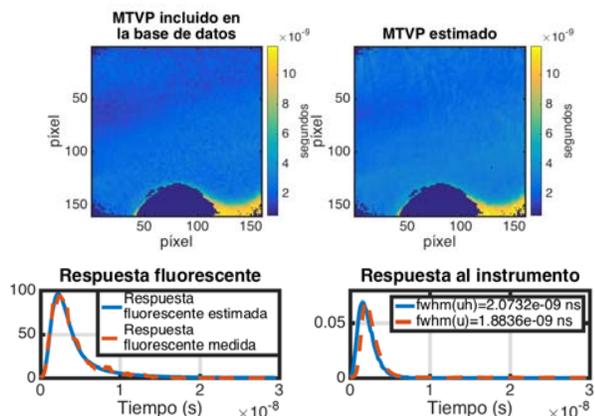


Fig. 4. Resultados obtenidos para la muestra “62 base” de la base de datos de la cavidad bucal. Parte superior izquierda: MTVP incluido en la base de datos. Parte superior derecha: MTVP estimado. Parte inferior izquierda: comparación de la RF estimada y la RF medida. Parte inferior derecha: comparación de la RI estimada y la RI experimental.

V. DISCUSIÓN

Los resultados para la base de datos sintética en la Tabla 1 muestran una estimación acertada tanto de la RF de las mediciones, como de las RIF's y la RI. Además, se validó la robustez del algoritmo al evaluar distintas combinaciones de SNR y PSNR. Con base en los resultados de la Tabla 1, se puede concluir que el ruido Poissoniano es el que más afecta en las estimaciones, y que a mayor SNR y PSNR menor error ya que representa una mejor calidad de señal. Por otro lado, el MTVP estimado muestra ser robusto a perturbaciones en los datos y mantiene independencia y suavidad espacial, como se aprecia en la Fig. 3.

Con respecto de los resultados obtenidos en la Tabla 2 con la base de datos de muestras de tejido de la cavidad bucal, se puede observar que la estimación de la excitación láser se realiza de manera adecuada, presentando características de forma similares a la RI experimental, y con ello un valor muy aproximado de la *FWHM* medida. También se puede apreciar un gran parecido en los resultados de MTVP. Uno de los objetivos principales del algoritmo ciego es aproximar de manera adecuada la RI, para no depender del proceso de adquisición de la misma, y además evitar la necesidad de

alinear las RF's y la RI, lo cual se logra según muestra la Tabla 2 con un error menor al 20%.

IV. CONCLUSIONES

En este trabajo se propuso un enfoque para la identificación ciega de sistemas de datos FLIM considerando un enfoque multi-exponencial. Esta metodología, referida como BDNLSJ, se implementó bajo la filosofía de MCA para resolver los procesos de búsqueda de manera independiente. Los resultados obtenidos sugieren que el algoritmo es robusto a distintos niveles y tipos de ruido. Por último, es posible eliminar la necesidad de medir y alinear la RI, garantizando una evaluación adecuada de la muestra de tejido, al aproximar de manera precisa la RI y asegurando la forma monótonicamente decreciente de la RIF asociada al fenómeno de fluorescencia. Como trabajo futuro se definirá un proceso automático para asignar el número de fluoróforos presentes en la muestra de tejido.

RECONOCIMIENTOS

Este estudio fue financiado por CONACYT a través de un apoyo para Ciencias Básica 2016-2019 (Ref. #254637) y una Beca Nacional de Maestría 2016-2.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. R. Lakowicz, Principles of fluorescence Spectroscopy, Springer, New York (2006).
- [2] L. Marcu, P. M. W. French, and D. S. Elson, Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging: Principles and applications in Biomedical Diagnostics, CRC Press, Boca Raton, Florida (2014).
- [3] S. Shrestha et al., High-speed multispectral fluorescence lifetime imaging implementation for in vivo applications, Opt. Lett. 35, 2558–2560 (2010).
- [4] M. O'Donnell et al., Multimodality cardiovascular molecular imaging technology, J. Nucl. Med. 51(Suppl. 1), 38S–50S (2010).
- [5] J. Park et al., Biochemical characterization of atherosclerotic plaques by endogenous multispectral fluorescence lifetime imaging microscopy, Atherosclerosis 220(2), 394–401 (2012).
- [6] V. De Giorgi et al., Combined non-linear laser imaging (two-photon excitation fluorescence microscopy, fluorescence lifetime imaging microscopy, multispectral multiphoton microscopy) in cutaneous tumours: first experiences, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 23(3), 314–316 (2009).
- [7] N. Galletly et al., Fluorescence lifetime imaging distinguishes basal cell carcinoma from surrounding uninvolved skin, Br. J. Dermatol. 159(1), 152–161 (2008).
- [8] J. M. Jabbour et al., Fluorescence lifetime imaging and reflectance confocal microscopy for multiscale imaging of oral precancer, J. Biomed. Opt. 18(4), 046012 (2013).
- [9] S.C. Warren et al. Rapid Global Fitting of Large Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy Datasets. PLOS One 8(8), e70687, 2013.
- [10] P. Pande, and J.A. Jo. Automated analysis of fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) data based on the Laguerre deconvolution method. IEEE Transactions on Biomedical Engineering 58(1), 172–181, 2011.
- [11] J. Liu, Y. Sun, J. Qi, and L. Marcu. A novel method for fast and robust estimation of fluorescence decay dynamics using constrained least-squares deconvolution with Laguerre expansion. Phys. Med. Biol. 57(4), 843–865, 2012.
- [12] N. Anthony, K. Berland, and P. Guo, Principles of fluorescence for quantitative fluorescence microscopy, in FLIM Microscopy in Biology and Medicine, Ammasi Periasamy and Robert M. Clegg, Eds., pp. 35–63, Chapman and Hall/CRC, Boca Raton, Florida (2009).
- [13] J. G. Proakis and D. G. Manolakis, Eds., Digital Signal Processing, 4th ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey (2006).
- [14] J. Nocedal and S.J. Wright. Numerical Optimization. Springer, 2nd Ed. 2006.
- [15] D.U. Campos-Delgado, O. Gutierrez-Navarro, E.R. Arce-Santana, M.C. Skala, A.J. Walsh, and J.A. Jo. Blind deconvolution estimation of fluorescence measurements through quadratic programming. J. Biomed. Opt. 20(7):075010, 2015.