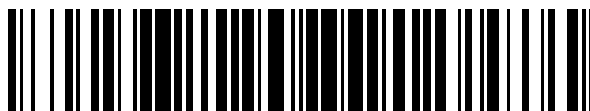


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 991**

51 Int. Cl.:  
**A61N 5/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05753177 .4**  
96 Fecha de presentación: **21.06.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1771225**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2007**

54 Título: **Usos cosméticos de radiación electromagnética**

30 Prioridad:  
**24.06.2004 GB 0414113**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.08.2012**

73 Titular/es:  
**VIRULITE DISTRIBUTION LIMITED  
53 HABGOOD DRIVE  
DURHAM DH1 2TN, GB**

72 Inventor/es:  
**DOUGAL, Gordon, Rex, Paterson**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 385 991 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**

Usos cosméticos de radiación electromagnética.

5 La presente invención se refiere al uso cosmético de radiación electromagnética para la reducción o alivio o eliminación o disminución de arrugas o líneas finas, especialmente, pero no exclusivamente, arrugas faciales y del cuello y otros signos de envejecimiento. La presente invención también proporciona el uso de radiación electromagnética para, de manera general, rejuvenecer la piel, retardar los signos de envejecimiento y mejorar la elasticidad, el tono y la apariencia de la piel. La invención también proporciona un método de tratamiento de la piel para reducir o aliviar o retardar o revertir los signos visibles de envejecimiento y para embellecer la piel.

**ANTECEDENTES**

10 En la piel joven, el colágeno que está justo por debajo de la superficie de la piel forma una red organizada con buena elasticidad y flexibilidad. A medida que pasan por la menopausia las mujeres y envejecen los hombres, ambos experimentan un aumento en la formación de arrugas en la piel y una disminución del grosor de la piel. Durante el envejecimiento, el colágeno cambia su estructura, afectando negativamente a la apariencia cosmética de la piel. El cambio en el colágeno también puede ser acelerado por la exposición prolongada a los rayos UV del sol.

15 Anualmente se gastan miles de millones de libras en la industria cosmética, y se estima que la mujer media gasta alrededor de 800 £ al año en productos para el cuidado de la piel y cosméticos.

20 Se conoce de la técnica anterior el uso de exfoliaciones químicas o preparaciones cosméticas, típicamente en la forma de cremas, para prevenir o mitigar las arrugas y como agentes antienvjecimiento. Tales preparaciones pueden contener productos vegetales y/o animales sintéticos o existentes en la naturaleza. Las composiciones se aplican por vía tópica y usualmente en una base regular, a fin de maximizar sus efectos. Sin embargo, hay limitadas evidencias de que incluso el uso persistente de tales composiciones alivie los signos visibles de envejecimiento.

25 Como alternativa a las preparaciones cosméticas y estiramientos faciales quirúrgicos, se conoce el uso de una fuente de radiación electromagnética de bajo nivel para conseguir respuestas fotoquímicas en la piel, denominado comúnmente bioestimulación. La bioestimulación depende del concepto de replicación y síntesis potenciadas, lo que da como resultado un aumento de la producción de colágeno, un aumento de la estimulación de los fibroblastos o un aumento en la síntesis de ADN. La energía de la luz es absorbida en los citocromos y porfirinas dentro de las mitocondrias celulares y las membranas celulares, produciendo una pequeña cantidad de oxígeno singlete. Por regla general, los pacientes requieren de cuatro a seis sesiones para las afecciones agudas y de seis a ocho tratamientos para las afecciones crónicas. Este tipo de tratamiento es tanto prolongado como caro.

30 Desde la década de los 90, se están usando láseres para la remodelación superficial de la piel y la eliminación de las arrugas. La eliminación de las arrugas es una técnica agresiva en la que se retira tejido capa a capa, invadiendo la dermis e induciendo de hecho una quemadura de segundo grado. Se deposita calor en la dermis, encogiendo el colágeno y tensando la piel. El láser induce la desnaturalización del colágeno en la dermis y la formación de reticulaciones, que dan como resultado un efecto tensor que estira la piel, reduciendo o eliminando así las arrugas.

35 Este proceso se denomina termólisis, y el calentamiento térmico de los tejidos es un requisito previo para la terapia, se cree que el umbral térmico para la termólisis es aproximadamente 70°C. Sin embargo, el problema con el tratamiento por láser tradicional es que el paciente puede sufrir quemaduras y por tanto tener una piel supurante, costras y enrojecimiento durante muchas semanas después del tratamiento. Además, se ha reportado una alta incidencia de hiperpigmentación después del tratamiento de eliminación de arrugas por láser de CO<sub>2</sub>.

40 La solicitud de patente internacional WO 99/19024 describe el uso de radiación electromagnética a 1072 nm para el tratamiento de afecciones asociadas con infecciones bacterianas y/o víricas. Hay por lo tanto una necesidad de un método alternativo, eficaz y seguro para reducir o aliviar o eliminar o disminuir las arrugas o líneas finas, rejuvenecer la piel, retardar los signos de envejecimiento y mejorar la elasticidad, el tono y la apariencia de la piel, y para embellecer en general la piel.

**45 BREVE COMPENDIO DE LA INVENCIÓN**

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar cosméticamente un área superficial de la piel facial de un mamífero reduciendo o aliviando o eliminando o disminuyendo las arrugas o líneas finas que aparecen como resultado del envejecimiento, comprendiendo el método irradiar la piel con una fuente de radiación electromagnética divergente centrada en 1072 nm y que tiene un ancho de banda de entre 10 y 120 nm, con una intensidad de al menos 500 µW/cm<sup>2</sup> y hasta 500 mW/cm<sup>2</sup>.

50

La referencia en la presente memoria a "tratar cosméticamente" incluye reducir o aliviar o eliminar o disminuir las arrugas o líneas finas, rejuvenecer la piel, retardar o revertir los signos visibles de envejecimiento, mejorar la elasticidad, el tono, la textura y la apariencia de la piel, y embellecer en general.

55 La referencia en la presente memoria a "piel" incluye la epidermis más externa, la capa basal y la dermis de la cara, el pecho, el brazo, la nalga, el muslo, el estómago o el cuello.

En toda la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras “comprender” y “contener” y variaciones de las palabras, por ejemplo “que comprende” y “comprende”, significan “que incluye pero no se limita a”, y no pretende (y no lo hace) excluir otras partes, aditivos, componentes, números enteros o etapas.

5 En toda la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular engloba el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, donde se usa el artículo indefinido, se entiende que la memoria descriptiva contempla tanto pluralidad como singularidad, a menos que el contexto requiera lo contrario.

Los rasgos, números enteros, características, compuestos, restos o grupos químicos descritos en conjunción con un aspecto, realización o ejemplo particular de la invención son para ser entendidos como aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en la presente memoria, a menos que sean incompatibles con los mismos.

10 Preferiblemente, la luz divergente está entre 10° y 50°. Por divergente se quiere decir que la radiación electromagnética emitida desde la fuente electromagnética tiene un ángulo medio divergente de al menos 5°. Preferiblemente la divergencia de la radiación electromagnética está en el intervalo 15° a 25° de divergencia de ángulo medio.

15 Por tanto, se apreciará que el método de la presente invención no incluye el uso de láseres como fuente de radiación electromagnética.

20 Se ha establecido ahora, sorprendentemente, que la radiación electromagnética de baja intensidad, de pequeño ancho de banda (alrededor de 10 nm a 120 nm y preferiblemente 50 nm) es eficaz en tratar cosméticamente la piel. Se postula que la manera en la que la radiación electromagnética lleva a cabo su acción es por medio de transmisión de energía a través de componentes/orgánulos celulares, enzimas tales como, pero no limitadas a, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Una molécula de agua que tiene un intervalo de longitudes de onda de radiación electromagnética que se ha hecho pasar a través de ella producirá varios picos de transmisión. Estos picos de transmisión están asociados con el intervalo de longitudes de onda de radiación electromagnética terapéutica preferido de la invención, y por tanto implica un papel para la molécula de agua en el mecanismo general de acción.

Según la invención, la longitud de onda de la radiación electromagnética está centrada alrededor de 1072 nm.

25 Los estudios de los autores de la invención han demostrado que las longitudes de onda centradas alrededor de una luz de ancho de banda único restringido centrado a 1072 nm son particularmente eficaces en reducir la longitud y área de las arrugas. Es de hacer notar que esta longitud de onda corresponde a las longitudes de onda de la emisión pico de un perfil de transmisión de la luz de una molécula de agua, y por tanto los autores de la invención creen que el mecanismo de acción está relacionado con el agua y posiblemente las membranas celulares.

