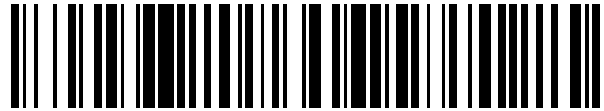


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 460**

21 Número de solicitud: 201531529

51 Int. Cl.:

A61N 1/32 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

23.10.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.05.2016

Fecha de la concesión:

29.12.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

05.01.2017

73 Titular/es:

**INDIBA, S.A. (100.0%)
C/ Moianes, 13, Polígono Industrial Can
Casablanques
08192 Sant Quirze del Vallès (Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

**UBEDA MAESO, Alejandro y
HERNÁNDEZ BULE, María Luisa**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

54 Título: **Procedimiento cosmético para la reducción o prevención de la acumulación de tejido adiposo**

57 Resumen:

Procedimiento cosmético para la reducción o prevención de la acumulación de tejido adiposo. Procedimiento para reducir o prevenir la acumulación de tejido adiposo en una zona de un cuerpo humano con efecto única y exclusivamente cosmético que comprende la aplicación de corriente eléctrica alterna con una frecuencia en el intervalo de 0,4 a 0,6 MHz en condiciones subtérmicas en dicha zona del cuerpo humano.

ES 2 571 460 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento cosmético para la reducción o prevención de la acumulación de tejido adiposo

5

La presente invención pertenece al campo cosmético, más concretamente se refiere a un procedimiento para la reducción o prevención de la acumulación de tejido adiposo, única y exclusivamente con efecto cosmético, no terapéutico.

10

Hoy en día la cosmética hace uso de tratamientos que utilizan señales físicas en un amplio rango de frecuencias. A este respecto, se han desarrollado una amplia variedad de técnicas no invasivas que van desde los ultrasonidos a los láseres, y que incluyen la estimulación eléctrica y/o magnética, bien sea en forma de corriente continua y frecuencias bajas o ultra bajas, o en forma de altas frecuencias o radiofrecuencias (Mulholland, R.S., Paul M.D. y Chalfoun C., Clin Plast Surg, 2011, 38, 503-520, vii-iii; Belenky I., y otros, Adv Ther, 2012, 29, 249-266). Específicamente, los tratamientos con radiofrecuencias aplican o utilizan campos electromagnéticos de radiofrecuencia o corrientes eléctricas en un rango de frecuencias aproximadamente entre 100 kHz y 3 GHz, que inducen el calentamiento del tejido a través de la fricción molecular.

20

En el campo de la cosmética, se aplican los métodos y tratamientos mencionados anteriormente, por ejemplo, para mejorar la laxitud o relajamiento de la piel, corrigiendo y reduciendo, de esta manera, arrugas (Krueger N. y Sadick N.S., Cutis, 2013, 91, 39-46; Abraham M.T. y Mashkevich G., Facial Plast Surg Clin North Am, 2007, 15, 169-177, v.; Alster T.S. y Lupton J.R., Clin Dermatol, 2007, 25 487-491; Sadick N., Facial Plast Surg Clin North Am, 2007, 15, 161-167, v.; Chipps L.K. y otros, J Drugs Dermatol, 12 (2013) 1215-1218; Tay Y.K. y Kwok C., J Cosmet Laser Ther, 11 (2009) 25-28). Otra aplicación cosmética incluye el modelado del cuerpo, cuyo efecto más visible o significativo ha sido descrito como una estilización de la silueta a través de la reducción de la celulitis y el tejido adiposo subcutáneo (van der Lugt C. y otros, Dermatol Ther, 22 (2009) 74-84; Del Pinto E. y otros, J Drugs Dermatol, 5 (2006) 714-722, Alexiades-Armenakas M., Dover J.S. y Arndt K.A., J Cosmet Laser Ther, 10 (2008) 148-153; y Valentim da Silva R.M. y otros, Dermatol Res Pract, 2013 (2013) 715-829).

35

Este último efecto (modelado del cuerpo y reducción de los depósitos de grasa) ha sido demostrado con resultados satisfactorios en estudios experimentales en conejos tratados

con corrientes electrotérmicas de radiofrecuencia, observándose una reducción en el número de adipocitos dérmicos e hipodérmicos, junto con aumento de la densidad del tejido conectivo (Ronzio, O.A., Fisioterapia, vol. 31, 2009, pp. 131-136).

5 Estudios clínicos también han reportado resultados satisfactorios de los tratamientos con radiofrecuencias aplicados a la reducción de los depósitos de grasa y mejora de la laxitud de la piel propias de postparto (Brightman L. y otros, *Lasers Surg Med*, 41 (2009) 791-798.). A nivel tisular, se ha demostrado que la aplicación percutánea, no invasiva de los tratamientos con radiofrecuencia produce el calentamiento del tejido subcutáneo, lo que resulta en la
10 reestructuración de las fibras de colágeno y el aumento de la microcirculación en el tejido adiposo, tanto en modelos animales (Belenky I. y otros, *Adv Ther*, 29 (2012) 249-266) como en seres humanos (Trelles M.A. y otros, *Lasers Med Sci*, 25 (2009) 191-195). A nivel celular, el tratamiento electrotérmico con radiofrecuencia, dependiendo de la frecuencia y la potencia de la señal, puede causar la lipólisis y la necrosis de adipocitos (Trelles M.A. y otros, *Lasers
15 Med Sci*, 25 (2009) 191-195; Hamida Z.H. y otros, *Appl Physiol Nutr Metab*, 36 (2011) 271-275.).

La electroterapia basada en la tecnología electrotérmica conocida como Transferencia Eléctrica Capacitiva Resistiva (TECR) consiste en una estrategia no invasiva basada en la
20 utilización de corrientes alternas con frecuencias en el intervalo de 0,4 MHz a 0,6 MHz (intervalo comprendido en el espectro de la radiofrecuencia) para elevar la temperatura de los órganos o tejidos diana del tratamiento mediante la acción de dichas corrientes eléctricas alternas. Este tipo de tecnología se ha mostrado eficaz en tratamientos médicos de rehabilitación y regeneración, así como en aplicaciones estéticas/cosméticas, por ejemplo,
25 para la regeneración de lesiones producidas por traumatismo(s) o lesiones degenerativas de tejidos, mediante la disminución del dolor asociado, reduciendo la inflamación, incrementando la circulación sanguínea, mejorando el tono vascular y muscular y mejorando la reabsorción de hematomas, edemas y líquido acumulado en las articulaciones y tejidos blandos.

30 En el caso de la terapia TECR, el tratamiento se aplica manualmente, ejerciendo presión con electrodos capacitivos o resistivos sobre la piel, de modo que los tejidos diana subyacentes reciben tres estímulos simultáneos: uno térmico, otro eléctricamente inducido, y un tercero mecánico. El estado de la técnica hasta la fecha, había demostrado que el
35 tratamiento cosmético con TECR induce o produce un efecto antiadipogénico o lipolítico, que hasta la fecha se había venido atribuyendo exclusivamente al efecto que la combinación

de los estímulos térmico y mecánico ejerce en los tejidos sobre los que se aplica el tratamiento, asumiéndose así que la corriente eléctrica alterna de radiofrecuencia no tenía otro efecto sobre el tejido que el de incrementar la temperatura de estos.

5 La solicitud de Patente PCT Núm. PCT/ES2015/070372 da a conocer la utilización o aplicación de corriente eléctrica alterna de radiofrecuencia in vitro, que por sí sola y en condiciones subtérmicas (eléctricas), incrementa la proliferación de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo subcutáneo sin afectar a sus capacidades para diferenciarse en diversos tipos celulares, tales como, osteocitos, adipocitos o condrocitos.

10

Adicionalmente, en los últimos años se han desarrollado numerosos estudios e investigaciones basadas en la utilización de la electroterapia mencionada anteriormente en condiciones subtérmicas con el fin de analizar el efecto del componente eléctrico en las células y descartar posibles riesgos oncogénicos o de desarrollo de tumores. Dichos estudios han demostrado que el componente eléctrico de la terapia efectivamente ejerce un efecto sobre las células de manera que, al aplicarse sobre cultivos celulares de líneas tumorales, se observan efectos citostáticos o citotóxicos. En concreto, se ha demostrado que:

15

20 - Una corriente eléctrica alterna de frecuencia 0,57 MHz aplicada en condiciones subtérmicas (pulsos de 5 minutos a 0,57 MHz con una densidad de corriente de $50 \mu\text{A}/\text{mm}^2$, aplicados cada 4 horas durante de 12 a 24 horas) en cultivos de la línea celular HepG2 (número de depósito en ATCC HB-8065) derivada de células de hepatocarcinoma humano, produce un efecto citostático y de diferenciación celular sobre los mismos (Hernández-Bule, M.L. y otros, Int J Oncol, 2007, 30, 583-592; Hernández-Bule, M.L. y otros, Int J Oncol, 2010, 25 37, 1399-1405; y Hernández-Bule, M.L. y otros, PLoS ONE, 2014, 9, 1e84636).

