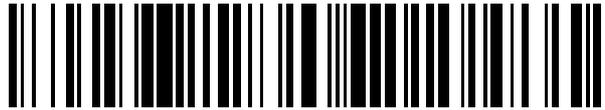


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 629**

51 Int. Cl.:

**A61F 7/10** (2006.01)

**A61F 7/02** (2006.01)

**A61F 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2016** **E 16306821 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** **EP 3342379**

54 Título: **Procedimiento de reducción de tejidos adiposos por criotermogénesis sin temblor**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.06.2020**

73 Titular/es:

**LOAP, SUVADDHANA SARIN (100.0%)**  
**11 Rue Eblé**  
**75007 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**LOAP, SUVADDHANA SARIN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 767 629 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

Procedimiento de reducción de tejidos adiposos por criotermogénesis sin temblor

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento cosmético no terapéutico y no invasivo de activación de termogénesis sin temblor para reducir el tejido adiposo sin interrupción de células ricas en lípidos en un sujeto esperando adelgazamiento por enfriamiento controlado.

10 **[0002]** El exceso de grasa corporal y la adiposidad localizada representan importantes problemas sociales y muchos sujetos afectados por ella buscan la cirugía plástica para mejorar su apariencia. Sin embargo, la cirugía plástica es un procedimiento médico invasivo con riesgos asociados, que generalmente puede permitir una recuperación rápida y puede afectar la vida social.

15 **[0003]** De hecho, incluso con ejercicios físicos regulares, es difícil de eliminar la grasa de las células ricas en lípidos o tejido adiposo, ya que por lo general sólo se queman las grasas en condiciones extremas, tales como la dieta. Sin embargo, las dietas solo brindan beneficios a corto plazo y presentan la desventaja de ser largas, difíciles, que requieren cambiar todo el estilo de vida y, en muchos casos, llevar a recuperar el peso perdido. En consecuencia, se han desarrollado varios procedimientos y dispositivos cosméticos para eliminar o reducir la grasa subcutánea local no deseada.

20 **[0004]** La atención se ha centrado en métodos alternativos para la interrupción del tejido adiposo (AT), incluyendo radiofrecuencia, ultrasonidos y tratamiento con láser. En los últimos años, el cuerpo de enfriamiento o "criolipólisis" ha sido desarrollado, se trata de ya sea la exposición al frío ambiental (Bartelt et al.) o dispositivos para reducir la temperatura de la superficie de la piel a  $-7^{\circ}\text{C}$  (por ejemplo, patente de EE.UU. n° 9.308.120 y la patente estadounidense N° 7,367,341, Ejemplo 1), que conduce a la exposición sistémica o local de los tejidos grasos al enfriamiento activo. El desarrollo de la criolipólisis se basó en estudios que muestran que el contenido de lípidos intracelulares varía entre los tipos de células, y que las células dérmicas y epidérmicas son relativamente bajas en ácidos grasos insaturados en comparación con los adipocitos subyacentes que forman el tejido graso subcutáneo. Como resultado, los diferentes tipos de células, por ejemplo, células ricas en lípidos y no ricas en lípidos, exhiben diversos grados de susceptibilidad al frío, con células no ricas en lípidos que soportan temperaturas más frías que las células ricas en lípidos. Por lo tanto, la criolipólisis está utilizando estas propiedades mediante la aplicación de medios de enfriamiento para cristalizar los lípidos citoplasmáticos, alterar la integridad celular e inducir la muerte celular a través de la apoptosis/necrosis, para reducir selectivamente la AT durante un período de semanas a meses (Patente de EE. UU. N° 9,308,120).

35 **[0005]** Por consiguiente, debido a la muerte celular de los adipocitos, los métodos de alteración de la integridad celular como criolipólisis presentan el inconveniente de:

- hematomas, congelación, hinchazón o embotamiento de sensación localizados pueden ocurrir (que desaparecen en unas pocas semanas);
- 40 - desarrollar un bulto duro debido a la cristalización de los lípidos citoplasmáticos, lo que requiere masajear el bulto después del tratamiento;
- riesgos de hiperplasia adiposa paradójica (Singh et al. (2015) y Jalian et al. (2014)), que pueden requerir cirugía en algunos casos graves;
- 45 - generar restos de células muertas grasas, grasa (lipotoxicidad), citocinas y otros mediadores inflamatorios que el organismo debe digerir y eliminar gradualmente en las semanas o meses posteriores al procedimiento, lo que restringe el tratamiento a un número limitado de regiones locales al mismo tiempo.

