

Deconvolución óptima de mediciones de fluorescencia

Gerardo Ibarra Vázquez

UASLP, Facultad de Ciencias, Av. Salvador Nava s/n., C.P. 78290, SLP, Teléfono: 52 (444) 8262491
gerardo.ibarra.v@gmail.com

Daniel u. campos Delgado

UASLP, Facultad de Ciencias, Av. Salvador Nava s/n., C.P. 78290, SLP, Teléfono: 52 (444) 8262491
ducd@fciencias.uaslp.mx

Edgar R. Arce Santana

UASLP, Facultad de Ciencias, Av. Salvador Nava s/n., C.P. 78290, SLP, Teléfono: 52 (444) 8262491
arce@fciencias.uaslp.mx

Javier A. Jo

Texas A&M University, Biomedical Engineering Department, College Station, TX, EUA
javierjo@bme.tamu.edu

Resumen

El análisis de la respuesta al impulso de fluorescencia usando componentes exponenciales provee de información que permite caracterizar cuantitativamente sistemas biológicos Sin embargo, usando métodos tradicionales de deconvolución se tiene la problemática de que la respuesta del instrumento o entrada del sistema puede no estar disponible o tiene que ser medida fuera de línea, lo que provoca un problema de sincronización. Por lo que en este trabajo, se propone una metodología iterativa para resolver el problema de deconvolución de forma ciega, es decir estimando simultáneamente la respuesta del instrumento y las respuestas al impulso fluorescentes de forma simultánea, lo cual realizamos partiendo de un conjunto de mediciones de

imagenología microscópica de fluorescencia de tiempo de vida. En nuestra formulación se emplea una base conformada por funciones de Laguerre para expandir la respuesta al impulso fluorescente. El método de deconvolución ciega propuesto es formulado como un problema de aproximación cuadrática. Además, debido a la naturaleza no lineal en el proceso de estimación, se opta por un esquema de mínimos cuadrados alternados que resuelve iterativamente el problema de aproximación. En este trabajo se presenta la paralelización del algoritmo y los resultados de validación con bases de datos de placas de arterosclerosis, células mamarias con cancer y tejido oral.

Palabra(s) Clave(s): deconvolución, base de Laguerre, fluorescencia, mínimos cuadrados no negativos, optimización.

1. Introducción

Durante los últimos 20 años ha habido un crecimiento notable en el uso de la fluorescencia en las ciencias biológicas. La fluorescencia es una herramienta muy utilizada en las ciencias biológicas y clínicas para la caracterización de muestras de tejido. Una de las técnicas más recientes son las imágenes de microscopía de tiempo de vida de fluorescencia multi-espectrales (m-FLIM, por sus siglas en inglés) [1]. Esta tecnología captura la respuesta fluorescente a la excitación de un láser en diferentes canales espectrales (diferentes longitudes de onda), con el fin de medir la emisión óptica de fluoróforos sintéticos o endógenos. A fin de proporcionar evaluaciones cuantitativas, las imágenes m-FLIM son procesadas para extraer la respuesta de fluorescencia intrínseca (respuesta al impulso) de la muestra del tejido, en la cual el tiempo de vida es utilizado para proveer una propiedad cuantitativa usada para la caracterización de tejidos [2]. Por lo tanto las imágenes m-FLIM, requieren de la recuperación fiable (deconvolución) de la respuesta al impulso fluorescente de las mediciones, por lo que numerosas herramientas matemáticas se han diseñado para la recuperación de esta respuesta [2,3,4,5]. El potencial de las imágenes de fluorescencia se basa en que proveen de información temprana y no invasiva para el diagnóstico de

diferentes patologías como enfermedades cardiovasculares y dermatológicas, pre-cáncer oral y displasia, entre otras [6,7,8,9].

En la literatura se pueden observar dos tendencias principales en los algoritmos de deconvolución que dependen de la estructura de la respuesta al impulso fluorescente. Para la primera se asume una combinación lineal de funciones exponenciales que caracteriza a cada uno de los fluoróforos en la muestra [1,10,11]. Entonces, para esta aproximación tenemos que nuestros parámetros a buscar son los tiempos característicos de las funciones exponenciales y sus coeficientes de escalamiento. Por otro lado, en la segunda tendencia, tenemos que nuestra aproximación de la deconvolución se considera como una combinación lineal de la base discreta de Laguerre para la respuesta al impulso fluorescente [4].

Por una parte cuando modelamos la respuesta al impulso como una combinación lineal de funciones exponenciales, tenemos que los coeficientes de escalamiento son variables lineales pero los tiempos característicos de los exponenciales tienen una dependencia no lineal [12]. Por lo tanto, una aproximación no lineal se formula para calcular estas variables y minimizar el error de aproximación, que puede ser resuelto iterativamente mediante mínimos cuadrados no lineales para cada punto espacial [13]. En el otro caso, en donde se usa la base de las funciones de Laguerre, tenemos que los coeficientes de escalamiento de la base son variables lineales, por lo que una estimación usando mínimos cuadrados puede utilizarse. Una desventaja de las bases de Laguerre es que para algunos casos, la respuesta al impulso fluorescente tal vez no tenga un decaimiento monotónico. Entonces, durante la optimización cuadrática se deben incluir restricciones sobre la segunda o tercer derivada de la respuesta al impulso fluorescente resultante [3].

