

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 635**

51 Int. Cl.:

A61B 5/05 (2006.01)

A61B 5/055 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2014 PCT/US2014/034720**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014 WO14172682**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2014 E 14786020 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2986210**

54 Título: **Generación de imágenes de biomarcadores para el diagnóstico del dolor de espalda**

30 Prioridad:

19.04.2013 US 201361813996 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.08.2019

73 Titular/es:

**CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER (100.0%)
8700 Beverly Boulevard
Los Angeles, CA 90048, US**

72 Inventor/es:

**GAZIT, DAN;
LI, DEBIAO;
BAE, HYUN;
PELLED, GADI;
GAZIT, ZULMA;
LIU, QI y
TAWACKOLI, WAFA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 721 635 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Generación de imágenes de biomarcadores para el diagnóstico del dolor de espalda

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a métodos de generación de imágenes y a sus aplicaciones.

5 Antecedentes

Con frecuencia se realiza MR1 en pacientes que sufren de dolor de espalda. Estas exploraciones generalmente revelan la presencia de degeneración del disco intervertebral (IVD). Sin embargo, el vínculo entre la degeneración y el dolor no siempre existe y es poco conocido. A menudo, MR1 puede detectar signos de degeneración y cambios en la estructura del disco sin la presencia de dolor lumbar. Además, en algunos casos el dolor existe, pero no se origina a partir de IVD degenerados observados en MRI. El procedimiento estándar actual incluye el uso de discografía provocativa. En este doloroso procedimiento, se inyecta una pequeña cantidad de agente de contraste en varios discos de la columna vertebral para detectar el disco desde el cual se origina el dolor. Sobre la base de esta prueba, se toma una decisión sobre qué disco será sometido a cirugía. Hasta ahora, no ha estado disponible un método no invasivo confiable para detectar discos dolorosos. Por lo tanto, existe una clara necesidad de identificar parámetros detectables por MRI específicos que puedan ser indicativos de dolor derivado de IVD degenerados. Además, existe la necesidad de métodos de imagen que también predigan el pronóstico de los discos degenerados y si se volverán dolorosos en el futuro. También es necesario establecer métodos para el diagnóstico y pronóstico de afecciones relacionadas que afecten tejidos similares.

La generación de imágenes de resonancia magnética para la evaluación de IVD se conocen de, por ejemplo, Stefan Haneder ET AL: "Assessment of glycosaminoglycan content in intervertebral discs using chemical exchange saturation transfer at 3.0 Tesla: preliminary results in patients with low-back pain", EUROPEAN RADIOLOGY, vol. 23, no. 3, 1 March 2013, pages 861-868.

Resumen de la invención

En diversas realizaciones, la invención enseña un método para pronosticar una afección asociada con la degeneración y/o el dolor tisular en un sujeto. Un método de acuerdo con la invención se define en la reivindicación 1. En realizaciones preferidas, la afección se selecciona del grupo que consiste en: degeneración del disco intervertebral, dolor discogénico, osteoartritis, artritis reumatoide, una lesión del cartílago articular, degeneración del disco tempromandibular y combinaciones de las mismas. En realizaciones preferidas, la región con imágenes del cuerpo del sujeto incluye una articulación o un disco intervertebral. En realizaciones preferidas, los biomarcadores se detectan evaluando la dispersión R1-rho. En ciertas realizaciones, los biomarcadores incluyen pH y/o concentración de GAG.

Breve descripción de los dibujos

Realizaciones de ejemplo se ilustran en las figuras referenciadas. Se pretende que las realizaciones y figuras descritas en este documento se consideren ilustrativas en lugar de restrictivas.

La Figura 1 demuestra, de acuerdo con una realización de la divulgación, una secuencia de pulsos para rFOV TSE CEST. El rFOV se logró moviendo pulsos de 180° en la dirección de codificación de fase. La zona verde indica las regiones que se están fotografiando. La preparación de CEST por pulsos se utilizó debido a la limitación de hardware de la duración más larga del impulso de RF.

La Figura 2 demuestra, de acuerdo con una realización de la divulgación, que un estudio fantoma de GAG demuestra una buena relación lineal ($R^2 = 0.997$ y 0.994) entre la concentración de GAG y la señal de CEST de OH medida por TSE convencional y rFOV TSE CEST, respectivamente. La señal de -OH CEST se calcula integrando MTR_{asim} entre 0.5 ppm y 1.5 ppm.

La Figura 3 demuestra, de acuerdo con una realización de la divulgación, imágenes típicas de TSE convencional (a) y rFOV TSE (b) de un voluntario sano. Las flechas blancas en (a) indican regiones con movimientos intestinales. En la TSE, estos movimientos podrían llevar a artefactos que comprometen la confiabilidad de la imagen IVD CEST. Con la técnica rFOV, la imagen en (b) está casi libre de tales artefactos.

La Figura 4 demuestra, de acuerdo con una realización de la divulgación, la diferencia absoluta entre las curvas MTR_{asim} de dos adquisiciones, tanto para el FOV convencional como para el rFOV TSE CEST, de todos los voluntarios sanos. Los datos se representaron como media \pm desviación estándar (las barras de error indican la desviación estándar). En comparación con las TSE convencionales, rFOV TSE MTR_{asim} tiene una diferencia menor cuando se repite, por lo que es una técnica más reproducible.

La Figura 5 demuestra, de acuerdo con una realización de la divulgación, (a) el promedio de y (c) la diferencia absoluta entre las curvas MTR_{asim} de dos adquisiciones, tanto para el FOV convencional como para el rFOV TSE CEST, de un voluntario sano típico. (b), (d) la diferencia media y absoluta de los espectros Z correspondientes, respectivamente. En este caso, el "pico" alrededor de 3.5 ppm en TSE convencional, como lo muestra la flecha en (a), podría

interpretarse erróneamente como de protones - NH, pero de hecho también podría ser un resultado de artefactos de movimiento intestinal como se refleja en la gran variación entre repeticiones en (c) alrededor de 3.5 ppm.

5 La Figura 6 demuestra, de acuerdo con una realización de la divulgación, la generación de imágenes de degeneración IVD por rFOV TSE CEST en un voluntario sano (41Y/F) con degeneración de disco. (a) La imagen sagital TSE - ponderada en T_2 . (b) Señales -OH CEST para discos desde L2/L3 hasta L5/S1. Los discos de grado III de Pfirrmann (L3/L4, L4/L5) tienen una señal de CEST sustancialmente inferior a la de los discos de grado II (L2/L3, L5/S1).

La Figura 7 demuestra, de acuerdo con una realización de la divulgación, el espectro Z de un voluntario sano (36Y/M) con rFOV TSE CEST cuando se adquiere con un grosor de corte de 3 mm y 8 mm, respectivamente. La flecha apunta a una "caída" causada por una señal de grasa proveniente de la interferencia del tejido óseo circundante.

10 La Figura 8 muestra, de acuerdo con una realización de la invención, un esquema de adquisición de bloqueo de giro bajo una baja amplitud de bloqueo de giro. a: Esquema de adquisición convencional. b: Nuevo esquema de adquisición. c: datos de bloqueo de giro de un píxel típico adquirido con una amplitud de 100 Hz y 400 Hz, respectivamente. La oscilación obvia se puede observar en datos de 100 Hz, mientras que los datos de 400 Hz tienen menos oscilación. Las flechas apuntan a "picos" dentro del ciclo de oscilación. d: Error de ajuste simulado de $R_{1\rho}$ bajo falta de homogeneidad B_0 , para los dos esquemas de adquisiciones. El esquema de la invención tiene mejor inmunidad a la falta de homogeneidad, y cuando $\Delta B_0 < 0.10$ ppm, el error de ajuste es pequeño, lo que indica que el método de la invención puede compensar la falta de homogeneidad B_0 . La simulación se realiza con: $R_{1\rho} = 10 \text{ s}^{-1}$, $R_{2\rho} = 20 \text{ s}^{-1}$, y una -amplitud de giro de 100Hz.

20 La Figura 9 demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, el GAG CEST simulado, la dispersión $R_{1\rho}$ y el RROC con respecto a la concentración de GAG (a-c) y al pH (d-f), y la dependencia del RROC del error B_1 (g), T_{2w} (h), y T_{1w} (i). La RROC es casi insensible a los cambios en la concentración, porque la división de la dispersión $R_{1\rho}$ y la CEST ha cancelado el efecto de la concentración pero mantiene su dependencia del pH. RROC se ve moderadamente afectado por los cambios en B_1 , T_{2w} , y T_{1w} relativos.

25 La Figura 10 demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, los resultados de los fantasmas de GAG en 3.0T. a-c: Muestra la dependencia del pH de CEST, dispersión $R_{1\rho}$ y RROC de fantasmas con diversas concentraciones, respectivamente. d-f: Mostrar imágenes CEST, $R_{1\rho}$ dispersión y RROC para los GAG 150 mM.

La Figura 11 demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, los resultados de tres IVD porcinos después de la inyección de Lactato de Na para manipular el nivel de pH. Se observó una correlación negativa entre RROC y pH.

30 La Figura 12 demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, los resultados del paciente. a,b: -OH CEST y valores de dispersión $R_{1\rho}$ para discos positivos y negativos, respectivamente. c, f: la diferencia en RROC y RROC normalizado entre discos positivos y negativos, respectivamente. d,g: RROC y RROC normalizado de discos individuales, respectivamente. e,h: curvas ROC para RROC y RROC normalizado, respectivamente. Las estrellas indican una diferencia significativa por la prueba-t pareada ($P < 0.05$).

35 La Figura 13 demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, un resultado típico del paciente (62Y/M). Una imagen TSE T_{2w} con resultado de discografía ("+" y "-" para valores positivos y negativos, respectivamente) (a), RROC (b) y valores RROC (c) normalizados, respectivamente, para los cuatro discos etiquetados.

Descripción de la invención

40 A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. March, *Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed.*; y Westbrook et al., *MRI in Practice 4th ed.*, proporcionan a un experto en la materia con una guía general de muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

45 Un experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que podrían usarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita de ninguna manera a los métodos y materiales descritos. Para los fines de la presente invención, ciertos términos se definen a continuación.

50 "Condiciones" y "condiciones de enfermedad", como se usan en este documento, pueden incluir, pero no están limitados de ninguna manera, a la degeneración del disco intervertebral, dolor discogénico, osteoartritis, artritis reumatoide, lesiones del cartílago articular, trastornos de la articulación tempromandibular y similares.

"Mamífero", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro de la clase *Mammalia*, incluidos, entre otros, humanos y primates no humanos como chimpancés y otras especies de monos y monos; animales de granja tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domesticados, tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no

denota una edad o sexo en particular. Por lo tanto, los sujetos adultos y recién nacidos, ya sean hombres o mujeres, deben incluirse dentro del alcance de este término.

Los inventores han desarrollado nuevos métodos que proporcionan información importante útil para (1) diagnosticar las condiciones mencionadas anteriormente, (2) monitorizar la progresión de las condiciones mencionadas anteriormente, (3) monitorizar la curación de las condiciones mencionadas anteriormente (4)) identificando el origen del dolor (por ejemplo, qué disco intervertebral es doloroso) asociado con cualquiera de las afecciones mencionadas anteriormente, y (5) pronosticar la progresión de cualquiera de las condiciones mencionadas anteriormente.

Los métodos de los inventores implican el uso de diversas técnicas de imágenes, que se describen con mayor detalle a continuación y en los ejemplos que se exponen en el presente documento, para identificar ciertos biomarcadores, que incluyen agua, pH, GAG, colágeno I y II, glucosa, lactato, productos de degradación del colágeno y agregados, y similares. Un experto en la materia apreciaría fácilmente que los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse utilizando cualquier equipo de resonancia magnética clínico e investigativo. Preferiblemente, el equipo de imagen de resonancia magnética con un campo principal de al menos 3.0 Tesla se usa para llevar a cabo los métodos de la invención descritos aquí.

A modo de antecedentes, la transferencia de saturación de intercambio químico (CEST) como una técnica de generación de imágenes molecular puede utilizarse para detectar información bioquímica relacionada con las sustancias químicas endógenas en los discos intervertebrales (y tejidos fisiológicamente similares) como GAG y colágeno, en función de sus propiedades bioquímicas, incluida la concentración, pH, temperatura, fuerza iónica, etc. El CEST se ha investigado ampliamente en varios estudios que utilizan compuestos endógenos, incluido el contraste de transferencia de protones amida para la detección de proteína/péptido móvil o pH, glycoCEST para detección de glucógeno, gluCEST para glutamato imágenes en el cerebro, MICEST para imágenes de mioinositol en el cerebro y CrCEST para imágenes de creatina en los músculos.

Con respecto a la dispersión de R1-rho, los valores de R1-rho a baja potencia (<~kHz) detectados por MRI son sensibles al movimiento molecular. En ciertas realizaciones, el método R1-rho descrito en este documento mide la diferencia en los valores de R1-rho medidos en dos potencias diferentes que se pueden lograr en los escáneres de RM clínicos. Los estudios de los inventores que involucran soluciones de GAG han demostrado que la dispersión de R1-rho es sensible a la concentración molecular y al pH, con un pH más bajo que tiene una mayor dispersión.

Debido a que tanto R1-rho como CEST están relacionados con la concentración y el pH, la relación entre R1-rho y CEST puede cancelar el efecto de la concentración, dejando solo el pH. Por lo tanto, R1-rho/CEST es un biomarcador para el pH.

Otra técnica de generación de imágenes importante que se puede utilizar junto con los métodos de la invención es la generación de imágenes de difusión. La generación de imágenes de difusión detecta señales relacionadas con la difusión de agua. Un mayor coeficiente de difusión aparente (ADC) indica una difusión menos restrictiva, mientras que un menor ADC indica que el proceso de difusión es más restringido. La difusión en el disco intervertebral (y estructuras fisiológicamente similares) está relacionada con sus estructuras bioquímicas.

Además, la MRI realizada después de la inyección de contraste puede usarse para detectar inflamación en un sujeto asociado con dolor de espalda, junto con otras afecciones descritas en este documento. Más específicamente, los patrones de aumento de contraste en los pacientes pueden ayudar a determinar el origen del dolor. También se han investigado estudios con contraste en los discos intervertebrales y las vértebras. Los agentes de contraste que pueden usarse pueden incluir, pero no están limitados a, gadopentetato dimeglumina, ácido gadolinio-tetraazaciclododecanotetraacético, gadodiamida, gadobutrol, y gadoteridol.

Es importante destacar que la experimentación de los inventores indica que existe una correlación directa entre pH bajo, bajo contenido de GAG, bajo contenido de glucosa y alto nivel de lactato, y aumento del dolor y/o progresión de la enfermedad en cada una de las condiciones descritas anteriormente. Al utilizar las técnicas de imagen descritas en este documento junto con lo que se conoce sobre los biomarcadores mencionados anteriormente, se puede mejorar el pronóstico y el diagnóstico de una multitud de afecciones asociadas con la degeneración del tejido y el dolor.

Por lo tanto, en diversas realizaciones, la divulgación enseña un método para diagnosticar a un sujeto con la presencia o ausencia de una afección caracterizada por degeneración del tejido y/o dolor. En ciertas realizaciones, el método incluye: (1) imágenes de una región del cuerpo del sujeto; (2) detectar uno o más biomarcadores dentro de la región de la imagen, en donde los biomarcadores pueden incluir pH, concentración de glicosaminoglicano (GAG), concentración de glucosa y concentración de lactato; y (3) diagnosticar al sujeto con la presencia o ausencia de la afección en función de los biomarcadores detectados dentro de la región del cuerpo del sujeto con imágenes.

En algunas realizaciones, la región con imágenes del cuerpo del sujeto incluye una o más articulaciones o uno o más discos intervertebrales. En ciertas realizaciones, la afección puede incluir degeneración del disco intervertebral, dolor discogénico, osteoartritis, artritis reumatoide, una lesión del cartilago articular, combinaciones de las mismas, degeneración del disco tempromandibular y similares.

En algunas realizaciones, las técnicas de generación de imágenes realizadas incluyen uno o más de los descritos anteriormente y en los ejemplos expuestos en este documento. De acuerdo con la invención, los biomarcadores se detectan mediante imágenes de transferencia de saturación de intercambio químico (CEST). En algunas realizaciones, los biomarcadores se detectan evaluando la dispersión de R1-rho (como se describe con mayor detalle a continuación). En ciertas realizaciones, los biomarcadores son pH y concentración de GAG. En ciertas realizaciones, el sujeto es diagnosticado con la condición si los biomarcadores detectados por imágenes indican uno o más estados fisiológicos anormales dentro de la región de la imagen. En ciertas realizaciones, los estados fisiológicos anormales pueden incluir pH bajo, concentración baja de GAG, glucosa baja, lactato alto y combinaciones de los mismos, en comparación con un sujeto sin la condición. En algunas realizaciones, el método incluye además determinar que un origen del dolor del sujeto asociado con la afección (por ejemplo, dolor de espalda) está dentro de la región del cuerpo del sujeto en donde se detecta el estado fisiológico anormal.

La invención enseña un método para pronosticar una afección (es decir, predecir la tasa de progresión o mejoría y/o la duración de la afección) asociada con la degeneración y/o el dolor del tejido en un sujeto como se define en la reivindicación 1. En realizaciones preferidas, la afección puede incluir degeneración del disco intervertebral, dolor discogénico, osteoartritis, artritis reumatoide, lesión del cartílago articular, combinaciones de los mismos, degeneración del disco tempromandibular y similares. En realizaciones preferidas, la región con imágenes del cuerpo del sujeto incluye una articulación o un disco intervertebral. En realizaciones preferidas, las técnicas de formación de imágenes realizadas incluyen uno o más de los descritos anteriormente y en los ejemplos expuestos en este documento. De acuerdo con la invención, los biomarcadores se detectan mediante imágenes de transferencia de saturación de intercambio químico (CEST). En realizaciones preferidas, los biomarcadores se detectan evaluando la dispersión de R1-rho (como se describe con mayor detalle a continuación). En realizaciones preferidas, los biomarcadores son pH y concentración de GAG. En realizaciones preferidas, los métodos de la invención incluyen además la selección de un tratamiento apropiado para que el sujeto logre resultados beneficiosos, basándose en el pronóstico comprobado por cualquiera de los métodos de la invención descritos en el presente documento.

