

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 089**

51 Int. Cl.:

A61N 1/00 (2006.01)

A61B 18/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2006 PCT/CA2006/000938**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2006 WO06130979**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2006 E 06752775 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 1890761**

54 Título: **Métodos para aumentar la lipólisis**

30 Prioridad:

07.06.2005 US 687872 P

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

12.12.2017

73 Titular/es:

**TRANSFERT PLUS S.E.C. (100.0%)
550, SHERBROOKE STREET WEST, SUITE 100
MONTREAL, QUEBEC H3A 1B9, CA**

72 Inventor/es:

**BOUCHER, JEAN, P.;
SAVARD, ROLAND;
PORTMANN, MICHEL y
HAJ HAMIDA, ZIED**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 646 089 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

Métodos para aumentar la lipólisis

5 **CAMPO TÉCNICO**

La presente solicitud se refiere a métodos para aumentar la lipólisis en células, especialmente la lipólisis asociada a adipocitos. Dichos métodos pueden comprender la aplicación de una corriente eléctrica a las células. La aplicación de tal corriente aumenta la lipólisis en las células al tiempo que conserva sustancialmente la viabilidad de las células.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las mujeres, así como un número creciente de hombres, están obsesionados por la forma en que se ven y buscan nuevas alternativas para mejorar su imagen corporal. Aunque eficaz, la extirpación quirúrgica de la grasa es costosa y también puede ser arriesgada. Como tal, se han diseñado diversos métodos menos intrusivos y se usan para reducir la cantidad y la apariencia de grasa.

15

Uno de estos métodos es la electrolipólisis, en la que se dice que la estimulación eléctrica causa la reducción en la cantidad o la apariencia de grasa. Dicha tecnología se describe en diversas publicaciones (tales como las Patentes de Estados Unidos N.º 5.913.836 (expedida el 22 de junio de 1999), 5.425.752 (expedida el 20 de junio de 1995), 5.810.762 (expedida el 22 de septiembre de 1998), 6.326.177 (expedida el 4 de diciembre de 2001), 6.697.670 (expedida el 4 de febrero de 2004), las solicitudes de patente de Estados Unidos N.º 2002/0138117 (publicada el 26 de septiembre de 2002), 2002/0193831 (publicada el 19 de diciembre de 2002) y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO/1995/029732 (publicada el 9 de noviembre de 1995)). Estas técnicas generalmente implican la reducción del número de adipocitos, principalmente induciendo la muerte celular que puede producir una respuesta inflamatoria y, a largo plazo, aumentar el número de células adiposas como una reacción de rebote directo.

20

25

Otra clase de métodos para reducir la aparición de grasa consiste en modular la actividad de receptores específicos en células que contienen lípidos para activar la lipólisis en estas células, ya sea disminuyendo la liponeogénesis o aumentando la lipólisis. Un receptor implicado en la mediación de los efectos liponeogénicos/lipolíticos es el receptor de sulfonilurea-1 (SUR 1). Este receptor, descrito en la patente de Estados Unidos N.º 6.492.130 (expedida el 10 de diciembre de 2002), se expresa mediante adipocitos y activa los canales de potasio.

30

Otro receptor implicado en la lipólisis es el receptor β -adrenérgico. Las vías de señalización acopladas a receptores β -adrenérgicos son estimuladas por hormonas naturales, tales como la noradrenalina y la adrenalina. Tras la activación de estos receptores, la subunidad α_s de la proteína G_s normalmente acoplada a los receptores, se disocia y activa la adenilato ciclasa unida a la membrana, que transforma ATP en AMP cíclico (cAMP). En consecuencia, el AMPc intracelular se acumula y activa la proteína cinasa A (PKA). Después, la PKA fosforila y activa la lipasa sensible a las hormonas que rápidamente conduce a la activación de una cascada lipolítica y a la liberación de ácidos grasos libres y glicerol.

35

40

Las vías de transducción de señales asociadas a receptores β -adrenérgicos se activan rápidamente tras la estimulación e inducen modificaciones intracelulares drásticas. La actividad de estos receptores está, por lo tanto, estrechamente regulada. Treinta minutos después de su activación, los receptores β -adrenérgicos son fosforilados por diversas cinasas celulares (tal como PKA, proteína cinasa C o PKC, y el receptor cinasa β -adrenérgico o β -ARK) que disminuyen la actividad de los receptores y finalmente, dos horas más tarde, conduce a la desensibilización (por ejemplo, falta de respuesta) de los receptores. Además, cuando los receptores se estimulan durante un largo período de tiempo, los receptores se internalizan y se degradan, lo que finalmente reduce el número total de receptores y mejora aún más el fenómeno de desensibilización. Como tal, estos receptores β -adrenérgicos ya no son capaces de estimular la lipólisis en los adipocitos (fenómenos de "desensibilización").

45

50

Este fenómeno de "desensibilización" se observa con frecuencia en sujetos obesos o en sujetos que tienen un exceso de deposición de grasa androide o ginoide. En consecuencia, en estos sujetos, la estimulación de los receptores β -adrenérgicos no conduce a la lipólisis y la reducción de grasa.

55

Sería muy deseable disponer de métodos para aumentar la lipólisis en un sujeto. En una realización, dichos métodos no deberían implicar al receptor β -adrenérgico o sus vías de señalización asociadas y/o provocar la desensibilización de dichos receptores. En otra realización, dichos métodos deberían limitar la muerte celular y/o conservar la viabilidad celular. El documento FR-A-2 694 501 representa la técnica anterior más relevante.

60

RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para aumentar la lipólisis en una célula de un sujeto, comprendiendo dicho método aplicar una corriente eléctrica a dicha célula, en el que dicha célula sigue siendo sustancialmente viable después de dicha aplicación.

65

En otra realización de la presente invención, dicha corriente eléctrica es bifásica o monofásica.

5 De acuerdo con la presente invención, dicha corriente eléctrica a nivel de célula es de aproximadamente 2 mA a aproximadamente 6 mA, más preferiblemente es de aproximadamente 4 mA.

En otra realización, dicha corriente eléctrica provoca una despolarización de la membrana de dicha célula. Además, la despolarización provoca una alteración en la actividad de un canal de iones en dicha célula.

10 De acuerdo con la presente invención, dicha despolarización provoca una disminución en la actividad de un canal iónico en dicha célula. El canal iónico es preferiblemente uno de la familia de canales iónicos seleccionado del grupo que consiste en EAG, KCNQ, SK, slo y Kv.