Una de las desventajas de los algoritmos de deconvolución que se han revisado en la literatura es que requieren de la medición de la respuesta del instrumento (láser de excitación) para desarrollar el cálculo. Además, para poder desarrollarse el proceso de deconvolución esta respuesta tiene que estar cuidadosamente alineada con la medición

de fluorescencia a fin de evitar tiempos muertos, y también puede sesgar las estimaciones de los tiempos de vida. Dada esta desventaja en los algoritmos de deconvolución tradicionales, en este trabajo se propone un algoritmo el cual no requiere del conocimiento de la respuesta del instrumento. Al mismo tiempo, este algoritmo propone estimar la respuesta al impulso fluorescente mediante funciones base para cada punto espacial, y la respuesta del instrumento con una perspectiva global, con lo que asumimos que la respuesta al instrumento es la misma para cada punto. Debido a que la función de costo de nuestra aproximación tiene una dependencia bilineal en nuestras variables de decisión, usamos una metodología de mínimos cuadrados alternados que iterativamente resuelve los coeficientes de escalamiento para nuestras funciones base y las muestras de la respuesta del instrumento.

2. Desarrollo

Los datos de las imágenes m-FLIM se modelan asumiendo que las mediciones de los decaimientos de fluorescencia son resultado de la convolución de la respuesta del instrumento y la respuesta al impulso fluorescente en cada punto espacial de la muestra. Además tenemos que los datos son discretos en el tiempo, y son muestreados con un periodo T sobre el dominio espacial de K puntos en el conjunto de datos [10,11]. Entonces, considerando que tenemos una ventana de tiempo de L muestras y una respuesta causal [14], el modelo de observación para la l -ésima muestra de tiempo y para el k -ésimo punto espacial está dado por la siguiente ecuación:

$$y_k[l] = u[l] \star h_k[l] + v_k[l] \quad (1)$$

$$y_k[l] = \sum_{j=0}^{L-1} u[l-j]h_k[j] + v_k[l] \quad \forall l \in [0, L-1], k \in [0, K-1] \quad (2)$$

donde $y_k[l]$, $u[l]$ y $h_k[l]$ denotan las muestras de las mediciones del decaimiento de fluorescencia, la respuesta del instrumento y la respuesta al impulso fluorescente, respectivamente, \star indica la operación de convolución, y $v_k[l]$ representa el ruido aleatorio relacionado a la instrumentación electrónica/óptica o en la medición. En

términos generales, la deconvolución es un problema inverso que puede tener soluciones múltiples [10,11]. Entonces, para restringir el espacio de búsqueda y tener un problema que se pueda manejar, en nuestra formulación, tenemos 2 hipótesis clave:

1. La respuesta al instrumento $u[l]$ es común para todos los K puntos espaciales en el conjunto de datos, y sus muestras son no-negativas y la suma de estas está normalizada a uno:

$$\sum_{l=0}^{L-1} u[l] = 1 \quad \& \quad u[l] \geq 0 \quad \forall l \in [0, L - 1] \quad (3)$$

2. La respuesta al impulso fluorescente $h_k[l]$ para cada punto espacial k e instante de tiempo l puede ser representada por una combinación lineal de N funciones bases en tiempo discreto $\{b_n[l]\}_{n=0}^{N-1}$, también común para todos los puntos espaciales.

Estas suposiciones nos permitirán tanto restringir la búsqueda de las posibles respuestas al instrumento y respuestas al impulso fluorescentes, y evitar problemas en los escalamientos numéricos, así como, formular las estimaciones como problemas de optimización cuadrática con restricciones que pueden ser resueltos eficientemente por algoritmos numéricos de optimización (punto interior, conjunto activo, etc.) [13]. Para comenzar con la explicación escribiremos nuestro modelo de observación de la convolución en notación vectorial asumiendo condiciones iniciales cero:

$$\begin{bmatrix} y_k[0] \\ y_k[1] \\ \vdots \\ y_k[L-1] \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} u[0] & 0 & \cdots & 0 \\ u[1] & u[0] & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ u[L-1] & u[L-2] & \cdots & u[0] \end{bmatrix} \begin{bmatrix} h_k[0] \\ h_k[1] \\ \vdots \\ h_k[L-1] \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} v_k[0] \\ v_k[1] \\ \vdots \\ v_k[L-1] \end{bmatrix}, \quad (4)$$

$$\mathbf{y}_k = \mathbf{U} \mathbf{h}_k + \mathbf{v}_k$$

donde tenemos como resultado que la matriz de entrada \mathbf{U} tiene una estructura toeplitz [15]. Enseguida se considera que la respuesta al impulso fluorescente en el punto espacial k y para cada instante l es modelada como una combinación lineal de las funciones base:

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

donde los coeficientes de escalamiento cumplen $c_{k,n} \in \mathfrak{R}$. Las funciones base que se utilizaron en este trabajo fueron las funciones base de Laguerre [2,3]. La ec. (5) se puede expresar en notación vectorial como:

$$\mathbf{h}_k = \mathbf{B} \mathbf{c}_k \quad \forall k \in [0, K - 1] \quad (6)$$

donde

$$\mathbf{B} = \begin{bmatrix} b_0[0] & b_1[0] & \cdots & b_{N-1}[0] \\ b_0[1] & b_1[1] & \cdots & b_{N-1}[1] \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ b_0[L-1] & b_1[L-1] & \cdots & b_{N-1}[L-1] \end{bmatrix} \in \mathfrak{R}^{L \times N} \quad (7)$$

$$\mathbf{c}_k = [c_{k,0} \quad \cdots \quad c_{k,N-1}]^T \in \mathfrak{R}^N \quad (8)$$

con las funciones base de Laguerre definidas como [2,3,4]:

$$b_n[l] = \alpha^{\frac{1}{2}(l-n)} \sqrt{1-\alpha} \sum_{i=0}^n (-1)^i \binom{l}{i} \binom{n}{i} \alpha^{n-i} (1-\alpha)^i \quad \forall n \in [0, N-1], l \in [0, L-1] \quad (9)$$