En diversas realizaciones, la divulgación enseña un método para determinar un grado de degeneración del disco intervertebral (IVD) en un sujeto. En algunas realizaciones, el método incluye usar un escáner de imágenes de resonancia magnética (MRI) para escanear una región de interés en un sujeto, en donde la región de interés incluye un disco intervertebral; obtener una señal de transferencia de saturación de intercambio químico -OH (-OH CEST) de la exploración de MRI; y determinar la extensión de la degeneración del IVD en el sujeto, en donde una señal de CEST inferior a OH, en comparación con la normal, indica la degeneración del disco, y en la que cuanto menor es la señal de CEST de OH, mayor es la extensión de la degeneración IVD que se determina. En algunas realizaciones, la exploración de MRI se realiza mediante el uso de una preparación CEST pulsada y una adquisición de eco en turborrotación. En algunas realizaciones, la exploración de MRI se realiza mediante el uso de una excitación reducida de campo de visión. En algunas realizaciones, se selecciona un grosor de corte para la exploración de MRI para que sea lo suficientemente pequeño como para evitar la interferencia de la señal grasa. En algunas realizaciones, el grosor de corte es de 3 mm.

En diversas realizaciones, la descripción enseña un método para identificar un disco intervertebral doloroso (IVD) en un sujeto. En algunas realizaciones, el método incluye el uso de un escáner de imágenes de resonancia magnética (MRI) para escanear una región de interés (ROI) en un sujeto, en donde el ROI incluye un IVD; determinación de la dispersión de R_{1ρ} y -OH CEST en el ROI; e identificar una IVD dolorosa en el sujeto basándose en la proporción de R_{1ρ} dispersión y -OH CEST (RROC), donde se determina un disco doloroso si un valor de RROC es alto en comparación con lo normal. En algunas realizaciones, el escáner de MRI es un escáner de MRI 3.0T. En algunas realizaciones, la exploración de MRI se realiza mediante el uso de una excitación reducida de campo de visión. En algunas realizaciones, se selecciona un grosor de corte para la exploración de MRI para que sea lo suficientemente pequeño como para evitar la interferencia de la señal grasa.

Un experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que podrían usarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita de ninguna manera a los métodos y materiales descritos.

Ejemplos

50 Experimentos I

Generación de imágenes de transferencia de saturación por intercambio químico confiable de discos intervertebrales lumbares humanos utilizando eco en turborrotación de campo de visión reducido en 3.0 Tesla

Ejemplo 1

Introducción

55 Como se indicó anteriormente, el dolor lumbar (LBP) es una enfermedad con amplia prevalencia y una carga significativa. En la población adulta, el dolor de espalda de intensidad y duración al menos moderada tiene una incidencia anual del 10-15%. Influye negativamente en las vidas de los afectados, lo que resulta en sufrimiento y discapacidad, y representa una enorme carga económica para los individuos y la sociedad. El dolor de espalda se

asocia con el proceso degenerativo natural del disco intervertebral (IVD), que es la estructura avascular más grande del cuerpo humano. El IVD se compone de: (1) el núcleo pulposo (NP), una estructura similar a un gel en el centro del disco rico en proteoglicanos [núcleo de proteína con glicosaminoglicanos (GAG)]; (2) el anillo fibroso (AF), una zona colágena alrededor del NP; y (3) la placa terminal cartilaginosa (EP) en la parte superior e inferior (3). Los GAG desempeñan un papel fundamental en el apoyo a las funciones de IVD, incluida la generación de presión hidrostática para resistir la carga mediante la unión del agua. La pérdida de GAG se acompaña de cambios en las propiedades bioquímicas y biomecánicas (4), por lo que es un buen biomarcador de imágenes. La cuantificación de los cambios en la concentración de GAG puede proporcionar una vía para controlar la progresión de la enfermedad y comprender la fisiopatología de la degeneración del disco.

La degeneración del disco ha sido evaluada con diversas técnicas de RM. La MRI ponderada en T_2 se usa rutinariamente en la evaluación de la degeneración por anomalías morfológicas. La clasificación de Pfirrmann clasifica la degeneración IVD en 4 grados según las imágenes ponderadas en T_2 sagitales. Las características como la disminución de la altura del disco y la reducción de la distinción entre NP y AF son indicadores de degeneración. La clasificación de Schneiderman basada en imágenes ponderadas en T_2 también es un método de calificación prevaliente. Se ha investigado la RM realizada por contraste para estudiar el estado de la placa terminal en la perfusión en los discos normales y degenerados, ofreciendo un método no invasivo para identificar el daño del cartílago de la placa terminal. Otra investigación de RM incluye espectroscopía, imágenes $T1\rho$, imágenes de difusión e intento de generación de imágenes de Na para vincular las mediciones de RM con degeneración IVD. Sin embargo, estos métodos de RM dependen de la evaluación subjetiva, por lo que no proporcionan una medición cuantitativa objetiva o no proporcionan información confiable sobre la concentración de GAG disponible en un entorno clínico.

La generación de imágenes de transferencia de saturación por intercambio químico (CEST) son sensibles a la pérdida de GAG. En la radiación de radiofrecuencia (RF) selectiva de la frecuencia de generación de imágenes la CEST aplicada durante unos pocos segundos en tales protones intercambiables, produce una reducción de la señal de la acumulación de agua con una amplitud que suele ser de cientos a millones de veces mayor que la del protón soluto. Varios estudios han investigado el uso de compuestos endógenos para la generación de imágenes CEST, incluido el contraste de transferencia de protones amida para la detección de pH, glycoCEST para la detección de glucógeno, gluCEST para la generación de imágenes de glutamato en el cerebro. Teniendo un papel esencial en la degeneración del disco, los GAG tienen protones intercambiables extensos, como los protones de amida (-NH) a +3.2 ppm y protones de hidroxilo (-OH) a alrededor de +1.0 ppm que son detectables por CEST. El estudio *ex vivo* ha demostrado una relación entre la señal de CEST de -OH de intercambio rápido y la concentración de GAG (Véase Saar et al. Assessment of glycosaminoglycan concentration changes in the intervertebral disc via chemical exchange saturation transfer NMR Biomed. 2012;25(2):255-261, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad como se establece completamente). Un estudio de Kim et al. demostró la viabilidad de transformar la técnica anterior en IVD *in vivo* a 3.0 Tesla (Véase Kim et al. Assessment of glycosaminoglycan distribution in human lumbar intervertebral discs using chemical exchange saturation transfer at 3T: feasibility and initial experience. NMR Biomed, 2011;24(9): 1137-1144, la cual se incorpora aquí como referencia como se establece completamente). La secuencia utilizada está compuesta por la preparación de CEST y la adquisición de eco en turborotación (TSE), para aprovechar la alta relación señal-ruido (SNR) de TSE y la insensibilidad a la falta de homogeneidad del campo. En un estudio posterior, la disminución de las señales de CEST se relacionó con el aumento del grado de degeneración en voluntarios, con una señal de -OH CEST de 7.17% y 6.00% para los discos de Schneiderman de grado 0 y 1, respectivamente. Claramente, es deseable tener una técnica que pueda medir de manera confiable la señal CEST y diferenciar de manera confiable sus pequeños cambios, que reflejan el grado de degeneración.

La aplicación *in vivo* de las técnicas actuales de TSE CEST puede sufrir de artefactos que reducen la fiabilidad de las imágenes CEST y socavan su aplicabilidad clínica. Estos artefactos probablemente son causados por el movimiento del intestino que puede aparecer tanto anterior como lateral a un IVD lumbar. Se sabe que el movimiento intestinal induce artefactos, y ciertos medicamentos, como el glucagón, se administran clínicamente para retardarlo. Cuando una misma imagen TSE axial se escanea repetidamente, se pueden observar claras variaciones en la señal en el IVD. Una exploración de CEST IVD lumbar axial que generalmente toma al menos varios minutos es inevitablemente propensa a tales artefactos. Dado que las imágenes contaminadas con artefactos podrían eventualmente llevar a una medición de señal CEST inexacta, una técnica TSE CEST para obtener imágenes de IVD *in vivo* con artefactos reducidos del movimiento intestinal representa un avance significativo y útil.

La estrategia de excitación de campo de visión reducido (rFOV) se ha utilizado anteriormente para generar señales de MR solo desde una región de interés (ROI), y mover las estructuras fuera de la ROI no introducirá ningún artefacto de movimiento en las imágenes reconstruidas. Dada su compatibilidad con el método de adquisición de TSE, rFOV es una excelente solución para mejorar las imágenes de TSE CEST. Como se analiza con mayor detalle a continuación, los inventores desarrollaron una técnica de TSE basada en rFOV para la generación de imágenes CEST IVD *in vivo* a 3.0T. El método propuesto se validó por primera vez en el fantoma GAG controlado por concentración, y luego se comparó con la técnica de TSE usada convencionalmente (denominada en adelante "TSE convencional") para la generación de imágenes CEST en nueve voluntarios.

60 Ejemplo 2

Materiales y Métodos

Fantoma

Para verificar la relación entre la concentración de GAG y la señal de CEST, se prepararon cuatro muestras de GAG con concentraciones de 50, 100, 150 y 200 mM respectivamente a partir de sulfato de condroitina A (Aldrich-Sigma, St. Louis, MO, USA) En una solución estándar. de solución salina regulada con fosfato. Todos los pH fueron valorados a 7.0. La concentración se refiere al número de unidades de disacáridos en GAG. En el momento de la generación de imágenes, las muestras de GAG se colocaron individualmente en un baño de agua dopada con gadolinio para reducir su T_1 .

Sujetos humanos

Se reclutaron nueve voluntarios sanos (3 mujeres, 6 hombres; edad promedio 39.1 ± 11.9) sin síntomas relacionados con la columna vertebral y sin antecedentes de enfermedad de la columna vertebral.

Secuencia de pulsos

Se implementó una secuencia 2D rFOV TSE CEST (FIGURA 1). Para lograr el rFOV, los gradientes de los pulsos de reenfoque de 180° en TSE se movieron desde la dirección de codificación de corte a la dirección de codificación de fase con su magnitud modificada en consecuencia en función del tamaño de FOV reducido deseado. Se utilizó un producto de alto ancho de banda de tiempo de 10 para pulsos de radiofrecuencia (RF) de 180° para lograr un mejor perfil de corte a lo largo de la dirección de codificación de fase. Al contrario que el TSE convencional, la cantidad de líneas de espacio k necesarias para generar una imagen se redujo en gran medida y todas las líneas de espacio k se adquirieron después de una única excitación. La codificación Centric se usó para maximizar la señal CEST para las líneas del espacio k central que son responsables de la mayoría del contraste de la imagen, ya que los efectos CEST disminuyen en función del tiempo T_1 después de la preparación.

La preparación de CEST se logró utilizando un tren de 8 pulsos gaussianos de 1440° y un ciclo de trabajo del 50%, cada pulso con una duración de 90ms. Para corregir la falta de homogeneidad del campo B_0 , se empleó el método WASSR (Véase Kim et al. Water saturation shift referencing (WASSR) for chemical exchange saturation transfer (CEST) experiments. Magn. Reson. Med. 2009;61(6):1441-1450, el cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad como se establece completamente), para determinar la frecuencia de resonancia de la reserva de agua utilizando la misma secuencia de pulso CEST con una amplitud y duración de saturación disminuidas. WASSR se logró mediante dos pulsos Gaussianos de 40° y 30 ms. Los gradientes del obturador se insertaron después de la preparación CEST/WASSR para impedir cualquier magnetización transversal residual. La frecuencia de referencia y de referencia se mantuvo sin cambios durante la adquisición de CEST y WASSR. Tanto en estudios fantoma como en humanos, las adquisiciones incluyeron 31 imágenes CEST con compensaciones de saturación distribuidas uniformemente entre -4.5ppm y +4.5ppm, una imagen sin saturación (S_0) y 11 imágenes WASSR con compensaciones distribuidas uniformemente entre -1.0ppm y +1.0ppm. Este rango de frecuencia de compensación de WASSR fue suficiente para cubrir el máximo cambio de frecuencia en fantomas e IVD después de un cuidadoso ajuste.

Adquisiciones de MRI

Todas las imágenes se adquirieron en un escáner clínico 3.0 T (Magnetom Verio, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Alemania). La RF se transmitió utilizando la bobina del cuerpo, que admite una duración máxima de RF de 100 ms. Se usó una bobina de columna de 24 elementos para la recepción de la señal tanto en el escaneo fantoma como en el humano.

La generación de imágenes fantoma GAG de un solo corte en el plano axial se realizó utilizando rFOV TSE CEST. Los parámetros fueron: TE/TR=9/2500 ms, grosor de corte =5mm, ancho de banda= 300Hz/píxel, FOV=47×180 mm², longitud de tren de eco (ETL) = 34, matriz=34×128, 3 promedios.

Luego de las adquisiciones de TSE ponderadas en T_2 localizadas y sagitales, en cada uno de los nueve voluntarios se adquirió un corte de IVD axial L3/L4 con el mismo plano de imagen y grosor de corte tanto para el TSE convencional como para el RFOV TSE CEST de generación de imágenes. Ambas técnicas se repitieron dos veces en un orden aleatorio para probar su reproducibilidad. Los parámetros de imagen comunes entre las técnicas fueron: TE/TR = 9/2500ms, grosor de corte = 3 mm, ancho de banda = 298Hz/píxel, ETL = 30. Para los parámetros de TSE convencionales fueron: FOV=230×230 mm², matriz=90×128, 1 promedio. Para rFOV TSE, se eligió un FOV reducido a lo largo de la dirección de codificación de fase (de izquierda a derecha) para cubrir el disco. Otros parámetros fueron: 68×230 mm², matriz=30×128, se utilizaron 3 promedios para alcanzar el mismo tiempo de imagen que el TSE convencional. El tiempo total de generación de imágenes para cualquiera de los métodos (incluido WASSR) es de 5.3 minutos. En un voluntario (41Y/F) con degeneración obvia, el rFOV TSE CEST también se realizó en los discos L2/L3, L3/L4, L4/L5, y L5/S1, para examinar su capacidad para identificar la degeneración del disco.

Ejemplo 3

Análisis de los datos

Todas las imágenes CEST se normalizaron primero con S_0 y se corrigieron para no homogeneidad B_0 píxel a píxel. El cambio de frecuencia de píxel-a-píxel B_0 se determinó en WASSR ajustando una forma de línea lorentziana (Véase Zaiss et al. Quantitative separation of CEST effect from magnetization transfer and spillover effects by Lorentzian-linefit analysis of z-spectra. J. Magn. Reson. 2011;211(2):149-155, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad como se establece completamente) en un rango de frecuencia de 0.8ppm que tiene una saturación sustancial. Luego, la curva fue interpolada por fragmentación para producir el espectro Z (CEST frente a la curva de frecuencia de desplazamiento). Los datos a ± 4.5 ppm se excluyeron del análisis posterior. La relación de asimetría de transferencia de magnetización (MTR_{asim}) para cada píxel se calculó como:

$$MTR_{asim}(\Delta\omega) = \frac{S(-\Delta\omega) - S(\Delta\omega)}{S_0}, \quad [1]$$

donde $\Delta\omega$ es el desplazamiento de frecuencia del pulso de saturación, $S(\pm\Delta\omega)$ es la intensidad de la señal CEST en el desplazamiento de frecuencia $+\Delta\omega$ and $-\Delta\omega$ respectivamente.

Para cada fantoma, primero se dibujó un ROI que contenía al menos 120 píxeles dentro de la región GAG, luego se promediaron los valores de MTR_{asim} dentro del ROI. Dado que los protones -OH resuenan alrededor de +1.0 ppm en campo abajo de la reserva de agua, se integró la señal de MTR_{asim} promedio entre 0.5 ppm y 1.5 ppm para cuantificar la CEST-OH (Véase Kim et al. Assessment of glycosaminoglycan distribution in human lumbar intervertebral discs using chemical exchange saturation transfer at 3T: feasibility and initial experience. NMR Biomed, 2011;24(9): 1137-1144, la cual se incorpora aquí como referencia como se establece completamente). Se usó regresión lineal para examinar la linealidad entre -OH CEST y la concentración de GAG.

Para las imágenes humanas, un investigador experimentado en el centro del IVD dibujó un ROI que contenía el núcleo pulposo y se calculó el promedio de MTR_{asim} . Dado que el movimiento intestinal ocurre independientemente con la adquisición de MRI, los artefactos del movimiento intestinal conducen a "ruidos aleatorios" que se agregan a la curva MTR_{asim} . Cuando la adquisición se repitió dos veces, se esperaban diferencias significativas entre las curvas de MTR_{asim} obtenidas de estas dos adquisiciones. Para cuantificar la diferencia entre ellas, el valor de la *Suma de la Diferencia Absoluta* (SAD) sobre todos los puntos de datos MTR_{asim} se calculó de la siguiente manera:

$$SAD(MTR_{asim}) = \sum_{i=1}^N |MTR_{asim1}(\Delta\omega_i) - MTR_{asim2}(\Delta\omega_i)|, \quad [2]$$

donde N (=14 en este caso) es el número de puntos de datos en una MTR_{asim} curva, MTR_{asim1} y MTR_{asim2} son curvas MTR_{asim} de la primera y la segunda adquisición respectivamente, y $\Delta\omega_i$ es la frecuencia de desplazamiento de los puntos de datos correspondientes. Una SAD más grande indica una mayor variación entre dos adquisiciones de una misma curva MTR_{asim} , que luego refleja más artefactos de movimiento intestinal. De manera similar, una SAD más pequeña indica menos artefactos de movimiento intestinal.

La clasificación de Pfirrmann también se realizó con base en una imagen de TSE ponderada en T2-sagital en un voluntario con evidente degeneración de la EIV, por un investigador experimentado. Se asignó una calificación (I, II, III o IV) a cada disco.