30 Los estudios de los autores de la invención también han demostrado que 1072 nm y 880 nm incitan efectos opuestos sobre la viabilidad de los linfocitos *ex vivo*, siendo la primera longitud de onda protectora y la segunda citotóxica. Además, los autores de la invención proporcionan evidencias de que 1072 nm protegen frente a la linfotoxicidad mediada por UV.

Preferiblemente, la radiación electromagnética es continua o pulsada.

35 Preferiblemente, cuando la radiación electromagnética es continua, la intensidad es al menos 500  $\mu$ Watios/cm<sup>2</sup> y hasta 500 mWatios/cm<sup>2</sup>.

40 Preferiblemente, cuando la radiación electromagnética es pulsada, la intensidad es al menos 500  $\mu$ Watios/cm<sup>2</sup> de energía pico y la potencia media es hasta 500 mWatios/cm<sup>2</sup>. La potencia media es la potencia pico multiplicada por la proporción del tiempo total en que se aplica la radiación. Por ejemplo, si la potencia pico es 500  $\mu$ Watios/cm<sup>2</sup> y es pulsada durante 10  $\mu$ segundos a una frecuencia de 600 Hz, entonces la potencia media es 30  $\mu$ Watios/cm<sup>2</sup>.

Los métodos de la técnica anterior que se basan en un calentamiento térmico especifican un límite inferior de 0,5 Watios/cm<sup>2</sup>. La presente invención, que busca evitar cualquier efecto térmico, opera por debajo de este nivel.

Preferiblemente, cuando la radiación electromagnética es pulsada, la potencia media de la intensidad está en la región de 50-100  $\mu$ Watios/cm<sup>2</sup>.

45 Los autores de la invención han encontrado que la potencia puede oscilar adecuadamente de 500  $\mu$ Watios/cm<sup>2</sup> a 500 miliwatios/cm<sup>2</sup> continuos de potencia pico cuando se aplica sobre la piel. Por regla general, se usan 20 mWatios/cm<sup>2</sup> sobre la piel, pero este valor es dependiente de cómo es de graso o muscular el paciente, y por tanto de qué profunda es la arruga.

50 Preferiblemente, cuando la radiación electromagnética es pulsada se aplica durante periodos de al menos 10-15  $\mu$ segundos, y más preferiblemente se aplica a una frecuencia/velocidad de repetición en el intervalo de 300-900 Hz, más preferiblemente aún la frecuencia/velocidad de repetición está en, o alrededor de, 600 Hz.

Los estudios de los autores de la invención han demostrado que la radiación electromagnética puede ser bien coherente o bien no coherente, los resultados clínicos no son afectados por este parámetro.

Preferiblemente, la radiación electromagnética se aplica al área afectada durante al menos 30 segundos hasta unos minutos. Un tiempo de exposición típico está en la región de 3 minutos, sin embargo, para arrugas más profundas, este tiempo aumenta según la profundidad de la capa de grasa del individuo, y la exposición podría ser de hasta 10 minutos.

5 Se debe apreciar que la fuente de energía que emite la radiación electromagnética tendrá que producir más que la intensidad requerida para el efecto clínico, dado que los autores de la invención han demostrado que aproximadamente el 99% de la cantidad terapéutica de luz aplicada se pierde a través de la superficie de la piel durante el tratamiento. Por tanto, la intensidad de la radiación aplicada tendrá que ser corregida cuando se lleve a cabo un tratamiento.

10 A partir de lo anterior se entiende que la radiación electromagnética puede ser dirigida hacia el sitio diana bien de manera continua o bien de una manera interrumpida (pulsada). El principal beneficio de la interrupción es que permite la conservación de energía y facilita una salida de potencia pico mucho más alta, mejorando de este modo la respuesta cosmética.

15 Preferiblemente, la fuente de terapia de radiación electromagnética incluye medios para reducir la cantidad de radiación ambiental, que incide sobre el sitio de tratamiento.

Preferiblemente, la fuente de radiación electromagnética es un diodo emisor de luz. La radiación de tales dispositivos puede ser accionada eléctricamente, o la radiación puede ser suministrada a un aplicador por medio de un sistema de suministro de fibra óptica.

20 Preferiblemente, la fuente de radiación emisora incluye una unión PN dispuesta para emitir radiación con una longitud de onda centrada en o alrededor de las longitudes de onda especificadas mencionadas anteriormente. Un montaje de diodo de luz único puede incluir una pluralidad de uniones orientadas. Los diodos emisores de infrarrojo pueden estar dispuestos no sólo para emitir radiación a una frecuencia específica, sino también para emitir un haz divergente de alta intensidad. La luz divergente también puede proceder de polímeros emisores de luz.

25 La presente invención se refiere a un método para tratar cosméticamente la piel con radiación electromagnética divergente que tiene una longitud de onda en el intervalo de visible a infrarrojo y centrada alrededor de 1072 nm. La radiación electromagnética se aplica a una intensidad baja, de tal modo que no se causa daño térmico ni calentamiento a la piel ni a ningún otro tejido u órgano alrededor del área de tratamiento. De esta manera, el método de la presente invención difiere de la técnica anterior, ya que los efectos son no térmicos y evitan la termólisis. Además, la presente invención es contraria a lo esperado respecto a la bioestimulación, dado que el concepto de aumento de la replicación y síntesis es evitado de forma concluyente. De hecho, los autores de la invención han encontrado que las longitudes de onda empleadas en la presente invención inhiben específicamente la síntesis de ADN, inhiben la producción de colágeno e inhiben la replicación de fibroblastos. Los resultados de los autores de la invención han demostrado que la calidad del tejido conectivo entre las células es mejorada sorprendentemente por la inhibición de la producción de colágeno en lugar de aumentar la densidad del colágeno para conseguir el efecto deseado, como por la técnica anterior.

30

35

La invención proporciona un método para mejorar las características elásticas de un área superficial de la piel de un mamífero que comprende irradiar la piel con una fuente de radiación electromagnética divergente de 1072 nm.

40 Los autores de la invención han encontrado, usando el método de la presente invención, que las fibras de elastina se vuelven menos fragmentadas y más uniformes, por ello mejoran las características elásticas de la piel. Por ejemplo, cuando se trató la piel del pecho, los autores de la invención encontraron que no sólo mejoró la elasticidad de la piel, sino también el tono tisular. Los autores de la invención también han encontrado que el método de la presente invención mejora la viabilidad celular.

45 La invención proporciona un método para reducir el área superficial y el volumen de tejido de un área superficial de la piel de un mamífero que comprende irradiar la piel con una fuente de radiación electromagnética divergente centrada alrededor de 1072 nm.

Los resultados obtenidos por el método de la presente invención demuestran que reduciendo el volumen de piel por encima de los ojos y por debajo de los ojos, se puede reducir la apariencia caída de los lados de la cara. De esta manera, los autores de la invención han demostrado que la reducción del volumen tisular y del área superficial de la piel, junto con la mejora en las características elásticas, proporciona los efectos cosméticos deseados.

50 Se apreciará que, en un cuarto aspecto del método de la presente invención, ésta también se puede usar para prevenir o reducir o revertir el daño en la piel causado por la luz UV o el fotoenvejecimiento.

La invención también proporciona el uso de radiación electromagnética divergente centrada alrededor de 1072 nm para tratar cosméticamente un área de piel superficial.

55 Preferiblemente, todos los aspectos de la invención incluyen además uno cualquiera o más de los rasgos del primer aspecto de la invención descritos anteriormente en la presente memoria.

Se ha demostrado que la terapia con luz, tanto láser como LED, proporciona un beneficio clínico en muchos escenarios terapéuticos. Los efectos de la luz centrada alrededor de longitudes de onda de 1072 nm y 880 nm, usando un intervalo de protocolos de irradiación únicos y múltiples, han sido evaluados en cuanto a su efecto sobre linfocitos humanos recién preparados estimulados con fitohemaglutinina (PHA). El número de células viables permaneció significativamente más alto después de la irradiación con 1072 nm, y fue significativamente más bajo después de la irradiación con 880 nm comparado con controles no tratados, siguiendo una irradiación única diaria durante un periodo de cinco días. Además, el número de células fue significativamente más alto después de un pretratamiento con 1072 nm y exposición a UVA, comparado con células tratadas con UVA solamente. Las células irradiadas dos veces en el Día 3 después de la recolección con diversas bandas de onda confirman en el Día 5 un aumento en el % de viabilidad celular después de la exposición a 1072 nm, y 1072 nm alternando con irradiación de 1268 nm, y una disminución en el % de viabilidad celular después de la irradiación con 880 nm sola. Estas observaciones conducen a los autores de la invención a creer que la luz centrada alrededor de una longitud de onda de 1072 nm puede ser útil en un método *ex vivo* para mejorar la viabilidad de las células inmunitarias.