15 Además, el canal iónico se selecciona del grupo que consiste en eag, erg, elk, KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4, KCNQ5, Kv1, Kv2, Kv3, Kv4, Kv5, Kv6, Kv7, Kv8, y Kv9.

Además, el canal iónico es un canal de potasio.

20 En una realización adicional, el sujeto es un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

De acuerdo con la presente invención, el adipocito se sitúa en un tejido subcutáneo, un tejido adiposo visceral o un tejido intramuscular. Además, el tejido subcutáneo está situado en una región seleccionada del grupo que consiste en brazo, rodilla, pantorrilla, abdomen, muslo, nalga y cadera.

25 De acuerdo con la presente invención, el aumento en la lipólisis es al menos 1,5 veces con respecto al nivel de lipólisis en una célula de control.

La invención se define en la reivindicación 1. Cualquier realización que no esté dentro del alcance de la presente reivindicación 1 no es parte de la invención.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

La figura 1 ilustra un histograma de los medios y las desviaciones estándar para las diversas condiciones evaluadas, en el que los resultados se expresan como 10^5 M de glicerol liberado;

35 la figura 2 ilustra el efecto de la estimulación eléctrica bifásica sobre la lipólisis de adipocitos en seres humanos;

la figura 3 ilustra los efectos de la estimulación eléctrica monofásica sobre la lipólisis de adipocitos en seres humanos; y

40 la figura 4 ilustra un transcurso temporal de las concentraciones de glicerol (se mide cada 10 min);

la figura 5 ilustra un histograma de los medios y las desviaciones estándar de las concentraciones de glicerol; y

la figura 6 ilustra un histograma de los cambios porcentuales relativos a los valores de referencia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

45

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan métodos, usos y paquetes para aumentar la lipólisis. Dichos métodos, usos y paquetes comprenden la aplicación de una corriente eléctrica y conservan sustancialmente la viabilidad.

50 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para aumentar la lipólisis en una célula. El término "lipólisis" pretende referirse a la hidrólisis de lípidos. Más específicamente, el término "lipólisis" de células grasas también se usa para incluir la hidrólisis de triglicéridos intracelulares y la liberación de ácidos grasos libres y glicerol de las células. La lipólisis generalmente tiene lugar intracelularmente en células que contienen una gota de lípido. La lipólisis se puede medir de diversas maneras para los expertos en la técnica, tales como la evaluación de la liberación de ácidos grasos libres y de la liberación de glicerol (véanse los Ejemplos a continuación), mediante bioluminiscencia, etc. La evaluación de la liberación de glicerol de las células es la mejor manera de medir la lipólisis, ya que el glicerol no puede volver a entrar en las células grasas cuando se libera, mientras que los ácidos grasos libres pueden hacerlo.

60 El método comprende aplicar una corriente eléctrica a la célula. En una realización, dicha célula sigue siendo sustancialmente viable después de la aplicación de la corriente. Como se usa en el presente documento, el término "viable" o "viabilidad" pretende referirse a la capacidad de una célula para realizar sus funciones previstas. Las funciones de la célula pueden variar de acuerdo con el tipo de célula. Las funciones celulares pueden incluir, por ejemplo, división celular, traducción, transcripción, ensamblaje y maduración de proteínas, secreción de proteínas, almacenamiento de compuestos (por ejemplo, proteínas, lípidos, etc.), capacidad de respuesta a estímulos externos, migración, etc. Un método en el que una célula sigue siendo "sustancialmente viable" después de la aplicación de la

65

corriente eléctrica es uno que no altera irreversiblemente la capacidad de la célula para realizar su función prevista. Como alternativa, cuando se aplica a una población de células, dicho método no induce la muerte celular (ya sea por apoptosis o lisis) en la mayoría de las células, ni causa una alteración en las funciones de la mayoría de las células. En una realización, la aplicación de la corriente eléctrica conserva la viabilidad de más del 50 % de las células, más del 60 % de las células, más del 70 % de las células, más del 80 % de las células, más del 90 % de las células, más del 95 % de las células, o más del 99 % de las células. En la presente invención, la viabilidad de las células de grasa se refiere a su capacidad para activar la lipólisis mediante receptores β -adrenérgicos y mediante una cantidad no significativa de lisis celular.

10 Como se ha mencionado anteriormente, la corriente eléctrica debería ser adecuada para administración o aplicación a nivel fisiológico. La corriente eléctrica se puede medir en amperios (A) o miliamperios (mA). La intensidad de la corriente eléctrica se puede medir de diferentes maneras usando diversos medios conocidos por los expertos en la técnica. En una realización, la intensidad de la corriente eléctrica se mide usando un amperímetro (véanse los Ejemplos anteriores), o con un osciloscopio. La corriente eléctrica aplicada es inferior a 7 mA. Por ejemplo, la corriente eléctrica puede ser de aproximadamente 2 mA a aproximadamente 6 mA. En otra realización más, la corriente eléctrica puede ser de 4 mA. La corriente eléctrica anterior es un "filtro" al nivel de la célula. Un experto en la técnica tendrá que ajustar este valor en función del sujeto a tratar, el porcentaje de grasa y/o músculo del área a tratar en un sujeto. Este valor también variará según la impedancia de la piel. Un experto en la técnica sabrá fácilmente cómo medir el filtro de corriente eléctrica a nivel de la célula, es decir, la corriente que llega a la célula y a la que está sometida la célula.

En una realización, la corriente eléctrica aplicada puede despolarizar la membrana de la célula. Las células vivas mantienen una diferencia en las concentraciones de iones (por ejemplo, cationes) a través de su membrana celular. Esta diferencia en la distribución de iones a ambos lados de la membrana celular permite la formación de una diferencia de potencial a través de la membrana celular (por ejemplo, el potencial de membrana). Normalmente, en las células en reposo, el espacio intracelular contiene más electrolitos negativos (por ejemplo, aniones) o menos iones positivos (cationes) que el medio extracelular. En los métodos descritos en el presente documento, la aplicación de la corriente eléctrica puede alterar (por ejemplo, disminuir) la diferencia de potencial entre cada lado de la membrana de la célula y, en consecuencia, alterar (por ejemplo, disminuir) el potencial de la membrana.