25

- Una corriente eléctrica alterna de frecuencia 0,57 MHz aplicada en condiciones subtérmicas (pulsos de 5 minutos a 0,57 MHz con una densidad de corriente de $50 \mu\text{A}/\text{mm}^2$, aplicados cada 4 horas durante de 12 a 24 horas) en cultivos celulares de la línea celular NB69 (número de catálogo 99072802 Sigma en Sigma-Aldrich) derivada de células de neuroblastoma humano, produce un efecto citotóxico (Hernández-Bule, M.L. y otros, Int J Oncol, 2012, 41, 1251-1259).

30

Además de dichos efectos antitumorales, también se ha descrito que la corriente eléctrica alterna de frecuencia 0,57 MHz aplicada en condiciones subtérmicas (pulsos de 5 minutos a 0,57 MHz con una densidad de corriente de $50 \mu\text{A}/\text{mm}^2$, aplicados cada 4 horas durante de

35

12 a 24 horas) no producen ningún efecto detectable en cultivos celulares de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos, dado que no se detectaron cambios significativos estadísticamente en la supervivencia, necrosis y distribución de subpoblaciones celulares tras el tratamiento con dicha corriente eléctrica alterna
5 (Hernández-Bule, M.L. y otros, Int J Oncol, 2012, 41, 1251-1259).

Los inventores de esta patente, tras extensos y exhaustivos experimentos, han descubierto sorprendentemente que la aplicación in vitro de corriente eléctrica alterna con una frecuencia en el intervalo de 0,4 a 0,6 MHz en condiciones subtérmicas, permite reducir y
10 prevenir la acumulación de grasa durante el proceso de adipogénesis de células madre de tejido adiposo.

En un primer aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento cosmético para reducir o prevenir la acumulación de tejido adiposo en una zona de un cuerpo humano adulto que comprende la aplicación de corriente eléctrica alterna con una frecuencia en el
15 intervalo de 0,4 a 0,6 MHz en condiciones subtérmicas. Dicho procedimiento de la presente invención presenta única y exclusivamente efectos cosméticos, no terapéuticos.

En un aspecto adicional, también se da a conocer un dispositivo generador de corriente eléctrica alterna configurado para llevar a cabo el procedimiento cosmético de la presente invención.
20

En otro aspecto, el presente documento también da a conocer el uso de un dispositivo generador de corriente eléctrica alterna para llevar a cabo el procedimiento cosmético de la presente invención.
25

Tal y como se utiliza en el presente documento “adulto” y su plural se utiliza para referirse a personas con una edad de al menos 16 años.

30 Tal y como se utiliza en el presente documento “tejido adiposo visceral” y su plural se refieren a tejido adiposo que se encuentra a escala mediastínica, mesentérica, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal.

Por tanto, tal y como se ha mencionado anteriormente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para reducir o prevenir la acumulación de tejido
35 adiposo en una zona de un cuerpo humano con efecto única y exclusivamente cosmético

caracterizado porque comprende la aplicación de corriente eléctrica alterna con una frecuencia en el intervalo de 0,4 a 0,6 MHz en condiciones subtérmicas en dicha zona del cuerpo humano.

- 5 El procedimiento cosmético de la presente invención es un procedimiento cosmético no invasivo y no traumático, de aplicación percutánea de densidades subtérmicas de corriente eléctrica emitida por electrodos aplicados sobre la piel, para reducir el tejido adiposo sometido a la acción de la corriente.
- 10 El procedimiento cosmético de la presente invención contribuye tanto a reducir la acumulación de tejido adiposo como a prevenir su acumulación, dado que la aplicación de corriente eléctrica alterna en las condiciones indicadas anteriormente ejerce un efecto antiadipogénico en etapas iniciales e intermedias de la diferenciación adipocitaria.
- 15 El procedimiento cosmético de la presente invención se puede llevar a cabo en un cuerpo humano, tanto de hombre como de mujer, preferentemente adulto.

En una realización preferente, la corriente eléctrica alterna presenta una frecuencia en el intervalo de 0,4 MHz a 0,5 MHz, aún más preferentemente, presenta la frecuencia de 0,448
20 MHz.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, las condiciones de tiempo de tratamiento y densidad de corriente se fijan de manera que el procedimiento se realiza en condiciones subtérmicas (es decir, que únicamente se produce el efecto eléctrico propio de la corriente
25 aplicada sin inducirse un incremento en la temperatura). Preferentemente, en el procedimiento cosmético de la presente invención la densidad de la corriente eléctrica alterna es de entre 1 y 3000 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$, aún más preferentemente de entre 5 y 500 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$; durante entre 6 y 20 sesiones de aplicación de corriente eléctrica alterna, más preferentemente entre 8 y 15 sesiones de aplicación de corriente eléctrica alterna; en
30 aplicaciones de entre 1 y 5 sesiones de aplicación de corriente eléctrica alterna por semana, aún más preferentemente en aplicaciones de 3 sesiones de aplicación de corriente eléctrica alterna por semana; y con una duración de cada una de las sesiones de aplicación de corriente eléctrica alterna de entre 30 y 90 minutos, más preferentemente de 60 minutos.

35 En una realización preferente, el procedimiento cosmético de la presente invención se aplica sobre la piel y se lleva a cabo utilizando un par de electrodos de material adecuado (por

ejemplo, acero inoxidable con o sin cubierta de aislamiento eléctrico) situados en la zona del cuerpo humano de interés y conectados a un dispositivo generador de corriente eléctrica alterna. La conexión de los electrodos con el dispositivo generador de corriente eléctrica alterna puede ser en serie o en paralelo. Más preferentemente, la conexión de los electrodos es en serie. Ejemplos de dispositivos generadores de corriente eléctrica alterna que con la configuración adecuada pueden ser utilizados para llevar a cabo el procedimiento cosmético de la presente invención son los siguientes dispositivos de la empresa Indiba®: modelo Activ 902, modelo Activ HCR 902 y modelo ELITE, entre otros.

10 Se contempla que el procedimiento cosmético de la presente invención se aplique en cualquier zona del cuerpo humano que presente una acumulación o que sea susceptible de acumular tejido adiposo. En una realización preferente, el procedimiento cosmético de la presente invención se emplea para reducir o prevenir la acumulación de tejido adiposo en el abdomen, glúteos, muslos, cintura, espalda, brazos, cartucheras o combinaciones de los mismos, aún más preferentemente en abdomen, cartucheras o combinaciones de los mismos.

La zona a tratar tal y como se ha descrito anteriormente, se coloca entre los electrodos de material adecuado.

20 Una de las principales ventajas del procedimiento cosmético de la presente invención es el hecho de que, a diferencia de los procedimientos convencionales basados en componentes térmicos o mecánicos que únicamente sirven para reducir el tejido adiposo subcutáneo que es el que entra en contacto con el estímulo, el procedimiento cosmético de la presente invención afecta a todo el tejido adiposo (reduciéndolo o previniendo su formación) situado entre los electrodos utilizados, tanto a tejido adiposo subcutáneo como a tejido adiposo visceral.

Adicionalmente, el procedimiento cosmético de la presente invención, se utiliza para reducir tejido adiposo blanco, tejido adiposo marrón o combinaciones de los mismos, preferentemente tejido adiposo blanco.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el presente procedimiento cosmético se utiliza para reducir tejido adiposo acumulado, para prevenir su acumulación o combinaciones de los mismos. La utilización o el efecto va a depender del estado del cuerpo humano sobre el que se utilice el procedimiento cosmético de la presente invención, es decir, si ya presenta una acumulación preexistente de tejido adiposo o si, por el contrario, el procedimiento se

está utilizando claramente para evitar acumulaciones futuras. Sin embargo, en una realización preferente, el procedimiento cosmético se utiliza para prevenir la acumulación de tejido adiposo en la zona del cuerpo humano en la que se utiliza.

5 El procedimiento cosmético de la presente invención se puede utilizar junto con otros procedimientos o tratamientos cosméticos que presentan efectos antiadipogénicos reduciendo o previniendo la acumulación de tejido adiposo, de manera que sus efectos puedan actuar de forma aditiva o sinérgica. En una realización preferente, el procedimiento cosmético de la presente invención se combina con estímulos de tipo térmico, eléctrico,
10 mecánico o combinaciones de los mismos.

El presente documento da a conocer un dispositivo generador de corriente eléctrica alterna que comprende un dispositivo de control configurado para llevar a cabo el procedimiento cosmético de la presente invención.

15 Dicho dispositivo comprende, preferentemente, un par de electrodos de material adecuado (por ejemplo, acero inoxidable con o sin cubierta de aislamiento eléctrico) conectados al dispositivo generador de corriente eléctrica alterna, preferentemente, en serie o en paralelo. Más preferentemente, la conexión de los electrodos es en serie.

20 El dispositivo de control comprendido en el dispositivo generador de corriente eléctrica alterna está configurado para generar corriente eléctrica alterna a una frecuencia en el intervalo de 0,4 MHz a 0,6 MHz, más preferentemente en el intervalo de 0,4 MHz a 0,5 MHz, aún más preferentemente una frecuencia de 0,448 MHz.

