Identificación Ciega de Mediciones de Tiempo de Vida Fluorescente *

D.U. Campos-Delgado, * Elvis Durán, ** Javier A. Jo**

 * Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, SLP, México (e-mail: ducd@fciencias.uaslp.mx).
 ** Biomedical Engineering Department, Texas A & M University,

College Station, TX, USA (e-mails: elvisduran8@gmail.com, javierjo@bme.tamu.edu)

Resumen: La fluorescencia es un fenómeno molecular que permite la caracterización química de una muestra de tejido. En este trabajo, se proponen dos técnicas de identificación ciega de sistemas que estiman las respuestas al impulso fluorescente de cada punto espacial de una muestra por medio de un modelo de múltiples-exponenciales, y a su vez de forma simultánea la excitación láser. Los enfoques propuestos tienen perspectivas locales y globales con respecto de las constantes de tiempo de las funciones exponenciales. Para los procesos de estimación, y dada la dependencia no-lineal de las variables a estimar, se emplean enfoques basados en mínimos cuadrados alternados, lo que generan procesos iterativos de búsqueda. Las metodologías de identificación ciega se evalúan con una muestra de una lesión benigna de la mucosa bucal, y los resultados verifican la capacidad de estimar la excitación láser, así como capturar el perfil monotónicamente decadente de las respuestas al impulso.

Palabras clave: Identificación de sistemas, Procesamiento óptimo de señales, Técnicas ciegas de procesamiento, Fluorescencia.

1. INTRODUCCIÓN

La fluorescencia es un fenómeno a nivel molecular que permite una caracterización química de muestras de tejido a través de una excitación óptica y el subsecuente registro de la emisión correspondiente (Marcu et al., 2004). En la imagenología microscópica de fluorescencia de tiempo de vida (FLIM, por sus siglas en inglés) (Periasamy and Clegg, 2009), un pulso óptico láser se emplea para excitar una sección de una muestra, donde enseguida la instrumentación electro-óptica registra temporalmente la emisión lumínica en ciertas bandas de longitud de onda asociadas con el espectro de emisión de los fluoróforos sintéticos o endógenos de interés (Shrestha et al., 2010). Ésta técnica permite un diagnóstico temprano de cambios en la composición química de una muestra asociados con diversas patologías, como enfermedades cardiovasculares o dermatológicas (Park et al., 2011; De Giorgi et al., 2009), etapas tempranas de cancer oral Jabbour et al. (2013), o medir la respuesta terapéutica a medicamentos anti-cancerígenos (Walsh et al., 2014). Sin embargo, para una evaluación precisa de las mediciones FLIM se requiere una etapa de procesamiento inicial donde se aísle el efecto de la excitación láser para identificar la respuesta al impulso fluorescente en cada punto espacial de la muestra. El modelo de observación se considera entonces como la respuesta de un sistema lineal e invariante en el tiempo (LTI) a la entrada de excitación láser. A este proceso se le conoce en la literatura como deconvolución, que

* Este estudio fue financiado por una apoyo de CONACYT para Ciencia Básica 2016-2019 (Ref. # 254637).

involucra a su vez la solución de un problema inverso de identificación.

El problema de deconvolución se puede atacar a través de técnicas de identificación de sistemas, pues se requiere estimar la respuesta al impulso del tejido analizado en cada punto espacial. Dado que la respuesta al impulso por el efecto de fluorescencia debe mostrar un patrón monotónicamente decadente en el tiempo (Marcu et al., 2004), en la literatura se emplean modelos basados en combinaciones lineales de funciones base de Laguerre o de múltiples-exponenciales (Warren et al., 2013; Dabir et al., 2009; Liu et al., 2012). Ambas metodologías emplean una formulación de un problema de aproximación óptima. En el primer enfoque se estiman los escalamientos de la base de Laguerre de forma lineal, pero debe ajustarse un parámetro de forma en la base con una estrategia no-lineal, así como definir el orden de la base (Dabir et al., 2009). Otro punto relevante es que deben incluirse restricciones de decaimiento continuo en las estimaciones. Por otro lado, en el enfoque de múltiple-exponenciales se emplea una estrategia de mínimos cuadrados no-lineales para estimar los escalamientos y las constantes de tiempo de cada exponencial (Warren et al., 2013). Sin embargo, estos enfoques asumen que se cuenta con la medición de la excitación láser, es decir la entrada al sistema LTI, lo cual en la práctica puede no darse, o se requiere de un proceso fino de sincronización en cada muestra espacial. Por lo que es atractivo tener una metodología que estime de forma conjunta la excitación láser como las respuestas al impulso fluorescentes.