El potencial de voltaje o de membrana surge de las diferencias en la concentración de los electrolitos (por ejemplo, iones) a través de la membrana celular. Para conseguir esta diferencia en la concentración iónica, estas células generalmente contienen canales iónicos y bombas de iones. La expresión "canal iónico" pretende referirse a un polipéptido que abarca la membrana capaz de controlar el movimiento de ciertos iones a través de la membrana. Dicho canal permite la formación de un gradiente iónico a cada lado de la membrana celular y, en consecuencia, permite la polarización de la membrana celular. En otra realización, la despolarización causada por la corriente eléctrica puede alterar (por ejemplo, disminuir) la actividad de dicho canal iónico en la célula.

En algunas células, es la diferencia en la concentración de electrolitos (o iones) de potasio (K⁺) y sodio (Na⁺) la que permite la formación de un potencial de membrana. Como tal, en una realización, el canal iónico descrito anteriormente es un canal de potasio. En otra realización más, el canal de potasio puede comprender una de las secuencias polipeptídicas. De una manera más general, en la presente invención, la corriente eléctrica puede interferir con los canales iónicos para abrir dicho canal o cerrar el mismo para crear un potencial de membrana que surge de las diferencias en la concentración de los electrolitos (por ejemplo, iones) a través de la membrana celular. Los canales iónicos que pueden verse afectados en la presente invención son, por ejemplo, pero sin limitación, los de las familias EAG (eag, erg, y elk), KCNQ (KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4, y KCNQ5), SK, slo, y Kv (Kv1, Kv2, Kv3, Kv4, Kv5, Kv6, Kv7, Kv8, y Kv9). Todas estas familias de canales iónicos, y sus miembros específicos, se conocen por los expertos en la técnica.

Ramirez-Ponce et al. han demostrado la presencia de canales de potasio abiertos por voltaje en membranas de adipocitos blancos de rata (1990, "Electrical activity in white adipose tissue of rat", Rev. Esp. Fisiol. 46(2): 133-188; 1991, "Effects of noradrenaline and insulin on electrical activity in white adipose tissue of rat", Rev. Esp. Fisiol. 47: 217-21; 1996, "Voltage-Dependent Potassium Channels in White Adipocytes", Biochem and Biophysical Research Communications; y 1998, "Noradrenaline modulates the electrical activity of white adipocytes by a cAMP-dependent mechanism", J Endocrinol) y humanos (2003, "Human Adipose Cells Have Voltage-dependent Potassium Currents", J. Membrane Biol. 196: 129-134). Han demostrado que las hormonas lipolíticas (por ejemplo, noradrenalina) y no lipolíticas (por ejemplo, insulina) modulan las propiedades eléctricas de las membranas de adipocitos blancos. Más específicamente, han demostrado que la noradrenalina causa una despolarización de la membrana de adipocitos, mientras que la insulina provoca una hiperpolarización. Han sugerido que, cuando los adipocitos se estimulan con noradrenalina, la acumulación resultante de cAMP intracelular modula (por ejemplo bloquea) la conductancia de los canales de potasio. El efecto de cAMP en los canales de potasio abiertos por voltaje también se ha investigado en otros tipos de células (Bruggmann et al. 1993, "Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP", Nature 365: 445-448; Chung y Kaczmare 1995, "Modulation of the inactivation of voltage-dependent potassium channels by cAMP", J. Neurosci. 15: 3927-3935; Deadwyler et al. 1995, "Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process", Pharmacol. Exp. Ther. 273(2): 734-743; Wilson et al. 2000, "ATP and beta adrenergic stimulation enhance voltage-

gated K current inactivation in brown adipocytes", Am. J. Physiol. 279: C1847-C1858).

Se pueden usar diversas células en los métodos descritos anteriormente. Dichas células incluyen, pero sin limitación, adipocitos. El término "adipocito" pretende referirse a una célula cuya función más conocida es el almacenamiento y la descomposición de la grasa. Los adipocitos generalmente se tiñen positivamente con rojo aceite O (que muestra la acumulación intracelular de lípidos) y expresan la lipoproteína lipasa, así como la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa. Existen dos tipos de adipocitos: adipocitos blancos y marrones. Los adipocitos blancos contienen principalmente una gran gota de lípidos, mientras que los adipocitos marrones contienen principalmente pequeñas gotas de lípidos y muchas mitocondrias. La función celular de los adipocitos marrones es la producción de energía térmica. A menos que se especifique otra cosa, y como se usa en el presente documento, el término "adipocito" se usa para referirse a adipocitos blancos.

En aún otra realización, el adipocito puede estar localizado en diversos tejidos. Los métodos se pueden aplicar en cualquier lugar donde haya adipocitos. Los adipocitos pueden ubicarse en el brazo (por ejemplo, cara lateral o posterior), el abdomen (por ejemplo, por encima y por debajo del ombligo), en las caderas, en el muslo (por ejemplo, cara externa, posterior o interna), alrededor del área de la rodilla (por ejemplo, por encima del área de la rodilla, cara interna), las pantorrillas (por ejemplo, cara posterior), la nalga.

Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse en tejido adiposo que puede someterse a una corriente eléctrica. Dichos tejidos incluyen, pero sin limitación, tejidos adiposos subcutáneos, tejidos adiposos viscerales y tejidos intramusculares.

Los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para aumentar la lipólisis en una célula en al menos 1,5 veces con respecto a una célula de control. La célula de control, como se describe en el presente documento, es una célula que no se ha sometido a la corriente eléctrica, tal como la célula de control descrita en los Ejemplos a continuación. La célula de control no ha sido sometida a ningún tratamiento que altere su nivel lipolítico. La célula de control puede derivarse del mismo sujeto que la célula sometida a la corriente eléctrica.

En otra realización, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para eliminar grasa en áreas muy específicas, por ejemplo, en tejidos que contienen una cantidad de grasa que puede eliminarse por razones estéticas/cosméticas o terapéuticas. La deposición de grasa en los hombres se observa habitualmente en la región abdominal (por ejemplo, grasa androide), mientras que en las mujeres, por lo general se observa en las regiones de la cadera, el muslo y los glúteos (por ejemplo, grasa ginoide). La grasa androide normalmente se asocia con un mayor riesgo de complicaciones cardiovasculares. Aunque la grasa androide se ve generalmente en los hombres y la grasa ginoide en las mujeres, el patrón de deposición de grasa no está determinado únicamente por el sexo. Algunas mujeres, por ejemplo durante o después de la menopausia, pasarán de un patrón de deposición de grasa ginoide a un patrón de deposición de grasa androide. Los métodos descritos en el presente documento también pueden servir en el tratamiento de otros trastornos asociados con la distribución de grasa, tales como lipodistrofia y obesidad. Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para acelerar el retorno a un estado de grasa normal después de uno o más embarazos, detener o ralentizar el efecto anti-lipolítico de la insulina en sujetos que padecen diabetes tipo II, o favorecer el uso de lípidos durante una sesión de entrenamiento.

Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse en solitario o en combinación con otras técnicas conocidas para aumentar la lipólisis. Por ejemplo, los métodos pueden usarse en combinación con fármacos conocidos por inducir lipólisis, tales como agonistas del receptor β -adrenérgico, u otros fármacos tales como metilxantinas (cafeína o teofilina) o suplementos de estrógenos. Los métodos también podrían usarse en asociación con un régimen de ejercicios dirigido a reducir el porcentaje de grasa. Dicho régimen de ejercicio puede incluir, pero sin limitación, entrenamiento cardiovascular y entrenamiento con pesas (por ejemplo, para desarrollar masa muscular y/o mejorar la resistencia muscular). Los métodos también podrían usarse junto con una dieta destinada a reducir el porcentaje de grasa y/o el peso total (por ejemplo, una dieta baja en carbohidratos, una dieta baja en grasas). Los métodos también pueden usarse junto con otros medios estéticos/cosméticos destinados a reducir la aparición de grasa (por ejemplo, crema anticelulítica, drenaje linfático, etc.). Los métodos pueden usarse adicionalmente junto con bebidas electrolíticas (tales como Gatoraid™, Ultimate replenished™, etc.) que modificarán el contenido de electrolitos de un tejido, modulando así el efecto de los métodos de la presente invención. Los métodos de la presente invención también pueden ir seguidos de un programa de ejercicio al que un paciente se adherirá para mejorar el metabolismo eliminando la grasa liberada de este modo por el método de la presente invención.

La corriente eléctrica descrita en el presente documento también se puede usar para aumentar la lipólisis en una célula. Se han descrito anteriormente diferentes realizaciones de la corriente eléctrica. La corriente eléctrica usada en el presente documento también puede conservar la viabilidad de una célula. La corriente eléctrica se puede aplicar, por ejemplo, en adipocitos o en áreas que contienen tejidos adiposos (se han descrito anteriormente diferentes realizaciones de los adipocitos y de los tejidos adiposos). La corriente eléctrica también puede ser adecuada para ser aplicada a un mamífero, y además a un ser humano.

La presente invención también comprende paquetes que comprenden medios para aplicar la corriente eléctrica e instrucciones para su uso en el aumento de la lipólisis. Se han descrito anteriormente diferentes realizaciones de las corrientes eléctricas y los usos.

- 5 La presente invención se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan para ilustrar la invención en lugar de limitar su alcance.

EJEMPLO I

10 Preparación de adipocitos para la estimulación y medición de la lipólisis

Material y métodos

- 15 *Muestras tisulares.* Se obtuvieron tejidos adiposos de 11 mujeres premenopáusicas, menores de 45 años, que se sometieron a una liposucción o una cirugía estética en la región suprailíaca.

- 20 *Aislamiento de adipocitos.* Los tejidos adiposos se colocaron primero en tampón de Krebs y se transportaron al laboratorio. Fragmentos de tejido adiposo fresco se incubaron entonces en una solución de colagenasa tipo II (reconstituida en tampón de Krebs, 5 mg de colagenasa por g de tejido, Sigma) durante 30 minutos a 37 °C en agitación (100 rpm) en una atmósfera controlada (O₂ al 95 %, CO₂ al 5 %) (Rodbell, 1964). Después del período de incubación, la suspensión celular se filtró a través de una malla de nailon de 250 µm y se separó de la fracción estromal y vascular por flotación. Los adipocitos recuperados se lavaron después tres veces con 5 ml de tampón de Krebs (precalentado a 37 °C, sin colagenasa) para eliminar cualquier rastro de la colagenasa. Para el último lavado, la concentración de adipocitos se ajustó a 500 células/50 µl. Los adipocitos se contaron usando un hemocitómetro
- 25 Neubauer usando colorante azul de tripano. Solamente los adipocitos que contienen una gota de lípido definida se consideraron para los fines presentados en el presente documento. La concentración celular se ajustó después entre 500 y 1000 adipocitos/50 µl. La técnica de aislamiento de adipocitos descrita en el presente documento permite el estudio de la estructura celular, el ión celular y la transferencia de nutrientes y la regulación hormonal de la lipólisis.

- 30 *Estimulación eléctrica.* La suspensión celular se colocó entre dos electrodos de caucho de carbono. Los electrodos tienen 4,7 cm de ancho y 1,4 cm de largo. Se colocaron a 8 cm de distancia en una placa de Petri. Los electrodos se diseñaron de tal manera que, cuando la placa de Petri se cierra, entran en contacto con el fondo de la placa.

- 35 Se usó un generador de potencia (tal como K0406, 0-30Vdc, 50 mA o Grass S80 adaptado para seguir en tiempo real la variación de corriente e impedancia, a fin de poder mantener preferiblemente la constante de corriente a nivel de la célula) para controlar estrictamente la corriente. En todas las experimentaciones realizadas, se usaron impulsos de ondas cuadradas de 500 ms seguido de un período no estimulante de 500 ms (correspondiente a una frecuencia de 1 Hz). La intensidad de la corriente era de 4, 8 o 20 mA. La intensidad de la corriente se controló estrechamente con un amperímetro (tal como FLUKE 179) en el lado del ánodo. Los impulsos se controlaron con un
- 40 osciloscopio (Tektronix™ TDS 2022, osciloscopio de almacenamiento digital, Estados Unidos).

- 45 Las células se estimularon eléctricamente durante 30 minutos en un baño de agua agitada (40 rpm) a 37 °C. Las células no sometidas a la corriente eléctrica se usaron como células de control (por ejemplo, INICIAL) o se estimularon con isoproterenol (SIGMA: ISO, 10⁻⁴ M).

- 50 La resistencia a lo largo de un electrodo varía de alguna manera entre 30 y 60 ohms. La resistencia de la solución se estima en aproximadamente 10 ohms. Esta diferencia en resistencias permite la formación de un campo eléctrico que cubre toda la superficie de la placa de Petri. Debido a que la resistencia de la solución es menor que la resistencia del electrodo y debido a que la solución se agita durante todo el período de estimulación, se cree que los adipocitos se estimulan uniformemente.