donde el parámetro libre $0 < \alpha < 1$ en las funciones de Laguerre determina la tasa de decaimiento exponencial. Cuanto mayor sea el orden n y/o cuanto mayor sea el parámetro α , más tiempo tendrá la propagación en el tiempo de las funciones base y mayor será la separación de tiempo entre el cruce por el cero. Entonces, considerando el ruido en la medición, el modelo de observación puede ser escrito en forma compacta como:

$$\mathbf{y}_k = \mathbf{U} \mathbf{B} \mathbf{c}_k + \mathbf{v}_k \quad \forall k \in [0, K - 1] \quad (10)$$

y aplicado para todas los puntos espaciales lo podemos escribir en notación matricial de la siguiente forma:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U} \mathbf{B} \mathbf{C} + \mathbf{V} \quad (11)$$

donde se definen las siguientes matrices

$$\mathbf{Y} = [\mathbf{y}_0 \quad \cdots \quad \mathbf{y}_{K-1}] \in \mathfrak{R}^{L \times K} \quad (12)$$

$$\mathbf{C} = [\mathbf{c}_0 \quad \cdots \quad \mathbf{c}_{N-1}] \in \mathfrak{R}^{N \times K} \quad (13)$$

$$\mathbf{V} = [\mathbf{v}_0 \quad \cdots \quad \mathbf{v}_{K-1}] \in \mathfrak{R}^{L \times K} \quad (14)$$

Entonces, tenemos que nuestro problema de deconvolución ciega se aborda como un problema de optimización [13]:

$$\min_{\mathbf{U}, \mathbf{C}} \frac{1}{2} \underbrace{\|\mathbf{Y} - \mathbf{U}\mathbf{B}\mathbf{C}\|_F^2}_J \quad (15)$$

$$\text{tal que } \|\mathbf{U}\|_\infty = 1 \ \& \ \mathbf{U} \geq 0$$

donde $\|\cdot\|_F$ y $\|\cdot\|_\infty$ nos indican la norma Frobenius y la norma infinito, respectivamente. Una ventaja importante de la formulación anterior es que la matriz de entrada \mathbf{U} tiene una estructura toeplitz [15]. Dado que la respuesta del instrumento es un pulso muy estrecho, no es necesario estimar todos los términos L , ya que muchos serán cero. Por lo tanto consideramos sólo los primeros \hat{L} términos ($\hat{L} < L$) para representar la respuesta del instrumento. De esta manera, la matriz de entrada \mathbf{U} puede parametrizarse por las variables $\{\theta_l\}$ como una combinación de \hat{L} matrices toeplitz $\mathbf{U}_l \in \mathfrak{R}^{L \times L}$

$$\mathbf{U} = \sum_{l=0}^{\hat{L}-1} \theta_l \mathbf{U}_l \quad (16)$$

por lo que el esquema de deconvolución ciega se puede volver a escribir como

$$\min_{\{\theta_l\}_{l=0}^{\hat{L}-1}, \mathbf{C}} \frac{1}{2} \left\| \mathbf{Y} - \sum_{l=0}^{\hat{L}-1} \theta_l \mathbf{U}_l \mathbf{B}\mathbf{C} \right\|_F^2 \quad (17)$$

$$\text{tal que } \sum_l \theta_l = 1 \ \& \ \theta_l \geq 0 \ \forall l \in [0, \hat{L} - 1]$$

2.1. Restricciones en la respuesta al impulso fluorescente

La estimación de la respuesta al impulso fluorescente necesita considerar condiciones de suavidad para representar una muestra biológica, por lo que se restringe nuestro modelo lineal en (5) [10,11]. Por lo tanto, la respuesta estimada necesita mostrar un patrón monótonamente decreciente en cualquier punto espacial [3]. Como resultado, la derivada temporal de la respuesta al impulso fluorescente tiene que ser negativa definida ($h'_k < 0 \forall k$), pero sin puntos de inflexión o cambios de curvatura. Así que, una restricción alternativa es considerar que la segunda derivada temporal debe ser siempre positiva definida ($h''_k > 0$) [3]. Sin embargo, resulta ser más fácil incorporar en el proceso de optimización que la tercera derivada en tiempo debe ser negativa semi-definida ($h'''_k \leq 0$). Con esto, aseguramos que la función al impulso fluorescente sea monótonamente decreciente y estrictamente convexa. Para este propósito, utilizaremos una aproximación numérica para la derivada temporal de tercer orden basada en diferencias centradas para el l -ésimo instante de tiempo y el k -ésimo punto espacial [12]:

$$h'''_k[l] = \frac{-h_k[l+3] + 8h_k[l+2] - 13h_k[l+1] + 13h_k[l-1] - 8h_k[l-2] + h_k[l-3]}{8T^3} \quad (18)$$

Entonces, usando notación vectorial, la aproximación discreta de la derivada temporal de tercer orden de la respuesta al impulso fluorescente en el k -ésimo punto espacial es:

$$\mathbf{h}'''_k = \mathbf{A} \mathbf{c}_k \in \mathfrak{R}^{L-6} \quad (19)$$

donde

$$\mathbf{A} \triangleq \frac{1}{8T^3} (-\mathbf{B}_{7:L} + 8\mathbf{B}_{6:L-1} - 13\mathbf{B}_{5:L-2} + 13\mathbf{B}_{3:L-4} - 8\mathbf{B}_{2:L-5} + \mathbf{B}_{1:L-6}) \in \mathfrak{R}^{(L-6) \times N} \quad (20)$$

y la notación $\mathbf{B}_{p:q}$ representa la matriz resultante de extraer los renglones p a q en la matriz \mathbf{B} . De esta manera siguiendo la notación vectorial, la siguiente desigualdad puede representar la restricción en la respuesta al impulso fluorescente para los coeficientes de escalamiento \mathbf{c}_k en el punto espacial k :

$$\mathbf{A}c_k \leq \mathbf{0} \quad \forall k \in [0, K - 1] \quad (21)$$

Por lo que nuestro esquema de optimización cuadrática para nuestro algoritmo de deconvolución ciega, que incluye las restricciones en las muestras de la respuesta del instrumento como en los coeficientes de escalamiento, queda formulado como:

$$\min_{\{\theta_l\}_{l=0}^{\hat{L}-1}, c} \frac{1}{2} \left\| \mathbf{Y} - \sum_{l=0}^{\hat{L}-1} \theta_l \mathbf{U}_l \mathbf{B} \mathbf{C} \right\|_F^2 \quad (22)$$

$$\text{tal que } \sum_l \theta_l = 1 \ \& \ \theta_l \geq 0 \ \forall l \in [0, \hat{L} - 1], \mathbf{A}c_k \leq \mathbf{0} \quad \forall k \in [0, K - 1].$$