50 **[0006]** Estos inconvenientes conducen a un tratamiento ampliamente espaciado (por ejemplo, varios días o semanas de diferencia) para permitir que el sujeto elimine dicho restos de células y grasa, para resolver la inflamación y otros efectos secundarios.

Sin embargo, las células ricas en lípidos o el tejido adiposo son muy útiles, ya que están involucrados en numerosos procesos del metabolismo, como almacenar el exceso de energía como lípidos, regular el equilibrio de energía sistémica a través de la liberación de adipocinas que se dirigen a los tejidos periféricos (Dempersmier et al., 2015), apuntando al cerebro para modular el apetito en respuesta al exceso de suministro de energía (Sonna et al., 1985) y protegiendo los tejidos, incluidos los músculos y el hígado, de la lipotoxicidad (Haemmerle et al., 2006). Por consiguiente, hasta ahora no se conocían métodos convenientes y eficientes no terapéuticos o cosméticos para mejorar la apariencia del sujeto al reducir el tejido adiposo sin causar daño a las células ricas en lípidos (por ejemplo, tejido adiposo). En este contexto, el solicitante encontró sorprendentemente un método que usa enfriamiento controlado para aumentar el gasto de energía a través del metabolismo de las grasas y la termogénesis sin temblores, que no presenta el inconveniente relacionado con la disrupción celular rica en lípidos descrita anteriormente. Por consiguiente, se demostró que el método de la invención promueve la reducción del tejido adiposo sin alteración celular rica en lípidos, reduciendo la circunferencia de la cintura con una sola sesión de múltiples aplicaciones, o acumulando la reducción de la circunferencia de la cintura con sesiones repetidas (incluso sesiones diarias repetidas) con un propósito estético. Otras ventajas del presente método sobre los métodos de la técnica anterior es que no promueve la reacción inflamatoria o la piel floja, aumenta el retorno venoso y es activo en la lipomastia.

**[0007]** La presente invención se refiere a un método no terapéutico sin temblor de criotermogénesis para reducir localmente el tejido adiposo del cuerpo de un sujeto sin la ruptura celular rica en lípidos, la criotermogénesis sin temblor se define como un aumento inducido por el frío en la producción del calor no asociada con una actividad muscular de temblores, dicho método comprende:

- (a) aplicar al menos un aplicador de un medio refrescante a la piel del sujeto a regiones en las que el tejido adiposo subcutáneo es tejido adiposo blanco (WAT) o contiene adipocitos de color amarillento o pardo que se refieren a transformación de adipocitos blancos en adipocitos marrones por frío; y
- (b) aplicar aplicadores adicionales de dicho medio de enfriamiento a la región local en la que se desea la reducción del tejido adiposo; y
- (c) dichos aplicadores de dicho enfriamiento significan mantener la temperatura superficial de la piel entre 4°C y 12°C, preferentemente entre 6°C y 10°C, más preferentemente aproximadamente 8°C; y
- (d) aplicar dichos aplicadores durante un período de tiempo total comprendido entre 20 y 60 minutos, preferentemente entre 30 y 50 minutos, más preferentemente aproximadamente 40 minutos.

**[0008]** Ventajosamente, el procedimiento según la invención comprende además en dicho paso b) la aplicación de los aplicadores adicionales de dicho medio de enfriamiento a lo largo de los grandes ejes vasculares del sistema circulatorio, tales como la arteria femoral, la arteria tibial, la arteria subclavia, arteria axilar, arteria braquial... cuidando de no comprimirlas. El término "criotermogénesis" se refiere aquí a un proceso biológico activado por frío que induce o mejora la termogénesis, sin causar la muerte celular. Por "termogénesis" se entiende un proceso que ocurre en todos los animales de sangre caliente y que consiste en células que producen calor a partir de ácidos grasos y carbohidratos. Durante este proceso metabólico, los productos finales no tóxicos son liberados (por ejemplo, H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub>) y no hay reacción inflamatoria se induce. Los términos "criotermogénesis sin temblores" se definen como un aumento inducido por el frío en la producción de calor no asociada con la actividad muscular de los temblores.