En la literatura, el problema de estimación conjunta (respuestas al impulso más entrada) se conoce como identificación ciega de sistemas (ICS), donde la suposición de partida es que se tienen varias mediciones de salida de sistemas LTI que comparten la misma entrada (Guanghan et al., 1995; Abed-Meraim et al., 1997). Este problema ha tenido diversas aplicaciones en telecomunicaciones, procesamiento de señales e imágenes, geofísica, medicina, localización de fugas, entre otros (Abed-Meraim et al., 1997). Por ejemplo, la ICS se ha sugerido para identificar la ubicación de fuentes acústicas (Yang et al., 2008), y en la restauración ciega de imágenes para microscopia 3D de fluorescencia y evitar así los efectos de borrosidad por la instrumentación óptica (Sarder and Nehorai, 2006). También la ICS se ha aplicado en conjunto con funciones base de Laguerre para estimar la dinámica cardiovascular y el flujo sanguíneo central a partir de mediciones de presión periférica (Hahn et al., 2010; McCombie et al., 2005) o de señales de fotopletismografía (McCombie et al., 2006). Recientemente, el problema de detectar fugas en tuberías se atacó por medio de técnicas de ICS, buscando cuantificar y ubicar la fuga a través de las señales de presión en el acueducto (Yang et al., 2008). En el estado del arte, existe ya una propuesta de ICS aplicado a muestras FLIM, pero considerando el enfoque de funciones base de Laguerre donde se emplea una metodología de mínimos cuadrados alternados (MCA) para generar una secuencia convergente a la estimación óptima (Campos-Delgado et al., 2015). Una ventaja de este enfoque es que la estimación es lineal con respecto a los parámetros desconocidos, salvo el factor de escala de la base de Laguerre y el orden de la misma. En este contexto, el articulo introduce una nueva metodología para la ICS en muestras FLIM por medio de un modelo de múltiplesexponenciales, considerando enfoques locales y globales en la estimación de las constantes de tiempo. Además para explotar la dependencia lineal de los escalamientos en el modelo de observación, se emplea un esquema de mínimos cuadrados alternados (Niesen et al., 2009), dentro de un esquema iterativo global. El esquema propuesto de ICS se valida experimentalmente con una muestra FLIM de tejido oral para mostrar la precisión en la estimación de la excitación láser, y los tiempos de vida promedio.

La notación empleada en el documento se describe a continuación. Letras itálicas describen variables escalares, y vectores y matrices por letras obscuras minúsculas y mayúsculas, respectivamente. \mathbb{R} representa a los números reales, \mathbb{R}^n denota vectores reales *n*-dimensionales, y $\mathbb{R}^{n \times m}$ matrices reales de dimensión $n \times m$. Para un vector \mathbf{x} , la operación de transposición se define por \mathbf{x}^{T} , la norma Euclidiana por $\|\mathbf{x}\| = \sqrt{\mathbf{x}^{\mathsf{T}}\mathbf{x}}$, y $\mathbf{x} \ge 0$ ($\mathbf{x} > 0$) representa que cada elemento en el vector es positivo o cero (positivo). Para los vectores $\mathbf{x} \in \mathbb{R}^n$ y $\mathbf{y} \in \mathbb{R}^m$, $T_{\mathbf{x},\mathbf{y}} \in \mathbb{R}^{n \times m}$ define una matriz toeplitz donde \mathbf{x} y \mathbf{y}^{T} representan su primera columna y primer renglón, respectivamente, donde el primer elemento en \mathbf{x} y \mathbf{y} deben ser iguales. Un vector n-dimensional con elementos unitarios (ceros) se denota como $\mathbf{1}_n$ ($\mathbf{0}_n$).

