



**SOMIB**  
Sociedad Mexicana  
de Ingeniería Biomédica

## Descomposición Multi-espectral de la Respuesta al Impulso de Fluorescencia para la Detección Temprana de Cáncer Oral.

O. Gutierrez-Navarro<sup>1</sup>, D. U. Campos-Delgado<sup>2</sup>, E. Durán<sup>3</sup> y J. A. Jo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Biomédica, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

<sup>3</sup>Biomedical Engineering Department, Texas A&M University, College Station, USA.

**Resumen**— En este trabajo se explora el uso de imágenes multi-espectrales microscópicas de tiempo de vida de fluorescencia (mFLIM) en diferentes muestras de tejido oral humano in-vivo para la detección temprana de cáncer. El objetivo de este trabajo es explorar el uso de datos mFLIM para la detección de tejido con lesiones malignas, cancerosas. La tecnología mFLIM captura la respuesta fluorescente endógena en tejidos, de manera mínimamente invasiva a diferentes longitudes de onda. Por medio de un proceso de deconvolución y técnicas de descomposición lineal se obtiene una descripción cuantitativa de los componentes base de la muestra. Estos datos fueron utilizados para generar vectores de características y clasificar diferentes muestras mFLIM. Utilizando un análisis de discriminación cuadrática fue posible detectar las muestras con lesiones malignas con una sensibilidad del 72%.

**Palabras clave**— clasificación automática, imágenes tiempo de vida de fluorescencia, lesiones malignas.

### I. INTRODUCCIÓN

La tendencia en el estado del arte es el desarrollo de tecnologías que puedan detectar patologías, especialmente lesiones cancerosas, de manera mínimamente invasiva, con una evaluación cuantitativa, y en el menor tiempo posible [1]. Además de estas cualidades, ya de por sí difíciles de cumplir, se busca que dichas herramientas sean útiles para la detección temprana de la patología. En el caso de cáncer, es crítico diagnosticarlo en una etapa incipiente de su desarrollo para aumentar las posibilidades de recuperación y/o sobrevivencia de los pacientes. Una de estas herramientas para la detección temprana y no invasiva, son las imágenes microscópicas de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM, por sus siglas en inglés) [2]. Esta técnica registra la respuesta fluorescente de una muestra al ser excitada por una fuente electromagnética, generalmente un láser UV. Recientemente se ha demostrado que esta tecnología es capaz de distinguir entre tejido sano y lesiones cancerosas [3–5].

Los datos o cubos multi-espectrales FLIM (mFLIM) capturan la respuesta fluorescente en diferentes bandas de frecuencia o longitudes de onda, y suelen ser de gran tamaño. Para interpretarlos, se suele acudir a diferentes metodologías; como el uso de técnicas de deconvolución [6] para extraer las respuestas al impulso del tejido y estimar los tiempos de vida de las moléculas auto-fluorescentes; o incluso técnicas de descomposición lineal [7], las cuales proporcionan una descripción cuantitativa de los datos. En

ambos casos, la intención proveer una interpretación más sencilla de los datos mFLIM para facilitar sus aplicaciones prácticas. En este contexto, este trabajo propone emplear datos mFLIM en conjunto con técnicas de deconvolución y de descomposición lineal, para generar rasgos que permitan generar una clasificación del tejido analizado, y lograr detectar una etapa temprana de cáncer oral.

El resto del artículo se detalla a continuación. En la Sección I se describe la metodología utilizada para extraer los datos y generar la descomposición lineal, donde a partir de las matrices de abundancia se generan las características que alimentan al clasificador. En la Sección III se explican los resultados del proceso clasificación. La discusión de los resultados y el trabajo futuro se describen en las Secciones III y IV, respectivamente.

### II. METODOLOGÍA

Los datos mFLIM utilizados en este trabajo fueron proporcionados por el Dr. Javier A. Jo. Las muestras fueron tomadas en pacientes del College of Dentistry en Texas A&M University. El protocolo de la toma de biopsias fue aprobado por el comité de ética de Texas A&M University. Las muestras fueron extraídas de diferentes secciones de la cavidad oral: lengua, encía y mucosa oral. Esta última es la membrana mucosa en el interior de la boca. En total, se utilizaron 86 muestras. Estas consisten en 43 pares de datos de diferentes pacientes. Cada par de datos corresponde a una muestra tomada de una zona con lesión y otra zona sana del mismo paciente, utilizada como control. De cada una de las muestras se extrajeron biopsias, las cuales fueron analizadas por un experto patólogo. Con base en estos estudios, las muestras fueron etiquetadas como tejido con lesiones benignas, con displasia baja y con carcinoma.