- 55 *Evaluación de la lipólisis.* Debido a que los ácidos grasos libres pueden reesterificarse dentro del adipocito mientras que el glicerol no lo está, la lipólisis se evaluó midiendo la liberación de glicerol. El glicerol se midió indirectamente mediante la evaluación de la formación de NADH producida durante su transformación enzimática. El NADH se midió usando un espectrofotómetro (Pharmacia LKB-Novaspec), a una longitud de onda de 340 nm. Los resultados se expresan como µmol de glicerol liberado por 10⁶ adipocitos por 30 minutos.

- 60 *Evaluación de la viabilidad celular.* La viabilidad celular se evaluó contando células viables usando un hematocitómetro Neubauer y el colorante azul de tripano. La viabilidad celular se evaluó antes de la estimulación eléctrica (0 min) y después de la estimulación eléctrica (30 min, 60 min, o 90 min).

- 65 *Análisis estadístico.* Los experimentos se realizaron por triplicado. Se usaron células obtenidas de once (11) individuos para el control (INICIAL), estimulación con isoproterenol (ISO) y condiciones de 4 mA. Se usaron células de cuatro (4) individuos para la condición de 8 mA y de siete (7) individuos para la condición de 20 mA. Se calcularon la media y la desviación estándar.

EJEMPLO II**Lipólisis de los adipocitos obtenida después de la estimulación eléctrica****5 Resultados**

Se aislaron los adipocitos y se estimularon eléctricamente como se describe en el Ejemplo 1. La Tabla 1 resume los resultados obtenidos.

10

Tabla 1

Análisis estadístico de los datos obtenidos (μM de glicerol)					
Condición experimental	INICIAL	ISO	4 mA	8 mA	20 mA
Media	1,4	3,7	2,3	2,1	1,4
Desviación estándar	0,4	2,1	0,8	0,9	0,7
Coefficiente de variación	29 %	57 %	34 %	41 %	53 %
N	11	11	11	4	7

15

Los resultados presentados en el presente documento muestran que la lipólisis de los adipocitos se aumentó 2,6 veces cuando los adipocitos se estimularon con isoproterenol en comparación con los valores de control (INICIAL, por ejemplo, sin tratamiento). A una concentración de 10^{-4} M, se sabe que el isoproterenol estimula los receptores β -adrenérgicos, estimula la lipólisis y facilita la liberación de glicerol.

20

Como se muestra en la figura 1, una estimulación eléctrica con una corriente de 4 mA aumentó la lipólisis de los adipocitos 1,6 veces por encima de los valores iniciales ($p < 0,001$). La lipólisis medida para la condición de isoproterenol (ISO) es significativamente más alta que la lipólisis medida para la condición de control (INICIAL). La lipólisis medida para la condición de 4 mA es significativamente más alta que la lipólisis medida para la condición de control (INICIAL), pero no es significativamente diferente de la lipólisis medida para la condición de isoproterenol (ISO). La estimulación de la lipólisis inducida por la corriente de 4 mA no es estadísticamente diferente de la inducida por la administración de isoproterenol.

25 EJEMPLO III**Lipólisis de los adipocitos obtenida después de la estimulación eléctrica bifásica**

30

Se probó si la estimulación eléctrica bifásica puede inducir la lipólisis en adipocitos.

35

Se usaron 4 mujeres entre 40-52 años de edad como sujeto. El tejido adiposo se obtuvo de áreas suprailíacas a través de la liposucción.

40

Se describe que el isoproterenol (ISO) aumentó la lipólisis de los adipocitos en un 15 %, es decir, a un nivel no significativo (figura 2). Estos datos son muy importantes ya que muestran claramente que las 4 mujeres son resistentes a la pérdida de grasa a través de la estimulación del receptor β -adrenérgico, que se conoce como la principal vía de estimulación de la lipólisis de los adipocitos. Por otro lado, la estimulación bifásica de 6 mA aumentó de manera significativa (a través de procedimientos de prueba T repetidos) la lipólisis en 2,3 veces sobre el valor inicial, contrarrestando de este modo la resistencia β -adrenérgica adipocítica observada con ISO. Además, la estimulación bifásica de 4 mA aumentó la lipólisis inicial en 1,8x, por lo tanto, a un nivel más bajo que la estimulación de 6 mA.

45

Estos datos confirman que una estimulación eléctrica bifásica puede ceder con éxito a pérdidas de grasa en el tejido adiposo.

EJEMPLO IV**Lipólisis de adipocitos obtenida después de la estimulación eléctrica monofásica**

50

En correlación con la presente invención, también se midió la estimulación monofásica en la lipólisis de adipocitos en seres humanos.

55

Se describe que las estimulaciones monofásicas de 2 mA y 6 mA aumentaron la lipólisis inicial en menos del 15 % (figura 3). Este nivel de estimulación no parece significativo a través de procedimientos de prueba T repetidos.

Estos datos confirman que en el caso de las estimulaciones monofásicas, una corriente entre 2 mA y 6 mA, y preferiblemente 4 mA, logró aumentar significativamente la lipólisis de los adipocitos.

EJEMPLO V**Viabilidad celular después de la estimulación eléctrica del adipocito**

5 La viabilidad celular se determinó usando dos maneras: en primer lugar a través de un colorante azul de tripano que consiste en contar solamente las células que mostraban su membrana coloreada con azul de tripano, mientras que las células con su color citosólico se consideraron no viables; en segundo lugar, las células se estimularon por ISO después de haber sido estimuladas eléctricamente durante 30 minutos. Por lo tanto, si la estimulación eléctrica afecta al metabolismo de las células, su respuesta a ISO disminuirá.

10 Para el estudio monofásico, la estimulación de 2 mA y 4 mA no tuvo efecto sobre el recuento celular y la estimulación con ISO de la lipólisis fue normal. Sin embargo, los 6 mA mostraron una pequeña disminución del recuento celular, pero la estimulación ISO también fue normal.

15 Después de la estimulación bifásica, las estimulaciones de 4 mA y 6 mA no tuvieron efecto sobre el recuento celular y la estimulación con ISO de la lipólisis de adipocitos fue normal.