2. PLANTEAMIENTO

Nuestra formulación considera que la información FLIM de los decaimientos fluorescente de una muestra se encuentra discretizada con un periodo de muestreo T, donde el campo de vista (FOV, por sus sigla en inglés) se divide en K puntos espaciales (Marcu et al., 2004; Periasamy and Clegg, 2009). En cada punto espacial, se registra una ventana de L muestras temporales y se asume una respuesta causal a la excitación láser. En el modelo de observación, la *l*-ésima muestra del decaimiento fluorescente $y_k[l]$ en el k-ésimo punto espacial se representa como la convolución de la respuesta al impulso fluorescente del tejido $h_k[l]$ con la excitación láser u[l]:

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

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

donde \star denota la operación de convolución y $v_k[l]$ representa un factor aleatorio asociado con ruido o incertidumbre en la observación. La Fig. 1 muestra de forma esquemática la interacción en el modelo de observación. En el planteamiento del problema a estudiar se consideran las siguientes suposiciones

A. La excitación láser u[l] es común a todos los K puntos espaciales en la FOV, y sus muestras son no-negativas y normalizadas a uno, es decir

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

B. La respuesta al impulso $h_k[l]$ en cada punto espacial k e instante de tiempo l se puede expresar como el cono convexo de N funciones exponenciales en tiempo discreto, más un termino general de polarización.



Figura 1. Modelo de Observación de los Datos FLIM.

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

$$\Rightarrow \mathbf{y}_k = \mathbf{U} \, \mathbf{h}_k + \mathbf{v}_k \quad \forall k \in [0, K-1].$$
(4)

donde

$$\mathbf{y}_{k} = \begin{bmatrix} y_{k}[0] \cdots y_{k}[L-1] \end{bmatrix}^{\top} \in \mathbb{R}^{L}$$
$$\mathbf{U} = \begin{bmatrix} u[0] & 0 & \dots & 0\\ u[1] & u[0] & \dots & 0\\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots\\ u[L-1] & u[L-2] & \dots & u[0] \end{bmatrix} \in \mathbb{R}^{L \times L} \quad (5)$$
$$\mathbf{h}_{k} = \begin{bmatrix} h_{k}[0] \cdots & h_{k}[L-1] \end{bmatrix}^{\top} \in \mathbb{R}^{L}$$
$$\mathbf{v}_{k} = \begin{bmatrix} v_{k}[0] \cdots & v_{k}[L-1] \end{bmatrix}^{\top} \in \mathbb{R}^{L}.$$

3. METODOLOGÍA

3.1 Estimación de las Respuestas al Impulso

Ahora de acuerdo a la estructura que tenga el modelo de múltiple-exponenciales para representar las respuestas al impulso en la muestra FLIM, se visualizan dos vertientes.

Enfoque Local: La respuesta al impulso en la k-ésima ubicación espacial se caracteriza por los coeficientes de escalamiento $\{c_{k,n}\}_{n=0}^{N-1}$ y constantes de tiempo $\{\tau_{k,n}\}_{n=1}^{N}$ de N funciones exponenciales, es decir

$$h_k[l] = c_{k,0} + \sum_{n=1}^{N} c_{k,n} e^{-\frac{l}{\tau_{k,n}}} \quad \forall l \in [0, L-1], \quad (6)$$

donde los parámetros del modelo $c_{k,n}, \tau_{k,n} \in \mathbb{R}$ se seleccionan tal que el error entre la predicción del modelo en (1) y la medición del decaimiento fluorescente $y_k[l]$ sea lo más pequeño posible (Dabir et al., 2009; Liu et al., 2012). La expresión anterior en (6) se puede escribir en notación vectorial al considerar la L muestras temporales disponibles

donde

У

$$\mathbf{h}_{k} = \mathbf{H}(\boldsymbol{\tau}_{k}) \, \mathbf{c}_{k} \quad \forall k \in [0, K-1] \tag{7}$$