25 Tal y como se ha mencionado anteriormente, las condiciones de tiempo de tratamiento y densidad de corriente en el procedimiento cosmético de la presente invención se fijan de manera que el procedimiento se realiza en condiciones subtérmicas (es decir, que únicamente se produce el efecto eléctrico propio de la corriente aplicada sin inducirse un
30 incremento en la temperatura), por tanto, el dispositivo de control comprendido en el dispositivo generador de corriente eléctrica alterna está configurado para generar corriente eléctrica alterna y aplicarla en condiciones subtérmicas. Preferentemente, el dispositivo de control comprendido en el dispositivo generador de corriente eléctrica alterna está configurado para que la densidad de la corriente eléctrica alterna generada por el dispositivo
35 generador de corriente alterna sea de entre 1 y 3000 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$, aún más preferentemente de entre 5 y 500 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$; y para que dicha corriente eléctrica alterna se aplique en pulsos o

sesiones individuales de una duración de entre 30 y 90 minutos, más preferentemente de 60 minutos.

5 El dispositivo de control configurado para llevar a cabo el procedimiento cosmético de la presente invención puede comprender una memoria que contiene la programación necesaria para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención según lo indicado anteriormente.

10 En el presente documento también se da a conocer el uso de un dispositivo generador de corriente eléctrica alterna para llevar a cabo el procedimiento cosmético de la presente invención.

Dicho dispositivo generador de corriente eléctrica alterna está configurado para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención, según lo indicado anteriormente.

15 Para una mejor comprensión, la presente invención se describe en más detalle a continuación en referencia a las figuras adjuntas, que se presentan a título de ejemplo, y en referencia a ejemplos ilustrativos y no limitativos. Dichos ejemplos ilustrativos muestran resultados in vitro relativos a genes, proteínas y vías celulares relevantes para el
20 procedimiento de la adipogénesis en humanos (es decir, in vivo) y, por tanto, validan la aplicación del procedimiento cosmético de la presente invención en humanos.

La figura 1 muestra los resultados obtenidos para la cantidad de ácidos grasos presentes en cada uno de los grupos mantenidos en medio de diferenciación adipogénica durante: 2, 9,
25 16 ó 23 y tratados con los pulsos de corriente eléctrica alterna en condiciones subtérmicas durante las últimas 48 horas de permanencia en el medio de diferenciación mencionado anteriormente. La determinación de dicha cantidad se lleva a cabo por tinción con Rojo Aceite O y medición de la absorbancia a 510nm. Los datos en esta figura aparecen expresados en tanto por uno respecto al correspondiente grupo control diferenciado. En el
30 eje de ordenadas (eje y) se muestra la absorbancia a 510nm y en el eje de abscisas (eje x) se muestra el grupo, es decir, el número de días que el cultivo de células madre derivadas de tejido adiposo ha estado en medio de diferenciación adipogénica. En esta figura y en las siguientes, los asteriscos denotan niveles de significación estadística, calculados mediante la prueba de la t de Student, en las diferencias entre las muestras tratadas y sus respectivos
35 controles. *: $0,01 \leq p < 0,05$; **: $0,001 \leq p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

La figura 2 muestra los resultados obtenidos para la expresión de proteína PPAR γ en los grupos control (AD), tratado (AD+CRET) y en células madre derivadas de tejido adiposo no sometidas al tratamiento de diferenciación adipogénica (ND). En la figura 2A, se muestra un inmunoblot, en el que la primera fila corresponde a la proteína PPAR γ y la segunda fila
5 corresponde a la proteína β -actina, utilizada como control de carga. En la figura 2B se muestra el análisis densitométrico para las bandas de PPAR γ del inmunoblot mostrado en la figura 2A. En dicha figura 2B, los resultados aparecen expresados en tanto por uno respecto a la densidad de la banda de PPAR γ observada para el grupo control de células diferenciadas durante 2 ó 9 días. En la figura 2B, el eje de ordenadas (eje y) muestra la
10 densidad relativa (proporcional a la expresión de la proteína en cuestión) y el eje de abscisas (eje x) muestra el grupo al que se refieren los resultados. Tanto en la figura 2A como en la 2B las tres primeras columnas hacen referencia a cultivos diferenciados durante 2 días (o mantenidos en cultivo durante ese periodo sin diferenciar en el caso del grupo ND) y las tres últimas columnas se refieren a cultivos diferenciados durante 9 días (o mantenidos
15 en cultivo durante ese periodo sin diferenciar en el caso del grupo ND).

La figura 3 muestra los resultados obtenidos para la expresión de proteína p-MEK en los grupos control (AD), tratado (AD+CRET) y en células madre derivadas de tejido adiposo no sometidas al tratamiento de diferenciación adipogénica (ND). En la figura 3A, se muestra un
20 inmunoblot, en el que la primera fila corresponde a la proteína p-MEK y la segunda fila corresponde a la proteína β -actina, utilizada como control de carga. En la figura 3B se muestra el análisis densitométrico para las bandas de p-MEK del inmunoblot mostrado en la figura 3A. En dicha figura 3B, los resultados aparecen expresados en tanto por uno respecto a la densidad de la banda de p-MEK observada para el grupo control de cultivos de células madre derivadas de tejido adiposo diferenciadas durante 2 ó 9 días. En la figura 3B, el eje
25 de ordenadas (eje y) muestra la densidad relativa (proporcional a la expresión de la proteína en cuestión) y el eje de abscisas (eje x) muestra el grupo al que se refieren los resultados. Tanto en la figura 3A como en la 3B las tres primeras columnas hacen referencia a cultivos diferenciados durante 2 días (o mantenidos en cultivo durante ese periodo sin diferenciar en el caso del grupo ND) y las tres últimas columnas se refieren a cultivos diferenciados
30 durante 9 días (o mantenidos en cultivo durante ese periodo sin diferenciar en el caso del grupo ND).

La figura 4 muestra los resultados de inmunofluorescencia obtenidos para PPAR γ en grupos
35 tratados con corriente eléctrica alterna en condiciones subtérmicas y grupos control de cultivos de células madre derivadas de tejido adiposo diferenciados durante 9 días. La

columna negra corresponde al grupo control diferenciado (AD), la columna con líneas horizontales corresponde al grupo tratado (AD+CRET) y la columna blanca corresponde a células madre derivadas de tejido adiposo no sometidas al tratamiento de diferenciación adipogénica (ND). Los resultados aparecen expresados en tanto por uno respecto a lo observado en el grupo control diferenciado durante 9 días. En el eje de ordenadas (eje y) se muestra la normalización de la cantidad de núcleos que expresan PPAR γ (PPAR γ +) y en el eje de abscisas (eje x) se muestra el grupo experimental.

En la figura 5 se muestran las diferencias de expresión en los genes PPARG1, PPARG2, FABP4, PLIN, ANGPTL4, SREBP1c, SCD y FASN observadas en el procedimiento de diferenciación adipogénica en células madre derivadas de tejido adiposo. En todos los gráficos se sigue la misma estructura de columnas, de izquierda a derecha: 2 días sin tratamiento de diferenciación; 2 días con tratamiento de diferenciación; 9 días sin tratamiento de diferenciación; y 9 días con tratamiento de diferenciación. Los resultados se expresan en tanto por uno respecto a lo observado para el cultivo de células madre derivadas de tejido adiposo con tratamiento de diferenciación durante 2 días. En todos los gráficos en el eje de ordenadas (eje y) se muestra la expresión relativa del ARN mensajero correspondiente y en el eje de abscisas (eje x) se muestra el grupo.

En la figura 6 se muestran las diferencias de expresión en los genes PPARG1, PPARG2, FABP4, PLIN, ANGPTL4, SREBP1c, SCD y FASN observadas entre grupos controles (células madre derivadas de tejido adiposo sometidas a diferenciación adipogénica) y grupos tratados (células madre derivadas de tejido adiposo sometidas a diferenciación adipogénica y tratadas con corriente eléctrica alterna en condiciones subtérmicas). En todos los gráficos se sigue la misma estructura de columnas, de izquierda a derecha: 2 días sin tratamiento con corriente eléctrica alterna; 2 días con tratamiento con corriente eléctrica alterna; 9 días sin tratamiento con corriente eléctrica alterna; y 9 días con tratamiento con corriente eléctrica alterna. Los resultados se expresan en tanto por uno respecto a lo observado para el cultivo de células madre derivadas de tejido adiposo sometidos a diferenciación adipogénica durante 2 días sin tratamiento con corriente eléctrica alterna. En todos los gráficos en el eje de ordenadas (eje y) se muestra la expresión relativa del ARN mensajero correspondiente y en el eje de abscisas (eje x) se muestra el grupo.

Ejemplo 1. Obtención y cultivo de células madre derivadas de tejido adiposo.