El procesamiento posterior se realizó con un programa personalizado en Matlab (The Mathworks, Natick, MA). La prueba de t pareada se usó para probar las diferencias de valor SAD entre TSE convencional y rFOV TSE CEST con el nivel significativo definido en $\alpha=0.05$ utilizando SPSS v. 16.0 (SPSS, Chicago, IL).

Ejemplo 4

Resultados

El estudio fantoma (FIGURA 2) mostró que la CEST-OH estaba altamente correlacionada con la concentración de GAG ($R^2=0.997$). Esto indica que el rFOV TSE CEST propuesto está relacionado linealmente con la concentración de GAG, y puede servir potencialmente como un biomarcador para la concentración de GAG y la degeneración de IVD.

La FIGURA 3 muestra imágenes de IVD *in vivo* típicas obtenidas de TSE convencional y rFOV TSE de un mismo disco. Las flechas en la FIGURA 3a ilustra regiones con movimientos intestinales que causan artefactos. En la FIGURA 3b, la técnica rFOV solo representó regiones ligeramente más grandes que el disco en la dirección de codificación de fase, mientras que excluye las contribuciones de señal desde fuera del FOV, por lo tanto reduce los artefactos de movimiento intestinal.

La diferencia entre estas dos técnicas de imagen CEST se puede apreciar mejor en la FIGURA 4, donde muestra la diferencia absoluta promedio de las curvas MTR_{asim} de dos adquisiciones, para todos los voluntarios. rFOV TSE demostró una diferencia promedio menor entre las adquisiciones en todas las frecuencias de desplazamiento, lo que

indica que rFOV es una técnica más confiable que puede reproducir de forma consistente las mediciones de CEST *in vivo*. También las variaciones de tales diferencias fueron menores entre los voluntarios, como lo muestran las barras de error más cortas de rFOV en comparación con las de las TSE convencionales. En los experimentos de los inventores, ciertos voluntarios tuvieron más movimiento intestinal que otros. Con el rFOV que reduce en gran medida los artefactos de movimiento, se espera que la contribución de dichos artefactos a la diferencia absoluta se reduzca en consecuencia. Esto explica la variación más pequeña de la diferencia absoluta entre los voluntarios. La FIGURA 5 muestra un ejemplo en donde el TSE convencional podría llevar a una interpretación errónea de los datos CEST. Se podría identificar un 'pico' de alrededor del 2% a alrededor de 3.5 ppm en (a), sin embargo, esto probablemente sea causado por artefactos, como lo justifica la gran diferencia de alrededor del 4% en el mismo desplazamiento en (b). Este 'pico' podría fácilmente atribuirse erróneamente a los protones -NH que resuenan alrededor de una frecuencia similar, mientras que con la confiabilidad mejorada de la técnica rFOV no existe tal preocupación.

El análisis cuantitativo también demostró la reproducibilidad mejorada de rFOV. Con solo nueve voluntarios, rFOV CEST mostró (Tabla 1) una disminución significativa de la SAD en comparación con la TSE convencional (0.14 vs 0.45, $p=0.002<0.05$). La diferencia absoluta media de MTR_{asim} de una sola frecuencia de desplazamiento fue de 0.94% y 3.01% para rFOV y CET de TSE convencional, respectivamente.

La viabilidad de rFOV TSE CEST en imágenes de degeneración IVD se ilustra en un sujeto humano en la FIGURA 6. De los cuatro discos estudiados, L2/L3 y L5/S1 se clasificaron como Pfirrmann grado II, y L3/L4 y L4/L5 se clasificaron como discos de grado III. Está claro en la FIGURA 6(b) que los discos más degenerados (L3/L4 y L4/L5) tienen una señal de CEST OH sustancialmente menor en comparación con los discos menos degenerados. El rFOV TSE CEST de la invención puede servir como una técnica de MR confiable para obtener imágenes de la degeneración IVD.

Tabla 1. Suma de la diferencia absoluta sobre todos los puntos de datos de la curva MTR_{asim} entre dos adquisiciones para TSE convencional y rFOV TSE CEST.

Numero de voluntario	SAD entre dos adquisiciones	
	TSE Convencional	rFOV TSE
1	0.485	0.160
2	0.170	0.134
3	0.977	0.293
4	0.736	0.135
5	0.337	0.089
6	0.289	0.068
7	0.288	0.095
8	0.320	0.210
9	0.470	0.082
Promedio*	0.453±0.255	0.140±0.072
$p = 0.002 < 0.05$. * Promedio expresado como media ± desviación estándar.		

Ejemplo 5

25 Discusión

Los experimentos descritos en el presente documento demuestran que la técnica rFOV TSE de generación de imágenes *in vivo* IVD CEST puede lograrse de manera confiable, lo que permite una mejor cuantificación de la

concentración de GAG y la generación de imágenes de la degeneración IVD. La técnica se verificó en fantasmas de GAG y en nueve voluntarios sanos. El IVD-OH CEST generalmente tiene una pequeña señal MTR_{asim} de no más del 8-10%. La diferencia de señal de -OH CEST entre un disco de grado 0 y 1 de Schneiderman es de solo 1.17%. Por lo tanto, es crucial detectar de forma confiable esta señal con alta precisión. La generación de imágenes de IVD por TSE convencional sufre de artefactos de movimiento intestinal que dan como resultado una baja reproducibilidad y, en ocasiones, conducen a mediciones de CEST inexactas. Por otro lado, rFOV TSE CEST se desempeña significativamente mejor que el TSE CEST convencional, lo que permite una cuantificación precisa de -OH CEST, y potencialmente detecta señales incluso más pequeñas de otros protones intercambiables, como el protón -NH.

Las mediciones fantoma y voluntaria de CEST estuvieron en línea con las publicadas previamente por Kim et al. (Véase Kim et al. Assessment of glycosaminoglycan distribution in human lumbar intervertebral discs using chemical exchange saturation transfer at 3T: feasibility and initial experience. NMR Biomed, 2011;24(9): 1137 – 1144. Ambos estudios demostraron una relación lineal entre las concentraciones de GAG y la señal de -OH CEST, así como la reducción de -OH CEST en los IVD con degeneración. Además de la técnica rFOV, se han realizado algunas otras mejoras con respecto al estudio anterior también. Primero, se usó una sección más delgada (3 mm vs. 8 mm). Con una sección de 8 mm de grosor se observó una "caída" significativa (podría ser tan alta como 20%) alrededor de -3.2 ppm en el espectro Z. Si bien no desea limitarse a ninguna teoría en particular, esta disminución de la señal podría deberse a la saturación de la señal de grasa en las vértebras por encima y por debajo del IVD en la que se sabe que la médula ósea es rica en grasa. La inclusión de dicha señal de grasa es debido a la imperfección del perfil de corte en la dirección de selección de corte. A medida que el grosor de corte aumentó de 3 mm a 8 mm gradualmente, la saturación a -3.2 ppm aumentó en magnitud en un disco con altura normal. Esta superposición de saturación de grasa con el efecto Overhauser nuclear (NOE) también tiene lugar a -3.2ppm, y complica aún más el análisis de MTR_{asim} . La generación de imágenes de IVD humanos gravemente degenerados puede plantear desafíos adicionales, ya que tales discos generalmente se asocian con una disminución de la altura. Por lo tanto, es importante mantener un grosor de corte que sea lo suficientemente delgado como para evitar la interferencia de la señal grasa de las vértebras, mientras que lo suficientemente grueso para tener una buena calidad de imagen. El grosor de 3 mm se determinó empíricamente en el estudio descrito aquí. Alternativamente, se podría combinar el uso de una sección gruesa con un pulso de supresión de la grasa selectivo por desplazamiento químico corto justo antes de la adquisición de la TSE, aunque los notorios problemas de falta de homogeneidad del campo magnético en la columna vertebral podrían deteriorar el efecto de saturación de la grasa, lo que complica el análisis de la señal CEST. En segundo lugar, se usó la preparación CEST pulsada en lugar de la preparación CEST continua de 500 ms. La duración más larga del pulso de RF suele estar limitada por la limitación de hardware en los escáneres clínicos. Por ejemplo, en el escáner de los inventores, la duración más larga del pulso de RF se limita a 100 ms, que es más corto que el tiempo de preparación en el orden de segundos que se requiere para lograr un efecto CEST sustancial. También hay un límite de hardware en el ciclo de trabajo máximo permitido para la generación de imágenes CEST. Es cierto que en ciertas aplicaciones, como las imágenes de rodilla, se puede disponer de un ciclo de trabajo más alto mediante el uso de bobinas especiales; sin embargo, en algunas realizaciones, como las imágenes IVD, la transmisión de bobinas corporales impone un máximo del 50% del ciclo de trabajo en la bobina del cuerpo con el sistema de los inventores. El esquema de preparación de CEST pulsado descrito aquí se puede implementar fácilmente en cualquier escáner clínico, lo que permite generar imágenes GAG confiables.

La confiabilidad mejorada de rFOV abre la posibilidad de crear imágenes de otros protones intercambiables. Simplemente a modo de ejemplo no limitativo, los protones -NH en IVD son de particular interés. En el cerebro, se ha utilizado NH CEST para obtener imágenes de acidosis isquémica y tumores. También se estudia la posible viabilidad de -NH CEST en la evaluación de la respuesta de la quimioterapia al tumor de mama. Dado que la IVD también es rica en protones -NH, es probable que -NH CEST pueda proporcionar información adicional para evaluar la degeneración del disco. GAG -NH CEST señal se observó en el disco bovino y cartílago con una magnitud típica mucho menor que -OH. En resumen, los inventores creen que la generación de imágenes de -NH tiene un gran valor potencial.

Varias otras técnicas también pueden usarse para reducir los artefactos del movimiento intestinal. La banda de saturación se usa clínicamente para reducir los artefactos del movimiento intestinal en las imágenes de la columna vertebral. Sin embargo, esta técnica no proporcionó una adecuada supresión del movimiento intestinal en el estudio de prueba de los inventores (datos no mostrados), lo que probablemente se deba a que el pequeño efecto CEST es extremadamente sensible a los artefactos. Aunque en otras aplicaciones la banda de saturación puede funcionar bien para proporcionar una calidad de imagen que sea lo suficientemente buena, en el análisis de imágenes CEST no funcionó para ese propósito. La excitación RF selectiva espacialmente en 2D puede excitar rotaciones dentro de un rFOV dado, evitando así los artefactos de movimiento de las regiones externas. Sin embargo, esta técnica viene con costes de mayor duración de RF y mayor deposición de energía, y sigue siendo en gran parte investigativa. La administración de glucagón puede reducir el movimiento intestinal, pero sin embargo sufre de diversos efectos secundarios.

En el estudio de los inventores, el número de pulsos de RF y el ángulo de giro se eligieron empíricamente a través de una serie de exploraciones experimentales. La optimización de parámetros rígidos por simulación y exploraciones *in vivo* sería útil para maximizar la señal CEST medida. Se utilizó el ciclo de trabajo máximo posible del 50%. La potencia de CEST promedio expresada como un equivalente de onda continua (36) es de alrededor de 0.8 μ T. Los estudios de los inventores indican que se observa una disminución de -OH CEST a medida que aumenta el grado de degeneración

del IVD. La insensibilidad al movimiento intestinal en rFOV TSE CEST conlleva el coste de una mayor deposición de energía. Aunque todavía muy por debajo de los estándares de la FDA, el alto producto de ancho de banda de tiempo de 10 utilizado para un mejor perfil de RF aumentó la tasa de absorción específica (SAR). Dado que la preparación del CEST ya requiere SAR, se sugiere precaución al ejecutar tales secuencias.

5 Ejemplo 6

Conclusión

En resumen, los inventores incorporaron la técnica rFOV en la adquisición de TSE CEST para generar una imagen confiable del IVD *in vivo*, reduciendo los artefactos del movimiento intestinal. La técnica de los inventores demostró una reproducibilidad significativamente mejor en comparación con la secuencia utilizada convencionalmente, lo que permite obtener imágenes de degeneración IVD cuantitativa en un entorno clínico, y también podría permitir futuras investigaciones sobre el efecto CEST de protones intercambiables con una magnitud más pequeña, como la -NH. Un experto en la materia apreciaría fácilmente que esta nueva técnica también es aplicable a otras anatomías en las que se desea el efecto rFOV, ya sea para eliminar artefactos de movimiento o para evitar una asignación errónea, como los pulmones, el corazón y los vasos sanguíneos principales.

15 Los números de ecuación a los que se hace referencia en la siguiente sección se refieren únicamente a las ecuaciones de los Experimentos II.

Experimentos II

Detección del dolor lumbar mediante el uso de imágenes-dependientes del nivel de pH del disco intervertebral utilizando la relación de dispersión $R_{1\rho}$ y transferencia de saturación de intercambio químico -OH (RROC)

20 Ejemplo 7

Introducción

Además de la introducción proporcionada en la sección anterior, el NP es rico en PG, que tiene numerosas cadenas GAG de sulfato de condroitina y sulfato de queratán unidos. El metabolismo de las células del disco es principalmente a través de la glucólisis anaeróbica, lo que lleva a una producción significativa de lactato. La difusión es la vía principal para el suministro de nutrientes como la glucosa y el oxígeno a las células del disco, así como el agotamiento de los desechos metabólicos como el lactato. La concentración de lactato en el centro del disco puede ser hasta 8-10 veces mayor que en el plasma. Como consecuencia, el pH del disco es ácido.

La espectroscopía de resonancia magnética (MRS) se ha explotado para evaluar de forma no invasiva el lactato en la IVD. Zuo et al. (Véase Zuo et al. Assessment of intervertebral disc degeneration with magnetic resonance single-voxel spectroscopy. Magn. Reson Med 2009; 62:1140-1146 demostró la posibilidad de adquirir espectros ^1H localizados en un escáner 3.0T en discos intactos de bovinos y humanos para cuantificar el lactato, la fuente de pH bajo. Un estudio posterior (Véase Zuo et al. In vivo intervertebral disc characterization using magnetic resonance spectroscopy and T1rho imaging: association with discography and Oswestry Disability Index and Short Form-36 Health Survey. Spine (Phila Pa 1976) 2012; 37:214-221) caracterizó la DIV *in vivo*. De manera importante, aunque se encontró una relación de agua/área PG significativamente elevada en los discos dolorosos con base en la discografía, no se detectó de manera confiable un pico de lactato. La MRS *in vivo* sufre de varias limitaciones que prohíben la detección de lactato: relación señal/ruido limitada (SNR), movimiento fisiológico, ensanchamiento de la línea inducida por susceptibilidad ósea, dificultad para diferenciar el lactato de los picos lipídicos, ya que sus frecuencias de resonancia son cercanas, el espacio del disco colapsado en ciertos pacientes, etc.

40 Recientemente se ha explotado la resonancia magnética (MRI) para evaluar de forma no invasiva el pH en la IVD. Melkus et al. adoptó enfoques tanto endógenos como exógenos para investigar la dependencia del pH de la transferencia de la saturación de intercambio químico (CEST) en los IVD porcinos (Véase Melkus et al. Ex vivo porcine model a measure pH dependence of chemical exchange saturation transfer effect of glycosaminoglycan in the intervertebral disc. Magn Reson Med 2013. Doi:10.1002/mrm.24838, la cual se incorpora aquí como referencia como se establece completamente). El CEST endógeno de los protones de hidroxilo (-OH) en GAG (gagCEST) demostró sensibilidad al pH en fantasmas y muestras de IVD porcino *ex vivo* a 7.0 Tesla. El CEST del agente de contraste de tomografía computarizada (TC) exógena Iopromide que se inyectó en los discos también demostró un potencial de generación de imágenes de pH. El Iopromide, junto con tipos de agentes de contraste similares, como el Iopamidol y el Iohexol, se ha investigado como sondas de pH en una serie de aplicaciones, como riñón de ratón, tumor en ratones y vejiga humana. Si bien las metodologías de generación de imágenes de pH IVD endógeno y exógeno son prometedoras, aún quedan limitaciones significativas. Primero, la metodología de medición de pH gagCEST existente se confunde con la concentración de GAG. Dado que tanto el pH como la concentración de GAG afectarán la señal gagCEST, se necesita una corrección adicional. Segundo, a pesar de la factibilidad demostrada en 7.0 Tesla, no se hicieron esfuerzos para traducir las técnicas a 1.5 o 3.0 Tesla. En tercer lugar, la metodología del agente de contraste de la TC puede no ser adecuada para imágenes *in vivo*. La difusión es la vía principal para que el agente de contraste exógeno ingrese al DIV, la estructura avascular más grande del cuerpo humano. En un disco normal, el agente de contraste exógeno puede tardar varias horas en difundirse en el NP central. Un tiempo de espera tan largo puede

obstaculizar la aplicabilidad de la técnica en un entorno clínico. Además, para cuantificar la señal CEST de amida a 4.2 ppm y 5.6 ppm, se requiere una concentración de Iopromide suficientemente alta en el IVD. Si se administra Iopromide por vía intravenosa, se puede necesitar una dosis prohibitivamente alta para que entre suficiente contraste en la IVD, lo que podría provocar problemas de seguridad. La inyección directa de Iopromide en el disco también podría funcionar en humanos, pero como técnica invasiva podría causar efectos secundarios, como dolor e infección. Estos problemas de entrega de contraste pueden desafiar la aplicación de agentes de contraste de CT exógenos para la formación de imágenes de pH en humanos.

Con estos problemas en mente, los inventores han desarrollado una técnica de MRI para imágenes de IVD *in vivo* dependientes del nivel de pH en un escáner clínico 3.0 Tesla, sin utilizar agentes de contraste exógenos. La técnica emplea la relación de dispersión $R_{1\rho}$ y -OH CEST (RROC). Se verificó mediante simulaciones numéricas y estudios sobre fantasmas de sulfato de condroitina y columnas porcinas *ex vivo*. El potencial de la técnica en el diagnóstico de discos dolorosos se exploró en un estudio con pacientes con LBP.