**[0009]** De acuerdo con ello, como se muestra en el presente documento no se observa ninguna diferencia significativa en el nivel de biomarcador inflamatorio antes, durante y después de la aplicación del método de acuerdo con la invención.

**[0010]** Por "reducción de tejido adiposo" se quiere decir en el presente documento que se reduce el volumen de tejido adiposo de al menos una parte del cuerpo de un sujeto. Esta reducción en el tejido adiposo puede determinarse midiendo el grosor de la piel con un adipómetro o midiendo la circunferencia de la parte del cuerpo tratada del sujeto.

**[0011]** El término "biomarcador inflamatorio" tal como se usa en el presente documento se refiere a biomarcador(es) indicativo(s) de la presencia de un estado inflamatorio, por ejemplo, neopterina, velocidad de sedimentación, proteína C-reactiva (CRP), y marcadores y citoquinas celulares adicionales identificables por una persona experta.

**[0012]** El término "tejido adiposo subcutáneo" significa tejido que se encuentra debajo de la dermis e incluye los adipocitos (células grasas) y la grasa subcutánea. Por "tejidos adipocitos subcutáneos ricos en adipocitos marrones" se refiere a áreas localizadas a lo largo de la columna (cervical, paravertebral), supraclavicular, axilar, pericárdica, pericárdica/renal/suprarrenal, tráquea-esofágica, mediastínica, intercostal y mesentérica (Figura 1). La expresión "tejido adiposo blanco (WAT) que contiene adipocitos marrones" o "adipocitos brite" (es decir, marrón en blanco) o adipocitos beige se refieren a todas las áreas de tejido adiposo blanco que contienen adipocitos marrones. Los adipocitos amarillentos o marrones se refieren a la transformación de adipocitos blancos en adipocitos marrones por varios factores, incluido el frío.

**[0013]** El término "adipocito pardo" se refiere a células presentes en BAT que se especializan en la producción de calor (termogénesis) en los mamíferos. Se han descrito dos tipos principales de tejido adiposo, WAT y BAT. Los tipos de células adiposas más abundantes son los adipocitos blancos que contienen una sola gota de lípidos intracelulares y se localizan en depósitos específicos dentro del cuerpo. A diferencia de WAT, los adipocitos BAT expresan proteínas de desacoplamiento que permiten que las mitocondrias metabolizan la grasa mediante la oxidación  $\beta$  para generar calor (Avram et Harry, 2009). Al desacoplar las proteínas 1, cuando se activa, se cortocircuita el gradiente electroquímico que impulsa la síntesis de ATP y, por lo tanto, estimula la actividad de la cadena respiratoria. El calor se genera a partir de la combustión de sustratos disponibles y se distribuye al resto del cuerpo a través de la circulación. Del mismo modo, los "adipocitos de tipo marrón" o "células grasas de color beige" también se identificaron en el tejido adiposo y se refieren a células que contienen cantidades significativas de proteínas de desacoplamiento 1, lo que les proporciona capacidades termogénicas <http://www.nature.com/nm/journal/v19/n10/full/nm.3361.html> - ref10.

**[0014]** Por "región local en la que se desea reducción del tejido adiposo" se quiere decir una región definida o área que comprende los adipocitos, y donde se aplicarán medios de refrigeración para reducir específicamente el tejido adiposo presente en esta zona, o para específicamente activar termogénesis a través de adipocitos marrones y/o WAT que contienen adipocitos marrones. De acuerdo con una realización preferida, dicha región local se selecciona del estómago, llantitas, muslos internos, rodillas internas, glúteos, brazos internos, mentón, área del seno, espalda y cuello.

**[0015]** Por lo tanto, el método según la invención mediante la reducción de tejido adiposo en un sujeto puede reducir la circunferencia de la cintura, caderas, parte superior del muslo, parte inferior del muslo, la pantorrilla, antebrazos, bíceps, pecho y/o el hombro, preferentemente la circunferencia de la cintura, caderas y/o muslo y mentón.