$$\mathbf{H}(\boldsymbol{\tau}_{k}) = \begin{bmatrix} 1 \ e^{-\frac{\sigma}{\tau_{k,1}}} \ \dots \ e^{-\frac{\sigma}{\tau_{k,N}}} \\ 1 \ e^{-\frac{1}{\tau_{k,1}}} \ \dots \ e^{-\frac{1}{\tau_{k,N}}} \\ \vdots \ \vdots \ \ddots \ \vdots \\ 1 \ e^{-\frac{L-1}{\tau_{k,1}}} \ \dots \ e^{-\frac{L-1}{\tau_{k,N}}} \end{bmatrix} \in \mathbb{R}^{L \times (N+1)} \quad (8)$$

$$\mathbf{c}_{k} = \begin{bmatrix} c_{k,0} \ \dots \ c_{k,N} \end{bmatrix}^{\top} \in \mathbb{R}^{(N+1)} \quad (9)$$

$$\mathbf{c}_k = [c_{k,0} \ \dots \ c_{k,N}]^\top \in \mathbb{R}^{(N+1)} \tag{9}$$

$$\boldsymbol{\tau}_{k} = [\tau_{k,1} \dots \tau_{k,N}]^{\top} \in \mathbb{R}^{N}$$

$$(10)$$

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

$$\mathbf{v}_k = \mathbf{U}\mathbf{H}(\boldsymbol{\tau}_k)\mathbf{c}_k + \mathbf{v}_k \quad \forall k \in [0, K-1].$$
 (11)

Por lo que asumiendo que la excitación láser $\{u[l]\}$ se conoce, y que el ruido o incertidumbre en (11) tiene una distribución Gaussiana donde cada muestra es independiente entre sí, el problema de estimación en la k-ésimo punto espacial se define como un problema de optimización de mínimos cuadrados (Nocedal and Wright, 2006)

$$\min_{\substack{\boldsymbol{\tau}_k \ge 0\\ \mathbf{c}_k \ge 0}} \frac{1}{2} \|\mathbf{y}_k - \mathbf{U}\mathbf{H}(\boldsymbol{\tau}_k)\mathbf{c}_k\|^2.$$
(12)

Enfoque Global: Bajo esta perspectiva los escalamientos $\{c_{k,n}\}_{n=0}^{N}$ se siguen calculado en cada ubicación espacial k, pero ahora las constantes de tiempo de las exponenciales $\{\tau_n\}_{n=1}^{N}$ son las mismas en toda la muestra FLIM. Por lo que el modelo de observación resultante es

$$\mathbf{y}_k = \mathbf{U}\mathbf{H}(\boldsymbol{\tau})\mathbf{c}_k + \mathbf{v}_k \quad \forall k \in [0, K-1],$$
(13)

donde $\boldsymbol{\tau} = [\tau_1 \cdots \tau_N]^{\top}$. De esta manera el proceso de estimación se realiza en dos etapas, mediante un proceso alternado. Si se asume conocido el vector $\boldsymbol{\tau}$ se resuelve para el *k*-ésimo punto espacial un problema de mínimos cuadrados no-negativos

$$\min_{\mathbf{c}_k \ge 0} \frac{1}{2} \left\| \mathbf{y}_k - \mathbf{U} \mathbf{H}(\boldsymbol{\tau}) \mathbf{c}_k \right\|^2.$$
(14)

Ahora, si se conocen los coeficientes de escalamiento $\{c_{k,n}\}_{n=0}^{N}$, se estiman de forma global el vector $\boldsymbol{\tau}$

por una estrategia no-lineal de mínimos cuadrados (Nocedal and Wright, 2006)

$$\min_{\boldsymbol{\tau}>0} \frac{1}{2} \sum_{k=0}^{K-1} \|\mathbf{y}_k - \mathbf{U}\mathbf{H}(\boldsymbol{\tau})\mathbf{c}_k\|^2.$$
(15)