Las células madre derivadas de tejido adiposo fueron aisladas de tejido adiposo subcutáneo obtenido quirúrgicamente de donantes sanos: hombres y mujeres de entre 29 y 69 años de edad. El protocolo de aislamiento ya ha sido descrito en detalle en el estado de la técnica (Hernández-Bule, M.L., Cell Physiol Biochem, 2014, 34, 1741-1755). Brevemente, los protocolos para el consentimiento informado y para la recolección y el procesamiento de las muestras cumplieron con los estándares éticos aplicables en la Unión Europea, y fueron evaluados y aprobados por el comité ético para ensayos clínicos del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Las células madre derivadas de tejido adiposo fueron aisladas de trozos de grasa de 0,5-1 cm³, libres de restos de vasos sanguíneos y tejido fibrótico y cortados en fragmentos de 1-2 mm³. Dichos fragmentos fueron digeridos con colagenasa A (Roche Applied Science, Basilea, Suiza) a una concentración de 1 mg/ml durante 40 minutos a 37°C. El tejido digerido se disoció utilizando una pipeta P1000. La dispersión de células resultante se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos para aislar la fracción estromal-vascular. El sedimento o "pellet" resultante fue resuspendido en medio de cultivo adecuado (MesenPro-RSTM, Gibco, Invitrogen, Camarillo, CA, EE.UU.) suplementado con 1% de glutamina (Gibco, Invitrogen, Camarillo, CA, EE.UU.) y 1% de penicilina-estreptomina (Gibco, Invitrogen, Camarillo, CA, EE.UU.) y las células presentes en dicho sedimento fueron sembradas en un frasco de cultivo T de 75 cm² (Falcon, Corning, NY, EE.UU.). Después de 4 días de cultivo, el medio fue renovado, y 3 días después, cuando las células estuvieron confluentes, fueron subcultivadas. Para ello, las células fueron despegadas utilizando tripsina al 0,05% con EDTA al 0,02% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) en solución salina de Hank y fueron sembradas en un nuevo frasco de cultivo T de 75 cm² a una densidad de 670 células/cm².

Todos los siguientes ejemplos utilizaron células obtenidas de acuerdo con este ejemplo, en los pasajes 3 a 7 y que fueron cultivadas en placas de Petri de 60 mm (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a una densidad de 2270 células/cm².

30

Ejemplo 2. Efecto del tratamiento con corriente eléctrica alterna en condiciones subtérmicas en el contenido lipídico durante la diferenciación adipogénica de células madre derivadas de tejido adiposo.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, las células madre derivadas de tejido adiposo obtenidas de acuerdo con el Ejemplo 1, en los pasajes 3 a 7, fueron cultivadas en placas de Petri de 60 mm (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a una densidad de 2270 células/cm².

- 5 Tras 4 días de crecimiento en placas de Petri, los cultivos fueron incubados en medio de diferenciación adipogénica compuesto por: D-MEM con alto contenido en glucosa (Biowhittaker, PA, EE.UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen, Camarillo, CA, EE.UU.), 1% de glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, Invitrogen, Camarillo, CA, EE.UU.), 3-isobutil-1-metylaxanthine a una concentración de 0,25
- 10 mM (IBMX, Gibco, Invitrogen, Camarillo, CA, EE.UU.), indometacina a una concentración de 200 µM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), insulina a una concentración de 10 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y dexametasona a una concentración de 1 µM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Los cultivos fueron mantenidos en este medio durante el tiempo de diferenciación deseado: 2, 9, 16 ó 23 días, reemplazando el medio por
- 15 medio nuevo cada 3-4 días. Los cultivos fueron tratados con corriente eléctrica alterna (TECR) o simplemente incubados en presencia de los electrodos conectados al dispositivo (controles a los que no se les aplica corriente eléctrica alterna) durante las últimas 48 horas de tratamiento de diferenciación adipogénica.
- 20 Dicho tratamiento con TECR y el sistema que fueron utilizados han sido descritos en detalle en el estado de la técnica (Hernández-Bule, M.L. y otros, Int J Oncol, 2010, 37, 1399-1405; y Hernández-Bule, M.L. y otros, Int J Oncol, 2007, 30, 583-592). Brevemente, la exposición o el tratamiento con la corriente eléctrica alterna fue llevado a cabo por medio de pares de electrodos de acero inoxidable estériles diseñado ad hoc para la estimulación *in vitro*. Dichos
- 25 electrodos fueron alojados dentro de todas las placas de Petri (que contenían cultivos de células madre derivadas de tejido adiposo), tanto las pertenecientes a los grupos tratados con TECR (corriente eléctrica alterna) como a los grupos controles en los que, tal y como se ha indicado anteriormente, solo se colocan los electrodos conectados al dispositivo generador de corriente eléctrica alterna pero sin aplicar la corriente. Sólo las células cultivadas en el área
- 30 rectangular situada dentro de la zona delimitada por los electrodos fueron utilizadas en el presente estudio (las células situadas en el resto de la superficie de la placa se descartan).

Para la exposición a corriente eléctrica alterna, los pares de electrodos fueron conectados en serie con un generador de corriente eléctrica alterna (modelo Indiba Activ 902, INDIBA®,

35 Barcelona, España).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, en los grupos controles, los pares de electrodos también fueron insertados en las placas. Dichos electrodos también fueron conectados al dispositivo generador de corriente eléctrica alterna, pero dicho dispositivo no fue activado.

5

Para los grupos expuesto, o tratados con corriente eléctrica alterna, el patrón de estimulación consistió en pulsos de 5 minutos de corriente eléctrica alterna a una frecuencia de 0,448 MHz, con una densidad de corriente de $50 \mu\text{A}/\text{mm}^2$, separados por pausas o descansos de 4 horas entre los pulsos, durante un total de 48 horas. Este procedimiento garantiza que el tratamiento eléctrico se aplica en condiciones subtérmicas.

10

Durante el intervalo de tratamiento de 48 horas, cada grupo tratado y su correspondiente grupo control fueron cultivados simultáneamente, separados en dos incubadoras de CO_2 idénticas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Los parámetros de tratamiento, así como las condiciones atmosféricas dentro de las incubadoras (temperatura de 37°C , humedad relativa del 90% y presión parcial de CO_2 del 5%) fueron monitoreados constantemente. El entorno electromagnético en el interior de las incubadoras fue controlado mediante magnetómetros específicos para tres rangos de frecuencia de interés: estática, frecuencia industrial (50 Hz y sus armónicos) y radiofrecuencia. Los valores registrados coincidieron con los reportados en el estado de la técnica y correspondieron a niveles de campo encontrados típicamente en entornos de laboratorio.

15

20

Tal y como se ha mencionado anteriormente se hicieron diversos grupos en función del tiempo de diferenciación: 2, 9, 16 ó 23 días de diferenciación adipogénica. Para cada una de dichas franjas temporales, el conjunto de las placas Petri se dividió en tres grupos. Dos de estos grupos fueron diferenciados; uno de ellos fue tratado con corriente eléctrica alterna y el otro sirvió de control diferenciado. El grupo restante permaneció sin diferenciar durante los intervalos correspondientes. El tratamiento con corriente eléctrica alterna se inició 48 horas antes de la finalización de la incubación del cultivo en medio de diferenciación adipogénica, es decir, a los: 0, 7, 14 y 21 días respectivamente.

25

30

Una vez llevado a cabo el cultivo y tratamiento de los grupos mencionados anteriormente, con el fin de evaluar la respuesta celular a la acción adipogénica del medio de diferenciación y al tratamiento con corriente eléctrica alterna, las cantidades de ácidos grasos sintetizados por los cultivos incubados en medio de diferenciación adipogénica durante 2, 9, 16 ó 23 días según lo indicado anteriormente, fueron cuantificadas. Para ello, tras el tratamiento

35

(corriente eléctrica alterna o control), los cultivos fueron lavados con tampón fosfato salino y fueron fijados en paraformaldehído al 4% a 4 °C durante 20 minutos. A continuación, las células fueron permeabilizadas mediante tratamiento con isopropanol al 60% durante 3 minutos y, entonces, los cultivos fueron teñidos con Rojo Aceite O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) durante 30 minutos.

Tras la tinción, en cada placa de Petri 15 campos de microscopio fueron seleccionados al azar y fotografiados.

Los ácidos grasos teñidos fueron extraídos mediante agitación de las muestras en isopropanol al 99% durante 5 minutos, y el contenido de ácido graso fue evaluado por espectrofotometría a 510 nm.

En la Figura 1 se muestran resumidos los resultados obtenidos en la cuantificación de los ácidos grasos. En los cultivos de células madre derivadas de tejido adiposo subcutáneo que se encuentran en etapas tempranas o intermedias de la diferenciación adipogénica (cultivos tratados o incubados en medio de diferenciación adipogénica durante 2 ó 9 días) se observa una reducción estadísticamente significativa de la acumulación de ácidos grasos en los cultivos. En cambio, cuando los cultivos se encuentran en etapas avanzadas de la diferenciación adipogénica, al final del ensayo experimental no se detectaron diferencias significativas estadísticamente entre las muestras tratadas con la corriente eléctrica subtérmica y sus controles.

En consecuencia, los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con corriente eléctrica alterna en condiciones subtérmicas permite reducir y prevenir la acumulación de grasa en células de tejido adiposo.

Ejemplo 3. Efecto del tratamiento con corriente eléctrica alterna en condiciones subtérmicas en la expresión proteica de PPAR γ y p-MEK en células madre derivadas de tejido adiposo.

PPAR γ es un factor de transcripción con un papel crucial en el metabolismo de los lípidos y en la diferenciación adipocitaria. Por su parte, p-MEK es una proteína que interacciona directamente con PPAR γ provocando la inactivación de ésta y su translocación al citoplasma.