5 **[0016]** Por "mantener la temperatura superficial de la piel" se entiende en esta memoria que el medio de refrigeración está adaptado para enfriar la superficie de la piel a una temperatura específica y para mantenerla mediante la adaptación de la temperatura aplicada. Sin embargo, será obvio para una persona experta adaptar la temperatura aplicada de acuerdo con la duración de la aplicación y, por el contrario, adaptar la duración de la aplicación de acuerdo con la temperatura aplicada. Dicha temperatura superficial de la piel puede determinarse por cualquier medio que permita medir la temperatura, que son bien conocidas por un experto en la materia. Por ejemplo, tales medios que permiten medir la temperatura se pueden seleccionar entre termómetros infrarrojos o termómetros láser o termómetros sin contacto. Por lo tanto, al mantener la temperatura superficial de la piel a la temperatura de acuerdo con la invención, las células adipocíticas se preservan de la muerte celular inducida por congelación, y se evita cualquier interrupción de las células adipocitarias.

15 **[0017]** Por "aproximadamente 8°C" se quiere decir una temperatura superficial de la piel de  $8^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , preferentemente  $8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Por "aproximadamente 40 minutos" se entiende un período de tiempo de 40 minutos  $\pm 4$  minutos, preferentemente 40 minutos  $\pm 2$  minutos. Obviamente, la persona experta que realiza el método reivindicado sería capaz de ajustar los parámetros para mantener la temperatura superficial de la piel a aproximadamente 8°C. Por "medio de enfriamiento" se hace referencia aquí a cualquier medio capaz de enfriar y/o aplicar a una parte del cuerpo de un sujeto una temperatura de configuración específica durante un cierto período de tiempo, es decir, eliminando calor o aplicando frío. El término "aplicador" se refiere a un tiempo, es decir, eliminando calor o aplicando frío. El término "aplicador" se refiere a una parte de un medio de enfriamiento que se puede aplicar directamente a la piel de un sujeto y del cual se expulsa aire frío generado para enfriar la superficie de la piel del sujeto. Por supuesto, sería obvio para la persona experta adaptar la forma o el tamaño de dicho aplicador al área local a enfriar. Preferiblemente, dichos aplicadores pueden aplicar presión negativa para formar una cámara sellada en contacto con la piel de un sujeto, en el que la temperatura de preparación específica se aplica en dicha cámara. Además, según la región local a tratar por el método según la invención, dichos aplicadores se elegirían de acuerdo con la superficie de la piel a cubrir. Tales dispositivos y enfriamiento aplicadores están disponibles comercialmente y son, por ejemplo suministrados por Beijing ADSS Development Co., Ltd, o Beijing Jontelaser Technology Co., Ltd, o Beijing Himalaya Medical Technology Co., Ltd.

20 **[0018]** En una realización particular, para llevar a cabo el método de acuerdo con la invención, los aplicadores de dicho medio de enfriamiento se aplica a la piel de dicho sujeto en un número comprendido al menos 2, preferentemente entre 5 y 14, más preferentemente entre 8 a 12. Preferentemente, dicho aplicador de dicho medio de enfriamiento cubre un área de superficie comprendida entre 60 y 90 cm<sup>2</sup>, preferiblemente entre 70 y 80 cm<sup>2</sup>. Ventajosamente, dicho aplicador tiene una forma rectangular. Será obvio para una persona experta adaptar la forma y/o el tamaño de dichos aplicadores a dicha región local en la que se desea la reducción del tejido adiposo.

40 **[0019]** Por otra parte, será obvio para un experto en la materia adaptar el número y/o la forma y/o el tamaño de los aplicadores a la acumulación del sujeto con el fin de cubrir la mayor superficie de la piel del sujeto.

45 **[0020]** En una realización preferida, dichos aplicadores de dicho medio de enfriamiento cubren entre 30% y 70%, preferentemente entre 40% y 55% de la parte posterior o la parte frontal de la parte superior del cuerpo del sujeto (es decir, desde el cuello hasta la parte inferior de la espalda o pelvis).

**[0021]** En una realización preferida, dichos aplicadores de dicho medio de enfriamiento cubren entre 60 cm<sup>2</sup> y 120 cm<sup>2</sup>, preferentemente entre 70 cm<sup>2</sup> y 100 cm<sup>2</sup> del sujeto cuerpo.