3.2 Estimación de la Excitación Láser

En esta sección, se asume que se conocen las respuestas al impulso \mathbf{h}_k en (5) y se busca estimar la excitación láser $\{u[l]\}$, o lo que es equivalente **U**. En este modelo, se observa que la matriz **U** tiene una estructura toeplitz, y debido a esta propiedad, para construir **U** solo se necesitan definir *L* términos. Además para aplicaciones FLIM, $\{u[l]\}$ se implementa como un pulso muy corto, por lo que no es necesario estimar *L* muestras, ya que muchas serán cero. Por lo que asumimos que solo se requieren las primeras \hat{L} muestras ($\hat{L} < L$) en la práctica. De esta manera, **U** en (5) puede parametrizarse por \hat{L} matrices toeplitz $\mathbf{U}_l^o \in \mathbb{R}^{L \times L}$ (Campos-Delgado et al., 2015)

$$\mathbf{U} = \sum_{l=0}^{\hat{L}-1} \theta_l \mathbf{U}_l^o \tag{16}$$

donde el parámetro $\theta_l = u[l]$ representa la *l*-ésima muestra de la excitación láser, y

$$\mathbf{U}_{l}^{o} = \mathbf{T}_{\mathbf{x}_{l},\mathbf{z}_{l}} \in \mathbb{R}^{L \times L} \tag{17}$$

$$\mathbf{x}_l = \begin{bmatrix} \mathbf{0}_l & 1 & \mathbf{0}_{L-l-1} \end{bmatrix}^\top \in \mathbb{R}^L \tag{18}$$

$$\mathbf{z}_l = \begin{bmatrix} 1 & \mathbf{0}_{L-1} \end{bmatrix}^\top \in \mathbb{R}^L.$$
(19)

Bajo esta consideración, la restricción de normalización en (3) para $\{u[l]\}$ se escribe como

$$\sum_{l=0}^{\tilde{L}-1} \theta_l = 1.$$

Finalmente, asumiendo nuevamente que los términos de ruido en el modelo de observación en (5) son independientes y con distribución Gaussiana, se puede plantear un problema de estimación por mínimos cuadrados con restricciones (Nocedal and Wright, 2006):

$$\min_{\{\theta_l\}} \frac{1}{2} \sum_{k=0}^{K-1} \left\| \mathbf{y}_k - \sum_{l=0}^{\hat{L}-1} \theta_l \mathbf{U}_l^o \mathbf{H}(\boldsymbol{\tau}_k) \mathbf{c}_k \right\|^2$$
(20)

tal que

$$\sum_{l} \theta_{l} = 1, \quad \& \quad \theta_{l} \ge 0 \quad \forall l \in [0, \hat{L} - 1].$$
(21)

Con este fin se emplea el enfoque sugerido en (Campos-Delgado et al., 2015), a través del cual la solución a (20) equivale a resolver un sistema L + 1 ecuaciones lineales.

4. ESTIMACIONES ÓPTIMAS

En esta sección se describen los algoritmos iterativos para realizar la ICS enfocado a muestras FLIM. Al enfoque local descrito en la sección anterior para calcular las constantes de tiempo se denotará como deconvolución ciega por mínimos cuadrados no-lineales (BDENLS, por sus siglas en inglés); mientras que al enfoque global se definirá como deconvolución ciega global por mínimos cuadrados no-lineales (BDEGNLS, por sus siglas en inglés). Ambas metodologías emplean dos procesos de MCA dentro del esquema global de estimación (Niesen et al., 2009). En ambos enfoques, resulta primordial tener un primer estimado de las posibles constantes de tiempo τ^0 , lo cual se logra al promediar todos los decaimientos fluorescentes $\{\mathbf{y}_k\}$ y tomar la respuesta a partir del punto pico. Por los planteamientos de los problemas de optimización en BDENLS y BDEGNLS, se puede garantizar convergencia aunque solo un mínimo local, lo que ubica en mayor relevancia la selección de las condiciones de inicio apropiadas en ambas metodologías.