Hay descrito pero no reivindicado un dispositivo emisor de luz portátil para el tratamiento cosmético de la piel; el dispositivo comprende un medio de energía para suministrar energía a un medio emisor de luz que produce radiación electromagnética divergente centrada alrededor de 1072 nm, un panel flexible o con forma a través del cual pasa la luz y una carcasa a la cual está unido el panel flexible o con forma, de tal modo que el dispositivo puede ser adaptado al contorno de una parte del cuerpo que requiere tratamiento cosmético.

Preferiblemente, el medio de energía es una batería o es electricidad de la red.

Preferiblemente, el dispositivo emisor de luz es un LED o más preferiblemente una pluralidad de LEDs. Se apreciará que el dispositivo de la presente invención no es un dispositivo láser.

Preferiblemente, el dispositivo también puede comprender al menos una o más uniones PN dispuestas para emitir radiación con una longitud de onda centrada en o alrededor de una cualquiera o más de las longitudes de onda especificadas seleccionadas del grupo que comprende 940 nm, 950 nm, 1040 nm, 1060 nm, 1072 nm y 1267 nm.

## 25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención será descrita ahora con referencia a las siguientes Figuras, en donde:

La Figura 1 muestra vistas en planta (1A), lateral (1B) y transversal (1C y 1D) de uno de los dispositivos para poner en práctica el método de la invención;

La Figura 2 muestra una vista lateral de una alternativa del dispositivo para poner en práctica el método de la invención;

La Figura 3 muestra una vista frontal, la Figura 4 muestra una vista lateral y la Figura 5 una vista trasera de una alternativa adicional del dispositivo para poner en práctica el método de la invención;

La Figura 6, columnas 1 y 2, muestran el % de viabilidad celular de Blastos PHA después de un tratamiento único de 3 min de IR1072 en el Día 3 y Día 5 antes de ensayar la apoptosis en el Día 5. Los datos se compararon con controles respectivos, y se analizaron usando un ANOVA, donde  $*p < 0,05$ .

Las columnas 3, 4 y 5 muestran el % de viabilidad celular de Blastos PHA después de tratamientos múltiples de 5 x 3 min de IR1072 y IR880 en el Día 3 y Día 5, antes de ensayar la viabilidad celular en el Día 5. Los datos se compararon con controles respectivos, y se analizaron usando un ANOVA, donde  $**p < 0,01$ .

La Figura 7 muestra el % de viabilidad celular de Blastos PHA después de tratamientos únicos diarios de 3 min irradiados bien con IR1072 o bien con IR880. La viabilidad celular se determinó usando el kit de apoptosis de Anexina V. Los datos de IR1072 se analizaron en comparación con los datos de IR880 respectivos, usando un ANOVA, donde se vieron diferencias significativas en los Días 1, 3, 4 y 5,  $*p < 0,01$ , y una tendencia a la significancia en el Día 2.

La Figura 8 muestra Blastos PHA que fueron pretratados 4 x 3 min en el Día 3, y 1 x 3 min en el Día 4 con IR1072, y después se incubaron las células durante 4 horas antes de la exposición a UVA durante 40 min. Después las muestras se ensayaron en cuanto a la viabilidad celular. Los datos fueron analizados y comparados con UV tratados solo, usando un ANOVA, donde  $**p < 0,01$ .

La Figura 9 muestra el efecto de diversas bandas de onda de Blastos PHA tratados en el Día 3 durante 2 x 3 minutos y analizados. Los datos fueron analizados y comparados con el control no tratado usando un ANOVA múltiple, donde  $**p < 0,01$ .

La Figura 10 muestra un Western Blot que muestra el efecto del tratamiento IR sobre los niveles de expresión de la proteína iNOS. Se expusieron los Blastos PHA diariamente a una fuente infrarroja 1 x 3 min, IR1072 o IR880, y se ensayaron en los Días 3 y 5 en cuanto a la expresión de la proteína iNOS usando un inmunoblotting cuantitativo con un anticuerpo anti-iNOS selectivo (Autogen Bioclear, Reino Unido) (los Inmunoblots se resonaron y estandarizaron

con un anticuerpo de beta-actina (Sigma, Reino Unido).

Carril 1, células de control (Día 5); Carril 2, células tratadas con IR1072 (Día 5); Carril 3, células tratadas con IR880 (Día 5); Los datos fueron comparados mediante un ANOVA múltiple con un nivel de significancia fijado a  $p < 0,01$ .

5 La Figura 11A muestra los efectos después de 2 meses de un tratamiento diario con 1072 nm comparado con la Figura 11B del mismo individuo antes de que comenzara el tratamiento, la Figura 11C muestra una imagen antes superpuesta y una imagen después de 1 mes de tratamiento con 1072 nm sobre el mismo individuo.

La Figura 12 muestra una representación esquemática del protocolo para los estudios humanos.

La Figura 13A (antes) y 13B muestran el efecto de tratamientos múltiples y la reducción de las bolsas bajo los ojos.

Las Figuras 14A, B y C muestran un individuo diferente de la Figura 12 que ha sufrido el mismo protocolo.

## 10 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Hay varios productos que reivindican eficacia en el tratamiento de las líneas y arrugas utilizando luz no térmica en las longitudes de onda azules, amarillas o rojas. En la presente invención los autores de la misma han intentado identificar cualquier respuesta fisiológica que fuera dependiente de la longitud de onda. Las longitudes de onda usadas oscilaron de 660 nm a 1268 nm, se examinaron diversos anchos de banda restringidos tanto solos como en combinación. Los autores de la invención han encontrado que un único ancho de banda de luz restringido centrado en 1072 nm pareció tener un efecto positivo sobre los linfocitos humanos. Se demostró que esta longitud de onda de luz protege a los linfocitos humanos frente al efecto dañino de la radiación UV, un conocido agente de fotoenvejecimiento.

20 El dispositivo preferido para poner en práctica el método de la invención es un dispositivo 1 emisor de luz portátil, que puede ser accionado bien por batería o bien por la red eléctrica. El dispositivo sigue los contornos del área 2 a ser tratada, la cara, ojos, brazos, muslos o pecho.

25 La Fig 1A muestra la vista en planta, vista lateral (1B) y vistas transversales (1C y 1D) de un dispositivo emisor de luz manual portátil, que tiene la forma conveniente de un ojo. La luz infrarroja pasa a través del panel 3 transparente hacia la piel a ser tratada. La fuente de alimentación a la unidad se conecta a través del área 4 y el dispositivo se sujeta en su lugar mediante el cuerpo 5. El panel 3 es ligeramente cóncavo para seguir los contornos del área a ser tratada y para evitar una presión indebida sobre el ojo cuando se coloca sobre la órbita. El espacio 6 contiene la electrónica de control, que controla la intensidad y duración del ciclo de tratamiento. También aloja los LEDs 7. La Figura 2 muestra una realización alternativa del dispositivo para su colocación sobre una parte más grande de la piel.

30 Con referencia a las Figuras 3 a 5 de los dibujos acompañantes, una segunda realización de acuerdo con la presente invención está en la forma de una fuente de radiación multipanel de longitudes de onda estrechas. En este caso, una pluralidad de paneles 7 están montados en una relación lado a lado sobre las bisagras 8 que, a su vez, están conectadas a un pie 9 por medio de los brazos 10 y 11. La disposición es tal que los paneles se pueden mover unos en relación a los otros y el pie puede ser ajustado para cambiar la dirección de iluminación. El pie bien se extiende desde el suelo o bien está unido a una silla o cama.

35 La pared frontal de cada panel 7 es transparente y, montada por debajo de la pared frontal, hay una matriz de dispositivos 12 emisores de radiación.

40 Como con las realizaciones del dispositivo descritas anteriormente, esta realización de la invención incluye electrónica de control para limitar el tiempo de aplicación de la radiación y para monitorizar la radiación ambiental y proporcionar una alarma cuando el valor umbral de la radiación ambiental es excedido.

Los dispositivos de la presente invención se pueden usar para la mejora cosmética de la celulitis que afecta a las nalgas y piernas, y del tono tisular de los pechos, también se pueden usar para tratar la cara como un todo.