2.2. Estimación de los coeficientes de escalamiento

Asumiendo que los parámetros $\{\theta_l\}_{l=0}^{\hat{L}-1}$ son dados, entonces la matriz \mathbf{U} puede ser calculada. Dado que los coeficientes de escalamiento son estimados para cada punto espacial $k \in [0, K - 1]$, una estimación local de mínimos cuadrados con restricción se formula como [5]:

$$\min_{c_k} \frac{1}{2} \|\mathbf{y}_k - \mathbf{U} \mathbf{B} c_k\|_2^2 = \min_{c_k} \frac{1}{2} c_k^T \mathbf{H} c_k - f_k^T c_k \quad (23)$$

donde $\mathbf{H} = \mathbf{B}^T \mathbf{U}^T \mathbf{U} \mathbf{B}$, $f_k = \mathbf{B}^T \mathbf{U}^T \mathbf{y}_k$ y \mathbf{A} dada por (20). Además como otra alternativa, el problema de optimización planteado se puede resolver de una manera más eficiente con su formulación dual, a través de una aproximación usando mínimos cuadrados no negativos. La dualidad del problema nos indica que un problema de optimización puede ser visto de dos perspectivas, el problema primario o el problema dual [13,6]. La idea básica de usar la función dual de Lagrange es tomar las restricciones en cuenta, mediante el aumento de la función objetivo con una suma ponderada de las funciones de restricciones, utilizando el multiplicador de Lagrange como el peso asociado para cada restricción. Dado que la función dual de Lagrange es el supremo puntual de una familia de funciones afines al multiplicador, esta es cóncava, incluso cuando el problema no es convexo. Por lo que puede ser resuelta con respecto al multiplicador de

Lagrange y enseguida se calculan los coeficientes de nuestro problema primario como se muestra a continuación [3]:

$$\lambda^* = \arg \min_{\lambda \geq 0} \frac{1}{2} \|\mathbf{R}(\mathbf{A}^\top \lambda - \mathbf{f}_k)\|_2^2 \quad (24)$$

donde $\mathbf{R}^\top \mathbf{R} = \mathbf{H}^{-1}$ se obtiene de la factorización de Cholesky y los coeficientes de escalamiento óptimos son:

$$\mathbf{c}_k = \mathbf{H}^{-1}(-\mathbf{A}^\top \lambda^* + \mathbf{f}_k). \quad (25)$$

Ya que las matrices \mathbf{H} y \mathbf{A} son constantes para cada punto espacial en el conjunto de datos, la matriz \mathbf{R} puede ser calculada una vez para toda la imagen FLIM. Sin embargo, este paso en el algoritmo de deconvolución ciega puede ser también paralelizado, a fin de reducir el tiempo de computo. Además se propone una disminución en las muestras espaciales equidistante en tamaño $D \in \mathbb{Z}$ ($D > 1$) para la matriz de mediciones de FLIM \mathbf{Y} , durante la estimación de la respuesta del instrumento y así obtener una versión reducida (en columnas) $\hat{\mathbf{Y}}$ donde $\hat{\mathbf{K}} = \lfloor K/D \rfloor$ y $\lfloor \cdot \rfloor$ denota la función piso.

2.3. Estimación de la respuesta del instrumento

Para la estimación de la respuesta del instrumento, suponemos que la matriz de coeficientes de escalamiento \mathbf{C} es conocida en la función de costo J , y entonces la optimización se realizará para los parámetros $\{\theta_l\}_{l=0}^{\hat{L}-1}$ que representan las primeras \hat{L} muestras de la respuesta del instrumento. Para este caso, se puede calcular una solución cerrada para toda la base de datos FLIM. Primero, la función de costo es aumentada para incluir la condición de normalización $\sum_l \theta_l = 1$ con un multiplicador de Lagrange [13,16]:

$$\hat{J} = \frac{1}{2} Tr \left\{ \left(\mathbf{Y} - \sum_{l=0}^{\hat{L}-1} \theta_l \mathbf{U}_l \mathbf{B} \mathbf{C} \right)^\top \left(\mathbf{Y} - \sum_{l=0}^{\hat{L}-1} \theta_l \mathbf{U}_l \mathbf{B} \mathbf{C} \right) \right\} + \mu \left(\sum_l \theta_l - 1 \right) \quad (26)$$

donde $\mu > 0$ es el multiplicador de Lagrange que está relacionado a la condición de igualdad y $Tr\{\cdot\}$ denota la traza de la matriz. Por lo tanto, las condiciones de optimalidad estacionaria son:

$$\frac{\partial \hat{f}}{\partial \theta_m} = 0 \quad \forall m \in [0, L - 1], \quad \& \quad \frac{\partial \hat{f}}{\partial \mu} = 0 \quad (27)$$