4.1 Metodología BDENLS

El algoritmo BDENLS permite estimar de forma local tanto los escalamientos como las constantes de tiempo de las funciones exponenciales que construyen las respuestas al impulso. El algoritmo inicia partiendo de una propuesta de la excitación láser θ^0 , que comúnmente se toma como un pulso cuadrado; y enseguida se estiman $\{\mathbf{c}_k\}$ y $\{\boldsymbol{\tau}_k\}$. Para el k-ésimo punto espacial, se aprovecha la dependencia lineal con respecto de los coeficientes de escalamiento \mathbf{c}_k en (12) fijando las constantes de tiempo $\boldsymbol{\tau}_k$, y enseguida se toma el escenario opuesto al fijar \mathbf{c}_k y se optimiza $\boldsymbol{\tau}_k$ por un algoritmo no-lineal de mínimos cuadrados. Después de lograr convergencia con respecto al error de estimación, y considerando todos los puntos espaciales, se calculan las muestras de la excitación θ . Nuevamente se regresa a estimar $\{\mathbf{c}_k\}$ y $\{\boldsymbol{\tau}_k\}$, hasta que se alcanza convergencia del error. El diagrama de flujo de esta metodología se muestra en la Fig. 2.



Figura 2. Diagrama de Flujo de la Metodología BDENLS (Enfoque Local).

4.2 Métodología BDEGNLS

Mientras tanto, el algoritmo BDEGNLS asume que las constantes de tiempo τ en las funciones exponenciales son las mismas en toda la muestra FLIM, y solo cambian los coeficientes de escalamiento por punto espacial. Gracias a esta simplificación, el algoritmo es menos complejo que BDENLS, como se muestra en la Fig. 3. Aunque nuevamente se tienen dos procesos de MCA dentro de la estructura global de optimización. Cabe mencionar que en algunas aplicaciones, esta suposición puede no ser recomendable y se restaría generalidad al proceso de estimación.



Figura 3. Diagrama de Flujo de la Metodología BDEGNLS (Enfoque Global).

5. VALIDACIÓN EXPERIMENTAL

En este sección se describen los resultados de la validación experimental con una muestra de una lesión benigna de la mucosa bucal. El tiempo de muestreo es 160 ps y la imagen es de 160×160 píxeles, es decir 25,600 puntos espaciales. La resolución de la muestra es de aproximadamente 100 micrómetros y el campo visual (FOV) de 11 mm de diámetro. En la base de datos FLIM se consideran tres canales por analizar el decaimiento fluorescente: 390 ± 20 ns (canal 1), 452 ± 22.5 ns (canal 2), y > 500 ns (canal 3). La duración temporal de cada canal es de 60 ns, es decir se consideran 375 muestras en cada ventana de datos. Durante la evaluación, en los algoritmos BDENLS y BDEGNLS se asumió que solo se necesitan dos funciones exponenciales para construir las respuestas al impulso, es decir N = 2. Para evaluar el desempeño de los algoritmos de ICS, se midió experimentalmente la excitación láser en los tres canales. Como parámetro de comparación, se evalúa el ancho completo a la mitad del máximo (FWHM, por sus siglas en inglés) del pulso excitación láser estimado y la medición del mismo, el cual se calcula por

$$FWHM = l_2 - l_1 \tag{22}$$

Cuadro 1. Parámetros de la Base de Datos FLIM

Parameter	Value
T_s	160 ps
K	$25,\!600$
L	375
\hat{L}	65
Ν	2

 ${\rm considerando}\ {\rm a}$

$$u_{max} = \max_{l \in [0, L-1]} u[l]$$
(23)

$$l_{max} = \arg \max_{l \in [0, L-1]} u[l] \tag{24}$$

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

$$u[l_1] = u[l_2] = u_{max}/2.$$
(25)

Además para evaluar la forma monotónicamente decadente de las respuestas al impulso estimadas $\hat{h}_k[l]$, se cuantifica el tiempo de vida promedio $\hat{\tau}_k$ en cada punto espacial k (Marcu et al., 2004) :

$$\hat{\tau}_k = \frac{\mathbf{t}^\top \hat{\mathbf{h}}_k}{\mathbf{1}_L^\top \hat{\mathbf{h}}_k},\tag{26}$$

donde $\hat{\mathbf{h}}_k = [\hat{h}_k[0] \dots \hat{h}_k[L-1]]^\top$ representa la respuesta al impulso estimada, y $\mathbf{t} = [0 \ T \ 2T \ \dots \ (L-1)T]^\top$ un vector de las muestra de tiempo generadas.