Los decaimientos de fluorescencia de las muestras fueron grabados utilizando el equipo mFLIM descrito en [8]. Este equipo tiene la capacidad de excitar muestras fluorescentes por medio de un láser UV, concretamente un láser pulsado Nd: YAG 355 nm con un ancho de pulso de 1 ns. La respuesta fluorescente de las muestras se graba en tres longitudes de onda,  $390 \pm 20$  nm,  $452 \pm 22.5$  nm y  $\geq 500$  nm. Estos canales fueron seleccionados para distinguir los principales fluoróforos endógenos que suelen estar presentes en el tejido: colágeno, nicotina adenina dinucleótido en su forma reducida (NADH), y flavín adenín dinucleótido en su forma oxidada (FAD).

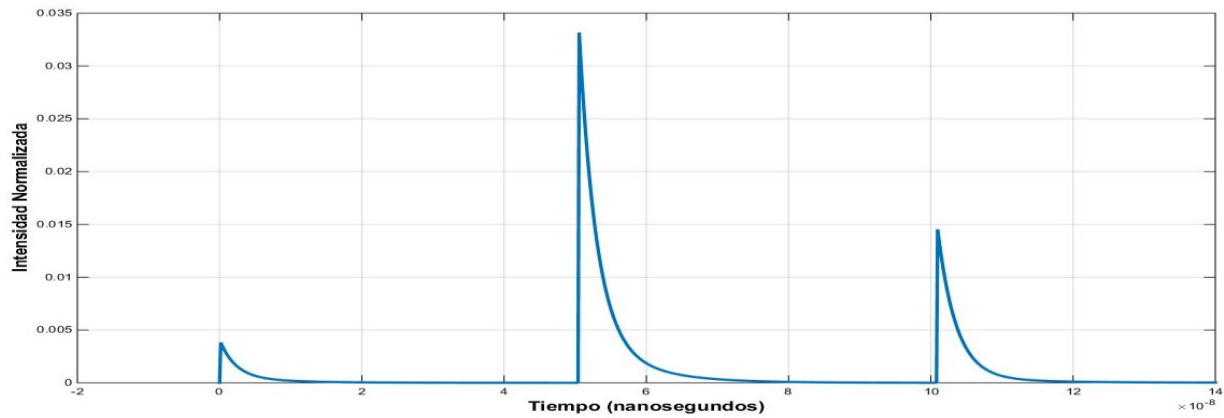


Fig. 1. Una de las respuestas al impulso de la fluorescencia utilizada. Cada dato FLIM contienen 25,600 mediciones como esta. Estos vectores contienen las respuestas fluorescentes de una muestra en 3 diferentes longitudes de onda:  $390 \pm 20$  nm,  $452 \pm 22.5$  nm  $\vee \geq 500$  nm.