Ejemplo 8

Teoría

CEST

El efecto de CEST pulsado se puede aproximar mediante la solución analítica de la señal CEST de onda continua (Véase Zu et al. Optimizing pulsed chemical exchange saturation transfer imaging sequences. Magn Reson Med 2011;66:1100-1108, el cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad como se establece completamente). Teniendo en cuenta un modelo de intercambio de dos reservas (lábil y de agua) sin intercambio de protones saturados o saturación directa (DS) en protones de agua, se muestra que la solución analítica para CEST de onda continua es:

$$CEST = f \cdot \alpha \cdot k_{sw} \cdot T_{1w} (1 - e^{-t_{sat}/T_{1w}}) \quad [1]$$

donde f es la concentración relativa de protones lábil, α es el coeficiente de saturación y es una función de la tasa de cambio k_{sw} , T_{1w} es la tasa de relajación longitudinal de la reserva de agua, y t_{sat} es el tiempo de saturación. Según la ecuación. 1, el efecto CEST medido es proporcional a la concentración f , y es una función del rata de intercambio k_{sw} , que a su vez es una función del pH. Vale la pena mencionar que las suposiciones anteriores no son completamente válidas para -OH CEST en 3.0T, ya que el intercambio anterior y DS no pueden ser ignorados. Sin embargo, cuando la concentración es lo suficientemente pequeña, como una aproximación, la ecuación anterior proporciona información valiosa sobre la relación de la señal CEST con el pH y la concentración. De hecho, se descubrió una relación aproximadamente lineal entre -OH CEST y la concentración de GAG en los fantasmas.

Dispersión $R_{1\rho}$

La dispersión de $R_{1\rho}$ (la tasa de relajación longitudinal en el marco giratorio), la dependencia de $R_{1\rho}$ de la amplitud de giro (SLA), es sensible a los intercambios químicos con tasas de cambio intermedias. Considerando un modelo de intercambio de dos reservas (lábil y de agua) con una población altamente desigual (concentración de protones lábil $p_1 \ll$ concentración de agua en la p_w), $R_{1\rho}$ se puede obtener como:

$$R_{1\rho} = R_1 \cdot \cos^2\theta + \left(R_2 + \frac{p_1 \cdot \delta^2 \cdot k_{ex}}{(\delta - \Omega)^2 + \omega_1^2 + k_{ex}^2} \right) \cdot \sin^2\theta \quad [2]$$

donde R_1 es la tasa de relajación longitudinal del agua, R_2 es la tasa de relajación transversal del agua intrínseca en ausencia de intercambio químico, δ es el desplazamiento químico de la reserva lábil en relación con la reserva de agua, k_{ex} es la tasa de cambio entre las dos reservas. $\theta = \arctan(\omega_1/\Omega)$ es el ángulo entre la magnetización efectiva y el eje Z, donde ω_1 es el SLA y Ω es el desplazamiento de frecuencia. Además, la tasa de cambio del agua a la reserva lábil (k_w) y la lábil a la reserva de agua (k_l) satisfacen $p_w - k_w = p_1 \cdot k_{lábil}$, y $k_{ex} = k_w + k_l$. Cuando los pulsos de bloqueo de giro se aplican en resonancia, $\theta = 90^\circ$ y $\Omega = 0$.

En un estudio de resonancia de bloqueo de giro cuando los valores de $R_{1\rho}$ se miden respectivamente en un SLA ω_{1L} alcanzable bajo (por ejemplo, 100 Hz), y en un SLA ω_{1H} alcanzable alto (por ejemplo, 400 Hz), se puede obtener la diferencia del valor $R_{1\rho}$ como:

$$R_{1\rho-Disp} = R_{1\rho}(\omega_{1L}) - R_{1\rho}(\omega_{1H}) = \frac{p \cdot k_{ex} \cdot [(\omega_{2H}/\delta)^2 - (\omega_{2L}/\delta)^2]}{[1 + (\omega_{2H}/\delta)^2 + (k_{ex}/\delta)^2] [1 + (\omega_{2L}/\delta)^2 + (k_{ex}/\delta)^2]}$$

[3]

$R_{1\rho-Disp}$ es proporcional a p_1 , la concentración. Como ω_{1L} y ω_{1H} pueden ser predeterminados y el valor de δ es fijo, $R_{1\rho-Disp}$ también depende de k_{ex} , que a su vez es una función del nivel de pH.

La derivada de la Ecuación 3 con respecto a k_{ex} es igual a

$$\frac{d R_{1\rho-Disp}}{d k_{ex}} = A \cdot \frac{(k_{ex}^2 - B) \cdot (k_{ex}^2 - C) - 4 \cdot k_{ex}^4}{(k_{ex}^2 + B)^2 \cdot (k_{ex}^2 + C)^2}$$

5

[4]

donde $A = p \cdot \delta^2 \cdot (\omega_{1H}^2 - \omega_{1L}^2)$, $B = \delta^2 + \omega_{1H}^2$, $C = \delta^2 + \omega_{1L}^2$. Como lo muestran los resultados fantoma de GAG (discutidos a continuación), en un rango de pH fisiológico $A > 0$, $k_{ex}^2 > B$, y $k_{ex}^2 > C$ para protones -OH. Por lo tanto $(k_{ex}^2 - B) \cdot (k_{ex}^2 - C) < 4 \cdot k_{ex}^4$ y la Ecuación 4 es siempre negativa, lo que sugiere que la tasa de cambio reducida conduce a más $R_{1\rho-Disp}$.

10 RROC

La discusión anterior muestra que tanto la dispersión de CEST como la de $R_{1\rho}$ son aproximadamente proporcionales a la concentración de GAG y dependen del nivel de pH. Teóricamente, $CEST = C \cdot f_1(pH)$ y $R_{1\rho-Disp} = C \cdot f_2(pH)$, donde C es la concentración, y f_1 y f_2 son funciones que describen la dependencia del pH de la dispersión de CEST y $R_{1\rho}$, respectivamente. RROC se define como la relación de dispersión $R_{1\rho}$ a CEST:

15

$$RROC = \frac{f_1(pH)}{f_2(pH)} = f(pH) \quad [5]$$

donde f es una nueva función que describe la dependencia del pH de RROC. Cuando f_1 y f_2 tienen diferentes respuestas de pH, el RROC es independiente de C y aún depende del pH como lo describe $f(pH)$. Por lo tanto, se puede utilizar para imágenes dependientes del nivel de pH.

Medición $R_{1\rho}$ en SLA bajo

20 La medición de $R_{1\rho}$ en resonancia es susceptible a las homogeneidades B_0 y B_1 . Diversas mejoras de secuencia intentaron abordar estos problemas. Entre estas se encuentra una preparación de bloqueo de giro llamada "bloqueo de giro compuesto de ciclo de fase", que combina el ciclo de fase y un esquema de pulso compuesto para la compensación de inhomogeneidades (Véase Chen et al. Quantitative T(1)(rho) imaging using phase cycling for B0 and B1 field inhomogeneity compensation. Magn Reson Imaging 2011:29:608-619). Esta técnica fue probada analíticamente para eliminar el efecto de inhomogeneidad B_1 . Además, se afirmó que el efecto de inhomogeneidad B_0 se corrigió, aunque no se proporcionaron pruebas analíticas. Aquí se busca la descripción analítica de la dependencia de esta técnica de la B_0 fuera de resonancia (suponiendo una B_1 perfecta), siguiendo el enfoque utilizado por Li et al. La magnetización después de la preparación del bloqueo de giro, para el número impar y par de adquisiciones respectivamente, se puede obtener como:

$$M_{impar} = R_x(\beta) \cdot R_y(\alpha) \cdot (R_x(\theta) \cdot R_z(\vartheta) E_p \cdot R_{-x}(\theta)) \cdot R_y(\alpha) \cdot R_x(\beta) \cdot M(t_0) \quad [6]$$

$$M_{par} = R_{-x}(\beta) \cdot R_y(\alpha) \cdot (R_x(\theta) \cdot R_z(\vartheta) E_p \cdot R_{-x}(\theta)) \cdot R_y(\alpha) \cdot R_x(\beta) \cdot M(t_0) \quad [7]$$

30

donde $M(t_0)$ es la magnetización inicial, $R_\phi(\Phi)$ representa una matriz de rotación con ángulo de giro Φ y orientación ϕ , $\beta = 90^\circ$ es el ángulo de giro del impulso de inclinación hacia arriba/abajo, $\alpha = 135^\circ$, θ es el ángulo entre el campo efectivo de bloqueo de giro y el eje z,

$$\theta = \tan^{-1} \left(\frac{\omega_1}{\Omega} \right)$$

35 describir $T_{1\rho}$ y $T_{2\rho}$ ($= 1/R_{2\rho}$, el tiempo de relajación transversal en el cuadro giratorio) relajación, y ϑ es el ángulo de giro del impulso de bloqueo de giro. La magnetización longitudinal M_z después del ciclo de fase es igual a $(M_{par} - M_{impar})/2$, y se puede obtener como:

$$M_z = M_0 \cdot (E_{1\rho} \cdot \sin^2 \theta + E_{2\rho} \cdot \cos^2 \theta \cdot \cos \xi) \quad [8]$$

donde M_0 es magnetización longitudinal, $E_{1\rho} = e^{-SLT \cdot R_{1\rho}}$, $E_{2\rho} = e^{-SLT \cdot R_{2\rho}}$, $\xi = 2\pi \cdot SLT \cdot \sqrt{(\omega_1)^2 + (\Omega)^2}$,

y SLT es el tiempo de bloqueo de giro. Cuando hay B_0 fuera de resonancia, el segundo término en la Ecuación 8 se vuelve distinto de cero, causando ' $R_{2\rho}$ contaminación'. Esta contaminación depende de SLA: para un dado Ω , un ω_1 más bajo causa una mayor contaminación de $R_{2\rho}$. Aunque generalmente no es un problema cuando las imágenes con SLA a 400 Hz, la medición de $R_{1\rho}$ a un SLA bajo de 100 Hz se complica por esta contaminación (FIGURA 8 (c)), y se necesita una corrección. El segundo término en la Ecuación 8 está oscilando a una frecuencia determinada por

$\sqrt{(\omega_1)^2 + (\Omega)^2}$. Para $\omega_1 = 100\text{Hz}$, este valor es mucho más alto que $R_{1\rho}$ o $R_{2\rho}$ que están en el orden de decenas de Hz. Por lo tanto, es posible "filtrar" los efectos de oscilación utilizando diversos procesos de datos y obtener solo la señal relacionada con $R_{1\rho}$

Aquí se utiliza una estrategia simple que puede aplicarse fácilmente en un entorno clínico. Mientras que la medición $R_{1\rho}$ convencional incluye un número de SLT que generalmente se distribuyen uniformemente, en el esquema propuesto, los SLT se dividen en dos grupos con SLT cortos y largos, respectivamente, y dentro de cada grupo se usa un número de SLT para muestrear completamente al menos un ciclo de la oscilación. A modo de ejemplo, estos dos tipos de esquemas se compararon mediante simulación numérica: el esquema convencional incluía 12 SLT distribuidas uniformemente entre 10 ms y 150 ms, mientras que las SLT en el esquema propuesto tenían SLT de 10 ms a 20 ms en el paso de 2 ms y de 140 ms a 150 ms en el paso de 2 ms (FIGURA 8 (a) y (b)). El valor $R_{1\rho}$ se obtuvo ajustando la señal a una función de decaimiento mono-exponencial utilizando el ajuste de mínimos cuadrados. Los errores absolutos entre $R_{1\rho}$ ajustado y el valor 'verdadero' $R_{1\rho}$ usado en la simulación, bajo diferente resonancia de B_0 , se representaron en la FIG. 8 (d). Este esquema funcionó mejor bajo B_0 fuera de resonancia, especialmente cuando $|\Delta B_0| < 0.12\text{ppm}$ la precisión de $R_{1\rho}$ puede lograrse ya que el error absoluto está cerca de cero.

Ejemplo 9

Métodos

Simulaciones Numéricas

Las simulaciones requieren el conocimiento de la rata de intercambio entre los protones -OH y los protones de agua. Se realizó un estudio de dispersión de bloqueo de giro por resonancia (que se discute más adelante) en 9.4T, y los valores de $R_{1\rho}$ se ajustaron a la Ecuación 2 para obtener una tasa de cambio bajo diferentes niveles de pH. Los resultados (Tabla 2) se utilizaron posteriormente para las simulaciones. El efecto CEST en 3.0T se simuló numéricamente utilizando el modelo de intercambio de dos grupos Bloch-McConnell en Matlab (The Mathworks, Natick, MA), como se describe en (Sun, PZ. Simplified and scalable numerical solution for describing multi-pool chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI contrast. J. Magn Reson 2010;205:235-241, la cual se incorpora aquí como referencia como se establece completamente). Los parámetros de relajación e intercambio químico utilizados se eligieron para representar la DIV humana típica: $T_{1w}=1000\text{ms}$, $T_{2w}=100\text{ms}$, $T_{1s}=500\text{ms}$, $T_{2s}=50\text{ms}$. El desplazamiento de protones -OH fue de 1.0 ppm. La concentración de GAG fue de 150 mM, asumiendo protones 3-OH en cada unidad de GAG. Los parámetros de simulación coincidieron con el protocolo de imágenes *in vivo* de los inventores: incluía un tren de 8 pulsos gaussianos de 1440° y un ciclo de trabajo del 50%, con cada pulso con una duración de 90 ms. El perfil de pulso de RF se extrajo de la plataforma de programación (IDEA, Siemens AG Healthcare, Erlangen, Alemania). Tiene una amplitud promedio normalizada (p_1) de 0.50, y una potencia promedio normalizada (p_2) de 0.38, medida usando las métricas previamente introducidas por Zu et al. (Véase Optimizing pulsed-chemical exchange saturation transfer imaging sequences. Magn Reson Med 2011; 66:1100-1108). -OH CEST se calculó como la integral de MTR_{asim} entre 0.5 ppm y 1.5 ppm. La dispersión de $R_{1\rho}$ entre SLA de 100 Hz y 400 Hz se simuló con base en la Ecuación 3. RROC se calculó posteriormente.

Tabla 2 - Resultados ajustados bajo diferentes niveles de pH

pH	6.00	6.40	6.68	7.04
Rata de intercambio $k_{\text{ex}}(\text{s}^{-1})$	504	646	749	834
Concentración p_1	0.011	0.012	0.016	0.015

Rata de relajación transversal R_2 (s^{-1})	1.71	1.76	1.65	1.72
---	------	------	------	------

Fantomas

5 Fantoma I: Para cuantificar la tasa de intercambio de fantasmas de GAG a diferentes niveles de pH a 9.4 T, se prepararon muestras de GAG con una concentración de 150 mM a partir de sulfato de condroitina A (Aldrich-Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) En una solución estándar de la solución salina regulada con fosfato y sus niveles de pH se ajustaron posteriormente a 7.04, 6.68, 6.40 y 6.00, respectivamente. La concentración se refiere al número de unidades de disacáridos en GAG. Fantoma II: para verificar la dependencia de la dispersión de CEST y $R_{1\rho}$ en la concentración de GAG y el pH a 3.0 T, en un estudio diferente, se prepararon 4 muestras de GAG con concentraciones de 50, 100, 150 y 200 mM, respectivamente, a partir de sulfato de condroitina A en una solución estándar. De solución salina regulada con fosfato. Luego, cada muestra se dividió uniformemente en cinco tubos más pequeños, y sus niveles de pH se ajustaron a valores de alrededor de 7.2, 7.0, 6.7, 6.3 y 6.0, respectivamente. En el momento de la generación de imágenes, las muestras se colocaron en un baño de agua dopado con gadolinio.

Columna Porcina

15 La columna torácica porcina se extrajo de un minicerdo de Yucatán recién sacrificado. La muestra se llevó inmediatamente a un congelador a -20°C para su almacenamiento y se llevó a temperatura ambiente al menos 24 horas antes de la MRI para descongelar. Después de la extracción de los músculos circundantes y los elementos posteriores, se realizó un pequeño corte (~ 3 mm) en el centro de cada disco intervertebral paralelo a las placas terminales utilizando un bisturí. Se inyectaron 0.05 mL de lactato de sodio (L-lactato de sodio, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) con diferentes concentraciones en el núcleo pulposo para inducir una variedad de niveles de pH dentro de los
20 discos. El pH se midió utilizando una sonda de pH de tejido hecha a medida (Warner Instruments, LLC, Hamden, CT) insertando el electrodo en el centro del disco.

Sujetos Humanos

25 Se reclutaron cuatro sujetos masculinos (edades 42.8 ± 18.3) y dos mujeres (edades 55.5 ± 2.1) con dolor lumbar crónico (> 6 meses) debido a una enfermedad discal degenerativa moderada en cualquier nivel lumbar y programada para una discografía provocativa. Los criterios de inclusión fueron: fracaso de la terapia conservadora durante al menos 3 meses (incluida la terapia física), dolor lumbar de al menos 40 mm en una escala analógica visual de 100 mm con dolor en la pierna menor que el dolor de espalda o no radicular de origen, patología del disco lumbar con una puntuación de Pfirrmann modificada de 3, 4, 5 o 6, con una hernia de no más de 6 mm y sin compresión neurológica, y dolor/patología no originados a partir de articulaciones facetarias o estenosis. Los resultados de la discografía se
30 clasificaron como positivos o negativos. Se estudiaron un total de 23 niveles discales. Las MRI se realizaron 1-4 (promedio = 1.9) semanas antes de la discografía programada para evitar los efectos combinados del daño potencial en el disco causado por el procedimiento.

Adquisiciones de Resonancia Magnética

35 El fantoma I fue escaneado en un generador de imágenes Biospec Bruker de 9.4 T (Bruker Biospin, Billerica, MA, EE. UU.), utilizando una bobina de RF de transmisión y recepción de volumen. La lectura de imágenes fue una adquisición rápida de un solo corte con una secuencia de ecos reenocados (RARE) con preparación de giro. Los SLA fueron de 298 Hz a 1746 Hz en el paso de 85 Hz. Los SLT fueron 50, 100, 150 y 200 ms. El fantoma II y la columna vertebral porcina se realizaron en un escáner clínico 3.0T (Magnetom Verio, Siemens AG Healthcare, Erlangen, Alemania). RF se transmitió utilizando bobina de cuerpo. La preparación de referencia de cambio de saturación de agua y CEST (WASSR) fue similar al estudio de los inventores descrito en los Experimentos I (arriba). La cuña se hizo manualmente. La preparación del bloqueo giratorio se logró mediante la preparación del ciclo de fase y el nuevo esquema de adquisición. Los SLA fueron de 100 y 400 Hz. Los SLT fueron de 22 ms a 40 ms en el paso de 2 ms, y de 122 ms a 140 ms en el paso de 2 ms. La imagen del Fantoma II en el plano axial se realizó utilizando CEST y eco en
40 turborotación (TSE) de giro y bloqueo, con una bobina de columna de 24 elementos y una bobina de matriz de cuerpo. Tres IVD de la columna porcina se escanearon individualmente con un corte axial 2D, utilizando CEST y TSE de bloqueo - giro.