Para estudiar la acción del tratamiento eléctrico sobre la expresión y localización de las dos proteínas mencionadas anteriormente, se procedió de la siguiente manera:

Las células madre derivadas de tejido adiposo obtenidas de acuerdo con el Ejemplo 1, en los pasajes 3 a 7, fueron cultivadas en placas de Petri de 60 mm (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a una densidad de 2270 células/cm² e incubadas en medio de diferenciación adipogénica durante 2 ó 9 días para, durante las últimas 48 horas de cultivo, ser tratados con corriente eléctrica alterna o como cultivo o grupo control, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

A continuación, las células presentes en la superficie de la placa delimitada por los dos electrodos fueron recogidas en tampón fosfato salino y fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos. El sedimento o “pellet” fue lisado por tratamiento con un tampón que contenía Tris-HCl a una concentración de 10 mM, KCl a una concentración de 10 mM, ditiotreitól a una concentración de 1 mM, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) a una concentración de 1 mM, PMFS (fenilmetilsulfonilfluoruro) a una concentración de 1 mM, leupeptina a una concentración de 10 µg/ml, pepstatina a una concentración de 5 µg/ml, NaF a una concentración de 100 mM, β-glicerofosfato a una concentración de 20 mM, molibdato de sodio a una concentración de 20 mM, 0,5% de Triton X-100 y 0,1% de SDS durante 45 minutos a 4 °C. Los lisados fueron centrifugados a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C y la concentración de proteína en el sobrenadante fue determinada utilizando el método colorimétrico de Bradford para cuantificación de proteínas (Bradford MM., Anal Biochem, 1976, 72, 248-254).

Las proteínas obtenidas y cuantificadas, fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE por sus siglas en inglés), cargándose en el gel 30 µg de proteína por carril y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa Odyssey® (LI-COR Biosciences, Nebraska, EE.UU.), utilizando la metodología de transferencia semi-seca (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Las membranas fueron bloqueadas utilizando tampón fosfato salino con un 5% de leche en polvo sin grasa, y fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo monoclonal de conejo contra PPARγ 81B8 (dilución 1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, EE.UU.), el anticuerpo monoclonal de conejo contra p-MEK1 / 2 conejo mAb (dilución 1:1000; Cell Signalling Technology) o el anticuerpo monoclonal de ratón contra la β-actina (dilución 1:5000; Sigma-Aldrich) como control de carga. Las diluciones de los anticuerpos mencionadas anteriormente se realizaron en tampón de bloqueo (0,1% de Tween y 5% de leche en polvo sin grasa en tampón fosfato salino).

El anticuerpo contra PPAR γ mencionado anteriormente permitió la detección de las dos isoformas de PPAR γ de interés para el estudio: PPAR γ 1 y PPAR γ 2.

Tras la incubación con el correspondiente anticuerpo, las membranas fueron lavadas cuatro veces con tampón fosfato salino-Tween y, posteriormente, fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente con IRDye 800CW anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG conjugado de conejo (dilución 1:10000; LI-COR Biosciences, Nebraska, EE.UU.) o con IRDye 680LT anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón (dilución 1:15000; LI-COR Biosciences, Nebraska, EE.UU.), según el caso. La intensidad de fluorescencia de las bandas fue medida con un escáner LI-COR Odyssey (LI-COR Biosciences, Nebraska, EE.UU.) y fue evaluada utilizando el programa para ordenador Quantity One, versión 4.6.7, de Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

Tal y como se observa en la Figura 2, el tratamiento con corriente eléctrica alterna no muestra un efecto en la expresión de PPAR γ en los cultivos celulares incubados durante dos días en medio de diferenciación adipogénica. Sin embargo, sí que se observa una disminución en la cantidad de PPAR γ en los cultivos celulares incubados durante nueve días en medio de diferenciación adipogénica y tratados con corriente eléctrica alterna según el protocolo explicado anteriormente.

Adicionalmente, la Figura 3 muestra los resultados obtenidos para p-MEK que son coherentes con los obtenidos para PPAR γ . En este caso el proceso de diferenciación adipogénica induce una disminución en la expresión de la proteína p-MEK. El tratamiento con corriente eléctrica alterna no modifica significativamente la expresión de p-MEK en los cultivos celulares incubados durante dos días en medio de diferenciación adipogénica, mientras que induce un incremento significativo de su expresión en los cultivos incubados durante nueve días.

Ejemplo 4. Efecto del tratamiento con corriente eléctrica alterna en condiciones subtérmicas en la localización celular de PPAR γ en células madre derivadas de tejido adiposo.

Las células madre derivadas de tejido adiposo obtenidas de acuerdo con el Ejemplo 1, en los pasajes 3 a 5, fueron cultivadas a la densidad estándar sobre cubreobjetos y mantenidas en condiciones de diferenciación adipogénica durante 9 días, sometiéndose al tratamiento con corriente eléctrica alterna o control, ambos según lo indicado anteriormente, durante las últimas 48 horas.

Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a 4°C, y permeabilizadas con etanol/ácido acético (95/5) a -20°C durante 20 minutos. Después, las células se incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo monoclonal contra PPAR γ (dilución 1:50; Santa Cruz Biotechnology, TX, EE.UU.) y fueron marcadas para fluorescencia con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (dilución 1:500; Molecular Probes, Life Technologies, MA, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos celulares fueron contrateñidos con bisBenzimida H 33258.

10 Los resultados obtenidos aparecen resumidos en la Figura 4. Se observó una translocación de PPAR γ desde el núcleo al citoplasma (ver, en la Figura 4, la reducción de inmunofluorescencia de PPAR γ nuclear en los cultivos tratados con corriente eléctrica alterna en condiciones subtérmicas). Dicha translocación de la proteína desde el núcleo hacia el citoplasma muestra una inactivación de la misma y está en concordancia con todos
15 los resultados mostrados anteriormente que demuestran que el tratamiento con corriente eléctrica alterna en condiciones subtérmicas permite reducir y prevenir la acumulación de grasa en células de tejido adiposo.

Ejemplo 5. Efecto del tratamiento con corriente eléctrica alterna en condiciones subtérmicas sobre la regulación de la expresión de diversos genes que intervienen en la diferenciación adipocitaria de células madre derivadas de tejido adiposo.

Las células madre derivadas de tejido adiposo obtenidas de acuerdo con el Ejemplo 1, en los pasajes 3 a 7, fueron cultivadas en placas de Petri de 60 mm (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a una densidad de 2270 células/cm² e incubadas en medio de diferenciación adipogénica durante 2 ó 9 días para, durante las últimas 48 horas de cultivo, ser sometidas a corriente eléctrica alterna o a un simulacro de tratamiento (grupo control), siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

30 El ácido ribonucleico (ARN) total de dichas células fue extraído utilizando el reactivo TriReagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones y protocolos del fabricante. Las células fueron homogeneizadas en 1 ml del reactivo TriReagent que contiene 1 μ l de glucógeno (20 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) como un portador para la precipitación de los ácidos nucleicos.

35 500 ng de ARN total fueron empleados para generar ácido desoxirribonucleico

complementario (ADNc) mediante transcripción inversa utilizando el kit de reactivos Primer Script RT™ Reagent kit (TaKara®, Shiga, Japón). La amplificación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se realizó utilizando el Master kit SYBR Green I y el dispositivo LightCycler 480 II (Roche Applied Science, Suiza). El paso de desnaturalización inicial fue a 95 °C durante 5 minutos, seguido por 45 ciclos de amplificación a 95 °C durante 10 segundos, a 60 °C durante 15 segundos, y a 72 °C durante 15 segundos. Las curvas de fusión obtenidas fueron evaluadas, los productos de la reacción fueron separados en un gel de agarosa al 2% y, finalmente, fueron teñidos con bromuro de etidio para confirmar la presencia de un solo producto. Todos los análisis fueron realizados por triplicado, y las cantidades relativas de los genes diana fueron normalizadas contra la expresión del gen “housekeeping” RPLP0 (que codifica la proteína ribosomal grande P0) de acuerdo con el método Δ Ct. Los cebadores utilizados en las reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real se muestran la Tabla 1.