## Métodos y materiales

### *Preparación de las células*

45 Se obtuvo sangre entera humana heparinizada de voluntarios sanos, y las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) se separaron usando Lymphoprep (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Noruega) y se centrifugaron a 400 X g durante 25 min. Las PBMCs fueron aisladas de la capa interfacial, se lavaron 2 veces en un lavado RPMI sin L-glutamina (Gibco™) y se resuspendieron en RPMIcm (lavado RPMI + suero fetal de ternero al 10% v/v + Penicilina/Estreptomicina al 1% + L-Glutamina al 1%). La densidad de las células se ajustó de manera acorde a  $1 \times 10^6$  células/ml con RPMIcm. Se añadieron a las células 100  $\mu$ l de PHA ("Lectin", Sigma) para preparar los Blastos PHA. Las células se incubaron a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%.

### *Configuración experimental*

Los cinco protocolos se establecieron como sigue:

1. Se expusieron los Blastos PHA a una fuente de luz infrarroja, IR1072, en los Días 3, 4 y 5 después de la recolección. Usando placas de cultivo de 35 mm, todas las células fueron expuestas a un tratamiento único de 3 min de luz infrarroja. Después de los tratamientos diarios, se analizaron muestras celulares individuales replicadas en cuanto al % de viabilidad celular en el día 5.

2. Se expusieron los Blastos PHA a IR1072 y IR880 en el Día 3 y 5 para tratamientos de 5 x 3 min y se analizaron en el Día 5. La viabilidad celular y la expresión de iNOS se determinó después de cada tratamiento en el Día 5.

3. Se expusieron los Blastos PHA diariamente desde el Día 1 en adelante a una dosis única de 3 minutos de IR1072 y IR880. Después de la irradiación diaria, se analizaron las células en cuanto al tanto % de viabilidad celular.

4. Se expusieron los Blastos PHA a IR1072 en el Día 3 para un tratamiento de 4 x 3 min y en el Día 4 para un tratamiento único de 3 min. Después las células se dejaron durante 4 horas antes de la exposición a UVA durante 40 min, y después se determinó la viabilidad celular.

5. Las células se incubaron hasta el Día 3 en tubos de cultivo tisular y se expusieron a diversas bandas de onda durante 2 x 3 minutos en el Día 3. Las bandas de onda incluyeron IR660 nm, IR880 nm, IR950 nm, IR1267 nm, IR1072 nm, IR1072 alternando con IR1268 nm, IR1072 y IR1267 nm, pulsación de 1 µs de IR1072 nm y pulsación de 7 µs de IR1072 nm. Las células fueron analizadas en cuanto al % de viabilidad celular inmediatamente después de la irradiación.

Notablemente, para todos los protocolos usados, la temperatura de todas las placas se mantuvo a la temperatura ambiente en todos los tratamientos de IR y de control.

#### *Kit de Apóptosis de Anexina*

Las viabilidades celulares se analizaron usando el kit de Detección de Apóptosis de Anexina V (Autogen Bioclear, Reino Unido). La apoptosis puede ser detectada por el cambio en la posición de la fosfatidilserina (PS, por sus siglas en inglés) en la membrana celular. En las células no apoptóticas, la mayoría de las moléculas de PS están localizadas en la capa interna de la membrana plasmática, pero poco después de inducir la apoptosis, la PS se redistribuye hacia la capa externa de la membrana. La PS expuesta puede ser fácilmente detectada con Anexina V. Las células con Anexina V unida mostraron una tinción verde en la membrana plasmática. Las células que habían perdido la integridad de la membrana mostraron una tinción roja (PI) en todo el citoplasma y un halo de tinción verde en la superficie celular (membrana plasmática). Se enjuagaron las células a  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  por placa y se resuspendieron en Tampón de Unión de Ensayo. Se añadieron a las células 5 µl de Anexina V y 10 µl de Yoduro de Propidio (PI, por sus siglas en inglés) antes de incubar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15-30 min. Las células se observaron bajo un set de filtro dual para FITC (Isotiocianato de fluoresceína, por sus siglas en inglés) y rodamina usando microscopía de fluorescencia, y fueron contadas en ciego por al menos dos observadores.

#### *Análisis Western Blotting*

Suspensiones de gránulos celulares derretidos se homogeneizaron en hielo con un homogeneizador Dounce. Los niveles de proteínas en la suspensión celular se determinaron usando el Ensayo de Lowry usando albúmina de suero bovino como patrón. Los niveles de proteínas se ajustaron a 10 µg de proteína que se cargaron en cada carril. Se realizó una electroforesis estándar usando un gel de poliacrilamida al 6%. Después de la electroforesis, la proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (NC) durante 2,5 horas a 50V. La membrana de NC se bloqueó con leche seca no grasa al 5% en 1 x de suero salino tamponado con Tris (TBS) que contenía Tween 20 (Sigma, Reino Unido) al 0,2% durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana de NC se incubó con anticuerpo primario iNOS (dilución 1:2500) durante una noche a 4°C. La membrana de NC se lavó 4 x 10 min con tampón de lavado (leche seca no grasa al 2,5%, Tween 20 al 0,2% en TBS) y se incubó con anticuerpo secundario enlazado a peroxidasa de rábano picante anticonejo (dilución 1:2000) durante 1 hora. La membrana de NC se lavó 4 x 10 min con tampón de lavado. Las bandas de proteína de la NC se visualizaron usando un sustrato de luminol 68 mM, ácido p-cumárico 1,25 mM, peróxido de hidrógeno al 30%. El inmunoblot fue expuesto a Hyperfilm™ durante 3 min en una cassette de película y se reveló y fijó a temperatura ambiente. Las bandas de proteína fueron cuantificadas usando un densitómetro ImageQuant® en el intervalo lineal de la película, para determinar la expresión de iNOS relativa. Los valores de densidad óptica (estandarizados con beta-actina) fueron comparados usando un ANOVA múltiple con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Los datos se obtuvieron de experimentos replicados en  $n = 3$  individuos.

#### *Estadística*

La apoptosis se midió usando el % de viabilidad celular, esto es,

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \left[ \frac{\text{N}^\circ \text{ de células viables}}{\text{N}^\circ \text{ de células totales}} \right] * 100$$

Los datos se dan como la media  $\pm$  desviación estándar.

Se hicieron comparaciones entre células de control y tratadas mediante un ANOVA múltiple y se expresaron como media  $\pm$  DE, con un intervalo de confianza de 95%. El análisis estadístico se llevó a cabo usando Prism 3.2.

#### *Fuentes de luz*

- 5 Tanto las fuentes de luz de 880 nm como de 1072 nm emitían luz multimodal de ancho de banda menor que 50 nm, modo continuo de energía óptica 5 mw/cm<sup>2</sup>.

#### *Estudios humanos*

- 10 Las longitudes de onda usadas oscilaron de 660 nm a 1268 nm, se examinaron diversos anchos de banda restringidos tanto solos como en combinación. Se reclutaron 40 voluntarios de la población general, de edades entre 45 años y 65 años, 38 mujeres, 2 hombres. Cada individuo fue fotografiado usando iluminación fija y distancia fija. Las vistas tomadas fueron: izquierda del centro de la cara; derecha del centro de la cara; perfil izquierdo de la cara y perfil derecho de la cara. La distancia e iluminación constantes facilitaron una comparación directa entre las fotografías "Antes" y "Después".

- 15 Cuando se tomaron las fotografías "Después" se aseguró que los ojos estaban abiertos en una cantidad similar en comparación con la fotografía "Antes". Esto permitió entonces la comparación de los pliegues de la piel por encima y las bolsas por debajo de los ojos. A los participantes se les pidió específicamente no sonreír ni tener cualquier expresión en la cara cuando se tomaron las fotografías. A cada uno de los participantes se le dio un dispositivo activo y se les pidió tratar el área de la piel alrededor de los ojos durante aproximadamente 30 minutos cada día (15 minutos por área de ojo). Se eligió la piel alrededor de los ojos, ya que es más móvil y más proclive a mostrar una  
20 mejora en la elasticidad de la piel.

#### **Ejemplo 1**

Usando un intervalo de protocolos, el tratamiento con IR1072 incitó consistentemente un significativo efecto protector sobre la supervivencia de los blastos PHA. En contraste, el IR880 fue consistentemente citotóxico comparado con las células de control y tratadas con IR1072.