Una secuencia de CET de TSE de campo de visión (rFOV) de dos dimensiones (2D) reducida se introdujo previamente, como se explicó anteriormente. Como se indicó anteriormente, rFOV puede suprimir efectivamente los artefactos de movimiento causados por el movimiento intestinal y mejorar la reproducibilidad de la medición. Esto es importante para imágenes IVD cuantitativas que son susceptibles a artefactos. El mismo diseño de secuencia de pulsos de rFOV TSE se aplicó a la preparación de bloqueo de giro, formando una secuencia de bloqueo de giro de rFOV TSE para generación de imágenes humanas a 3.0T. Luego de las adquisiciones del localizador y del TSE ponderado en T_1/T_2 estándar, en cada paciente se usó un corte de sección sagital 2D a través del centro de los IVD para la generación de imágenes CEST y bloqueo de giro. Solo se usó la bobina de la columna vertebral para recibir la señal. El rango de
55 frecuencia de compensación de WASSR fue suficiente para cubrir el cambio de frecuencia máximo después de un ajuste cuidadoso con el cuadro de cuñas seleccionado para cubrir solo la región de la columna vertebral de interés.

La potencia de saturación de WASSR fue suficiente para lograr la cuantificación de la frecuencia de resonancia del agua. Los parámetros de imagen se muestran en la Tabla 3. Los parámetros de preparación de CEST y WASSR se muestran en la Tabla 4. Para la preparación de bloqueo de giro, los SLA fueron 100 y 400 Hz. Los SLT fueron de 22 ms a 40 ms en el paso de 2 ms, y de 102 ms a 120 ms en el paso de 2 ms.

5 Tabla 3 - Parámetros de generación de imágenes humanas 3.0T

Secuencia	TE (ms)	TR (ms)	TH (mm)	FOV (mm ²)	ETL	Matriz	No. de promedios	TA (min)
rFOV CEST	9	3000	8	73x220	42	32x192 (interpolado a 64x384)	4	5.4
rFOV Bloqueo de giro	9	3000/5830-8050 ^a	8	73x220	42	32x192 (interpolado a 64x384)	4	11.8-18.5

^aTR se fijó en 3000 ms para escaneo a 100Hz. Se utilizó el TR mínimo permitido para el escaneo a 400Hz. TE = tiempo de eco; TR = tiempo de repetición; TH = espesor de sección; rFOV = campo de visión reducido; ETL = longitud del tren de eco; TA = tiempo de generación de imágenes

Tabla 4 - Parámetros CEST humanos 3.0T

Secuencia	FA (°)	Duración de RF (ms)	No. de RFs	No. de compensaciones	Rango de compensación (ppm)	Tiempo de irradiación (ms)	Potencia de irradiación (μT)
CEST	1440	90	8	15	-2.1 a 2.1	1350	0.9
WASSR	60	30	2	11	-1.0 a 1.0	90	0.09

Análisis de los datos

- 10 El procesamiento posterior se realizó con programas personalizados en Matlab (The Mathworks, Natick, MA). Las imágenes CEST se procesaron como se describe en los Experimentos I (arriba). Las imágenes de bloqueo de giro en diferentes SLT se ajustaron a un modelo de decaimiento monoexponencial para obtener valores $R_{1\rho}$ utilizando el ajuste de mínimos cuadrados, píxel por píxel. En las imágenes fantoma, la región de interés definida por el usuario (ROI) que contiene al menos 100 píxeles dentro de las regiones GAG se dibujó manualmente. Para los datos de IVD porcinos y
- 15 humanos, se eligió el ROI para incluir solo la región central de NP que tiene una señal alta en MRI, debido a la preocupación de una SNR insuficiente en las regiones externas de NP y AF. Al dibujar el ROI en los IVD porcinos, se evitaron cuidadosamente las regiones con fugas de NP como resultado de un disco abierto. Los valores de dispersión de CEST y $R_{1\rho}$ se promediaron dentro del ROI antes del cálculo de RROC. Además, el RROC normalizado para cada IVD humano se calculó dividiendo el valor RROC correspondiente por el valor más bajo en cada sujeto. Esta
- 20 normalización podría ayudar a reducir las variaciones entre los sujetos. Dos discos del paciente No. 2 se excluyeron del análisis subsiguiente debido a los valores negativos de la dispersión $R_{1\rho}$, que posiblemente fueron causados por una pequeña dispersión $R_{1\rho}$, ruidos debidos a una SNR limitada y falta de brillo. Se analizaron un total de 21 discos humanos.

Estadística

- 25 El análisis estadístico se realizó utilizando SPSS v. 16.0 (SPSS, Chicago, IL). La prueba t pareada se usó para probar las diferencias de valor de RROC entre los IVD con resultados de discografía positivos y negativos con el nivel significativo definido en $\alpha=0.05$. Las curvas de la característica operativa del receptor (ROC) se generaron para RROC como biomarcador de dolor de disco y se calcularon las áreas bajo la curva (AUC).

Ejemplo 10

Resultados

- La tasa de cambio ajustada k_{ex} de los protones -OH bajo diferentes niveles de pH se muestra en la Tabla 2. Estas tasas se encuentran en el régimen de intercambio intermedio y un pH más bajo conduce a una reducción en la tasa de cambio, lo que significa que el intercambio de -OH está principalmente catalizado por bases, similar a las mediciones de protones de amina (27). Cuando $\omega_{1H} = 400$ Hz y $\omega_{1L} = 100$ Hz, B y C, como se define en la Ecuación 4, son 1.8×10^5 y 2.6×10^4 respectivamente, que son más pequeñas que las más bajas k_{ex}^2 of 4.1×10^5 . Esto indica que los niveles de pH en el rango fisiológico, la Ecuación 4 es negativa y, por lo tanto, un nivel de pH más bajo conducirá a una mayor dispersión de $R_{1\rho}$ en los GAG. Sin embargo, cuando ω_{1H} se vuelve demasiado grande, se violará esta afirmación y la relación de disminución monótona entre la dispersión de $R_{1\rho}$ y el pH ya no se mantendrá.
- Los resultados de la simulación se muestran en la FIGURA 9. Tanto la dispersión CEST como la dispersión $R_{1\rho}$ fueron proporcionales a la concentración como se muestra en la FIGURA 9a y la FIGURA 9b. En comparación con CEST, la dispersión de $R_{1\rho}$ fue más sensible a los cambios de pH como se refleja en una mayor pendiente en la FIGURA 9e en comparación con en la FIGURA 9d. RROC fue casi independiente de la concentración y dependiente del pH como se muestra en la FIGURA 9c y la FIGURA 9f. La simulación indica que RROC puede servir como un biomarcador de imágenes dependiente del nivel de pH independiente de la concentración.
- Los resultados del Fantoma II se muestran en la FIGURA 10. Mientras que tanto la dispersión de CEST como la de $R_{1\rho}$ dependían del pH, la dispersión de $R_{1\rho}$ era más sensible a los cambios en el nivel de pH, como se ve en la mayor pendiente en la FIGURA 10b en comparación con en la FIGURA 10a. Los resultados mostrados en la FIGURA 10c confirmó la independencia de la concentración y la dependencia del nivel de pH de RROC. Imágenes CEST, dispersión $R_{1\rho}$ e imágenes RROC. La 10d-f de los fantomas de 150 mM demostró la capacidad de generación de imágenes dependiente del nivel de pH de la técnica propuesta, ya que los GAG con diferentes niveles de pH fueron bien discriminados en la FIGURA 10f. Vale la pena mencionar que los resultados del Fantoma II y RROC de simulación difieren en los valores, ya que las simulaciones se realizaron con parámetros como el típico IVD *in vivo* en lugar de GAG. Sin embargo, en ambos estudios se observaron tendencias similares de dependencia del pH, lo que respalda que el RROC es adecuado para la generación de imágenes dependiente del nivel de pH.
- La capacidad de las imágenes dependientes del nivel de pH se probó en IVD de columna porcina, con los resultados mostrados en la FIGURA 11. De los 3 discos estudiados, un pH reducido se correlacionó con un RROC más alto. Estos valores de RROC difieren de los fantomas de GAG porque tenían diferentes parámetros de MR, como T1 y T2. Sin embargo, se observó una tendencia similar de dependencia del pH.
- Los resultados de los pacientes se muestran en la FIGURA 12. Los valores promedio de RROC de los discos dolorosos y no dolorosos basados en la discografía fueron 135 ± 75 y 73 ± 36 , respectivamente (media \pm SE), y se identificó una diferencia significativa entre ellos mediante la prueba t pareada ($P=0.024$). Los valores de RROC más altos en los discos dolorosos sugirieron un nivel de pH más bajo. Este hallazgo estuvo en línea con las predicciones de las teorías y estudios de patogénesis de LBP. El análisis de ROC tuvo un AUC de 0.76, lo que indica que es un predictor justo para los discos dolorosos. Para corregir las variaciones entre sujetos humanos, los valores RROC se normalizaron por el valor más pequeño en cada sujeto. Los valores promedio de RROC normalizados de los discos dolorosos y no dolorosos basados en la discografía fueron 3.3 ± 2.6 y 1.1 ± 0.2 , respectivamente (media \pm SE), y se identificó una diferencia significativa entre ellos mediante la prueba t pareada ($P=0.013$). El análisis de ROC reveló que este enfoque tiene un alto poder de predicción con un AUC de 1.00. La normalización mejoró la previsibilidad de la técnica.
- Los resultados de imágenes de un paciente típico se muestran en la FIGURA 13. En este aspecto, se identificaron 2 discos positivos y 2 negativos mediante discografía FIGURA 13a. Los umbrales se pueden dibujar entre discos dolorosos y no dolorosos, tanto en RROC como en los resultados de RROC normalizados FIGURA 13b-c.

Ejemplo 11

Discusión

- En algunas realizaciones, la invención enseña una nueva técnica de formación de imágenes dependiente del nivel de pH. Esta técnica no depende de agentes de contraste exógenos, y puede aplicarse en un escáner 3.0T. Se propuso un nuevo índice independiente de la concentración y del nivel de pH, RROC, como un biomarcador adecuado para la generación de imágenes de pH en los IVD. Se descubrió una correlación negativa entre los niveles de RROC y pH mediante simulaciones numéricas, estudios fantoma y estudios de columna porcina, en un rango de pH fisiológico. El estudio del paciente mostró valores significativamente más altos de RROC en los IVD dolorosos, y la RROC normalizada demostró un gran poder para predecir discos dolorosos. Estos resultados sugieren que 1) los discos dolorosos se asocian con niveles de pH más bajos y 2) la técnica propuesta es un método prometedor y no invasivo para detectar el dolor discogénico en la parte baja de la espalda.

- La relación entre -OH CEST y el pH demostrado aquí es diferente de la informada por Melkus et al. (Véase Melkus et al. *Ex vivo porcine model a measure pH dependence of chemical exchange saturation transfer effect of glycosaminoglycan in the intervertebral disc.* Magn Reson Med 2013. Doi: 10.1002/mrm.24838, el cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad como se establece completamente), donde se observó una dependencia del nivel de pH complicada cuando se investigó un amplio rango de pH. Cuando se enfocó en el rango de pH fisiológico de

~7.2 a 6.0, el CEST de OH en el estudio reportado aquí aumentó con un nivel de pH disminuido, mientras que en su estudio se observó una tendencia opuesta. Las discrepancias podrían atribuirse a diferentes campos magnéticos, efectos de DS y perfil de pulso de saturación. Específicamente, su estudio se realizó a 7.0 Tesla, que tiene una frecuencia de resonancia más alta. Se puede considerar que un rata de intercambio de 600 Hz se encuentra dentro del régimen de intercambio intermedio en 3.0 T, a 7.0 T puede estar más cerca de un régimen de intercambio lento, y por lo tanto, debe esperarse una relación de dependencia de pH diferente. Otro factor importante es el DS de la reserva de agua como resultado del ancho de banda del pulso de saturación no despreciable. Esto es especialmente relevante para las imágenes de -OH ya que sus frecuencias de resonancia están cerca de la del agua (~125 Hz en 3.0T y ~292 Hz en 7.0T). A mayor campo magnético, ya que los protones -OH están más separados del pico de agua, generalmente se espera menos efecto de saturación directa. El perfil del pulso de saturación también importa. Se ha demostrado previamente que la forma del pulso tiene influencias en gagCEST. También se ha propuesto el uso de la amplitud media normalizada (p_1) y la potencia media normalizada (p_2) como métricas para describir el CEST pulsado. A pesar de que esos estudios usaron pulsos gaussianos, las diferencias en el perfil del pulso (por ejemplo, p_1 y p_2) podrían llevar a una señal CEST diferente. Por lo tanto, la dependencia de -OH CEST en el pH debe caracterizarse cuidadosamente en cada plataforma.

El modelo de dispersión $R_{1\rho}$ de dos grupos, como se muestra en la Ecuación 2, solo incluye los protones de agua y OH, y descuida los protones NH. Jin et al. concluyó que el bloqueo de giro en resonancia es más sensible al régimen de intercambio intermedio. GAG-OH tiene una tasa de cambio entre ~640 Hz and ~930 Hz medida en el experimento de los inventores. El rata de intercambio GAG -NH exacto es desconocido. En el cerebro, la tasa de cambio de NH se ha medido en ~10-30 Hz. Los resultados *ex vivo* anteriores revelaron que la señal GAG -NH CEST es aproximadamente un orden más pequeño que -OH, lo que indica que es probable que GAG -NH se intercambie con una velocidad lenta. Por lo tanto, en este caso, el modelo de intercambio químico $R_{1\rho}$ de dos grupos debería ser suficiente. En los casos en que haya múltiples protones de intercambio, cada uno con una contribución sustancial, se debe considerar un modelo de agrupación múltiple. En estos casos, la contribución a $R_{1\rho}$ del intercambio químico es la suma de las contribuciones de cada uno de los grupos de protones. Para los protones con $k_{ex}^2 > B$, la ecuación 4 es negativa, lo que significa que un k_{ex} reducido conducirá a una mayor dispersión de $R_{1\rho}$. Para aquellos con $C < k_{ex}^2 < B$, la Ecuación 4 sigue siendo negativa. Solo cuando $k_{ex}^2 < C$, o $k_{ex} < 161$ Hz, existe una relación no monotonía entre la dispersión $R_{1\rho}$ y el pH. Sin embargo, esto ya cae en un régimen de intercambio lento, y su contribución al intercambio químico es limitada. Por lo tanto, para la mayoría de los metabolitos que tienen una dispersión de $R_{1\rho}$ sustancial, un k_{ex} reducido conducirá a una mayor dispersión de $R_{1\rho}$. Además, considerando que los protones intercambiables vistos comúnmente en el régimen de intercambio intermedio, como la amina y el -OH, se catalizan en una base dentro del rango de pH fisiológico, una disminución en el nivel de pH típicamente conducirá a una mayor dispersión de $R_{1\rho}$, en un escáner clínico 3.0T usando parámetros similares a en nuestro estudio.

Quedan algunos factores de confusión que podrían complicar las imágenes dependientes del nivel de pH con la técnica RROC de la invención. El primer tipo de factores de confusión incluyen parámetros de MR como T1 y T2. Aunque no se dispone de una descripción matemática para la generación de imágenes CEST pulsadas, la generación de imágenes T1 y T2 de pulsos continuos contribuye a la señal CEST como lo revelan las soluciones analíticas analizadas anteriormente. Por lo tanto, es posible que tales parámetros de MR puedan confundir las imágenes dependientes del nivel de pH al afectar la señal CEST, y pueden requerir una corrección adicional. De hecho, cuando los valores de RROC se normalizaron por sujeto en el estudio del paciente, el valor de AUC en la prueba de ROC aumentó de 0.76 a 1.00, lo que indica que el proceso de normalización trajo más poder de predicción en la identificación de discos dolorosos, posiblemente al reducir las variaciones en T1 y T2 entre los sujetos, pero no dentro del tema. Otro enfoque potencial es examinar primero la relación entre RROC y T1 y T2 utilizando simulaciones numéricas y estudios fantoma, luego realizar la cuantificación de T1 y T2 durante la adquisición de MRI, y finalmente corregir el valor de RROC medido utilizando los valores de T1 y T2. Sin embargo, este enfoque tiene un coste de tiempo de imagen prolongado. El segundo tipo de factores de confusión incluye mecanismos alternativos de transferencia de saturación que incluyen MT convencional y efecto Overhauser nuclear (NOE). Los efectos subyacentes de la MT provienen de componentes semisólidos, como las macromoléculas, y siempre acompañan a la CEST en los tejidos. La MT es asimétrica y no se puede corregir mediante el análisis de MTR_{asim} . Los NOE en GAG se identificaron a -2.6 ppm y -1.0 ppm. Estos NOE negativos disminuyen la señal CEST medida. Aunque en los IVD sanos, la CEST con alto contenido de OH como resultado de la alta concentración de GAG puede anular el NOE a -1.0 ppm, en los IVD gravemente degenerados esto puede no ser cierto.