Gen	Nombre del cebador / Número de secuencia	Secuencia del cebador (5' -> 3')
RPLP0	RPLP0 Fw / SEQ ID NO 1	CCTCATATCCGGGGGAATGTG
	RPLP0 Rev / SEQ ID NO 2	GCAGCAGCTGGCACCTTATTG
PPARG1	PPARG1 Fw 1,1 / SEQ ID NO 3	AAGGCCATTTTCTCAAACGA
	PPARG1 Rev 1,1 / SEQ ID NO 4	AGGAGTGGGAGTGGTCTTCC
PPARG2	PPARG2 Fw 1,2 / SEQ ID NO 5	CCATGCTGTTATGGGTGAAA
	PPARG2 Rev 1,2 / SEQ ID NO 6	TCAAAGGAGTGGGAGTGGTC
FABP4	FABP4 Fw 1.2 / SEQ ID NO 7	AGCACCATAACCTTAGATGGGG
	FABP4 Rev 1.2 / SEQ ID NO 8	CGTGAAGTGACGCCTTTCA
SCD	SCD Fw 1.1 / SEQ ID NO 9	TCTAGCTCCTATACCACCACCA
	SCD Rev 1.1 / SEQ ID NO 10	TGTCGTCTTCCAAGTAGAGGG
PLIN	Plin Fw / SEQ ID NO 11	GTGGAGTACCTCCTCCCTG
	Plin Rev / SEQ ID NO 12	GGTGTATCGAGAGAGGGTGTT
ANGPTL4	ANGPTL4 Fw 1.2 / SEQ ID NO 13	GGCTCAGTGGACTTCAACCG
	ANGPTL4 Rev 1.2 / SEQ ID NO 14	CCGTGATGCTATGCACCTTCT
SREBP1c	SREBP1c Fw 1.1 / SEQ ID NO 15	ACCGACATCGAAGGTGAAGT
	SREBP1c Rev 1.1 / SEQ ID NO 16	AGCATGTCTTCGAAAGTGCA
FASN	FASN Fw 1.1 / SEQ ID NO 17	TACGTACTGGCCTACACCCAGA
	FASN Rev 1.1 / SEQ ID NO 18	TGAACTGCTGCACGAAGAAGCATAT

15

Los resultados obtenidos aparecen resumidos en las Figuras 5 y 6.

En la Figura 5 se observa que a medida que avanza el proceso de diferenciación adipogénica aumenta la expresión de los siguientes genes: PPARG1, PPARG2, FABP4, PLIN, ANGPTL4, SREBP1c, SCD y FASN.

5

En la Figura 6 se observa que el tratamiento con corriente eléctrica alterna en condiciones subtérmicas no produce un efecto estadísticamente significativo en la expresión de ninguno de los genes analizados en los cultivos celulares incubados durante dos días en medio de diferenciación adipogénica. Sin embargo, sí que se observa una disminución en la expresión de los genes PPARG1, PLIN, ANGPTL4 y FASN en los cultivos celulares incubados durante 10 nueve días en medio de diferenciación adipogénica y tratados con corriente eléctrica alterna según el protocolo explicado anteriormente. Para el resto de genes no se observó variación estadísticamente significativa. Los resultados obtenidos están en concordancia con todos los resultados mostrados anteriormente que demuestran que el tratamiento con corriente 15 eléctrica alterna en condiciones subtérmicas permite reducir y prevenir la acumulación de grasa en células de tejido adiposo.

Si bien la invención se ha presentado y descrito con referencia a realizaciones y ejemplos de la misma, se comprenderá que éstos no son limitativos de la invención, por lo que podrían 20 ser variables múltiples detalles constructivos u otros que podrán resultar evidentes para los técnicos del sector después de interpretar la materia que se da a conocer en la presente descripción, reivindicaciones y dibujos. Así pues, todas las variantes y equivalentes quedarán incluidas dentro del alcance de la presente invención si se pueden considerar comprendidas dentro del ámbito más extenso de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para reducir o prevenir la acumulación de tejido adiposo en una zona de un cuerpo humano con efecto única y exclusivamente cosmético caracterizado porque
5 comprende la aplicación en dicha zona del cuerpo humano de corriente eléctrica alterna con una frecuencia en el intervalo de 0,4 a 0,6 MHz en condiciones subtérmicas, en las que la densidad de la corriente eléctrica alterna es de entre 1 y 3000 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ y cada una de las sesiones de aplicación de corriente eléctrica alterna dura entre 30 y 90 minutos.
- 10 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque el cuerpo humano es un cuerpo humano adulto.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la corriente eléctrica alterna presenta una frecuencia en el intervalo de 0,4 MHz a 0,5 MHz.
- 15 4. Procedimiento, según la reivindicación 3, caracterizado porque la corriente eléctrica alterna presenta la frecuencia de 0,448 MHz.
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque
20 la densidad de la corriente eléctrica alterna es de entre 5 y 500 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque en el procedimiento se realizan entre 6 y 20 sesiones de aplicación de corriente eléctrica alterna.
- 25 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, caracterizado porque en el procedimiento se realizan entre 8 y 15 sesiones de aplicación de corriente eléctrica alterna.
8. Procedimiento, según la reivindicación 6 u 7, caracterizado porque se aplican entre 1 y 5
30 sesiones de aplicación de corriente eléctrica alterna por semana.
9. Procedimiento, según la reivindicación 8, caracterizado porque se aplican 3 sesiones de aplicación de corriente eléctrica alterna por semana.
- 35 10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque cada una de las sesiones de aplicación de corriente eléctrica alterna dura 60 minutos.

11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la zona del cuerpo humano es abdomen, glúteos, muslos, cintura, espalda, brazos, cartucheras o combinaciones de los mismos.

5

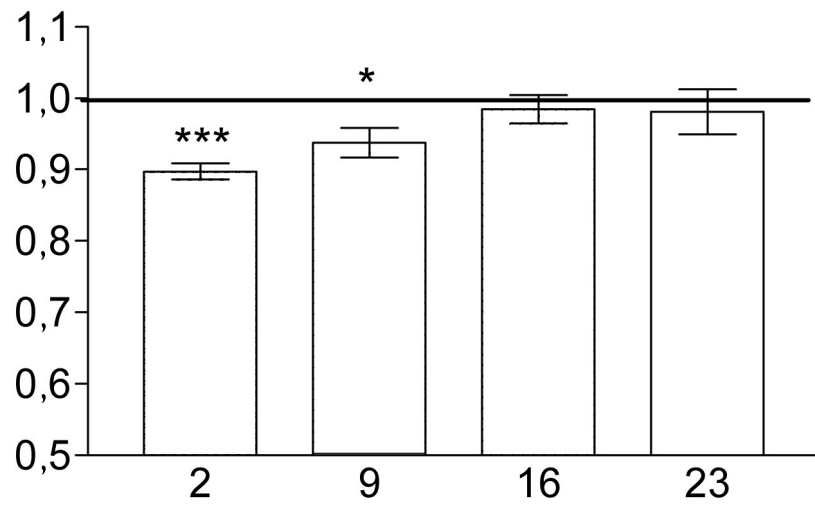
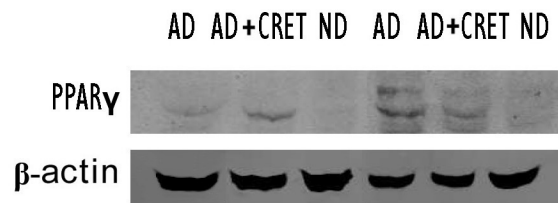


FIGURA 1

A



B

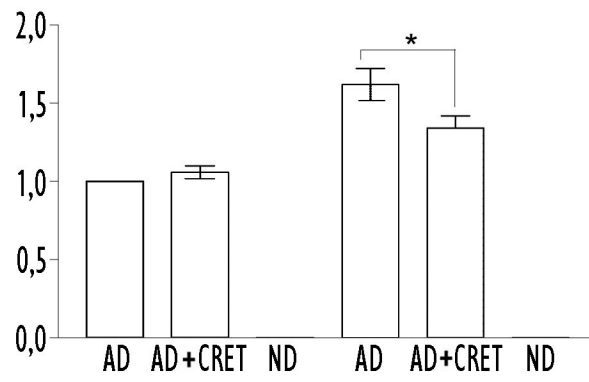
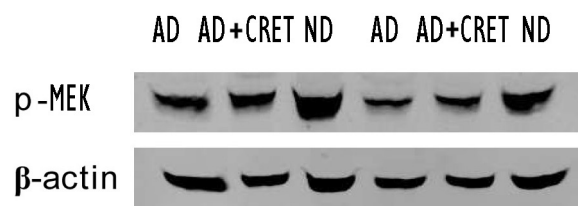