Al aplicar la función de costo en la ec. (26) a las condiciones en (27), se obtiene el siguiente par de ecuaciones:

$$\sum_{l=0}^{\hat{L}-1} \underbrace{Tr\{\mathbf{C}^T \mathbf{B}^T \mathbf{U}_m^T \mathbf{U}_l \mathbf{B} \mathbf{C}\}}_{\delta_{m,l}} + \mu = \underbrace{Tr\{\mathbf{Y}^T \mathbf{U}_m \mathbf{B} \mathbf{C}\}}_{b_m} \quad \forall m \in [0, \hat{L} - 1] \quad (28)$$

$$\sum_{l=0}^{\hat{L}-1} \theta_l = 1 \quad (29)$$

Por consiguiente, obtenemos un sistema de $\hat{L} + 1$ ecuaciones lineales y $\hat{L} + 1$ variables desconocidas:

$$\begin{bmatrix} \delta_{0,0} & \cdots & \delta_{1,\hat{L}-1} & 1 \\ \vdots & \ddots & \cdots & \vdots \\ \delta_{0,\hat{L}-1} & \cdots & \delta_{\hat{L}-1,\hat{L}-1} & 1 \\ 1 & \cdots & 1 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \theta_0 \\ \vdots \\ \theta_{\hat{L}-1} \\ \mu \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} b_0 \\ \vdots \\ b_{\hat{L}-1} \\ 1 \end{bmatrix}, \quad (30)$$

la cual provee la solución óptima a los parámetros $\{\theta_l\}_{l=0}^{\hat{L}-1}$. Si al resolver la ec. (3), un parámetro viola la restricción de no negatividad, el algoritmo lo obliga a ser cero ($\theta_l = 0$) y reescala los parámetros para conservar la condición de normalización ($\sum_{l=0}^{\hat{L}-1} \theta_l = 1$).

2.4. Estimación de la deconvolución ciega

Utilizando la hipótesis planteada en la sección anterior, podemos construir el algoritmo que deconvolucione de forma ciega los datos m-FLIM, estimando las respuestas al impulso fluorescente, así como la respuesta al instrumento. Con lo que se presenta el algoritmo en forma general:

Algoritmo de deconvolución ciega

1. Inicialización y selección de un conjunto reducido de datos: Se provee la matriz de mediciones de FLIM (Y) y basado en la selección de la disminución de muestras espaciales D , se crea el conjunto de datos \hat{Y} reducido. Se define el número de muestras a ser estimadas para la respuesta del instrumento \hat{L} , su condición inicial θ^0 , el número máximo de iteraciones t_{max} , el umbral de convergencia para el error estimado κ y las funciones bases $\{b_n[l]\}_{n=0}^{N-1}$ para construir la matriz B en (7). Se pone el contador de iteraciones $t=0$ y $J^0 = 10^6$. Con el punto de inicio θ^0 , enseguida se calcula la matriz de entrada U^0 .
2. Estimación de los coeficientes de escalamiento de la base de Laguerre: Se aumenta el contador en 1, y para el conjunto reducido de puntos espaciales $k \in [0, \hat{K} - 1]$ con U^{t-1} , se calcula el algoritmo de mínimos cuadrados no negativos para c_k^t en (24) and (25). Se construye la matriz resultante de coeficientes de escalamiento C^t .
3. Estimación de la respuesta del instrumento: Se fija C^t , se evalúan los parámetros óptimos de entrada θ^t según la ec. (30) y se obtiene la matriz de entrada U^t .
4. Prueba de convergencia: Se estima el error en la iteración t como $J^t = \|Y - U^t B C^t\|_F$, se evalúa la mejora en el error con respecto de su iteración anterior $\Delta J = |J^t - J^{t-1}|$. Si $\Delta J > \kappa$ & $t < t_{max}$ regresar al paso 2, y en caso contrario continuar.
5. Estimación de los coeficientes de escalamiento para el conjunto de datos completo: Para todo el conjunto de puntos espaciales $k \in [0, K - 1]$ con U^t se calcula el algoritmo de mínimos cuadrados no negativos para c_k^t en (24) and (25).
6. Computo final de las estimaciones de la respuesta al impulso fluorescente y los decaimientos medidos de fluorescencia: Si asumimos que el algoritmo calcula

en la \hat{t} -ésima iteración las salidas $(\theta^{\hat{t}}, \mathbf{C}^{\hat{t}})$, las estimaciones finales están dadas por:

$$\hat{u}[l] = \begin{cases} \theta_l^{\hat{t}} & 0 \leq l \leq \hat{L} - 1 \\ 0 & \hat{L} \leq l \leq L - 1 \end{cases} \quad (31)$$

$$\hat{\mathbf{h}}_k = \mathbf{BC}^{\hat{t}} \Rightarrow \hat{h}_k[l] = \sum_{n=0}^{N-1} c_{k,n}^{\hat{t}} b_n[l] \quad \forall l \in [0, L - 1], k \in [0, K - 1] \quad (32)$$

$$\hat{\mathbf{y}}_k = \mathbf{U}^{\hat{t}} \mathbf{BC}^{\hat{t}} \Rightarrow \hat{y}_k[l] = \sum_{n=0}^{N-1} c_{k,n}^{\hat{t}} \hat{u}[l] \star b_n[l] \quad (34)$$

donde $\mathbf{U}^{\hat{t}}$ se construye con $\{\theta_l^{\hat{t}}\}$.

2.5. Paralelización del algoritmo

La implementación de este algoritmo se realizó en la plataforma de MATLAB, la cual tiene capacidad de poder paralelizar el procesamiento de los programas implementados en ella. Por lo que se estudió la posibilidad de paralelizar el algoritmo, para poder realizar la estimación más eficiente y en un menor tiempo. MATLAB contiene un herramienta (*Parallel Computing Toolbox*) la cual permite al usuario resolver problemas computacionalmente intensos usando los procesadores con múltiples núcleos, GPU's y grupos de computadoras. Usando esta herramienta en el algoritmo descrito en la Sección 2.3, se paralelizó el calculo de los coeficientes de la base de Laguerre para cada punto espacial en la ec. (24), ya que inicialmente se utilizaban los ciclos *for*, los cuales fueron sustituidos por los ciclos *parfor*. Al realizar este cambio lo que se hace es correr cada una de las iteraciones del ciclo en uno de los núcleos del procesador de la computadora. También se configuraron las preferencias de la función del método de mínimos cuadrados no negativos para que se ejecutase en paralelo. No se optó por utilizar GPU's dado a que la herramienta tiene soporte a un número reducido de modelos.