Vale la pena señalar que ciertos parámetros no fueron optimizados experimentalmente. Por ejemplo, las amplitudes de 100 Hz y 400 Hz utilizadas para la medición de dispersión $R_{1\rho}$ se eligieron empíricamente. Se eligió 400 Hz porque permite la ejecución de la secuencia de pulsos en todos los sujetos sin encontrar ningún problema con la tasa de absorción específica (SAR) o el amplificador de RF. Se debe usar un ω_{1H} mayor siempre que sea posible, porque una dispersión más grande permite una medición más precisa. El 100 Hz fue elegido porque a veces se encontraron artefactos en un SLA inferior a 100 Hz en el experimento de los inventores. Alternativamente, en lugar de un bloqueo de giro de 100 Hz, se podría pensar en usar la cuantificación T2, que proporciona una mayor dispersión. La cuantificación de T2 puede requerir una preparación separada en comparación con el bloqueo de giro, como lo demostraron recientemente Li et al. (Véase Li et al. Simultaneous acquisition of T1p and T2 quantification in knee cartilage: repeatability and diurnal variation Magn Reson Imaging 2013. Doi: 10.1002/jmri.24253). Se debe tener

cuidado al interpretar los datos de dispersión medidos usando dos esquemas de preparación diferentes. Sin embargo, se recomienda la optimización con simulaciones numéricas, estudio del fantoma y estudio *in vivo*.

Ejemplo 12

Conclusión

5 En realizaciones preferidas, la invención enseña un RROC independiente del nivel de pH, dependiente de la concentración, para la formación de imágenes de pH en los IVD, mediante la combinación de la dispersión $R_{1\rho}$ y la formación de imágenes CEST. Para facilitar la medición de este nuevo índice en un escáner 3.0T, se utilizaron la técnica rFOV y un nuevo esquema de adquisición de bloqueo de giro con baja amplitud de bloqueo de giro. Los estudios demostraron una correlación negativa entre los valores de RROC y los niveles de pH. El RROC normalizado
10 detectó con éxito todos los discos dolorosos en el estudio preliminar del paciente. Como una herramienta de imagen no invasiva, dependiente del nivel de pH, esta técnica podría usarse para 1) diagnosticar discos dolorosos, 2) contribuir a la comprensión de la patogénesis de la LBP, y 3) proporcionar información sobre el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos.

15 Los diversos métodos y técnicas descritos anteriormente proporcionan varias formas de llevar a cabo la solicitud. Por supuesto, debe entenderse que no necesariamente todos los objetivos o ventajas descritos pueden lograrse de acuerdo con cualquier realización particular descrita en este documento. Así, por ejemplo, los expertos en la materia reconocerán que los métodos pueden realizarse de una manera que logre u optimice una ventaja o un grupo de ventajas como se enseña en este documento sin necesariamente lograr otros objetivos o ventajas como se describe o sugiere en este documento. Se menciona aquí una variedad de alternativas. Debe entenderse que algunas realizaciones preferidas incluyen específicamente una, otra o varias características, mientras que otras excluyen específicamente una, otra o varias características, mientras que otras mitigan una característica particular mediante la inclusión de una, otra o varias características ventajosas.

20 Además, el experto en la materia reconocerá la aplicabilidad de diversas características de diferentes realizaciones. De manera similar, los diversos elementos, características y pasos descritos anteriormente, así como otros equivalentes conocidos para cada uno de dichos elementos, características o pasos, pueden emplearse en diversas combinaciones por un experto en la técnica para realizar métodos de acuerdo con los principios descritos aquí. Entre los diversos elementos, características y pasos, algunos se incluirán específicamente y otros se excluirán específicamente en diversas realizaciones.

25 Aunque la solicitud se ha divulgado en el contexto de ciertas realizaciones y ejemplos, los expertos en la técnica entenderán que las realizaciones de la solicitud van más allá de las realizaciones específicamente divulgadas a otras realizaciones alternativas y/o usos y modificaciones y equivalentes de las mismas.

30 En algunas realizaciones, los términos "un" y "una" y "el/la" y referencias similares utilizadas en el contexto de la descripción de una realización particular de la solicitud (especialmente en el contexto de algunas de las siguientes reivindicaciones) se pueden interpretar para cubrir tanto lo singular como lo plural. La citación de los rangos de valores en el presente documento tiene la intención de servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del rango. A menos que se indique lo contrario en este documento, cada valor individual se incorpora a la especificación como si se hubiera citado individualmente en este documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje de ejemplificación (por ejemplo, "tal como") proporcionado con respecto a ciertas realizaciones en el presente documento pretende simplemente ilustrar mejor la solicitud y no plantea una limitación en el alcance de la aplicación reivindicada de otro modo. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como una indicación de ningún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la solicitud.

35 Las realizaciones preferidas de esta solicitud se describen en el presente documento, incluido el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la solicitud. Las variaciones en esas realizaciones preferidas se harán evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción anterior. Se contempla que los expertos en la técnica pueden emplear tales variaciones según sea apropiado, y la solicitud se puede practicar de otra manera que la descrita específicamente en este documento. Por consiguiente, muchas realizaciones de esta solicitud incluyen todas las modificaciones y equivalentes de la materia enunciada en las reivindicaciones adjuntas según lo permitido por la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las posibles variaciones de los mismos está incluida en la solicitud, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente.

40 Para concluir, debe entenderse que las realizaciones de la solicitud descritas en este documento son ilustrativas de los principios de las realizaciones de la solicitud. Otras modificaciones que pueden emplearse pueden estar dentro del alcance de la solicitud. Así, a modo de ejemplo, pero no de limitación, pueden utilizarse configuraciones alternativas de las realizaciones de la solicitud de acuerdo con las enseñanzas de este documento. Por consiguiente, las realizaciones de la presente solicitud no se limitan a eso precisamente como se muestra y describe.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la tasa de progresión o mejora y/o la duración de una afección asociada con la degeneración y/o dolor tisular en un sujeto, que comprende
generar imágenes de una región del cuerpo de un sujeto;
- 5 detectar uno o más biomarcadores dentro de la región de la imagen, seleccionados del grupo que consiste en pH, concentración de glicosaminoglicano (GAG), concentración de glucosa y concentración de lactato; y
predecir la tasa de progresión o mejora y/o la duración de la afección mediante la comparación de las mediciones de uno o más biomarcadores detectados dentro de la región de la cual se han generado las imágenes con las mediciones previas de los mismos o más biomarcadores detectados dentro de la región de la cual se han generado las imágenes,
- 10 en donde los biomarcadores se detectan mediante generación de imágenes de transferencia de saturación por intercambio químico (CEST).
2. El método de la reivindicación 1, en donde la afección se selecciona del grupo que consiste en: degeneración del disco intervertebral, dolor discogénico, osteoartritis, artritis reumatoide, una lesión del cartílago articular, degeneración del disco tempromandibular y combinaciones de las mismas.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la región con imágenes del cuerpo del sujeto comprende una articulación o un disco intervertebral.
4. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde los biomarcadores se detectan evaluando la dispersión de R1-rho, en donde los biomarcadores comprenden preferiblemente pH y/o concentración de GAG.