20 Los datos respaldan el hecho de que las estimulaciones monofásicas a 2 mA y 4 mA, así como las estimulaciones bifásicas a 4 mA y 6 mA no afectan a la viabilidad celular. Además, se debe tener en cuenta que, en el presente estudio, las células se aislaron del tejido humano y, por lo tanto, eran mucho más frágiles que *in situ*. Por lo tanto, es razonable considerar para una persona experta en la técnica que la presente estimulación eléctrica (monofásica 2 mA 4 mA, bifásica 4 mA 6 mA) no tiene ningún efecto sobre la viabilidad de las células si se aplica *in vivo*.

EJEMPLO VI

25

Flujo de corriente pasante

30 En correlación con la presente invención, se evaluó una prueba previa para medir la eficacia de la corriente que fluye a través de la piel. Se realizó una estimulación eléctrica transcutánea muscular. El objetivo fue evaluar la pérdida de amplitud de la corriente que fluye a través de la piel. Además, también se evaluó la medición de la intensidad de la pérdida de corriente debido a la resistencia de la piel.

35 Se usó una corriente de 4 mA con una corriente monofásica de 500 ms. No se observó dolor en el paciente, por lo que la corriente no estimulaba las fibras nerviosas responsables de la sensación de dolor. También se observó que una aplicación de una corriente de 4 mA da como resultado una contracción muscular, por lo tanto, el reclutamiento de fibras motoras. En consecuencia, una persona experta en la técnica reconocerá que una gran mayoría de la corriente fluía a través de la barrera cutánea y los adipocitos con el fin de alcanzar las fibras musculares y producir una contracción muscular. Al menos 3,8 mA de los 4 mA se hicieron fluir a través de la piel de manera eficiente. En consecuencia, el 95 % de la estimulación de corriente aplicada fluyó a través de la barrera cutánea. Además, la onda de estimulación cuadrada no se vio afectada ya que se estimularon neuronas motoras alfa. Las neuronas motoras alfa se despolarizan de manera eficiente mediante ondas de estimulación cuadradas. La observación en el osciloscopio mostró que solamente se apreció una leve deformación de la onda. Se observó una pequeña curva de la onda que estaba asociada a la capacitancia de la piel.

45 Estos datos demuestran que el 95 % de la estimulación de corriente aplicada fluyó a través de la barrera cutánea y que la onda estimulante se puede considerar como una onda cuadrada fisiológicamente.

EJEMPLO VII**Microdiálisis *in vivo***

50 En correlación con la presente invención, se ensayó la microdiálisis *in vivo*. La microdiálisis es una técnica que permite estimular el tejido adiposo *in vivo*.

55 En resumen, ha de implantarse una sonda en los tejidos adiposos que se ubicarán en el espacio intersticial donde se alcanzará un equilibrio entre el fluido intersticial y la solución fisiológica que circula en la sonda. Cuando se alcanza este equilibrio, la sonda puede atrapar moléculas liberadas de las células.

60 Los resultados se obtienen en concentraciones reales expresadas en micro molar (μM) de glicerol con el fin de obtener mediciones válidas de la lipólisis. Se ensayaron tres condiciones experimentales: (1) INICIAL (actividad de lipólisis normal sin ninguna estimulación); (2) estimulación eléctrica de corriente bifásica de 6 mA; (3) estimulación eléctrica de corriente bifásica de 7,6 mA.

65 El sujeto utilizado en el presente estudio fue una mujer de 45 años (que pesaba 166 libras y que medía 5 pies 8) y la sonda se implantó en el tejido adiposo abdominal. La estimulación bifásica de 6 mA se aplicó durante 30 min, así como la estimulación bifásica de 7,6 mA. En primer lugar, es importante tener en cuenta que se observó que el

campo eléctrico cruzaba la pared de la piel y llegaba al tejido adiposo. Los resultados obtenidos confirman esta afirmación.

5 La Tabla 2 y la figura 4 describen un transcurso temporal de concentraciones de glicerol medidas durante el experimento (mediciones cada 10 minutos).

Tabla 2

Transcurso de tiempo de concentraciones durante el experimento (mediciones cada 10 minutos).									
	INICIAL (30 min)			6 mA (20 min)		Inicial (10 min)	7,6 mA (20 min)		Inicial (10 min)
	B1	B2	B3	S1	S2	B4	S3	S4	B5
μM de glicerol	3,75	3,57	3,5	4,8	6,03	3,3	4,12	3,5	3,5

10 Los resultados obtenidos se representan en la Tabla y la figura 5.

Tabla 3

Tabla resumen que presenta las concentraciones medias (μM) con las desviaciones estándar (DE) y los cambios porcentuales relativos a las concentraciones medias iniciales,					
Concentraciones en μM de glicerol					
	Condiciones	INICIAL	6 mA	7,6 mA	
	Media	3,52	5,42	3,81	
	D.E.	0,16	0,87	0,44	
	% de cambio	100 %	154 %	108 %	

15 Estos resultados demuestran que la estimulación eléctrica de 6 mA produjo una lipólisis significativamente estimulada a un nivel un 54 % mayor que el valor inicial normal (figura 6). La estimulación eléctrica de 7,6 mA no produjo una lipólisis significativa. Estos resultados, tomados *in vivo* en un sujeto vivo humano, validan los resultados encontrados *in vitro*.

20 Estos datos demuestran la correlación entre los datos *in vitro* obtenidos y la capacidad de la presente invención para aumentar la lipólisis de células grasas *in vivo*.

25 Sin desear quedar ligado por una teoría específica, estos resultados sugieren que la corriente eléctrica aplicada a las células modifica el potencial de sus membranas, probablemente inactivando (por ejemplo, cerrando) los canales de potasio abiertos por voltaje. En cambio, la acumulación de potasio intracelular podría activar las vías lipolíticas sin activar los receptores β -adrenérgicos.