3. Resultados

Para la validación del algoritmo se probó con imágenes m-FLIM de 3 tipos: tejido de placas coronarias con arterosclerosis, células de cáncer de mama y tejido oral. Para cuantificar el desempeño del método de deconvolución ciega, se comparó la respuesta al impulso estimada de este algoritmo con nuestra referencia generada a partir de la deconvolución usando la respuesta del instrumento medida. Se analizaron para los tejidos de placas coronarias con arterosclerosis 60 imágenes, con 170 muestras temporales, 60x60 muestras espaciales y un tiempo de muestreo de 250 ns; para las imágenes de células de cáncer de mama se analizaron 13 imágenes, con 170 muestras temporales, 256x256 muestras espaciales y un tiempo de muestreo de 48.867 ns; y para los datos de tejido oral fueron 13 imágenes, con 200 muestras temporales, 160x160 muestras espaciales y un tiempo de muestreo de 160 ns. También para todas las pruebas, se obtuvieron los resultados del algoritmo de deconvolución ciega con el factor de disminución de muestras de $D=8$ y $D=36$.

Los resultados de la validación y de los tiempos de cómputo se muestran a continuación en las Figs. 1 a 3 y Tabla 1. Para poder mostrar la respuesta de fluorescencia intrínseca se calcula el tiempo de vida promedio para cada una de las muestras espaciales y se muestra la imagen. Este tiempo de vida promedio puede ser calculado con la siguiente formula:

$$\tau_k = \frac{\mathbf{t}^T \hat{\mathbf{h}}_k}{\mathbf{1}_L^T \hat{\mathbf{h}}_k} \quad \forall k \in [0, K - 1] \quad (35)$$

donde τ_k denota el tiempo de vida promedio para la k -ésima muestra, $\hat{\mathbf{h}}_k \in \mathbb{R}^L$ representa la aproximación de respuesta al impulso fluorescente, y $\mathbf{t} \in \mathbb{R}^L$ el vector de muestras de tiempo. Se escogió una imagen dentro del juego de datos analizados para cada método y así poder observar gráficamente los resultados. A continuación se muestran estas imágenes en las Figs. 1, 2 y 3, en las cuales se observa el método de deconvolución con la respuesta del instrumento medida (DEMIR)

y el método de deconvolución ciega (BDE) con factor de disminución de muestras (D=8 y D=36).

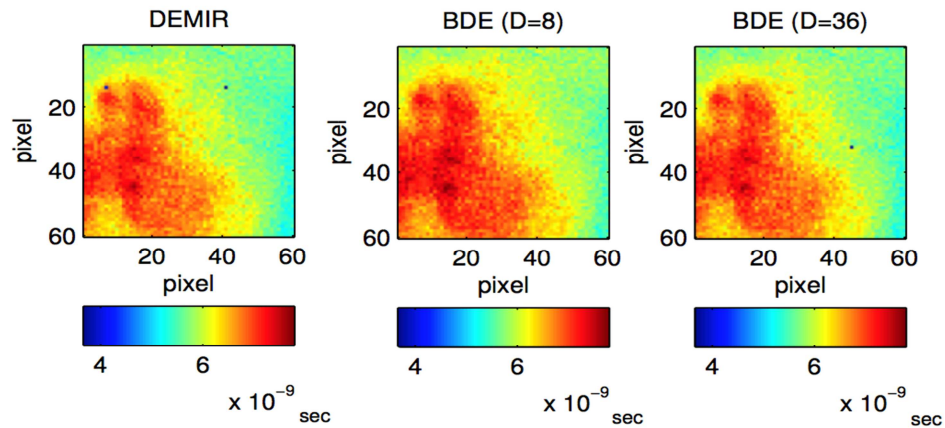


Fig. 1. Comparativo de resultados en los tiempos de vida promedio de la respuesta al impulso para tejido de placas coronarias con arterosclerosis en la imagen 16.

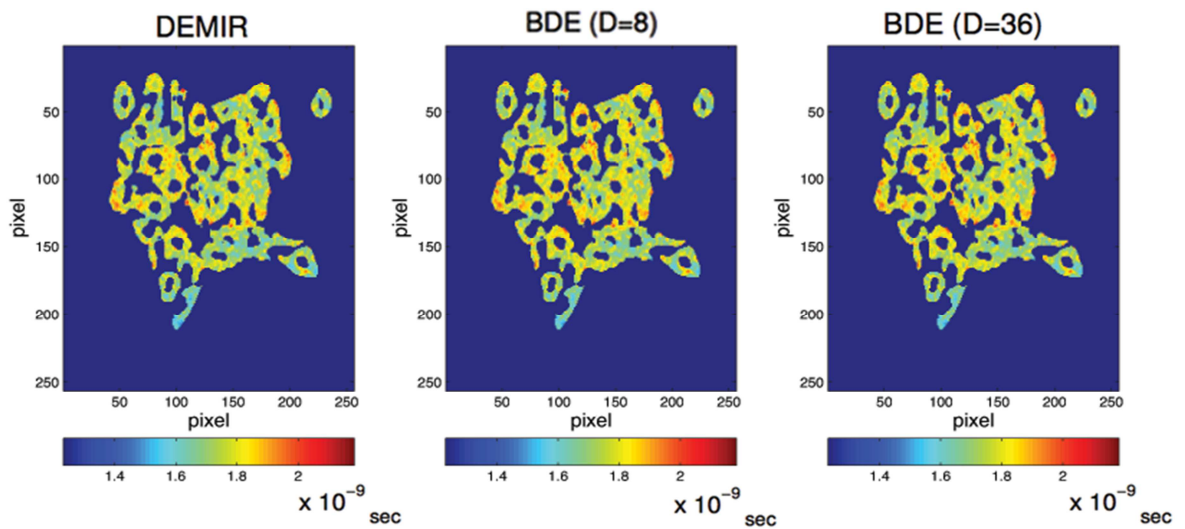


Fig. 2. Comparativo de resultados en los tiempos de vida promedio de la respuesta al impulso para tejido con células de cáncer de mama en la imagen 4.