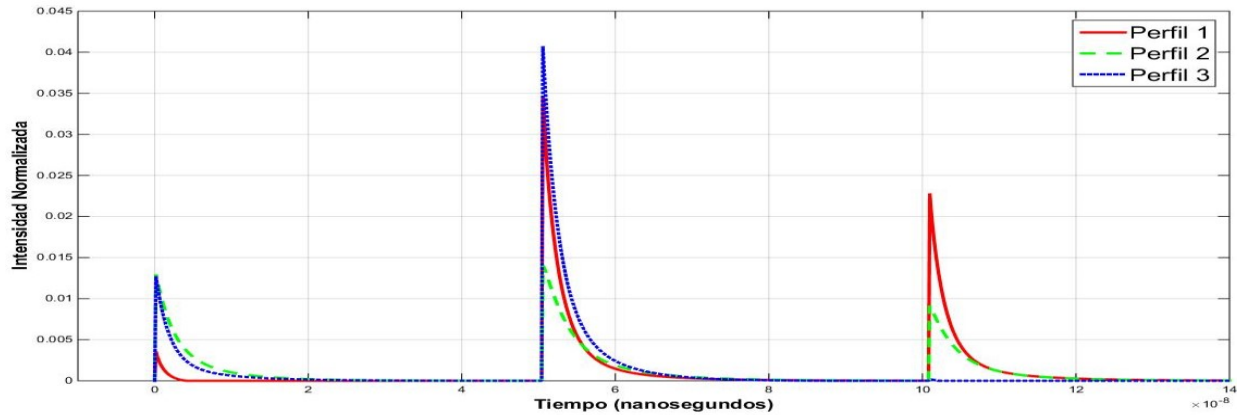


Fig. 2. Perfiles característicos obtenidos de la descomposición de 12 muestras de tejido obtenido de lenguas humanas. Estos vectores fueron utilizados para caracterizar la respuesta fluorescente en 86 datos FLIM y calcular sus concentraciones proporcionales

Los decaimientos de fluorescencia son el resultado de la convolución de la respuesta al impulso de fluorescencia en el tejido, con la respuesta del instrumento [6]. Para obtener la respuesta al impulso de fluorescencia se empleó un proceso de deconvolución, y con este fin se utilizó el método propuesto en [9]. Esta etapa permite además eliminar ruido que se obtiene durante la obtención de las muestras mFLIM. Un ejemplo de las respuestas al impulso de fluorescencia en las tres bandas analizadas puede ser apreciado en la Fig. 1.

Cada una de las 86 muestras de la base de datos está compuesta por arreglos de  $160 \times 160 \times 943$  datos. Las primeras dos dimensiones corresponden a dimensiones espaciales. En cada una de estas  $K = 25,600$  posiciones espaciales se obtuvo un vector multi-espectral de longitud  $D = 943$ . Estos vectores contienen la respuesta al impulso de fluorescencia en cada posición. Para poder interpretar los datos, se utilizó una técnica de descomposición espectral, concretamente el método ciego y la herramienta presentada en [7]. Esta técnica funciona bajo un modelo de mezcla lineal

$$Y = PA + V \quad (1)$$

donde  $Y \in \mathbb{R}^{D \times K}$  representa los datos de la respuesta el impulso de fluorescencia y  $V \in \mathbb{R}^{D \times K}$  es una matriz de ruido. De acuerdo al modelo, los datos de entrada se

descomponen en  $N$  perfiles característicos  $P \in \mathbb{R}^{D \times N}$  y sus abundancias  $A \in \mathbb{R}^{N \times K}$  o concentraciones proporcionales. En este trabajo, se fijó  $N = 3$  para obtener los perfiles característicos de las muestras de cavidad oral. Para la descomposición, se utilizaron solamente 24 muestras, correspondientes a 12 pares de muestras de tejido de lengua: 4 clasificados como lesiones benignas, 4 clasificados como displasia baja y 4 como carcinomas. Estos datos fueron procesados por la herramienta de descomposición ciega en [10], y los perfiles característicos obtenidos se muestran en la Fig. 2. Los perfiles fueron utilizados para descomponer la totalidad de las 86 muestras y estimar sus abundancias. Esta información nos dice que cantidad relativa de cada perfil característico emplea cada medición. En la Fig. 3, se aprecian un ejemplo de las abundancias calculadas para una de las muestras clasificadas por el experto como lesión maligna o carcinoma.

### III. RESULTADOS

El objetivo de este trabajo es explorar el uso de datos mFLIM para la detección automática de carcinoma oral en muestras *in-vivo*. Con este fin, se planteó utilizar la información de las abundancias, obtenidas a partir de la descomposición lineal de una muestra representativa, para generar un vector de características útil para diferentes

TABLA I

Matriz de confusión de la validación cruzada. Se realizaron 43 análisis de discriminación cuadrática utilizando el esquema *leave-one-out*. Esta matriz es la suma de las 43 matrices de confusión resultantes.

		Predicción	
		Benigna	Carcinoma
Etiqueta	Benigna	27	5
	Carcinoma	3	8

algoritmos de clasificación. En esta primera etapa, se probó la capacidad de separación entre las muestras clasificadas por el experto como lesiones benignas y aquellas detectadas con carcinoma.