30 Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es apta para modificaciones adicionales y esta solicitud está destinada a incluir cualquier variación, uso o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo dichas desviaciones de la presente descripción como parte de la práctica conocida o habitual en la técnica a la que pertenece la invención y que puede aplicarse a las características esenciales expuestas anteriormente en el presente documento, y como se indica a continuación en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método cosmético o estético no terapéutico para aumentar la lipólisis en una célula adipocítica blanca de un sujeto, comprendiendo dicho método aplicar una corriente eléctrica a la célula adipocítica blanca que produce la hidrólisis de lípidos en la célula adipocítica blanca, en el que dicha célula adipocítica blanca permanece viable después de dicha aplicación y en el que dicha corriente eléctrica a nivel de las células adipocíticas blancas es de 2 mA a 7 mA.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha corriente eléctrica es monofásica o bifásica.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que dicha corriente eléctrica a nivel de las células adipocíticas blancas es de 2 mA a 6 mA, y preferiblemente 4 mA.
- 15 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha corriente eléctrica provoca una despolarización de la membrana de dicha célula adipocítica blanca, que a su vez provoca una alteración en la actividad de un canal iónico en dicha célula adipocítica blanca.
- 20 5. El método de la reivindicación 4, en el que dicho canal iónico es uno de una familia de canales iónicos seleccionada del grupo que consiste en éter a go-go -EAG-, canal de K⁺ dependiente de voltaje relacionado con el síndrome de QT largo -KCNQ-, canal activado por calcio de pequeña conductancia -SK-, slowpoke -slo-, ERG, ELK, y canal de K⁺ dependiente de voltaje -Kv-.
6. El método de la reivindicación 4, en el que dicho canal iónico es un canal de potasio.
- 25 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho aumento en la lipólisis es al menos 1,5 veces con respecto al nivel de lipólisis en una célula adipocítica blanca de control.