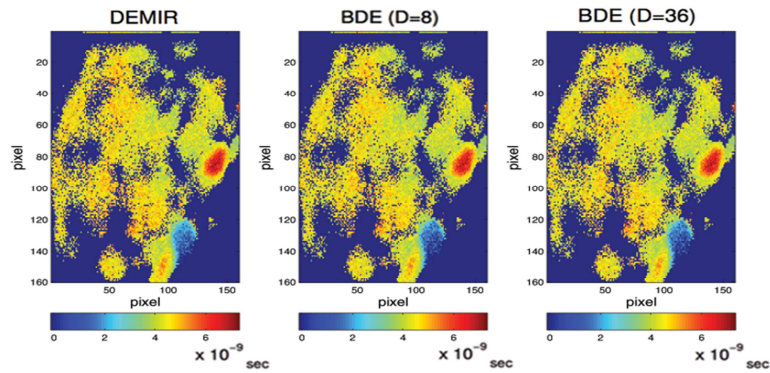


Fig. 3. Comparativo de resultados en los tiempos de vida promedio de la respuesta al impulso para tejido oral en la imagen 19.

Para poder evaluar la exactitud de la metodología se uso una métrica sobre todo el conjunto de datos, y considerando como el tiempo de vida promedio por DEMIR como nuestra referencia, el porcentaje de error en la estimación por el algoritmo de deconvolución ciega para toda la imagen se definió como:

$$E_l^{BDE} = \frac{1}{K} \sum_{k=0}^{K-1} \frac{|\tau_k^{DEMIR} - \tau_k^{BDE}|}{\tau_k^{DEMIR}}. \quad (36)$$

En cuanto el tiempo de ejecución para cada uno de estos algoritmos se obtuvieron los siguientes valores que se muestran en la Tabla 1.

| | | Tiempo de Procesamiento (Segundos) | | | | | |
|--|---------------------|------------------------------------|---------|---------|--------------|---------|---------|
| | | Normal | | | Paralelizado | | |
| | | DEMIR | BDE | | DEMIR | BDE | |
| | | | D=8 | D=36 | | D=8 | D=36 |
| Tejido de placas coronarias con arteriosclerosis | Media | 1.4151 | 14.0877 | 12.1621 | 0.7203 | 4.566 | 4.214 |
| | Desviación estándar | 0.2465 | 6.5013 | 4.7898 | 0.1604 | 1.172 | 1.3493 |
| Células cancerígenas de mama | Media | 38.28 | 53.52 | 48.8687 | 13.9566 | 18.1065 | 14.5015 |
| | Desviación estándar | 7.5377 | 10.27 | 7.9506 | 2.1186 | 2.6843 | 2.2352 |
| Tejido oral | Media | 42.4477 | 57.4056 | 44.7883 | 13.594 | 18.4836 | 14.7639 |
| | Desviación estándar | 12.7222 | 17.6769 | 13.9839 | 3.2362 | 4.9334 | 4.2446 |

Tabla 1. Comparativo de resultados en los tiempos de procesamiento del algoritmo de deconvolución ciega.

4. Discusión

Como se podrá visualizar en las imágenes mostradas en las Figs. 1 a 3, se resalta la similitud entre nuestra referencia, la deconvolución usando la respuesta del instrumento medida (DEMIR) y el método de deconvolución ciega (BDE). Además teniendo en cuenta los resultados de la métrica del error en el cálculo del tiempo de vida promedio en (36) se observaron valores promedio para el tejido de placas coronarias con arterosclerosis de 3.4% y 4.0% para el BDE ($D=8$) y BDE ($D=36$), respectivamente. Para los datos de tejido con células de cáncer de mama se observó un error de 4.2% y 4.6% y para tejido oral 4.5% y 4.9%. Confirmando estos números que nuestros tiempos de vida promedio calculados con el algoritmo de deconvolución ciega (BDE) se encuentran apegados a los valores estimados con la medición de la respuesta del instrumento.

Mediante la paralelización del algoritmo se pudo reducir el tiempo de procesamiento del algoritmo en promedio para la deconvolución usando la respuesta del instrumento medida (DEMIR) aproximadamente en 40% del tiempo original. Mientras para los dos casos del algoritmo de deconvolución ciega (BDE) con el factor de disminución de muestras de 8 y 36 se redujo en promedio a aproximadamente 33% y 32% del tiempo original, respectivamente. Todas las mediciones del tiempo de ejecución fueron tomadas en la misma computadora con características de procesador Intel 2.3 GHz Quad-core I7-3820QM y 8 Gb de RAM.

5. Conclusiones

La propuesta del método de deconvolución ciega que se presenta en este trabajo, ayuda a resolver el problema de deconvolución para los datos FLIM de una manera novedosa, donde se modela la respuesta al impulso fluorescente como una combinación lineal de funciones base para cada punto espacial. Este algoritmo se encarga de estimar tanto las muestras de la respuesta del instrumento con una perspectiva global, así como los coeficientes de escalamiento de nuestras funciones

base localmente en cada punto espacial. La base matemática de este algoritmo se centra en la metodología de mínimos cuadrados alternados que iterativamente estima nuestras variables de decisión. Para el proceso de estimación de ambas variables se utilizan métodos como optimización cuadrática con restricciones para los coeficientes de escalamiento, y mínimos cuadrados para la respuesta del instrumento.