A partir de la información de las abundancias, se definió un vector de características con el fin de clasificar los datos. Por cada par de datos lesión/control, se calculó el vector de características como:

$$\vec{r}_i = [r_{i,1} \quad r_{i,2} \quad r_{i,3}] \quad \forall i = 1, \dots, 43 \quad (2)$$

donde  $r_{i,j}$  se calcula en el  $i$ -ésimo par de datos como la mediana de la abundancia en la lesión para el perfil característico  $j$  ( $j \in \{1,2,3\}$ ), entre la mediana de la abundancia en el área normal para el mismo perfil característico  $j$ .

Los vectores característicos fueron clasificados por validación cruzada (*leave-one-out*) utilizando el método de análisis de discriminación cuadrática [10]. Ya que se cuentan con pocas muestras clasificadas como lesiones con displasia baja, estas fueron consideradas como parte del grupo de muestras con lesiones benignas. De tal manera, que se hizo una clasificación binaria para detectar muestras con lesiones benignas vs muestras con lesiones malignas. En el caso de la detección de las muestras de carcinoma, la sensibilidad fue de 72.72% mientras que la especificidad fue del 84.37 %. Para comprender mejor los resultados de la validación cruzada se calculó la matriz de confusión, ver Tabla 1, como la suma de las 43 validaciones cruzadas *leave-one-out*.

#### IV. DISCUSIÓN

Se utilizaron en total 86 datos mFLIM de muestras humanas *in-vivo* de lengua, encías y mucosa oral. Cada dato consiste en un arreglo de dimensiones 160x160x936. La mitad de las muestras fueron tomadas de regiones con alguna lesión, y la otra mitad de regiones sanas como puntos de control. Las muestras fueron clasificadas en parejas con base en el estudio de sus biopsias como benignas, displasia baja y carcinoma. De las 86 muestras disponibles, solamente 5 pares (10 datos) fueron clasificados por el experto como en estado de displasia baja, mientras que 11 pares (22 datos) fueron etiquetados como carcinoma. Enseguida, se utilizó una descomposición lineal con 3 componentes buscando obtener los perfiles característicos de los principales fluoróforos presentes en las muestras de cavidad oral: colágeno, NADH y FAD. Con base en los tres perfiles obtenidos se calcularon sus abundancias en los 86 datos disponibles. Esta información fue utilizada para construir vectores de características como se definió en (2).

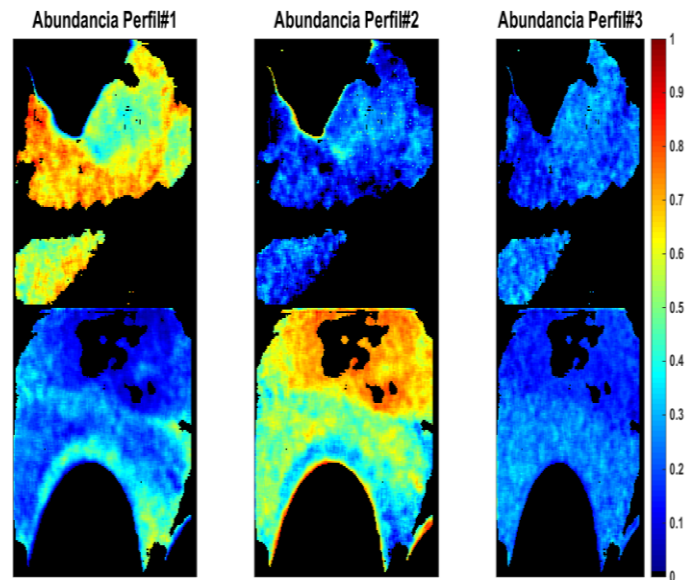


Fig. 3. Abundancias de los tres perfiles característicos en una muestra con lesión (imágenes del renglón inferior) y su muestra de control (imágenes del renglón superior). Las abundancias representan la concentración proporcional de cada vector característico y van desde el 0 hasta el 1, el cual representa una concentración del 100%.

Debido a la baja proporción de muestras con displasia media, el propósito de este estudio fue realizar una clasificación binaria entre las muestras sanas (benignas y con displasia baja) contra las muestras con carcinoma. El método utilizado para clasificar los datos fue análisis de discriminación cuadrática con validación cruzada. En este análisis, se utilizaron 43 iteraciones, una por dato, en donde en cada una se hizo la clasificación dejando una muestra fuera (*leave-one-out*). Los primeros resultados indican que la clasificación tuvo una efectividad arriba del 81%, lo cual corresponde a las muestras con carcinoma y muestras sanas correctamente clasificadas. La sensibilidad, el porcentaje de las muestras con carcinoma identificadas correctamente, fue del 72%. Mientras que las muestras identificadas correctamente como benignas fueron del 86%.