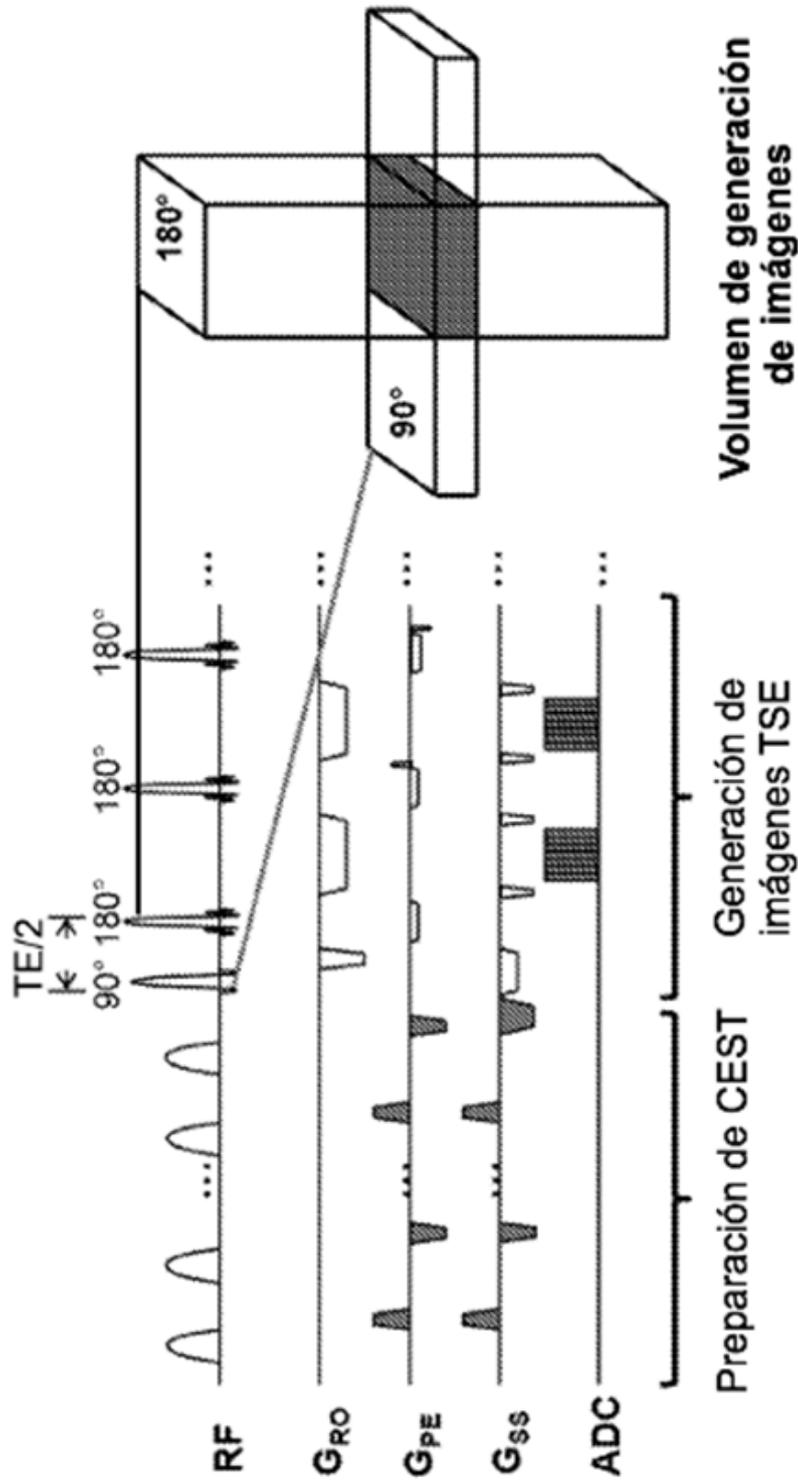


FIG. 1

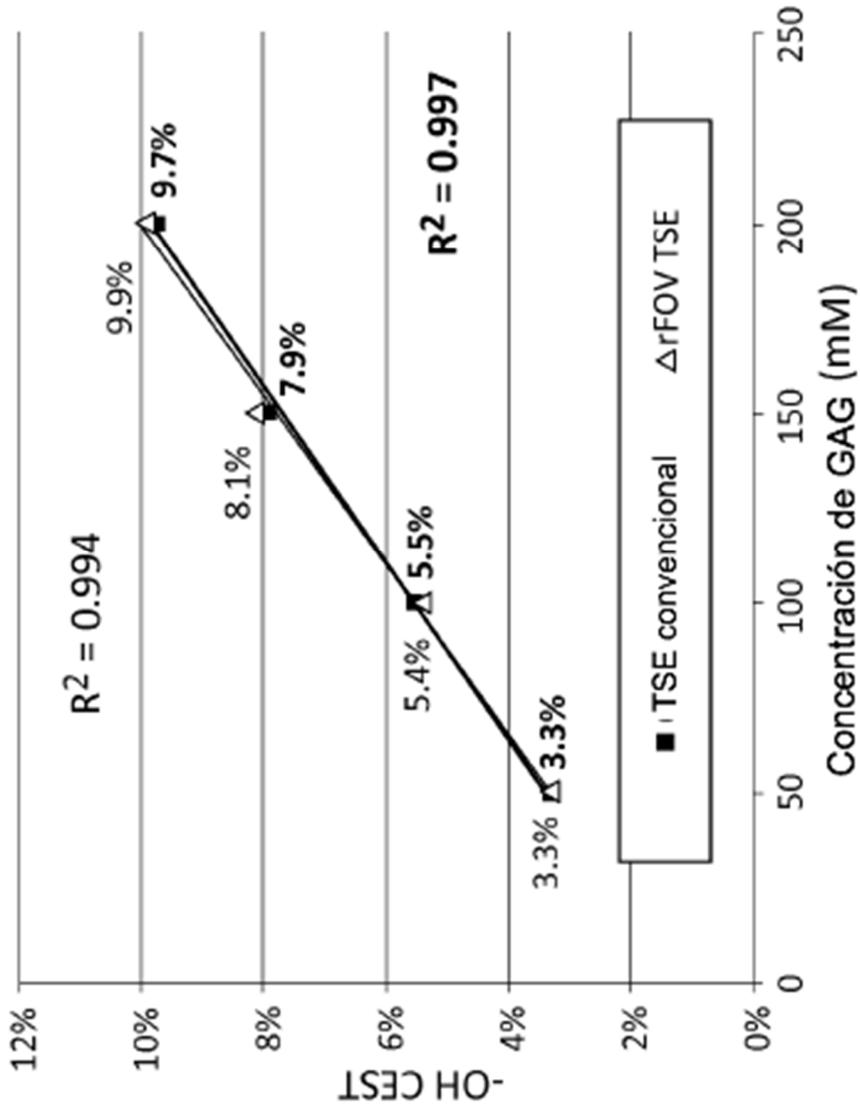


FIG. 2

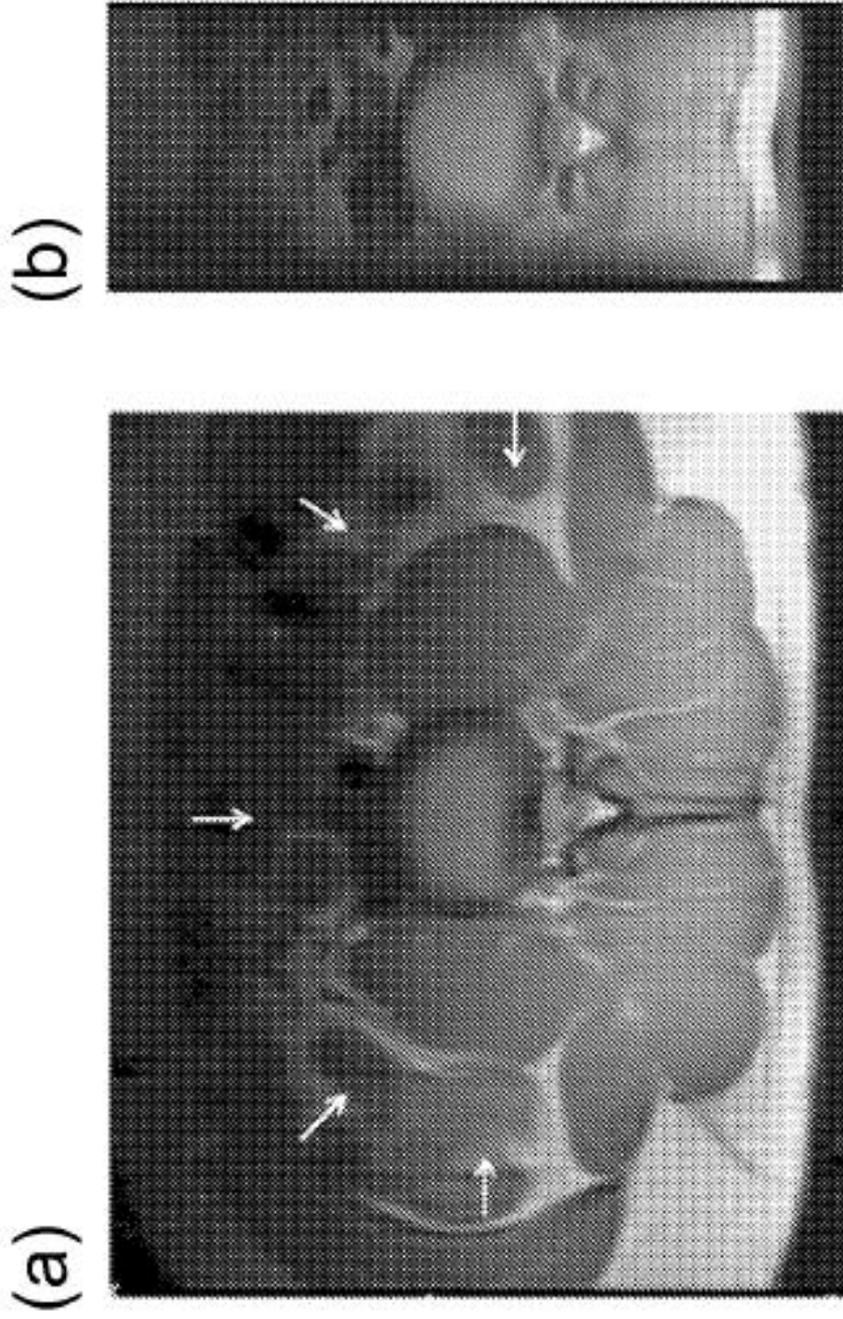


FIG. 3

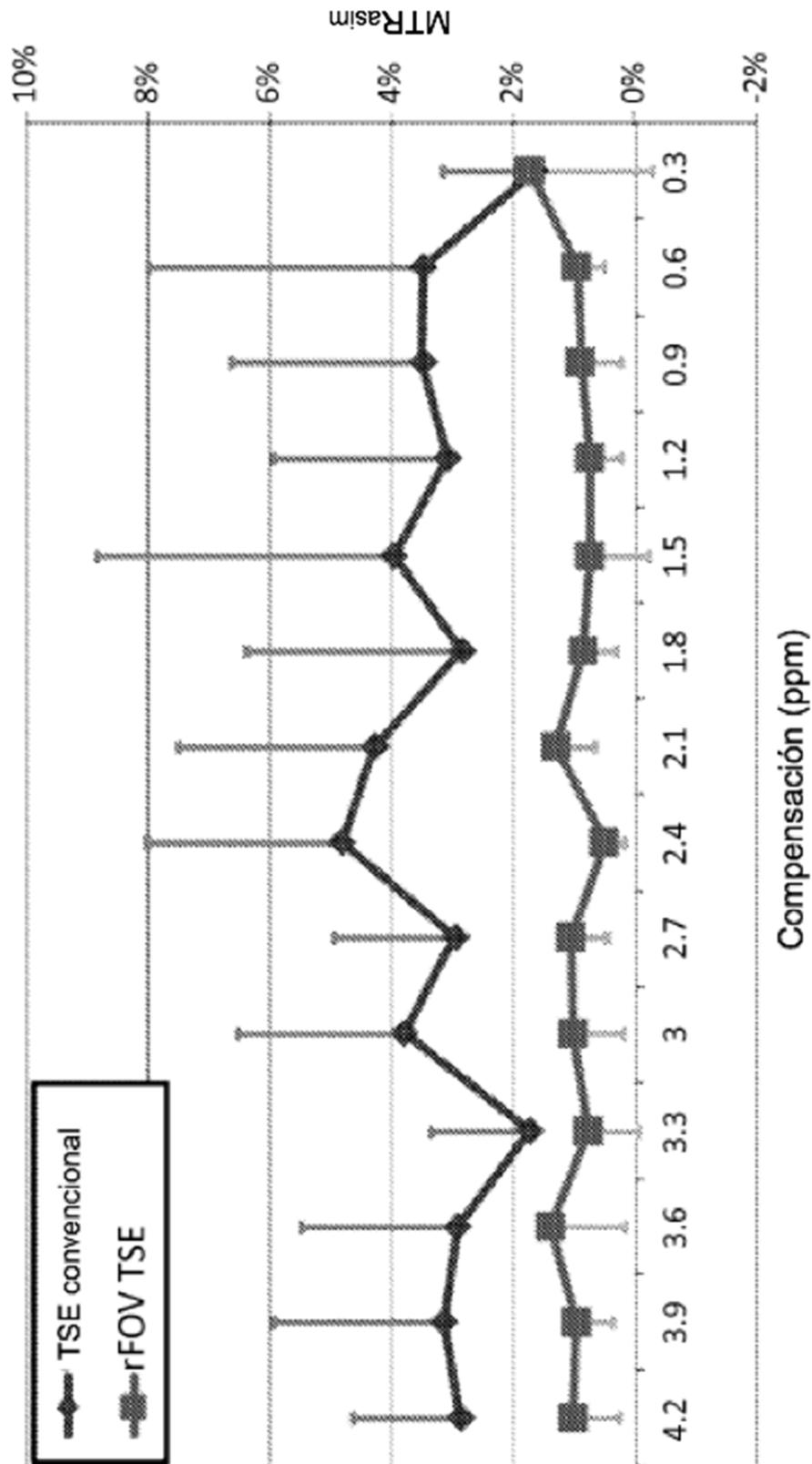


FIG. 4

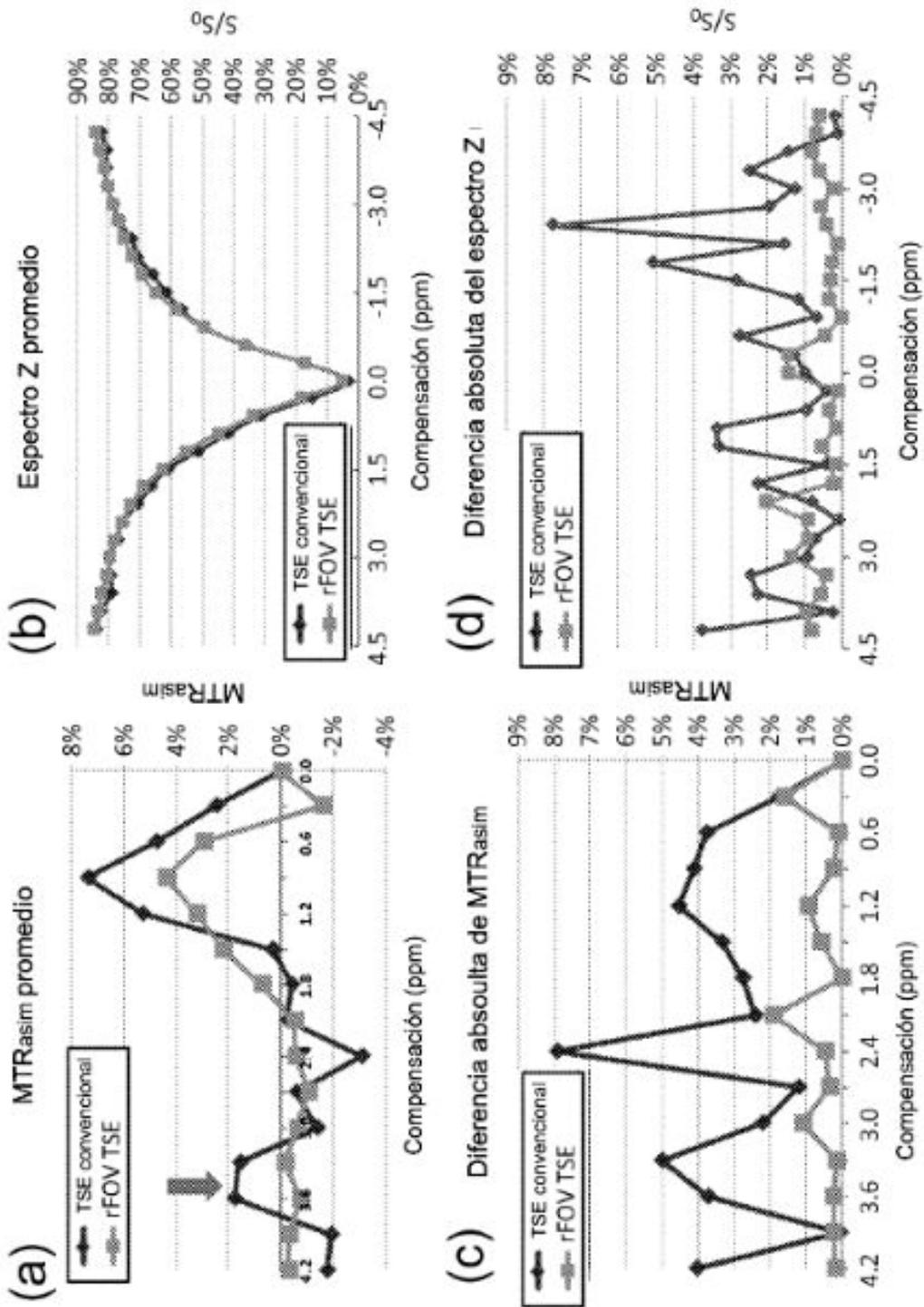


FIG. 5

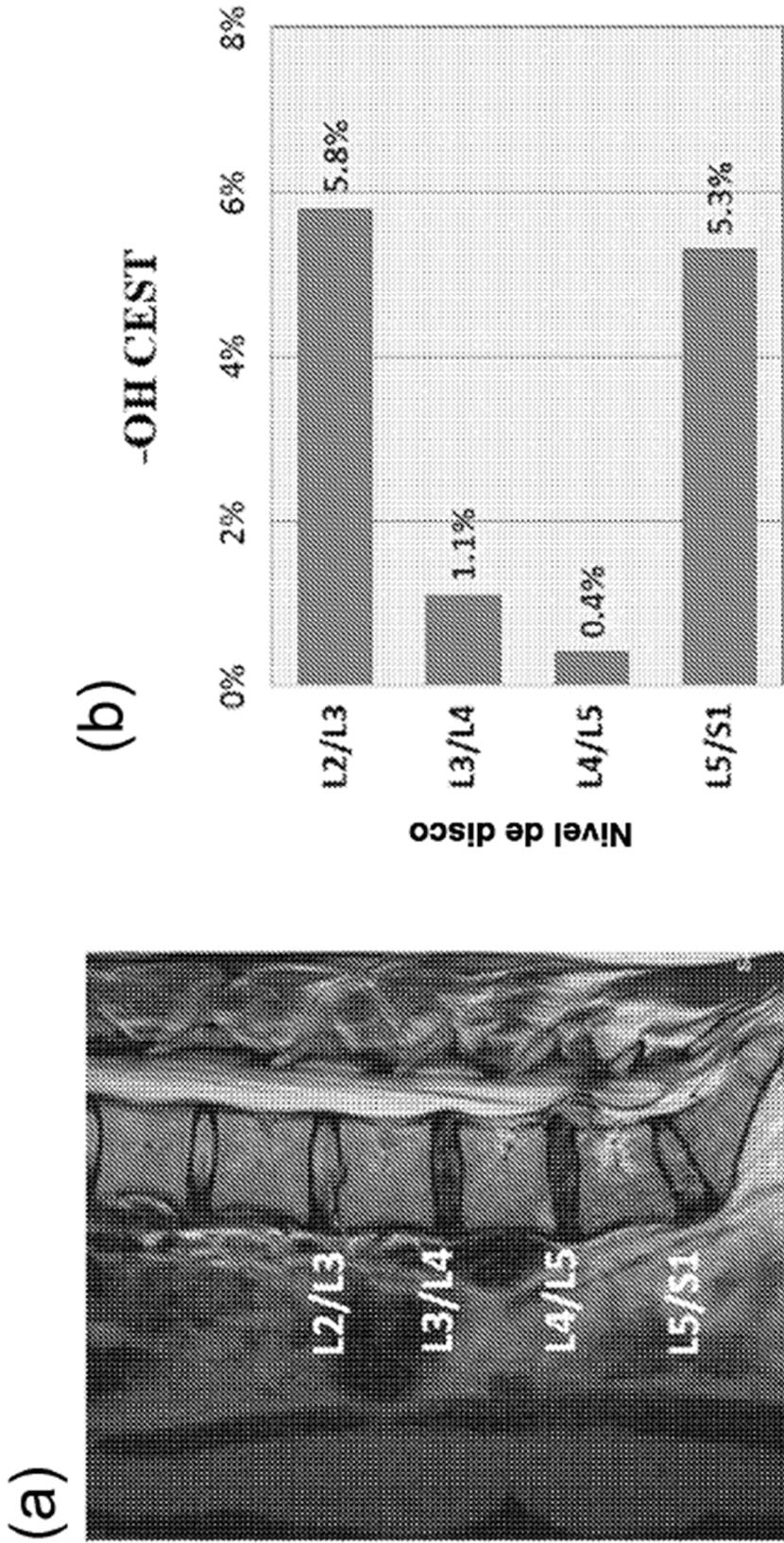


FIG. 6

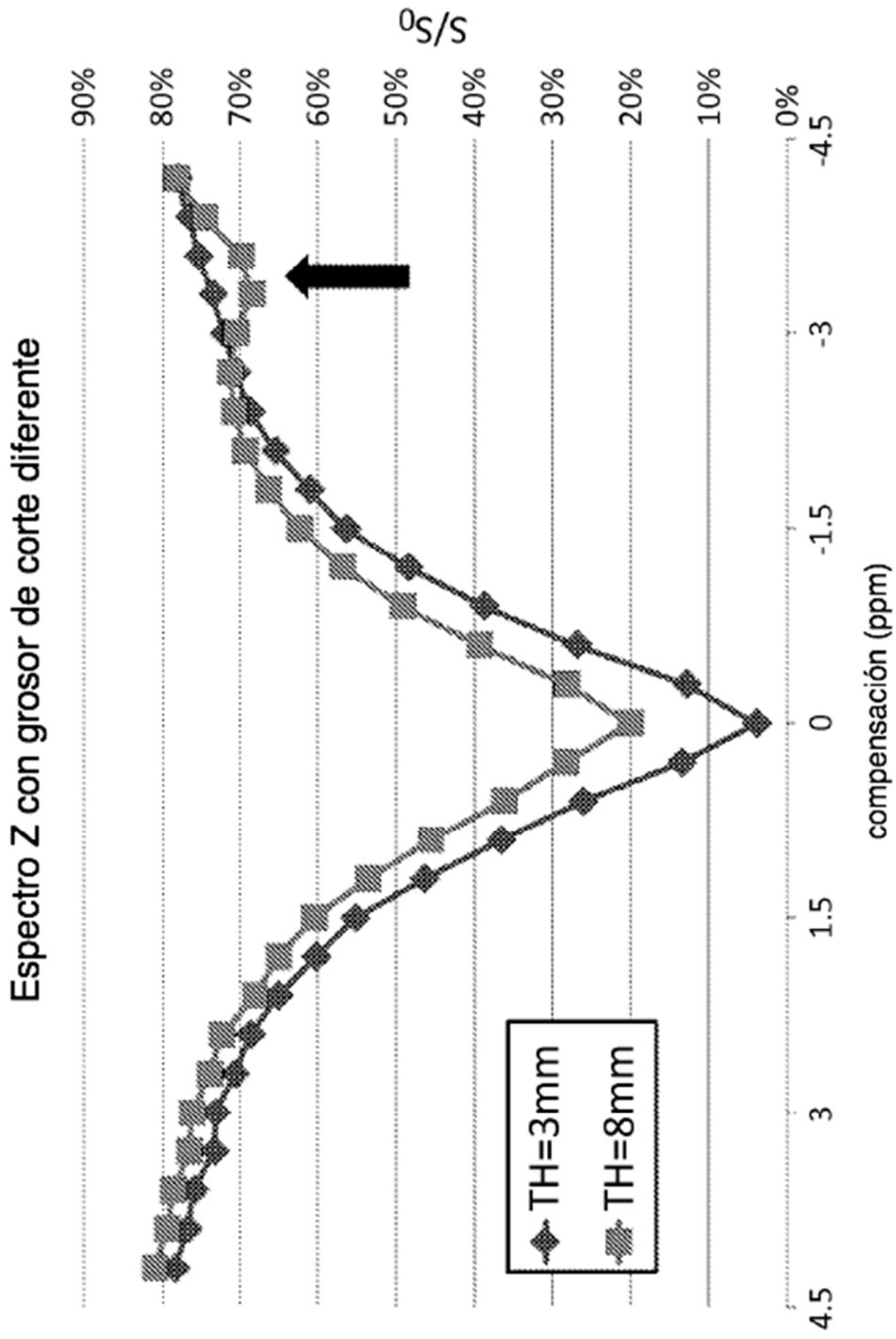