Para acelerar el procesamiento de la información se reduce el conjunto de mediciones hasta alcanzar la convergencia. Después, el método de deconvolución ciega provee la estimación final de la respuesta al instrumento y calcula las respuestas al impulso fluorescentes en todos los puntos espaciales. Al final en el análisis de los resultados, se puede observar que el método ofrece buenos resultados en la precisión de las estimaciones, así como la paralelización del algoritmo que ayuda a reducir el tiempo distribuyendo las operaciones en los núcleos del procesador sin modificar su respuesta.

6. Referencias

- [1] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. 2006. Springer Press. New York.
- [2] P. Pande, J. A. Jo. "Automated analysis of fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) data based on the Laguerre deconvolution method". *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. Vol. 58. No. 1. 2011. 172—181 pp.
- [3] J. Liu, Y. Sun, J. Qi, 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.* Vol. 57. 2012. 843-865 pp.
- [4] J. A. Jo, Q. Fang, T. Papaioannou, L. Marcu, "Fast model-free deconvolution of fluorescence decay for analysis of biological systems". *Journal of Biomedical Optics*. Vol. 9. No. 4. 2004. 743-752 pp.

- [5] W. R. Ware, L. J. Doemeny, T. L. Nemzek, "Deconvolution of fluorescence and phosphorescence decay curves. A least square method". *J. Phys. Chem.* Vol. 77, 1973. 2038-2048 pp.
- [6] I. B. Berlman, *Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules*. 2nd ed. 1971. Academic Press. New York.
- [7] M. O'Donnell, E. R. McVeigh, H. W. Strauss, A. Tanaka, B. E. Bouma, G. J. Tearney, M. A. Guttman, E. V. Garcia, "Multimodality cardiovascular molecular imaging technology". *Journal of Nuclear Medicine*. Vol. 51. No. 1. 2010. 38S–50S pp.
- [8] V. De Giorgi, D. Massi, S. Sestini, R. Cicchi, F. S. Pavone, T. Lotti, "Combined non-linear laser imaging (two photon excitation fluorescence microscopy, fluorescence lifetime imaging microscopy, multispectral multiphoton microscopy) in cutaneous tumours: first experiences". *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. Vol. 23. No. 3. 2009. 314–316 pp.
- [9] N. Galletly, J. McGinty, C. Dunsby, F. Teixeira, J. Requejo-Isidro, I. Munro, D. Elson, M. Neil, A. Chu, P. French, G. Stamp, "Fluorescence lifetime imaging distinguishes basal cell carcinoma from surrounding uninvolved skin". *British Journal of Dermatology*. Vol. 159. No. 1. 2008. 152–161 pp.
- [10] A. Periasamy, R.M. Clegg, *FLIM Microscopy in Biology and Medicine*. 2009. Chapman and Hall. CRC.
- [11] L. Marcu, P.M.W. French, D.S. Elson, *Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging: Principles and Applications in Biomedical Diagnostics*. 2014. CRC Press.
- [12] J. H. Mathews, K. K. Fink, *Numerical Methods Using Matlab*. 4th Edition. 2004. Prentice-Hall. Upper Saddle River.

- [13] J. Nocedal, S. J. Wright, Numerical Optimization. 2nd Edition. 2006. Springer-Verlag.
- [14] J. G. Proakis, D. G. Manolakis, Digital Signal Processing. 4th Edition. 2006. Prentice Hall.
- [15] R. A. Horn, C. R. Johnson, Matrix Analysis. 1985. Cambridge University Press.
- [16] S. Boyd, L. Vandenberghe, Convex Optimization. 2004. Cambridge University Press.

7. Autores

Gerardo Ibarra Vazquez es actualmente alumno de la maestría en Ingeniería Electrónica de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), y obtuvo el grado de Ingeniero Electrónico también de la UASLP. Su trabajo de investigación se centra en métodos numéricos para la caracterización de tejido utilizando imágenes microscópicas de tiempo de vida de fluorescencia.

Daniel U. Campos Delgado es profesor de tiempo completo en la UASLP desde 2001. Recibió su título de Ingeniero en Electrónica en la UASLP en 1996. Sus estudios de Maestría y Doctorado los realizó en Louisiana State University (LSU), Baton Rouge, LA, EUA, en 1999 y 2001, respectivamente. Es autor de más de 150 artículos en revistas científicas y congresos. Sus áreas de interés incluyen métodos de optimización, modelado de sistemas dinámicos y procesamiento de señales.

Edgar R. Arce Santana es profesor en la UASLP en México. Recibió su grado de licenciatura en ciencias de la computación en el Instituto Tecnológico de San Luis Potosí en 1987. Obtuvo sus grados de Maestría y Doctorado en el CIMAT en Guanajuato en 2000 y 2004, respectivamente. Es autor de más de 50 artículos publicados en revistas y congresos científicos. Sus áreas de interés incluyen la visión computacional, procesamiento de señales y reconocimiento de patrones.

Javier Jo es profesor en el Biomedical Engineering Department en la Universidad de Texas A&M. Recibió su grado de Ingeniero Electrónico de la Pontificia Universidad Católica del Perú en 1996. Obtuvo sus grados de Maestría y Doctorado de la University of Southern California, LA, EUA en 2000 y 2002, respectivamente. Sus principales áreas de interés incluyen análisis de sistemas y procesamiento de imágenes, así como instrumentación biomédica con aplicaciones en biofotónica, fisiología y medicina.