- 25 Después de la irradiación con IR1072, el % de viabilidad celular aumentó significativamente en el Día 5 ( $p < 0,05$ ) comparado con los datos de control siguiendo tanto un protocolo de tratamiento de 5 x 3 min único como múltiple en el Día 3 y 5 (Figura 6). En el siguiente protocolo, células irradiadas con 5 x 3 min de IR1072 y IR880, el % de viabilidad celular disminuyó significativamente después del tratamiento con IR880 en el Día 5 ( $p < 0,01$ ) comparado con las células tratadas con IR1072 (Figura 6). El protocolo de tratamiento diario incitó una disminución significativa en el % de viabilidad celular para células tratadas con IR880 durante un periodo de 8 días [Día 1 ( $p < 0,01$ ), Día 3 ( $p < 0,01$ ), Día 4 ( $p < 0,05$ ), Día 5 ( $p < 0,05$ ) y Día 8 ( $p < 0,05$ )], comparado con las irradiadas con IR1072 (Figura 7), en experimentos paralelos. Después de un pretratamiento con IR1072, y una exposición posterior a UVA, el % de viabilidad celular permaneció significativamente más alto ( $p < 0,01$ ) comparado con células tratadas sólo con UVA (Figura 8). Después de la irradiación con diversas bandas de onda, de nuevo las células expuestas a IR880 mostraron una disminución significativa en el % de viabilidad celular ( $p < 0,01$ ), mientras que el % de viabilidad celular fue más alto después del tratamiento con IR1072 ( $p < 0,01$ ) y luz de banda de ondas IR1072/IR1268 alternadas ( $p < 0,01$ ), todos comparados con controles no tratados (Figura 9). Todas las demás longitudes de onda y condiciones ensayadas no tuvieron un efecto significativo sobre la viabilidad celular.

- 40 Aunque las longitudes de onda en el intervalo 855-905 nm pueden estimular la proliferación de fibroblastos, los autores de la invención han encontrado que la luz en este intervalo parece ser linfotóxica. Los efectos citotóxicos y protectores sobre las células son rápidos, ya que el análisis se llevó a cabo a las 2 horas de exposición a la luz IR, y ambos efectos fueron de larga duración, siendo observados al menos 2 días después de los tratamientos. Los estudios de los autores de la invención demuestran claramente que la luz en el intervalo 1050 nm-1100 nm mejora la viabilidad celular después de protocolos de tratamiento tanto únicos como múltiples. Mantener la viabilidad de los  
45 linfocitos en presencia de factores adversos es de significación, ya que las endo- y exo-toxinas bacterianas son factores leucotóxicos, el efecto de los cuales puede ser reducido mediante la irradiación de las células inflamatorias por luz de 1072 nm  $\pm$  25 nm. Se ha postulado durante mucho tiempo que la luz IR tiene un efecto protector frente al UVA, sin embargo el intervalo exacto de longitudes de onda era desconocido. Estos presentes resultados sugieren que la luz de 1072 nm  $\pm$  25 nm es protectora frente a algunos de los efectos dañinos del UVA.

#### **Ejemplo 2**

- 50 Se ha demostrado que el óxido nítrico es un potente inhibidor de la apoptosis en diversos tipos de células. El NO se difunde muy rápidamente tanto a través del agua como de las membranas celulares, y la iNOS se produce más rápidamente y eficientemente que la eNOS y la nNOS. La iNOS puede funcionar sin la elevación de los niveles de calcio intracelular, y su actividad es rápidamente inducible en células inmunitarias, por ejemplo, monocitos y  
55 macrófagos activados primariamente, después de la exposición a citocinas y productos microbianos.



A fin de elucidar el mecanismo potencial que subyace en la observada citoprotección de larga duración incitada por la exposición a IR1072, se realizó un inmunoblotting cuantitativo sondando la expresión de iNOS, en comparación con el control y IR880 nm. Después de un pretratamiento con IR1072, se detectó en el Día 5 un significativo aumento de  $4,9 \pm 2,1$  veces ( $p < 0,05$ ) en la inmunorreactividad de la iNOS, comparado con el control. En contraste, no se observó un aumento significativo en la iNOS con IR880 ( $2,1 \pm 2,2$  veces para el Día 5) ( $p > 0,05$ ), realizado en estudios paralelos (Figura 10).

Bioquímicamente, estos presentes resultados muestran que la iNOS ha sido regulada en ascenso de un modo dependiente de la longitud de onda, en comparación con los controles no tratados. Se cree que el NO actúa como un inhibidor de la apoptosis mediante dos mecanismos distintos: en primer lugar, mediante un mecanismo dependiente del cGMP, donde el NO actúa bien a nivel de activación de la proteasa similar a la caspasa-3 o bien corriente arriba de este evento para impedir la activación de la proteasa; en segundo lugar, el NO también inhibe la actividad de la proteasa similar a la caspasa-3 mediante S-nitrosilación de la enzima. La supresión de la actividad de la proteasa similar a la caspasa-3 rescata entonces a la célula de la muerte celular programada.

### Ejemplo 3

Después del tratamiento de la piel de la cara y ojos con la fuente de luz, los autores de la invención observaron una reducción en la profundidad, longitud y área de las arrugas, los autores también observaron una reducción en el área superficial de la piel por encima del ojo y una reducción en la prominencia de las bolsas bajo los ojos. Para asegurar una reducción en el artefacto al mínimo se usó una caja de luz de iluminación constante. Esto facilitó una distancia constante de la lente de la cámara desde el sujeto, y una exposición constante. Se requirió a los sujetos que enfocaran en el mismo punto y descansaran sus mejillas sobre un punto fijo, con su nariz tocando una cuerda para asegurar la mínima rotación entre fotografías. Después se les dio a los sujetos una fuente de luz para que se trataran a sí mismos al menos una vez al día, pero preferiblemente dos veces al día. Después de un mes se tomaron las fotografías iniciales de seguimiento, seguido de otra serie de fotografías a los 2 meses. Cuando se tomaba la fotografía era esencial que en todos los casos, en todos los tiempos, la cara estuviera desprovista de expresión, los ojos estuvieran abiertos en la misma cantidad, permitiendo la comparación directa de la piel por encima del ojo, y la mirada dirigida al mismo punto en la caja de luz en todos los casos. Se tomaron 4 vistas, Frontal Izquierda, Frontal Derecha, perfil Izquierdo y perfil Derecho. Esto facilitó la comparación directa de las bolsas bajo los ojos y la longitud y profundidad de las arrugas. Las arrugas que no estaban en el plano perpendicular ni horizontal no se examinaron, ya que ligeras diferencias en rotación crearían diferencias de artefacto. Los autores de la invención también han observado una mejora del tono tisular y muscular en diversas otras partes del cuerpo en las que se ha aplicado el tratamiento cosmético electromagnético. Los resultados muestran una mejora cualitativa en la reducción de los signos visibles de envejecimiento, una reducción en la piel redundante que afecta a los párpados superiores, un mantenimiento del tono del tejido facial y por tanto un mantenimiento de los pliegues nasofaciales y contornos de la cara juveniles.

El método de la invención mejoró la textura y los contornos de la piel, dando como resultado una piel más lisa. Estos efectos pueden ser mantenidos durante hasta uno a tres meses después de interrumpir el tratamiento, y son capaces de revertir los signos visibles de envejecimiento hasta tanto como 10 años en algunos casos.

Cuando se aplicó la luz a los muslos y nalgas, hubo una mejora significativa en la celulitis observada, una reducción en el grado de caída de las nalgas bajo la influencia de la gravedad.

Con referencia a la Figura 11A se muestran los efectos después de 2 meses de tratamiento diario con IR1072 nm comparado con la Figura 11B del mismo individuo antes de que comenzara el tratamiento, la Figura 11C muestra una imagen superpuesta antes y una imagen después de 1 mes de tratamiento con IR1072 nm en el mismo individuo. Los autores de la invención han observado que después de 1 mes de tratamiento los pliegues de la piel por encima del párpado pueden ser comparados directamente, ya que el párpado superior corta la córnea en el mismo lugar, y los reflejos de la luz en la córnea son idénticos tanto en el caso del control como en los de los ensayos (Figura 11C). Los autores de la invención han observado que el párpado superior cae menos después del tratamiento. La caída es mejorada adicionalmente después de dos meses de tratamiento (Figura 11A).

### Ejemplo 4

Con referencia a la Figura 13A, se muestra un perfil lateral de un individuo antes del tratamiento, y en la Figura 13B, del mismo individuo tras el tratamiento. El individuo tenía una marca identificable de una lesión pigmentada inferior al limbo corneal. Se dibujó una línea perpendicular a la línea marcadora negra y se hicieron las siguientes medidas:

	Figura 13A	Figura 13B
1. Punta de la nariz:	34,2 mm	38,3 mm
2. De la línea a la lesión pigmentada:	20,3 mm	28,6 mm
3. De la línea a la bolsa (7 mm por debajo del párpado)	18 mm	23,2 mm

Se hizo un ajuste debido a la variación de escala (distancia a la nariz) para la línea a la lesión pigmentada:  $(38,3/34,2) \times 20,3 = 22,7$  mm, y de la línea a la bolsa:  $(38,3/34,2) \times 18 = 20,2$  mm.