50 **[0022]** En una realización preferida, dichos aplicadores cubren entre el 19% y 33,5%, preferentemente entre 22,5% y 30% de la parte posterior del sujeto.

**[0023]** En una realización preferida, dichos aplicadores cubren entre el 14% y 31,5%, preferentemente entre 17,5% y 25% de la parte delantera del sujeto.

55 **[0024]** En una realización preferida, la temperatura aplicada por dicho aplicador en el procedimiento según la invención está comprendida entre -15°C a 5°C, preferentemente -10°C a 0°C, más preferentemente -9°C a -3°C.

60 **[0025]** En una realización particular, los períodos de tiempo del paso d) del método según la invención se dividen en dos o tres subperíodos, preferencialmente tres subperíodos, dichos subperíodos durante entre 8 y 25 minutos cada uno, preferentemente durante 10 o 20 minutos cada uno.

65 **[0026]** En una realización preferida, el período de tiempo del paso d) del método según la invención está comprendido entre 25 y 75 minutos, entre 30 y 65 minutos, preferentemente entre 35 y 55 minutos, más preferentemente aproximadamente 40 minutos.

[0027] En una realización preferida, el método según la invención comprende tres subperíodos que consisten en:

- i. aproximadamente 10 minutos a aproximadamente  $-10^{\circ}\text{C}$ ; y
- ii. aproximadamente 10 minutos a aproximadamente  $-8^{\circ}\text{C}$ ; y
- iii. aproximadamente 20 minutos a aproximadamente  $-7^{\circ}\text{C}$ .

[0028] En otra realización, dichos aplicadores de dicho medio de enfriamiento de acuerdo con la invención se aplican a la piel del sujeto con una presión de aspiración comprendida entre 20 y 300 kPa, preferentemente entre 100 kPa y 200 kPa. Preferentemente, dicha presión está comprendida entre 20 kPa y 100 kPa cuando el grosor de la piel de un sujeto es inferior o igual a aproximadamente 3 cm, y está comprendido entre 101 kPa y 300 kPa cuando el grosor de la piel de un sujeto es superior a unos 3 cm. El término "aproximadamente 3 cm" significa que el grosor de la piel es de  $3\text{ cm} \pm 0,3$ , preferentemente de  $3\text{ cm} \pm 0,2$ . Preferentemente, dicha presión debe variar entre 20 kPa a 100 kPa cuando dichos aplicadores de dicho medio de enfriamiento se aplican a lo largo de los grandes ejes vasculares del sistema circulatorio, tales como la arteria femoral, la arteria tibial, la arteria subclavia, arteria axilar, arteria braquial...

[0029] La expresión "el espesor de la piel" se refiere en este documento a la medición del espesor de la piel por un adipómetro. El experto en la materia sabe que las mediciones del adipómetro se utilizan como guía para calcular la cantidad de grasa subcutánea. Sin embargo, sería obvio para una persona experta adaptar los valores umbral con mediciones obtenidas por cualquier otro medio.

[0030] En una realización preferida, cuando dichos aplicadores son de forma rectangular, el método según la invención que comprende un paso siguiendo adicional dichos pasos a) y/o b), en donde dichos aplicadores de forma rectangular se mueven por 90 grados y se aplican por un período adicional de tiempo. Ventajosamente, dicho paso adicional después de dichos pasos a) y/o b) se aplica cuando el grosor de la piel de dicho sujeto es superior a aproximadamente 3 cm.

[0031] Otro objeto de la presente invención es un método de criotermogenesis para reducir el tejido adiposo de cuerpo de un sujeto, que comprende el paso de:

- (a) aplicar en primer lugar el método de acuerdo con la invención a la parte posterior del sujeto desde el cuello hasta la parte inferior de la espalda o pelvis; y luego
- (b) en segundo lugar aplicar el método de acuerdo con la invención a la parte anterior del sujeto desde el cuello hasta la parte inferior de la espalda o la pelvis.