FIGURA 2

A



B

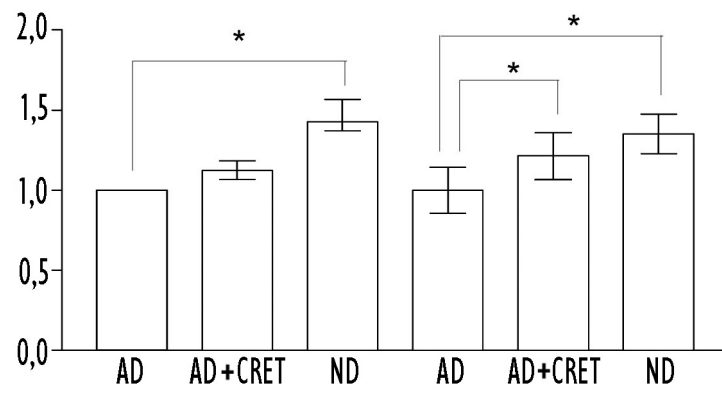


FIGURA 3

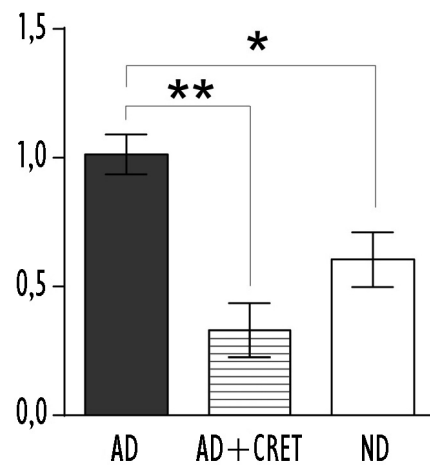


FIGURA 4

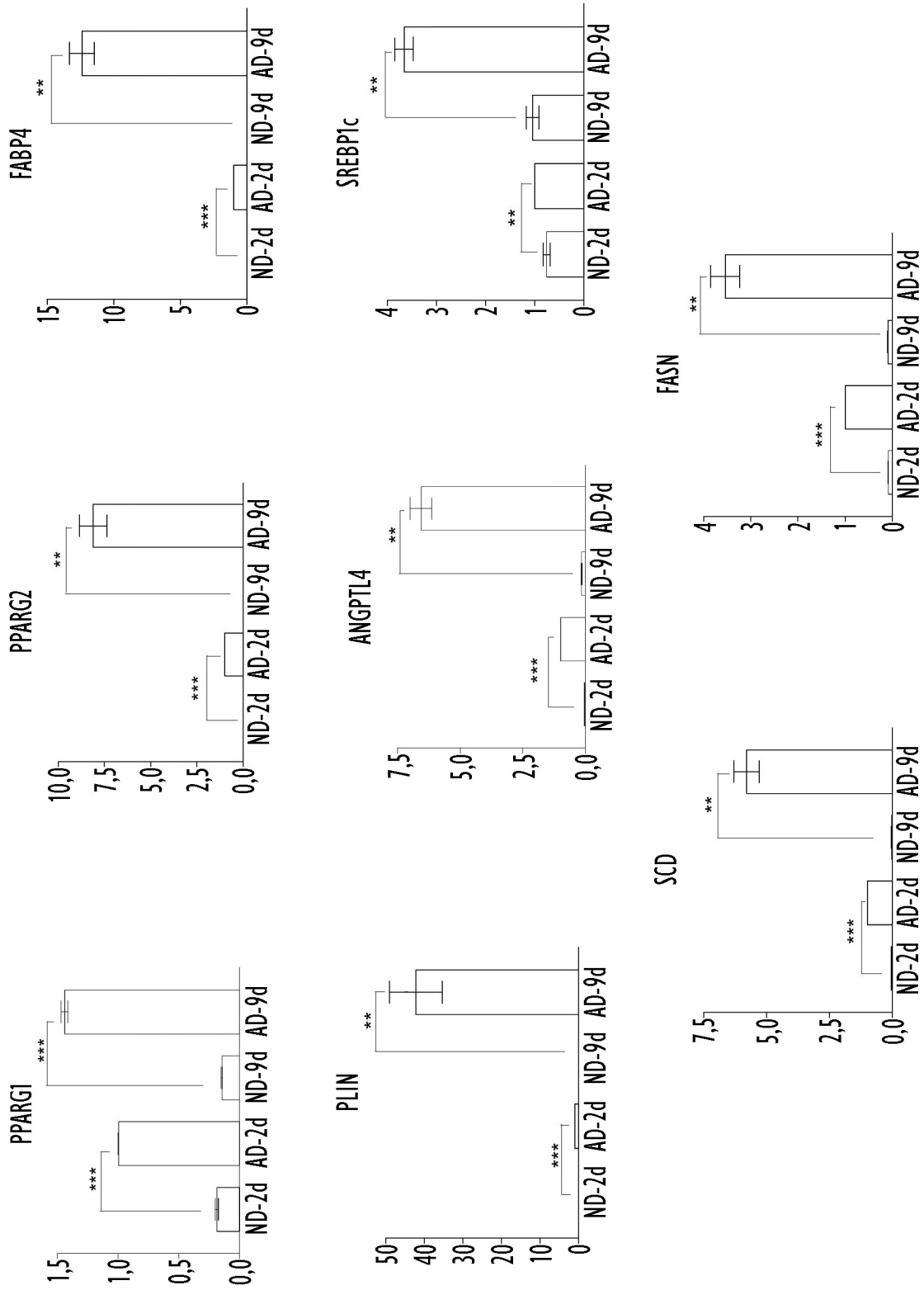


FIGURA 5

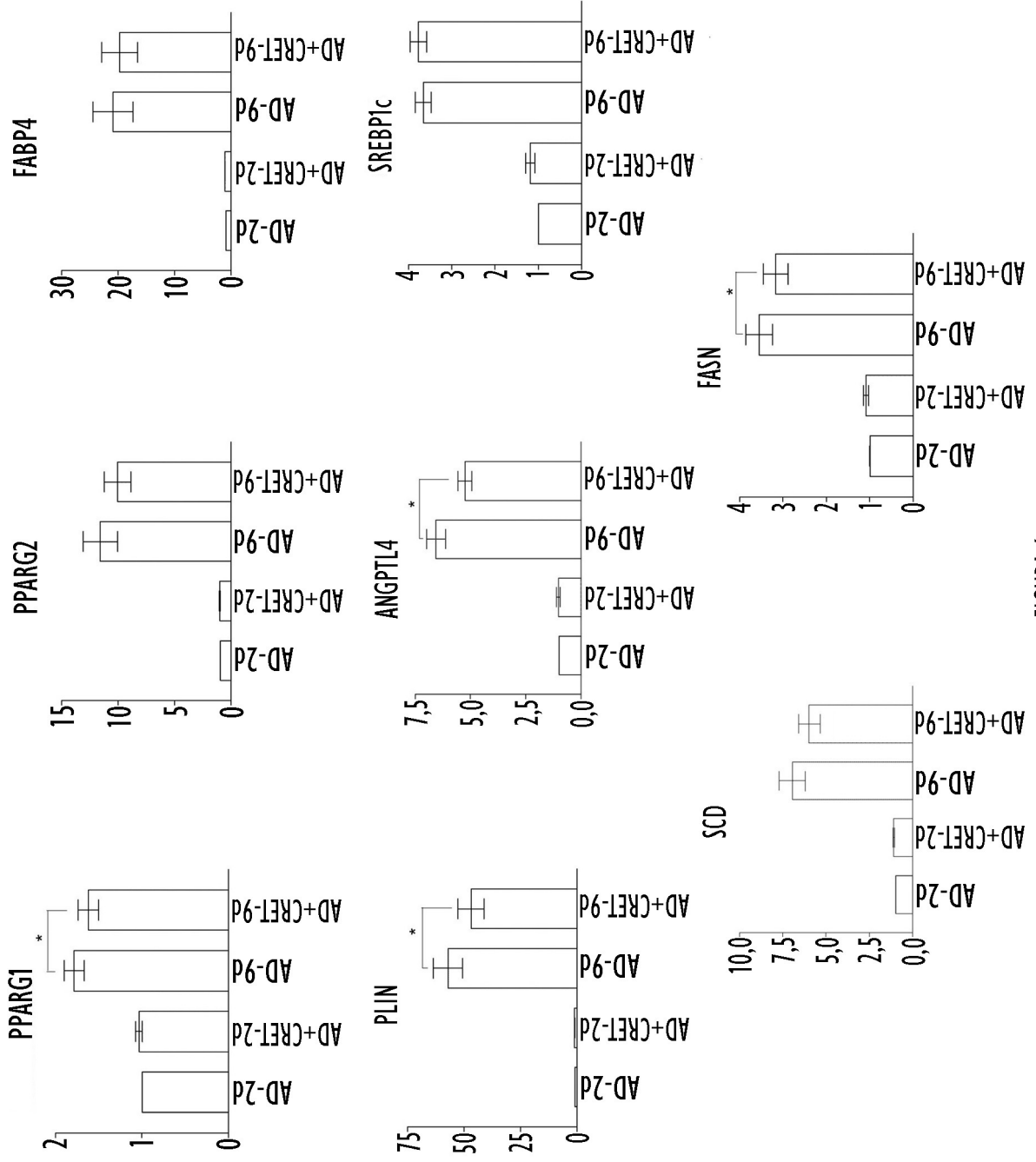


FIGURA 6



- ① N.º solicitud: 201531529
② Fecha de presentación de la solicitud: 23.10.2015
③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **A61N1/32** (2006.01)
C12N5/0775 (2010.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HERNÁNDEZ-BULE, M.L. et al. "Electric stimulation at 448 kHz promotes proliferation of human mesenchymal stem cells", Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, Switzerland, 2014, ISSN 1421-9778 (Electronic) VOL - 34, NR - 5, Páginas 1741-1755.	1-11
A	KATO SHINYA et al. "Repressive effects of a capacitive-resistive electric transfer (CRet) hyperthermic apparatus combined with provitamin C on intracellular lipid-droplets formation in adipocytes", International Journal of Hyperthermia, 2013, ISSN 1464-5157(electronic), VOL - 29, NR - 1, Páginas 30-37.	1-11
A	HERNÁNDEZ-BULE, M.L. et al. "Cytostatic response of HepG2 to 0.57 MHz electric currents mediated by changes in cell cycle control proteins", International Journal of Oncology, diciembre 2010, ISSN 1019-6439, VOL - 37, NR - 6, Páginas 1399-1405.	1-11
A	HERNÁNDEZ-BULE, M.L. et al. "Radiofrequency currents exert cytotoxic effects in NB69 human neuroblastoma cells but not in peripheral blood mononuclear cells", International Journal of Oncology, octubre 2012, ISSN 1019-6439, VOL - 41, NR - 4, Páginas 1251-1259.	1-11
A	HERNÁNDEZ-BULE M. L. et al, "Nonthermal levels of electric currents applied in capacitive electric transfer therapy provokes partial cytotoxic effects in human neuroblastoma cultures", Neurocirugía, España, agosto 2004, ISSN 1130-1473 (Print), VOL - 15, NR - 4, Páginas 366-371.	1-11
A	HERNÁNDEZ-BULE M.L. et al. "Molecular Mechanisms Underlying Antiproliferative and Differentiating Responses of Hepatocarcinoma Cells to Subthermal Electric Stimulation", PLoS One, enero 2014, ISSN 1932-6203(electronic), VOL - 9, NR - 1, páginas e84636.	1-11
A	WO 2014068698 A1 (INDIBA JAPAN CO. LTD.) 08.05.2014, resumen.	1-11
A	US 2007282318 A1 (SPOONER et al.) 06.12.2007, resumen; párrafo 93.	1-11
A	FRANCO WALFRE et al. "Controlled volumetric heating of subcutaneous adipose tissue using a novel radiofrequency technology", Lasers in surgery and medicine- United States, diciembre 2009, ISSN 1096-9101 (Electronic), VOL - 41, NR - 10, Páginas 745-750.	1-11

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

- para todas las reivindicaciones para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 17.05.2016	Examinador A. Cárdenas Villar	Página 1/6
--	----------------------------------	---------------



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201531529

②² Fecha de presentación de la solicitud: 23.10.2015

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A61N1/32** (2006.01)
C12N5/0775 (2010.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 02053224 A1 (ZHAROV VLADIMIR PAVLOVICH) 11.07.2002, resumen.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
17.05.2016

Examinador
A. Cárdenas Villar

Página
2/6

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61N, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, INSPEC, BIOSIS, MEDLINE, COMPDX, EMBASE, XPIEE, XPESP, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPEPEA, TXPEPFA, TXPEPGA, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPW0EA, TXPW0FA, TXPW0GA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.05.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HERNÁNDEZ-BULE, M.L. et al. "Electric stimulation at 448 kHz promotes proliferation of human mesenchymal stem cells", Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, Switzerland, 2014, ISSN 1421-9778 (Electronic) VOL - 34, NR - 5, Páginas 1741-1755.	
D02	KATO SHINYA et al. "Repressive effects of a capacitive-resistive electric transfer (CRet) hyperthermic apparatus combined with provitamin C on intracellular lipid-droplets formation in adipocytes", International Journal of Hyperthermia, 2013, ISSN 1464-5157(electronic), VOL - 29, NR - 1, Páginas 30-37.	
D03	HERNÁNDEZ-BULE, M.L. et al. "Cytostatic response of HepG2 to 0.57 MHz electric currents mediated by changes in cell cycle control proteins", International Journal of Oncology, diciembre 2010, ISSN 1019-6439, VOL - 37, NR - 6, Páginas 1399-1405.	
D04	HERNÁNDEZ-BULE, M.L. et al. "Radiofrequency currents exert cytotoxic effects in NB69 human neuroblastoma cells but not in peripheral blood mononuclear cells", International Journal of Oncology, octubre 2012, ISSN 1019-6439, VOL - 41, NR - 4, Páginas 1251-1259.	
D05	HERNÁNDEZ-BULE M. L. et al, "Nonthermal levels of electric currents applied in capacitive electric transfer therapy provokes partial cytotoxic effects in human neuroblastoma cultures", Neurocirugía, España, agosto 2004, ISSN 1130-1473 (Print), VOL - 15, NR - 4, Páginas 366-371.	
D06	HERNÁNDEZ-BULE M.L. et al. "Molecular Mechanisms Underlying Antiproliferative and Differentiating Responses of Hepatocarcinoma Cells to Subthermal Electric Stimulation", PLoS One, enero 2014, ISSN 1932-6203(electronic), VOL - 9, NR - 1, páginas e84636.	
D07	WO 2014068698 A1 (INDIBA JAPAN CO. LTD.)	08.05.2014