#### V. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

La tecnología mFLIM busca caracterizar tejido de manera mínimamente invasiva y cuantitativa. Sin embargo, la información que generan si bien es más completa, o complementaria, también es cierto que es más difícil de interpretar. Los resultados muestran que es posible utilizar la información de la descomposición lineal de datos mFLIM para la detección de lesiones malignas en tejido *in-vivo*. Concretamente, se utilizó un descriptor sencillo con base en los datos de abundancia para distinguir entre muestras sanas y aquellas con carcinoma. Sin embargo, la efectividad no es tan alta como se busca. Una probable causa es la baja proporción de datos con lesiones comprobadas por histopatología como no-sanos, es decir, con displasia media y/o carcinoma.

En trabajos futuros nos enfocaremos en la detección de la displasia baja, de las cuales por el momento se tienen pocas. La displasia baja es un estado pre-canceroso del tejido, en el cual las células de la muestra se reproducen a un ritmo mayor que el normal. La detección temprana de esta etapa sería de gran utilidad para la efectividad de los tratamientos y/o intervenciones contra el cáncer.

#### RECONOCIMIENTOS

El autor O. Gutierrez Navarro agradece el financiamiento recibido del Programa de Fortalecimiento de la Calidad Educativa PFCE 2016. El autor D.U. Campos Delgado agradece el financiamiento del CONACYT a través del fondo para Ciencia Básica 2016-2019 (Ref. # 254637)

#### BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. Adlam, S. Joseph, C. Robinson, C. Rousseau, J. Barber, M. Biggs, B. Morgan, and G. Rutty, "Coronary optical coherence tomography: minimally invasive virtual histology as part of targeted post-mortem computed tomography angiography," *International journal of legal medicine*, vol. 127, 2013, pp. 991–996.
- [2] M.Y. Berezin and S. Achilefu, "Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging," *Chemical Reviews*, vol. 110, 2010, pp. 2641–2684.
- [3] K. Awan, P. Morgan, and S. Warnakulasuriya, "Evaluation of an autofluorescence based imaging system (VELscope™) in the detection of oral potentially malignant disorders and benign keratoses," *Oral oncology*, vol. 47, 2011, pp. 274–277.
- [4] D. Roblyer, C. Kurachi, V. Stepanek, M.D. Williams, A.K. El-Naggar, J.J. Lee, A.M. Gillenwater, and R. Richards-Kortum, "Objective detection and delineation of oral neoplasia using autofluorescence imaging," *Cancer prevention research*, vol. 2, 2009, pp. 423–431.
- [5] I. Pavlova, M. Williams, A. El-Naggar, R. Richards-Kortum, and A. Gillenwater, "Understanding the biological basis of autofluorescence imaging for oral cancer detection: high-resolution fluorescence microscopy in viable tissue," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, 2008, pp. 2396–2404.
- [6] D.U. Campos-Delgado, O.G. Navarro, E.R. Arce-Santana, A.J. Walsh, M.C. Skala, and J.A. Jo, "Deconvolution of fluorescence lifetime imaging microscopy by a library of exponentials," *Opt. Express*, vol. 23, Sep. 2015, pp. 23748–23767.
- [7] O. Gutierrez-Navarro, D.U. Campos-Delgado, E.R. Arce-Santana, and J.A. Jo, "Quadratic blind linear unmixing: A graphical user interface for tissue characterization," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 124, 2016, pp. 148–160.
- [8] S. Cheng, R.M. Cuenca, B. Liu, B.H. Malik, J.M. Jabbour, K.C. Maitland, J. Wright, Y.-S.L. Cheng, and J.A. Jo, "Handheld multispectral fluorescence lifetime imaging system for in vivo applications," *Biomedical optics express*, vol. 5, 2014, pp. 921–931.
- [9] 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," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 20, 2015, p. 075010.
- [10] J. Friedman, T. Hastie, and R. Tibshirani, *The elements of statistical learning*, Springer series in statistics New York, 2001.