Resultados corregidos

	Antes	Después
Línea a la lesión pigmentada	22,7 mm	28,6 mm
Línea a la bolsa	20,2 mm	23,2 mm

- 5 Utilizando la técnica anterior, se midió la reducción de la bolsa en 8 voluntarios. 7 demostraron una reducción en el tamaño de las bolsas bajo el ojo.

**Ejemplo 5**

Asegurando que la apertura de los ojos fuera idéntica tanto en el antes como en el después en la Figura 14C, una parte de un ojo está cortada en la imagen “antes” (Figura 14A) y fusionada con el lado complementario del ojo de la imagen “después” (Figura 14B). La mejora en la calidad de la piel se puede ver fácilmente.

- 10 Las medidas de los resultados, el tamaño de las bolsas y la medida de los pliegues de piel floja eliminaron la variabilidad inherente al evaluar meramente las arrugas alrededor de los ojos.

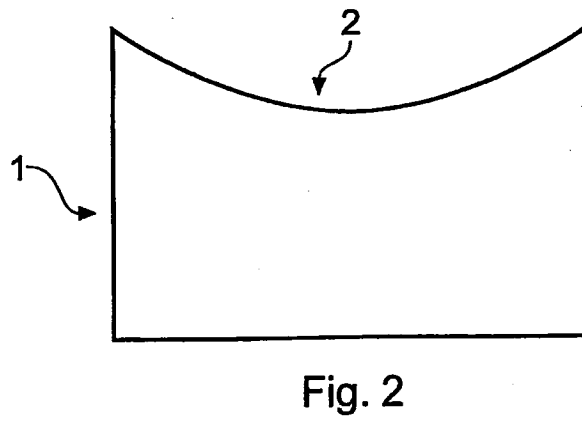
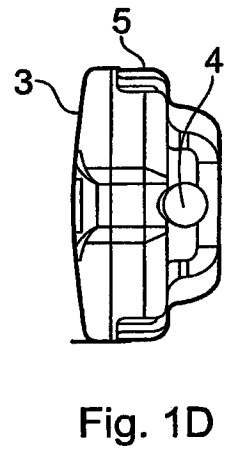
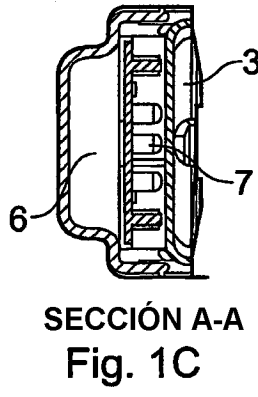
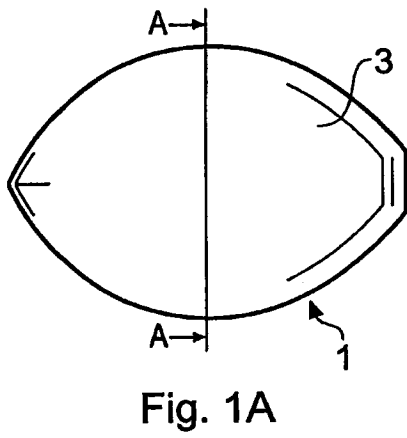
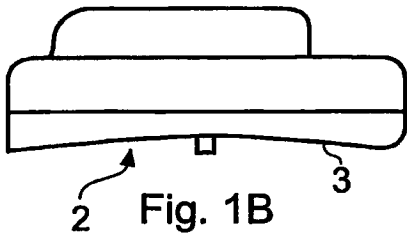
	Arrugas	Bolsas bajo los ojos	Piel floja por encima del párpado
Mejorado	n=18	n=6	n=14
No mejorado	n=2	n=1	n=2
	p=0,0004	p=0,1	p=0,04

19 de los 20 participantes implicados en el estudio estuvieron conformes en que la terapia con luz de 1072 nm fue eficaz, p=0,00004.

- 15 Utilizando las fotografías de línea de base como el aspecto de control de la prueba cosmética, los datos anteriores demuestran la eficacia del método y dispositivo de la presente invención. Los tratamientos diarios dan como resultado que la mayoría de los participantes consiguen un resultado positivo, con una apariencia más juvenil.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para tratar cosméticamente un área superficial de la piel facial de un mamífero reduciendo o aliviando o eliminando o disminuyendo las arrugas o líneas finas que aparecen como resultado del envejecimiento, comprendiendo el método irradiar la piel con una fuente de radiación electromagnética divergente centrada en 1072 nm y que tiene un ancho de banda de entre 10 y 120 nm con una intensidad de al menos 500  $\mu$ Watios/cm<sup>2</sup> y hasta 500 mWatios/cm<sup>2</sup>.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que la piel facial se selecciona del grupo que comprende la piel alrededor, por encima o por debajo de los ojos y la piel del cuello.
- 10 3. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la radiación electromagnética se aplica al menos una vez al día.
4. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el periodo de tratamiento es durante al menos un mes.
5. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que la luz divergente está entre 10° y 50°.
- 15 6. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que la radiación electromagnética es continua o pulsada.
7. Un método según la reivindicación 6, en el que, cuando la radiación electromagnética es pulsada, se aplica durante periodos de al menos 10-15  $\mu$ segundos.
8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en el que, cuando la radiación electromagnética es pulsada, la frecuencia/velocidad de repetición está en el intervalo 300-900 Hz.
- 20 9. Un método según la reivindicación 8, en el que la frecuencia/velocidad de repetición está en, o alrededor de, 600 Hz.
10. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que la radiación electromagnética se aplica a la piel durante al menos 30 segundos y hasta unos minutos.
- 25 11. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que la fuente de radiación electromagnética es un diodo emisor de luz.
12. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que la fuente de luz emisora incluye al menos una o más uniones PN dispuestas para emitir radiación con una longitud de onda que está centrada en 1072 nm.
13. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que la longitud de onda que está centrada en o alrededor de la longitud de onda especificada tiene un ancho de banda estrecho de aproximadamente 50 nm.
- 30 14. Uso de radiación electromagnética divergente centrada en 1072 nm y que tiene un ancho de banda de entre 10 y 120 nm con una intensidad de al menos 500  $\mu$ Watios/cm<sup>2</sup> y hasta 500 mWatios/cm<sup>2</sup> para tratar cosméticamente un área superficial de la piel facial de un mamífero reduciendo o aliviando o eliminando o disminuyendo las arrugas o líneas finas que aparecen como resultado del envejecimiento.