FIG. 7

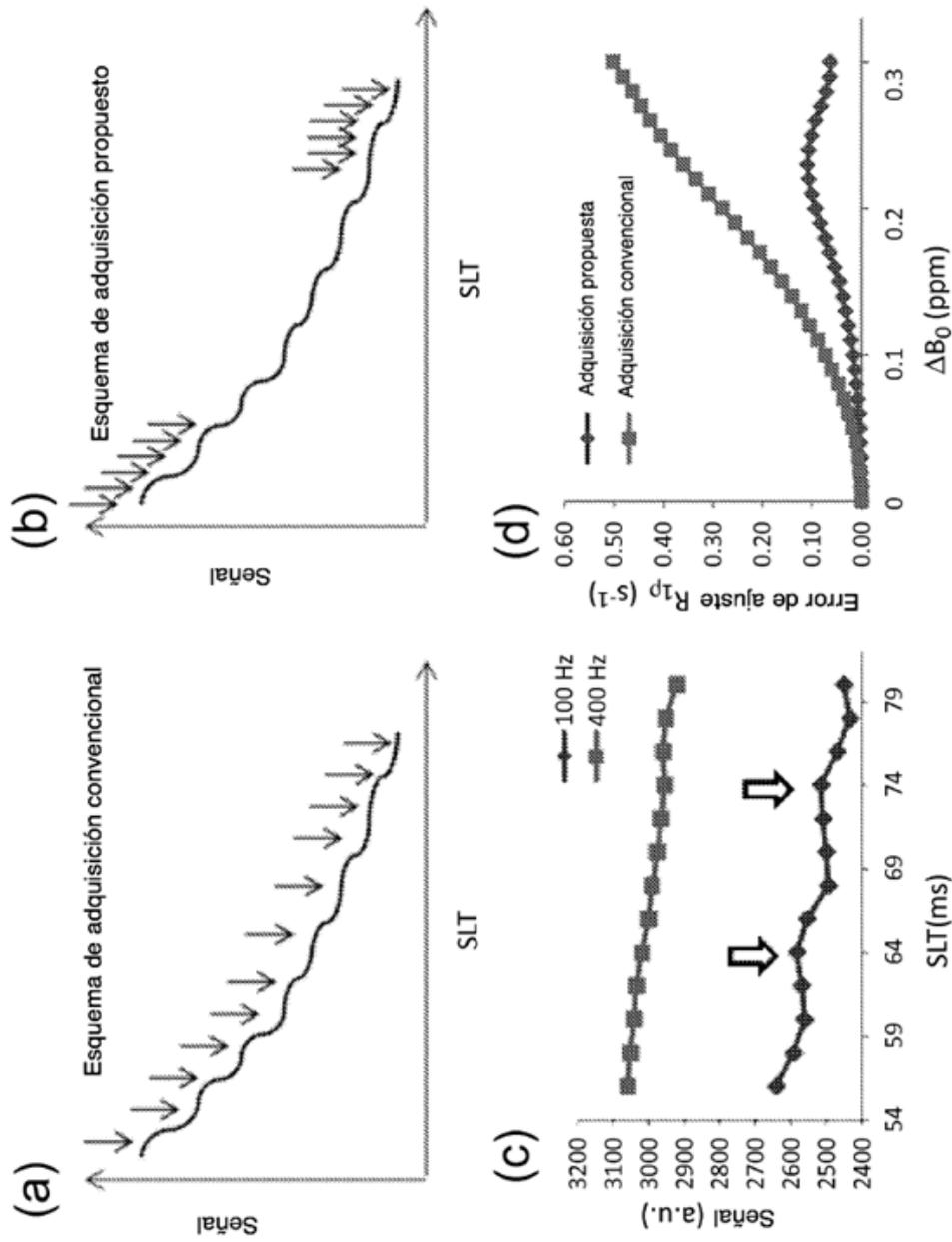


FIG. 8

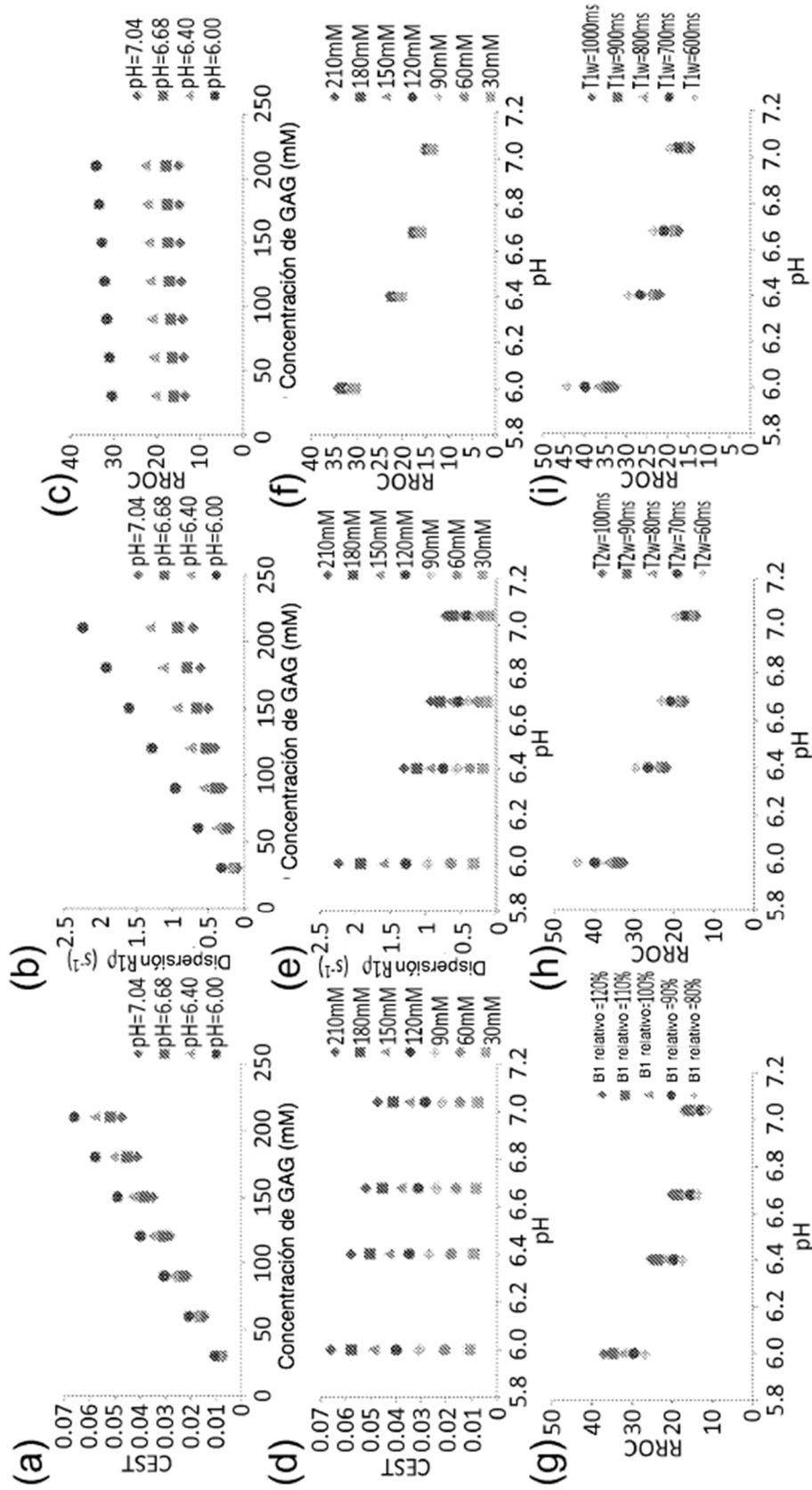


FIG. 9

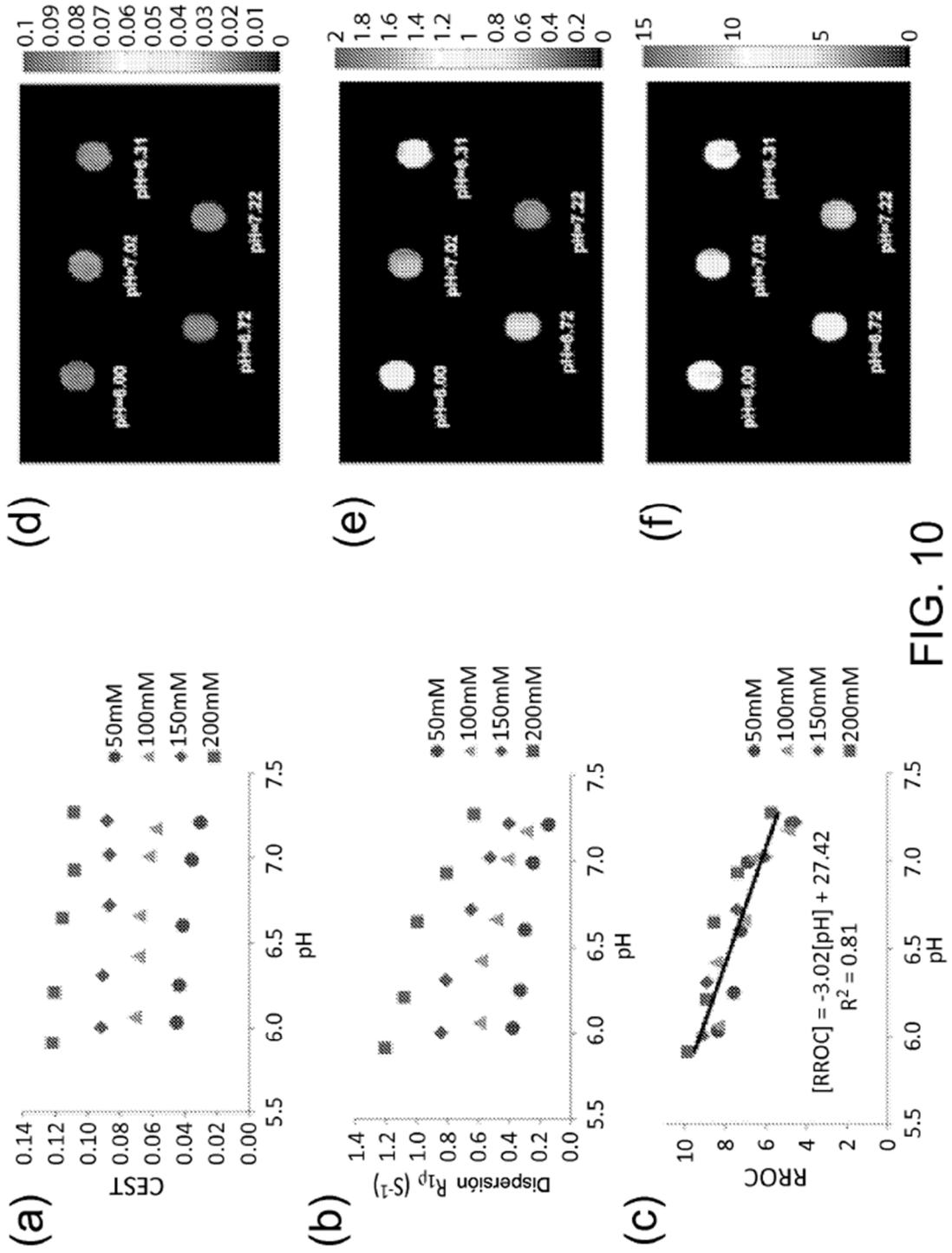


FIG. 10

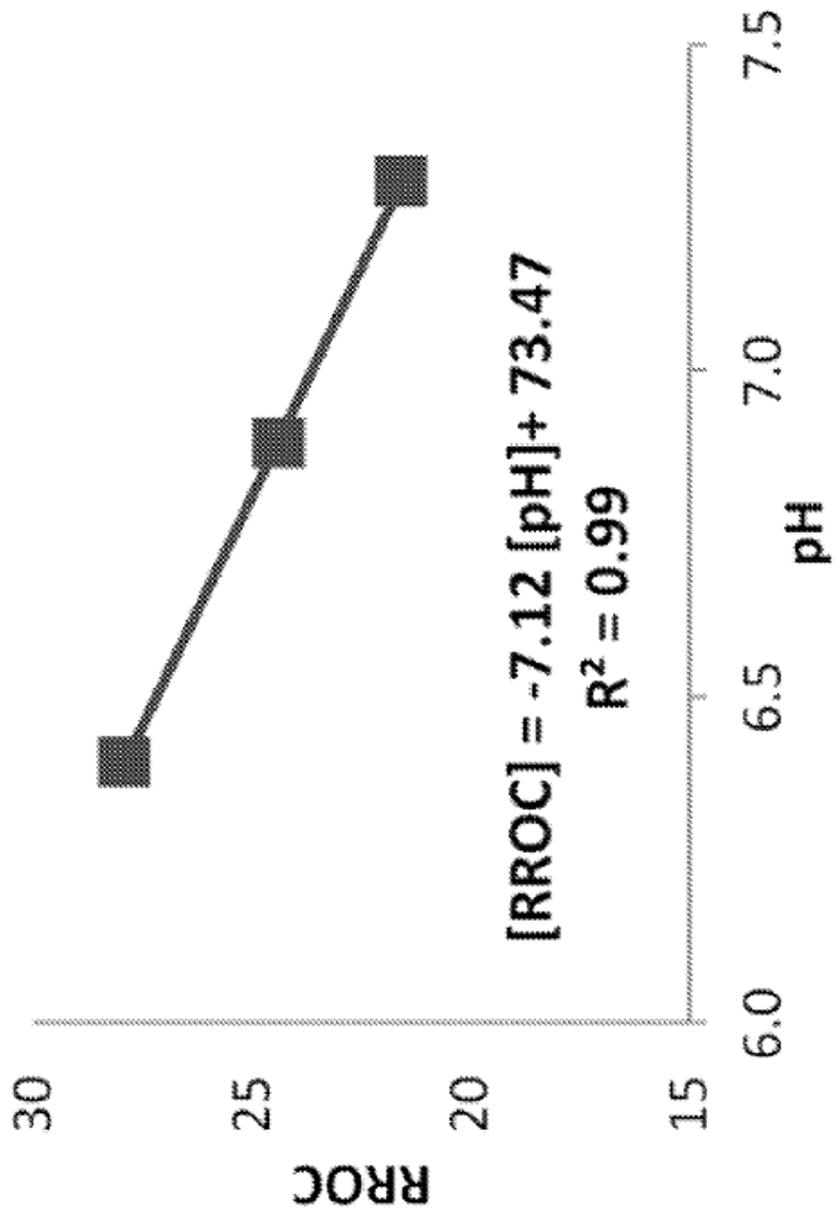


FIG. 11

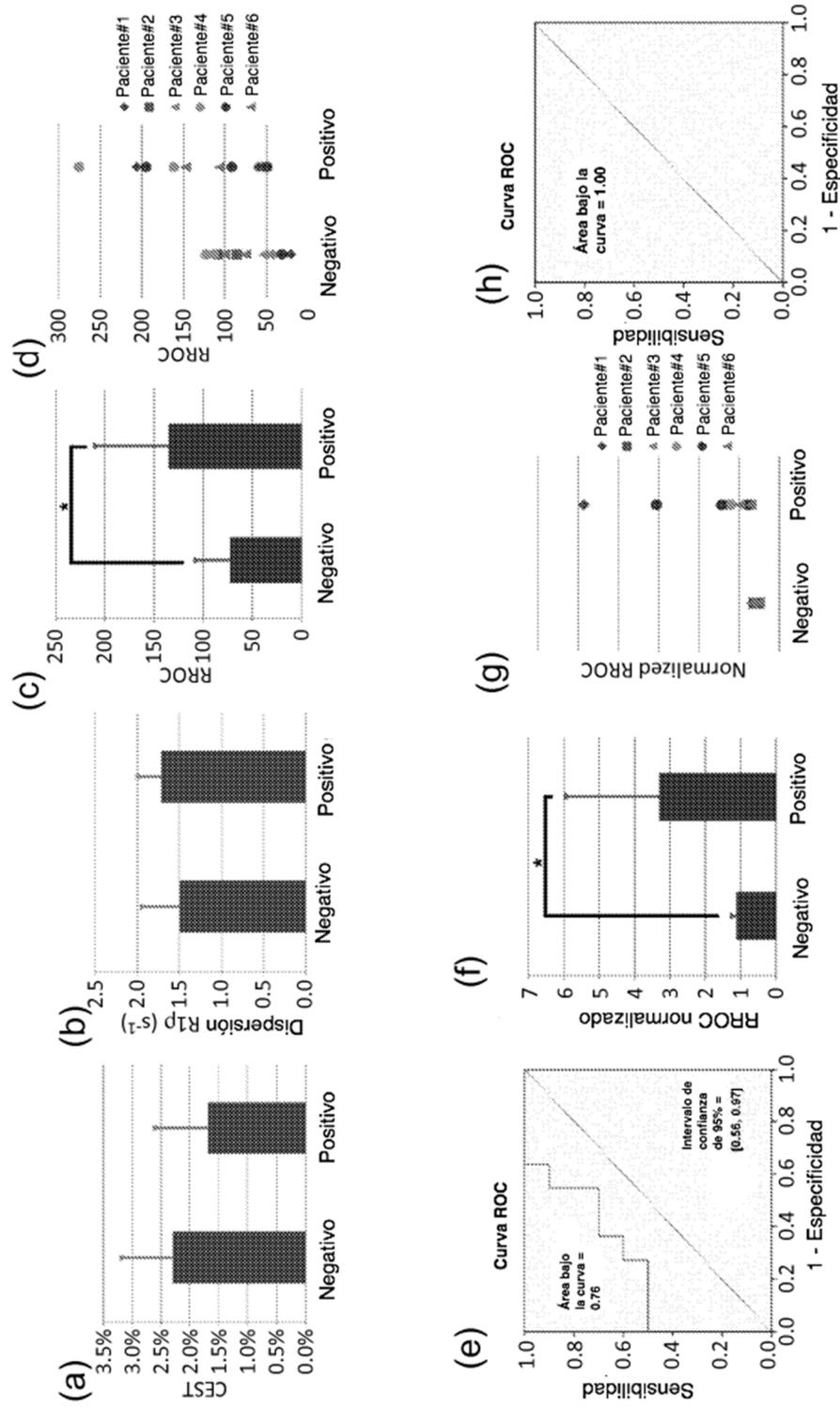


FIG. 12

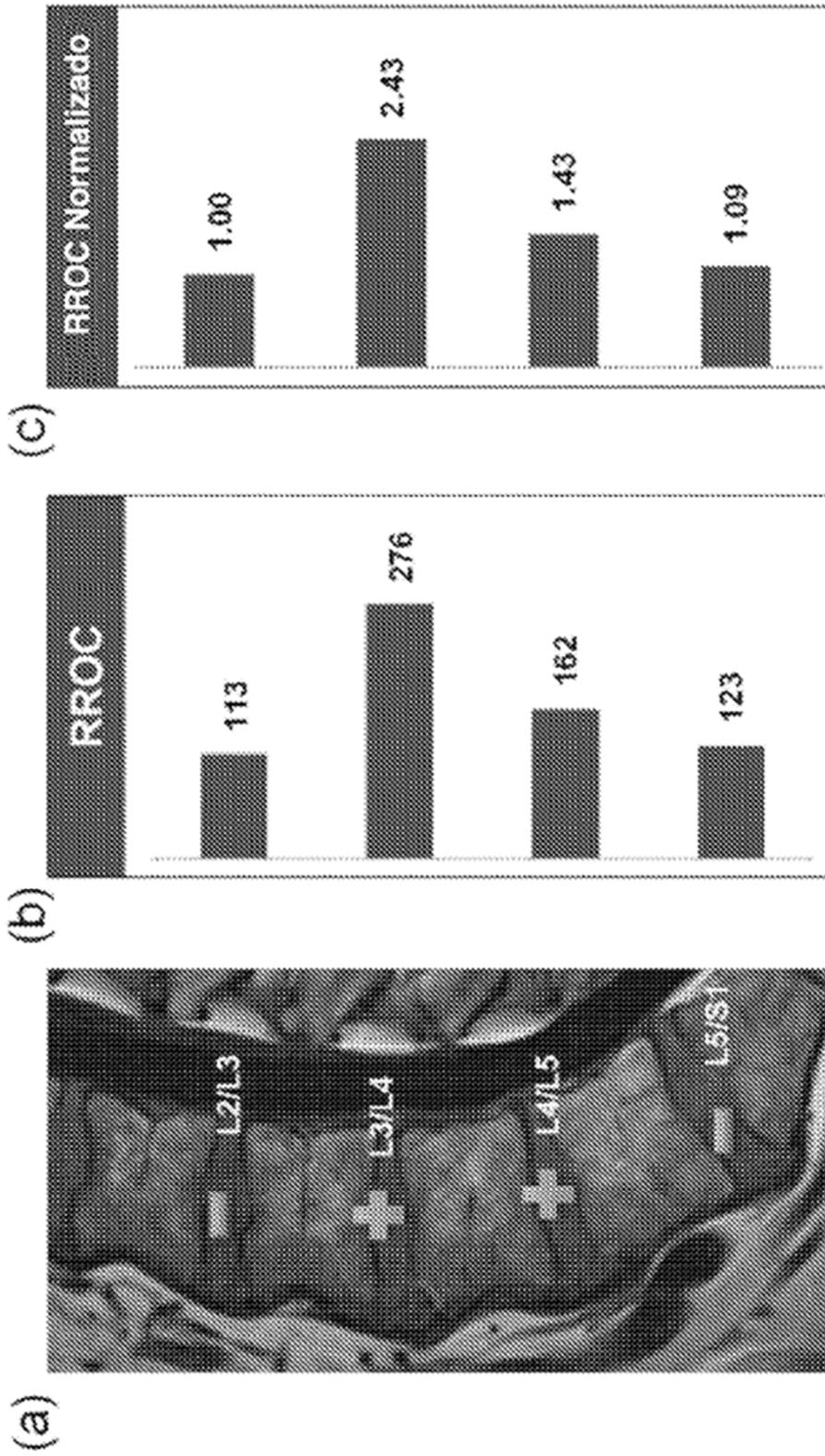


FIG. 13