Figura 4. Estimaciones de las Excitaciones Laser por BDENLS.



Figura 5. Estimaciones de las Excitaciones Laser por BDEGNLS.

Al evaluar el desempeño de BDENLS y BDEGNLS en la estimación de la excitación láser (ver Figs. 4 y 5), se observa que ambos logran capturar la forma y extensión



Figura 6. Estimaciones de Tiempo de Vida Promedio por BDENLS.



Figura 7. Estimaciones de Tiempo de Vida Promedio por BDEGNLS.

del pulso de entrada, teniendo en el parámetro FWHM siempre un error menor al 20 %. Cabe mencionar que en el canal 1 siempre se tuvo el mayor error y la estimación más precisa en el canal 2. Ahora con respecto de las estimaciones de las respuestas al impulso, se cuantifica el tiempo de vida promedio también con las mediciones de las excitaciones láser por canal, nuevamente con los enfoques local y global, y estos algoritmos los definimos como NLS y GNLS. Los resultados de esta comparación se muestran en las Figs. 6 y 7, donde se observa una buena concordancia entre los tiempos de vida promedio calculados por las estrategias ciegas y las normales, salvo en el canal 1 para el algoritmo NLS. Este comportamiento se puede originar debido al ruido, pero la ventaja es que el algoritmo ciego mostró robustez en este escenario. En trabajos futuros se realizará una evaluación más exhaustiva considerando tanto muestras sintéticas como experimentales de otros tipos de tejido, así como una comparación detallas con respecto de la técnica de ICS considerando funciones base de Laguerre (Campos-Delgado et al., 2015).

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se propusieron dos enfoques para la ICS de muestras FLIM considerando un modelo de múltiplesexponenciales. Primero el enfoque local asume que en cada punto espacial de la muestra, tanto los coeficientes de escalamiento como las constantes de tiempo son diferentes. En el segundo, considerando una visión global, las constantes de tiempo de las exponenciales son las mismas en toda la muestra, y solo los coeficientes de escalamiento cambian por punto espacial. Estas metodologías referidas como BDENLS y BDEGNLS se implementan bajo una filosofía de MCA para resolver las optimizaciones de forma individual en cada paso. También ambos enfoques emplean como herramientas base los algoritmos de mínimos cuadrados no-negativos y mínimos cuadrados no-lineales. Un punto a resaltar es que se puede garantizar convergencia de las metodologías iterativas, pero solo a un mínimo local, por lo que es sumamente importante elegir de forma apropiada las condiciones de inicialización. Los resultados muestran que las propuestas de ICS pueden estimar de forma precisa la excitación láser, así como capturar la forma monotónicamente decadente de las respuestas al impulso inherentes al fenómeno de fluorescencia.

REFERENCIAS

- K. Abed-Meraim, W. Qiu y Y. Hua. Blind system identification. Proceedings of the IEEE 85(8), 1310– 1322, 1997.
- M.V. Afonso, J.M. Bioucas-Dias, y M.A.T. Figueiredo. An augmented Lagrangian approach to the constrained optimization formulation of imaging inverse problems. IEEE Trans. Image Process. **20**(3), 681–695, 2011.
- D.U. Campos-Delgado, O. Gutierrez-Navarro, E.R. Arce-Santana, M.C. Skala, A.J. Walsh, y J.A. Jo. Blind deconvolution estimation of fluorescence measurements through quadratic programming. J. Biomed. Opt. 20(7):075010, 2015.
- A.S. Dabir, C.A. Trivedi, Y. Ryu, P. Pande y J. A. Jo. Fully automated deconvolution method for on-line analysis of time-resolved fluorescence spectroscopy data based on an iterative Laguerre expansion technique. Journal of Biomedical Optics 14(2), 024030, 2009.
- V. De Giorgi, D. Massi, S. Sestini, R. Cicchi, F.S. Pavone y T. Lotti. Combined non-linear laser imaging (twophoton excitation fluorescence microscopy, fluorescence lifetime imaging microscopy, multispectral multiphoton microscopy) in cutaneous tumours: first experiences. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 23(3), 314–316, 2009.
- O. Gutierrez-Navarro, D. Campos-Delgado, E. Arce-Santana, M. Mendez, and J. Jo. Blind end-member and abundance extraction for multi-spectral fluorescence lifetime imaging microscopy data. IEEE J. Biomed. Health Informatics 18(2), 606–617, 2014.
- X. Guanghan, H. Liu, L. Tong y T. Kailath. A leastsquares approach to blind channel identification. IEEE Transactions on Signal Processing 43(12), 2982–2993, 1995.
- J.O. Hahn, D.B. McCombie, A.T. Reisner, H.M. Hojman, y H.H. Asada. Identification of multichannel cardiovascular dynamics using dual Laguerre basis functions for noninvasive cardiovascular monitoring. IEEE Transactions on Control Systems Technology 18(1), 170–176, 2010.
- J. M. Jabbour, S. Cheng, B. H. Malik, R. Cuenca, J. A. Jo, J. Wright, Y.-S. L. Cheng, y K. C. Maitland. Fluorescence lifetime imaging and reflectance confocal microscopy for multiscale imaging of oral precancer. J. Biomed. Opt. 18(4), 046012, 2013.