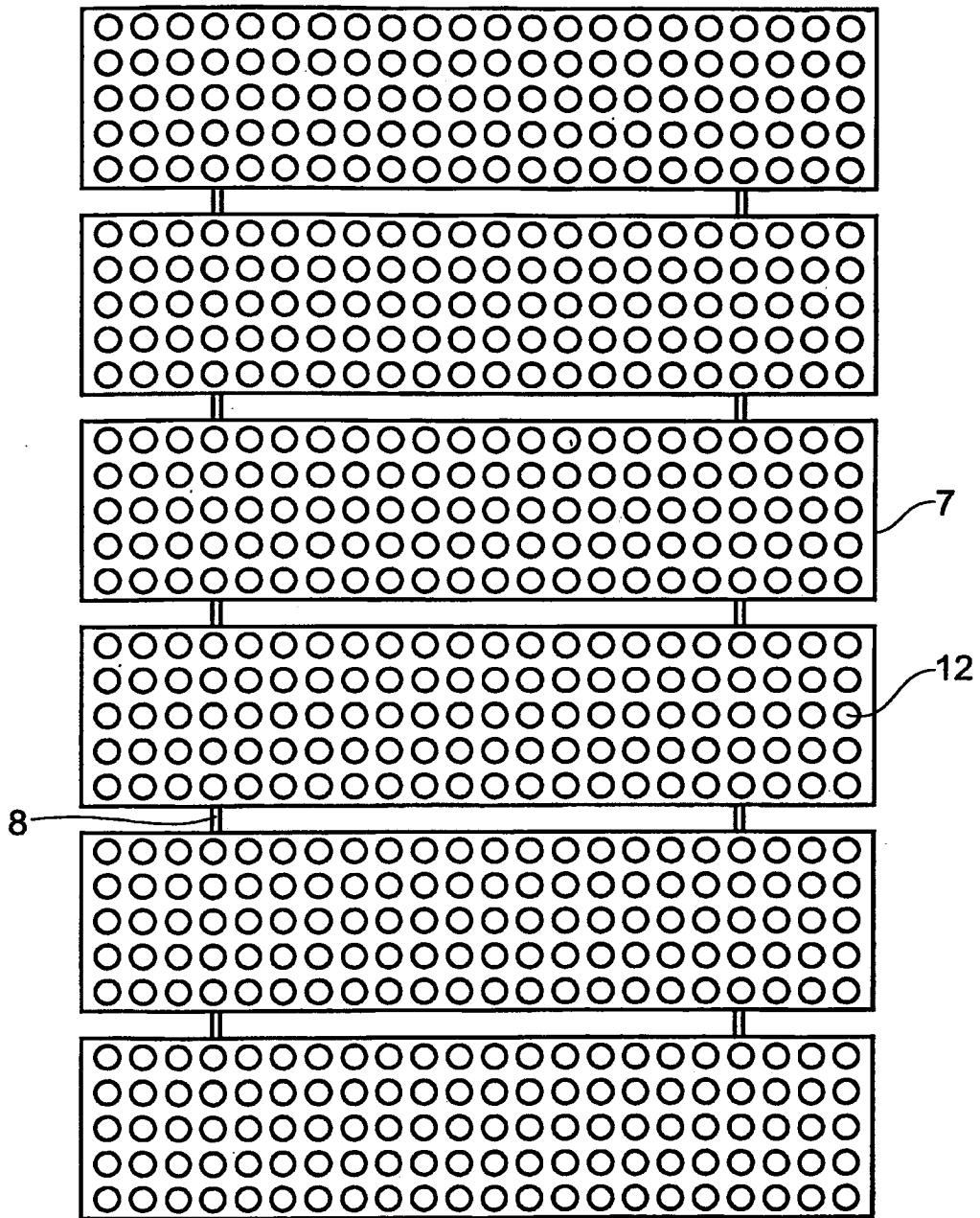


Fig. 3

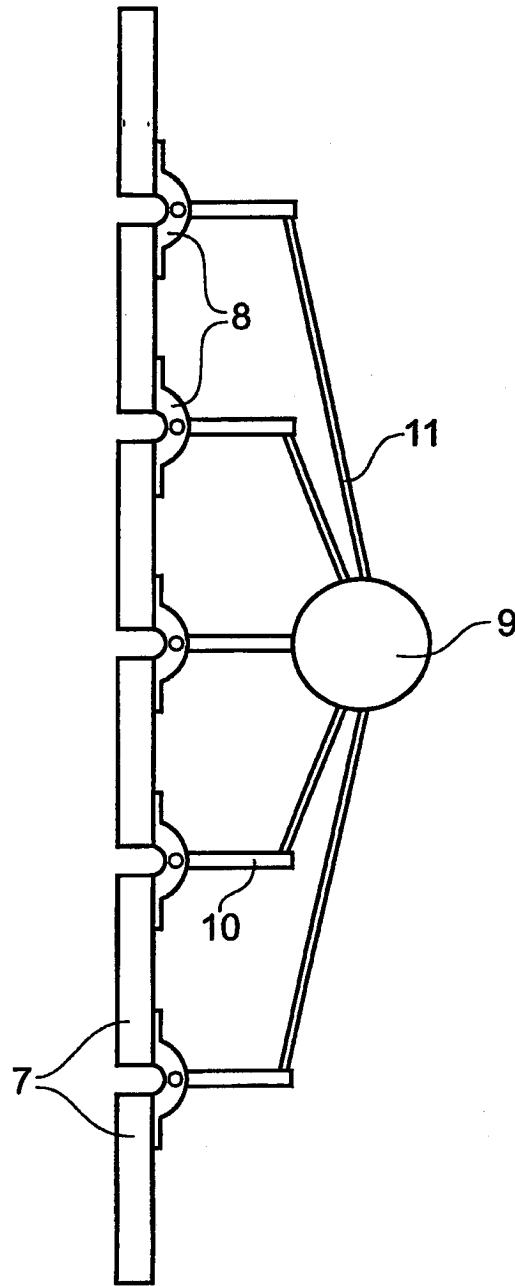


Fig. 4

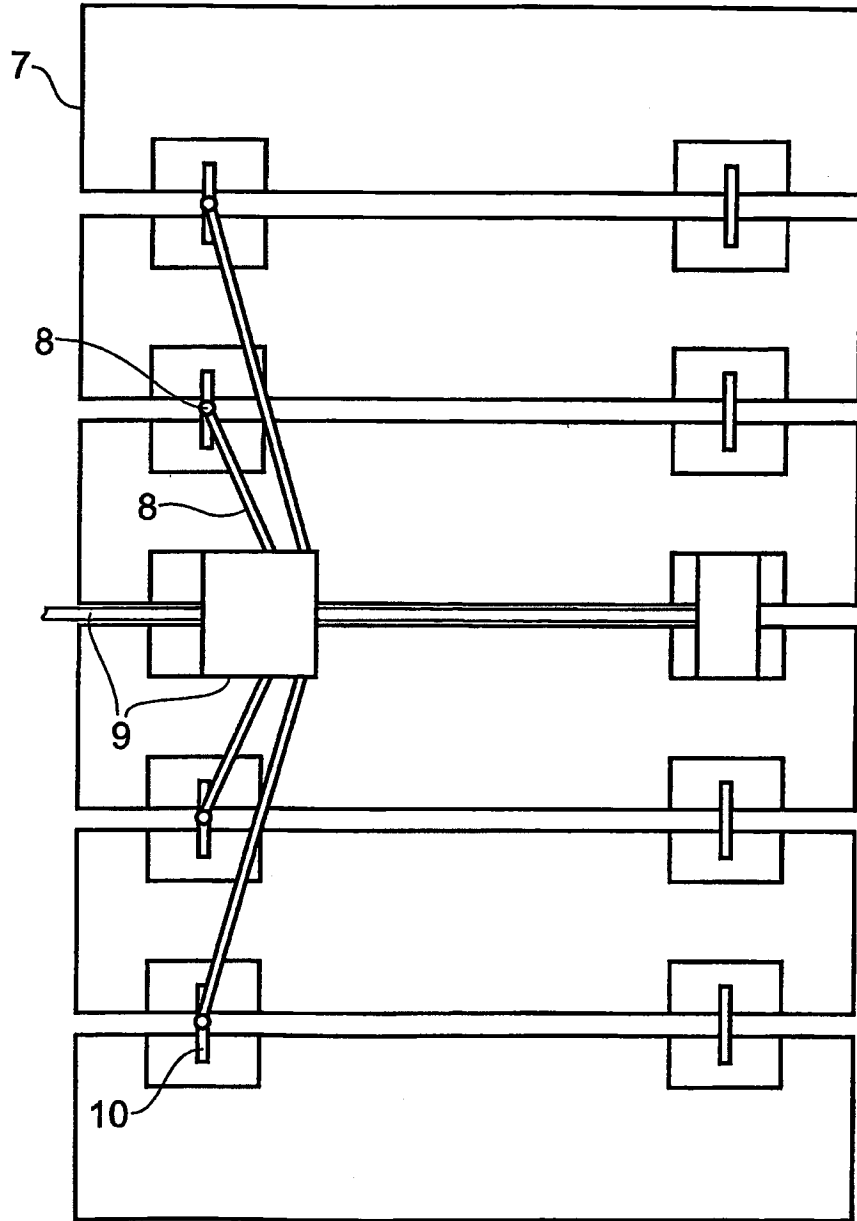


Fig. 5

FIGURA 6

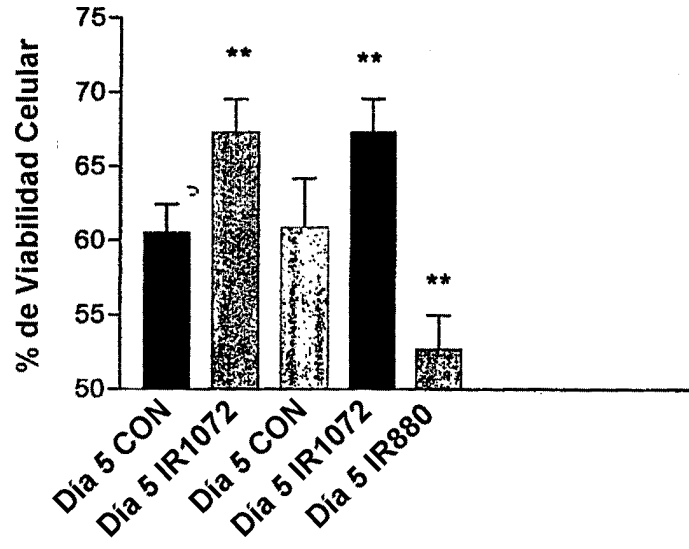


FIGURA 7

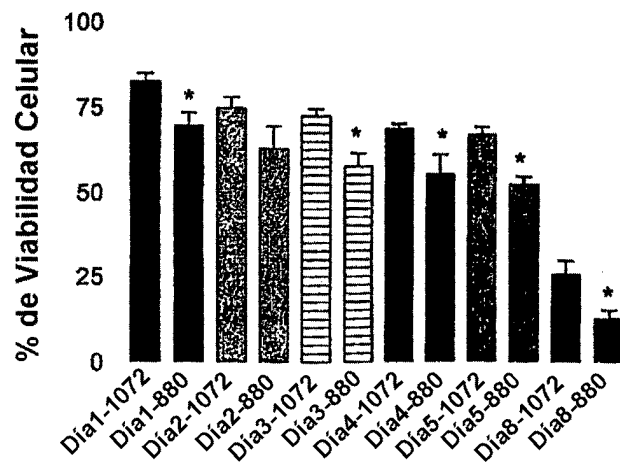




FIGURA 8

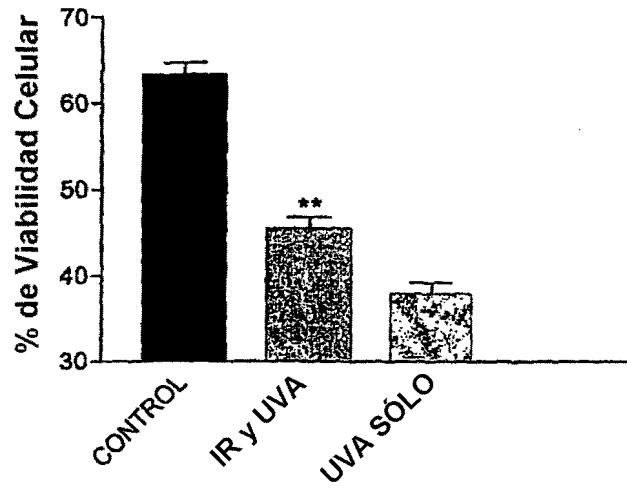


FIGURA 9

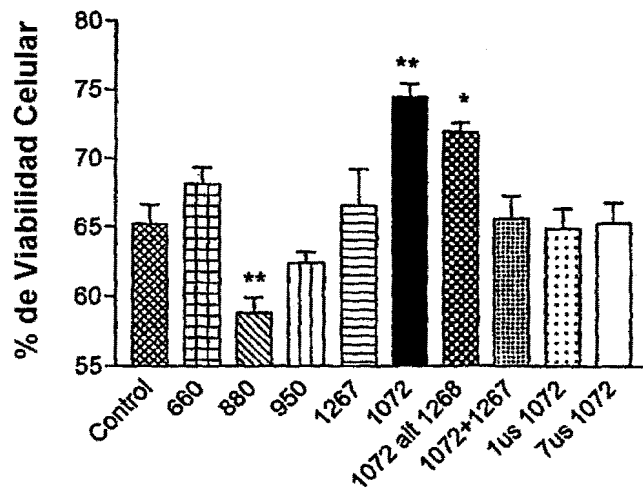