D08	US 2007282318 A1 (SPOONER et al.)	06.12.2007
D09	FRANCO WALFRE et al. "Controlled volumetric heating of subcutaneous adipose tissue using a novel radiofrequency technology", Lasers in surgery and medicine-United States, diciembre 2009, ISSN 1096-9101 (Electronic), VOL - 41, NR - 10, Páginas 745-750	
D10	WO 02053224 A1 (ZHAROV VLADIMIR PAVLOVICH)	11.07.2002

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud de patente en estudio tiene una reivindicación independiente, la nº 1, que se refiere a un procedimiento, con efecto única y exclusivamente cosmético, para reducir o prevenir la acumulación de tejido adiposo en una zona del cuerpo humano que se caracteriza por la aplicación de corriente eléctrica alterna con una frecuencia entre 0,4 y 0,6 MHz en condiciones subtérmicas con densidad de corriente entre 1 y 3000 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ y con una duración de cada sesión de 30 – 90 minutos. Las reivindicaciones dependientes R.3- R.10 se ocupan de los parámetros precisos de frecuencia, densidad de corriente y número y duración de las sesiones de aplicación. Las reivindicaciones dependientes R.2, R.11 se ocupan de especificar las zonas de aplicación.

En el estado de la técnica existen documentos que describen la utilización de corriente eléctrica alterna en condiciones subtérmicas sobre cultivos celulares empleando frecuencias comprendidas dentro del intervalo de frecuencias reivindicado y con una densidad de corriente también incluida en el intervalo citado.

Así, en el documento D01 se describe un procedimiento de aplicación "in vitro" para la proliferación de células madre mesenquimales humanas (células multipotenciales con la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células, como los adipocitos) que utiliza corriente eléctrica alterna con una frecuencia específica de 0,448MHz y una densidad de 50 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$. En los documentos D03 – D04 (citados en la propia solicitud) se encuentra descrita la aplicación de una corriente alterna de 0,57 MHz en condiciones subtérmicas con una densidad de corriente de 50 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ en cultivos de la línea celular HepG2 (D03) en donde se describe un efecto citostático y de diferenciación celular; y sobre cultivos celulares de la línea NB69 (D04) describiéndose un efecto citotóxico. También habían sido descritos con anterioridad el efecto citotóxico al aplicar corriente alterna de 0,5MHz sobre cultivos de neuroblastoma (D05) y los mecanismos que frenaban la proliferación de células cancerígenas (hepatocarcinoma) al aplicar corriente alterna de 0,57MHz con una densidad de 50 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ (D06).

Por otra parte, el documento D02 describe un tratamiento combinado de Transferencia Eléctrica Capacitiva Resistiva (TECR) con el empleo de una provitamina-C (aunque en condiciones de hipertermia) que suprime el proceso de adipogénesis en células OP9.

También existen documentos en el estado de la técnica que describen métodos y dispositivos que utilizan los efectos de la aplicación de la corriente alterna para la reducción de la acumulación de grasa.

El documento D07 (ver resumen) describe un dispositivo inhibidor de celulitis y cuerpos lipídicos (ver resumen) que utiliza la combinación de dos dispositivos: un primer dispositivo para el tratamiento por RF a una frecuencia específica de 0,45 MHz junto con un tratamiento térmico con temperatura ajustable con un ciclo de 1 a 30 min y un segundo dispositivo que emplea provitamina- C junto con un tratamiento a frecuencias de 5 a 15KHz.

El documento D08 reivindica un procedimiento para el tratamiento del tejido graso subcutáneo (incluyendo el tratamiento específico de la celulitis) que utiliza la aplicación de RF (ver resumen, párrafo 93) con frecuencias preferentemente comprendidas entre 0,5 y 10 MHz (aunque con aumento de la temperatura en el tejido).

El documento D09 se refiere al control volumétrico del calentamiento del tejido adiposo subcutáneo en tratamientos de RF a frecuencias entre los 0,5 MHz y los 4MHz.

El documento D10 describe un método y un dispositivo (ver resumen), para su aplicación en cosmética, que se utilizan para regular el contenido de grasa en el organismo. El método se basa en la aplicación de forma individual o conjunta de los efectos fototérmicos, fotoacústicos y fotodinámicos inducidos por una fuente lumínica.

Aunque en el estado de la técnica citado se encuentren ejemplos de la aplicación de corriente alterna en condiciones subtérmicas a determinadas frecuencias incluidas en el intervalo comprendido entre 0,4 y 0,6MHz y densidades de corriente de 50 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$; ejemplos de la utilización experimental de TECE en procesos de adipogénesis; y métodos y dispositivos para la utilización de RF en tratamientos con fines cosméticos para la reducción de grasa, no se ha encontrado ningún procedimiento basado en los parámetros de funcionamiento citados en la primera reivindicación que permita reducir y prevenir la acumulación de tejido adiposo y, por consiguiente, se ha considerado que dicha solicitud presenta novedad y actividad inventiva según lo especificado en los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.