[0032] Otro objeto de la presente invención es un método de criotermogenesis para reducir localmente el tejido adiposo del cuerpo del sujeto, que comprende repetir el método de acuerdo con la invención a la piel del sujeto una pluralidad de veces hasta que se haya logrado la reducción deseada en el tejido adiposo en una región local, determinándose dicha reducción en el tejido adiposo midiendo el grosor de la piel en la región local con un adipómetro o midiendo la circunferencia de la parte tratada del cuerpo del sujeto, en el que dicha aplicación repetida puede aplicarse tan pronto como dicho tejido adiposo recupere su temperatura de dicho paso (a) o (b) anterior. Preferentemente, dicha pluralidad de tiempos está separada de intervalos de tiempo de aproximadamente 60 minutos, o intervalos de tiempo de 1 hora, intervalos de tiempo de 12 horas, o intervalos de tiempo de 1 día, preferentemente intervalos de tiempo de 1 día.

**Figura 1.** Cambio porcentual en (A) circunferencia de la cintura y (B) circunferencia del muslo, después de aplicaciones abdominales únicas de crioterapia tisular ( $n = 17$ ; duración del tratamiento ca 1,33 h; tiempo después del tratamiento,  $\leq 1$  h). Las barras de error indican DE.

**Figura 2.** Respuestas individuales a la crioterapia tisular en función de la edad en sujetos que reciben aplicaciones únicas de crioterapia tisular (línea de tendencia agregada,  $P = 0,2$ ).

**Figura 3.** Disminución de (A) circunferencia de la cintura, (B) peso y (C) IMC después de tres tratamientos diarios de crioterapia tisular ( $n = 12$ ). Las barras de error indican DE.

**Figura 4.** Disminución progresiva de la circunferencia de la cintura (expresada como %) en cinco sujetos que se someten a tratamientos repetidos de crioterapia tisular en cuatro (sujeto 1, M, 59 años de edad), cinco (sujetos 2, 3, 4; F, 47 años; F, 71 años; F, 52 años), o siete (sujeto 5, M, 51 años) días. La disminución media después de 5 tratamientos fue del 6,1%.

## **EJEMPLOS**

### **EJEMPLO 1- Efecto del procedimiento de criotermogenesis en circunferencia de la cintura**

#### Métodos

##### 1. Los sujetos y los permisos éticos

**[0033]** En este estudio retrospectivo de datos para 28 participantes (9M/19F), edad media 51,5 (intervalo 33-71 años) fueron analizados. Todos tenían un IMC consistente con sobrepeso. El método de termogénesis, un procedimiento no invasivo, no requiere una aprobación ética institucional formal.

## 5 2. Procedimiento de crioterapia de tejido

**[0034]** El tratamiento emplea un dispositivo de crioterapia de tejido comercial (FG6601-006, ADSS, República de China) equipado con múltiples sondas de enfriamiento (área de enfriamiento 20 X 8 cm). Se registraron las circunferencias de peso, altura y cintura y muslo (izquierda); El IMC se calculó automáticamente utilizando un aparato comercial (modelo SC240MA, Tanita, Japón). Se aplicó una capa de papel humedecido (membrana humectante a base de glicerol, ETG-111-200, Freezefats, República de China) en la parte inferior de la espalda del sujeto reclinado, seguido de la aplicación simétrica de cuatro a seis sondas por pares, acompañadas de una succión suave a mejorar el contacto. La temperatura de enfriamiento se ajustó a  $-10^{\circ}\text{C}$ , disminuyendo a  $-7^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos; la duración de la aplicación fue de 40 minutos. Los sujetos se acostaron en posición supina y el tratamiento se repitió en la parte inferior del abdomen, nuevamente durante 40 minutos. La temperatura oral, un proxy de la temperatura central, se registró antes y después del procedimiento. Las temperaturas locales de la superficie de la piel se registraron inmediatamente después de retirar la sonda de enfriamiento y la medición mostró que se mantuvo alrededor de  $+8^{\circ}\text{C}$  y no cayó por debajo de  $+4^{\circ}\text{C}$ . El peso, la circunferencia de cintura y muslo, el peso corporal y el IMC se registraron nuevamente después del procedimiento. 12 sujetos se ofrecieron para aplicaciones triples diarias. Cinco participantes (3 F y 2 M; de 47, 51, 71 y 51, 57 años, respectivamente) se ofrecieron como voluntarios para solicitudes diarias más prolongadas, y el procedimiento se repitió diariamente para un total de cuatro, cinco o siete aplicaciones, con grabación sistemática como antes.