FIGURA 10

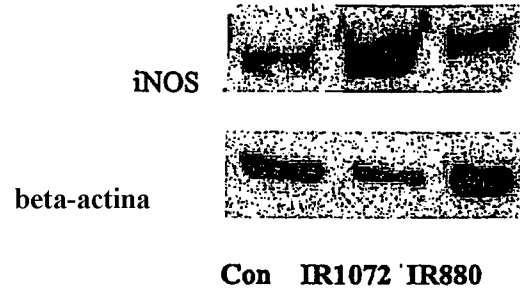


FIGURA 11A



FIGURA 11B



FIGURA 11C



FIGURA 12

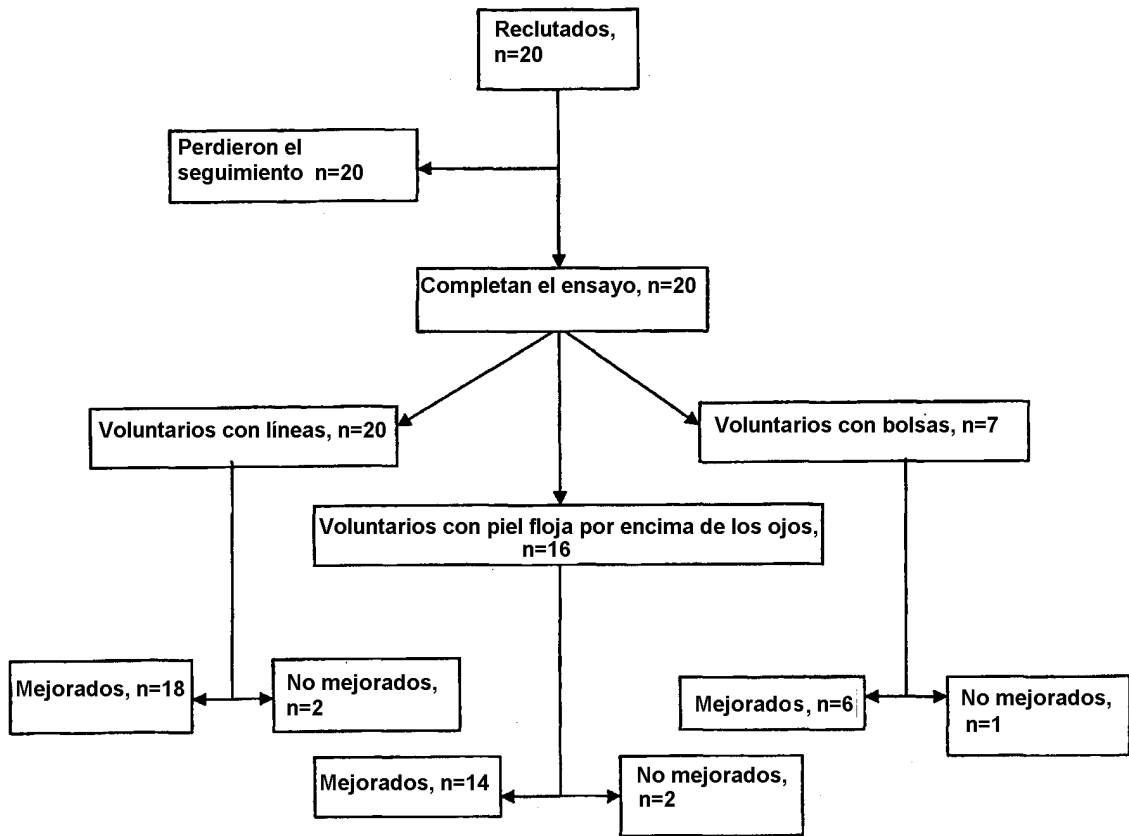


FIGURA 13A

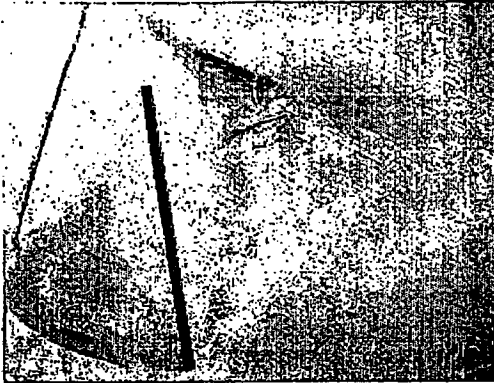


FIGURA 13B



FIGURA 14A

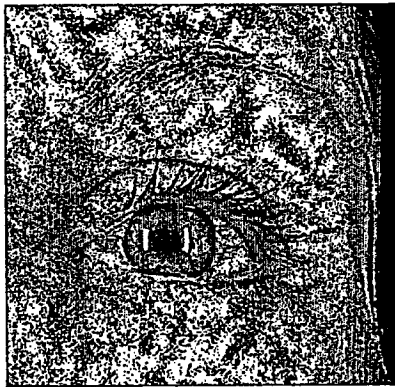


FIGURA 14B

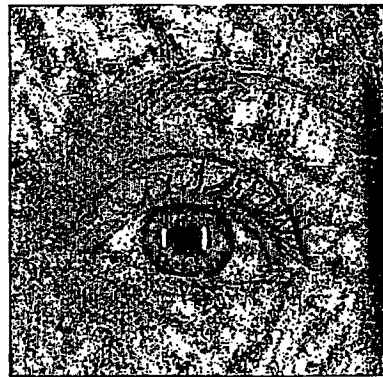


FIGURA 14C