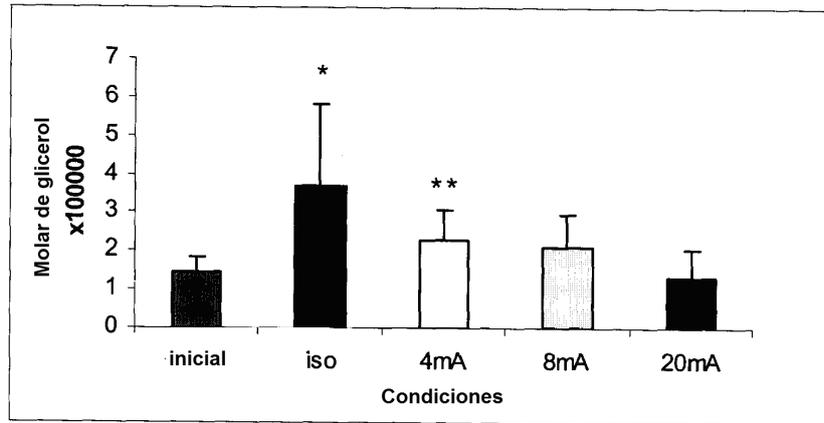


Fig. 1

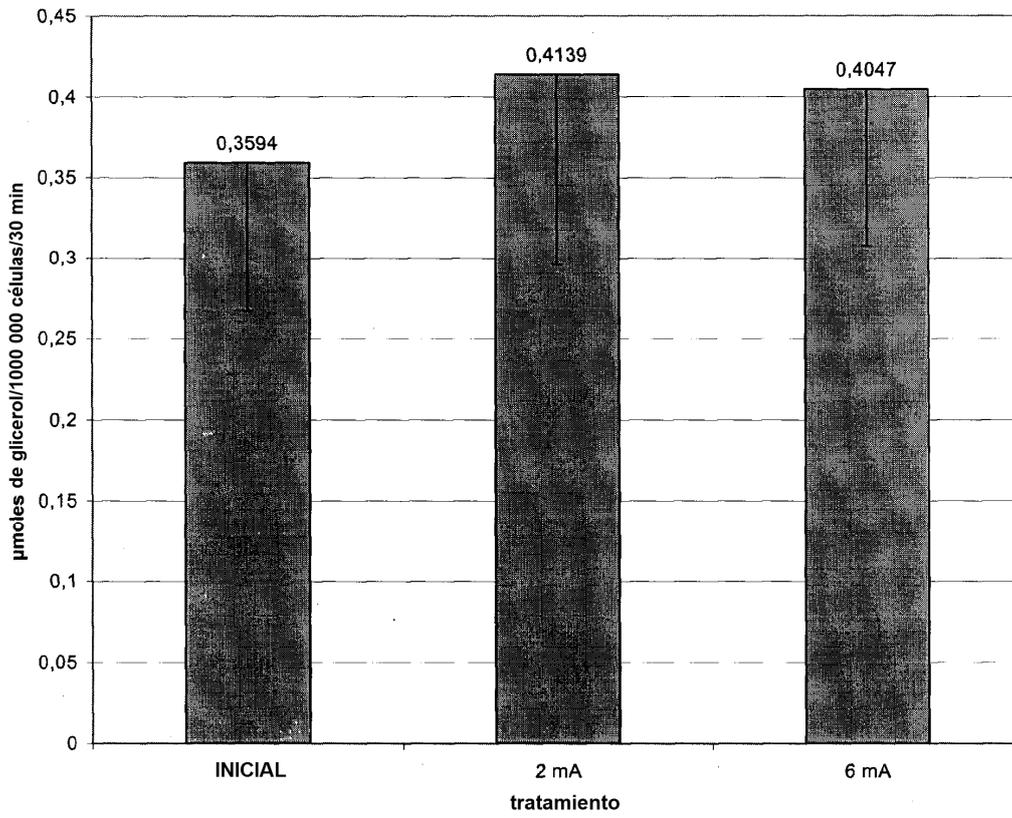


Fig. 2

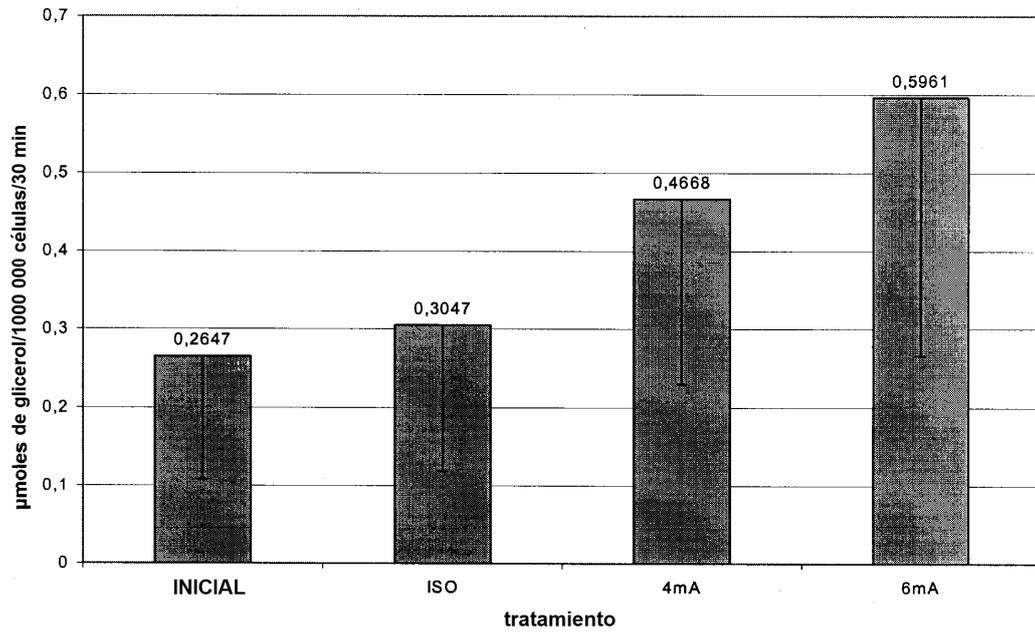


Fig. 3

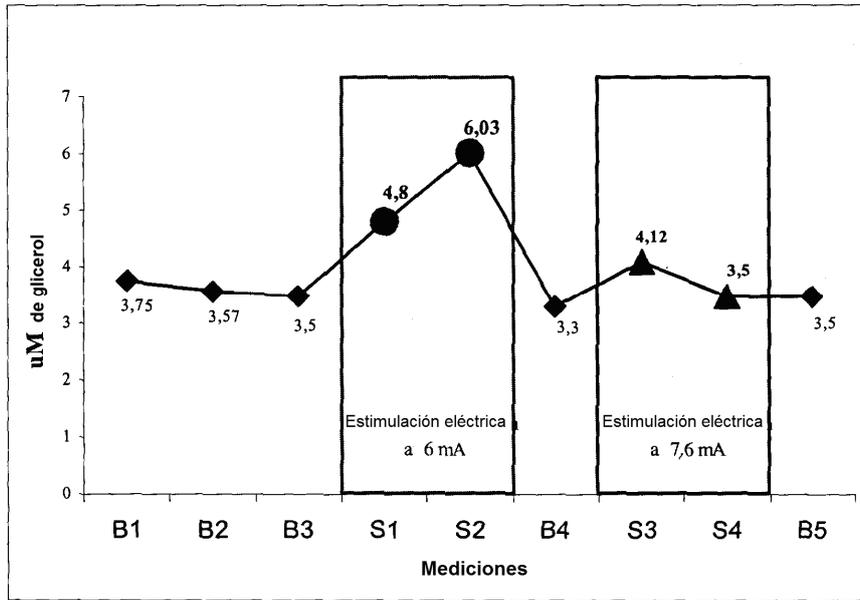


Fig. 4

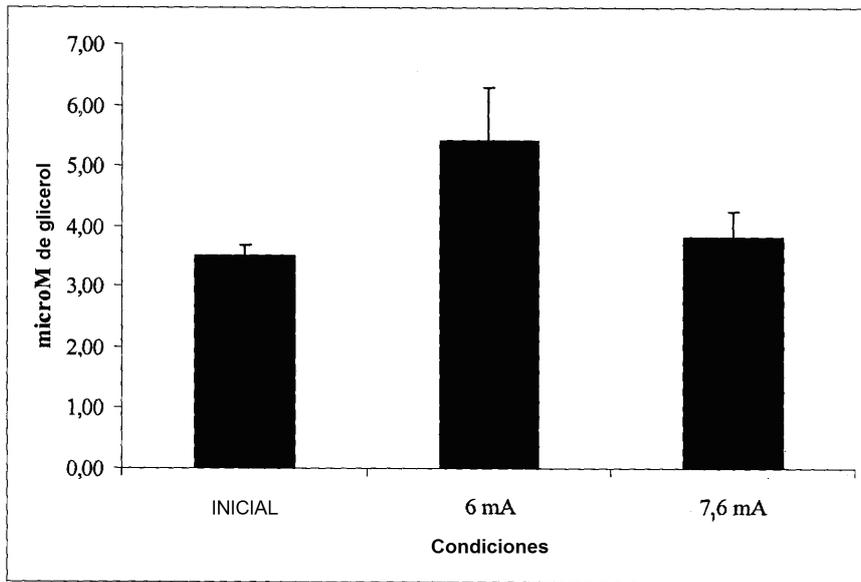


Fig. 5

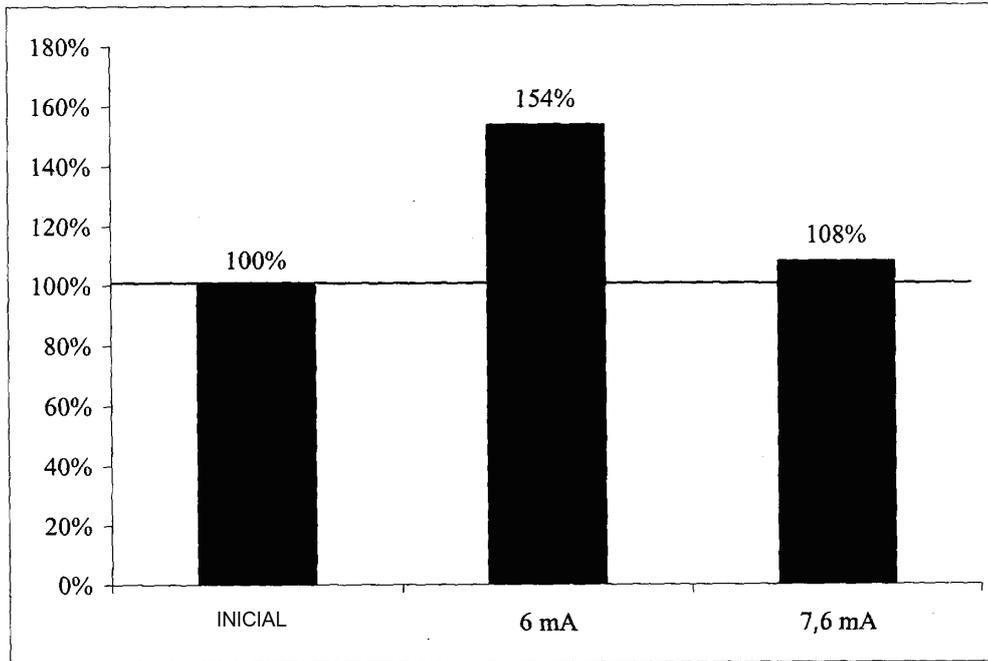


Fig. 6