- J. Liu, Y. Sun, J. Qi, y 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.
- L. Marcu, P.M.W. French, y D.S. Elson. Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging: Principles and Applications in Biomedical Diagnostics. CRC Press, 2014.
- D. McCombie, H. Asada, y A. Reisner. Identification of Vascular Dynamics and Estimation of the Cardiac Output Waveform from Wearable PPG Sensors. International Conference of the IEEE-EMBC, 27th Annual Engineering in Medicine and Biology Society, 3490– 3493, 17-18 Jan. 2006
- D.B. McCombie, A.T. Reisner y H.H. Asada. Laguerremodel blind system identification: cardiovascular dynamics estimated from multiple peripheral circulatory signals. IEEE Transactions on Biomedical Engineering 52(11), 1889–1901, 2005.
- J. Nocedal y S.J. Wright. *Numerical Optimization*. Springer-Verlag, 2nd Edition, 2006.
- J. Park, P. Pande, S. Shrestha, F. Clubb, B. E. Applegate, y J. A. Jo, Biochemical characterization of atherosclerotic plaques by endogenous multispectral fluorescence lifetime imaging microscopy. Atherosclerosis 220(2), 394 – 401, 2012.
- A. Periasamy and R. M. Clegg. FLIM Microscopy in Biology and Medicine. Chapman and Hall/CRC, 2009.
- P. Sarder y A. Nehorai. Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images. IEEE Signal Processing Magazine 23(3), 32–45, 2006.
- S. Shrestha, B. Applegate, J. Park, X. Xiao, P. Pande, y J. Jo. High-speed multispectral fluorescence lifetime imaging implementation for in vivo applications. Opt. Lett. 35(15), 2558–2560, 2010.
- S.C. Warren, A. Margineanu, D. Alibhai, D. J. Kelly, C. Talbot, Y. Alexandrov, I. Munro, M. Katan, C. Dunsby, y P.M.W. French. Rapid Global Fitting of Large Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy Datasets. PLOS One 8(8), e70687, 2013.
- A.J. Walsh, R.S. Cook, M.E. Sanders, L. Aurisicchio, G. Ciliberto, C.L. Arteaga, and Melissa C. Skala. Quantitative Optical Imaging of Primary Tumor Organoid Metabolism Predicts Drug Response in Breast Cancer. Cancer Research 74(8), 5184-5194, 2014.
- J. Yang, Y. Wen, y P. Li. Application of blind system identification in acoustic source location. 10th International Conference on Control, Automation, Robotics and Vision, 1764–1768, 17-20 Dec. 2008.
- J. Yang, Y. Wen, y P. Li. Leak location using blind system identification in water distribution pipelines. Journal of Sound and Vibration **310**(1) 134-148, 2008.
- U. Niesen, D. Shah, and G.W. Wornell. Adaptive Alternating Minimization Algorithms. IEEE Transactions on Information Theory 55(3), 1423–1429, 2009.