## 25 3. Estadísticas

**[0035]** El análisis estadístico emplea medios normalizados y DE. Los resultados se evaluaron mediante la prueba *t* de Student; la significación estadística se estableció en  $P \leq 0,05$ .

## 30 4. Enfriamiento local produce decrementos en la circunferencia de la cintura

**[0036]** La circunferencia de la cintura se registró antes y después de las aplicaciones individuales de tejido abdominal local de refrigeración (método de criotermogenesis) en una serie de 17 sujetos. Como se muestra en la figura 1A, hubo una reducción media del 3,0% de la circunferencia de la cintura después del procedimiento. La disminución fue de alta significancia estadística ( $P = <0,0001$ ). Por el contrario, no hubo cambios en la circunferencia del muslo (Fig. 1B). La temperatura corporal central (oral) aumentó de 35,8 a 36,1 ( $+0,3^{\circ}\text{C}$ ), pero el cambio no fue significativo. Los cambios en el peso y el IMC con aplicaciones individuales no alcanzaron la significación estadística (no presentado; ver más abajo).

**[0037]** Como se muestra en la Fig. 2, hubo una tendencia hacia una reducción de la eficacia en función de la edad. Sin embargo, la tendencia no fue de significación estadística ( $P = -0,2$ ): algunos individuos mayores mostraron reducciones sustanciales en la circunferencia de la cintura y algunos sujetos jóvenes mostraron respuestas bajas. No hubo diferencias de género significativas.

## 45 5. Múltiples aplicaciones producen pérdida de la circunferencia de la cintura

**[0038]** Doce sujetos realizaron tratamientos posteriores en los días 2 y 3 bajo las mismas condiciones y por la misma duración como en el día 1. Como se muestra en la Fig. 3, además de una disminución significativa en la circunferencia de la cintura ( $P = 0,0068$ ), se observaron reducciones altamente significativas tanto en el peso corporal ( $P = <0,001$ ) como en el IMC ( $P = 0,013$ ). La extensión de la reducción media en la circunferencia de la cintura, 4,2%, excedió la reducción media obtenida por aplicaciones individuales (3,0%,  $P = \text{NS}$  versus aplicación única).

**[0039]** Para hacer frente a un posible efecto dependiente de la demora/tiempo, nueve sujetos que recibieron un solo tratamiento se sometieron a mediciones adicionales 5 a 10 días más tarde, pero sin más crioterapia de tejido. Dado el pequeño número de sujetos, el grado de reducción en la circunferencia de la cintura (3,9%,  $\text{SD} = 3,09$ ) no alcanzó significación estadística versus la reducción observada inmediatamente después del tratamiento único (3,0%,  $\text{DE} = 2,71$ ), aunque hubo una tendencia hacia un aumento.

**[0040]** Cinco sujetos (3 M, 2 M) se ofrecieron para la repetición de tratamientos diarios durante periodos de 4, 5, y 7 días. Como se muestra en la Fig. 3, repetir el tratamiento fue acompañado, en los cinco sujetos, por una pérdida progresiva de la circunferencia de la cintura (pérdida media del 6,1% inmediatamente después de cinco tratamientos), se compararán con una pérdida media del 3% inmediatamente después de un solo tratamiento. La diferencia en la pérdida de cintura después de cuatro a siete tratamientos fue significativamente mayor que la de los tratamientos individuales ( $P = <0,01$ ).

## 65 6. Parámetros Biomédicos

[0041] Temperaturas locales de la piel inmediatamente por debajo de la sonda de enfriamiento fueron variables dentro de la región, pero pudieorn no caer por debajo de + 6°C. Hubo algún enrojecimiento local de la piel consistente con un aumento de la circulación sanguínea local. No se observó daño superficial de la piel de ningún tipo. Se realizó un análisis exhaustivo de la sangre en cuatro sujetos antes y 3 días después del tratamiento. Los perfiles antes y después del tratamiento fueron irrelevantes. Es importante destacar que, excepto como se indicó, no hubo indicios de inflamación, activación de macrófagos o perfiles lipídicos anormales. Por lo tanto, el método de criotermogénesis no está asociado con inflamación sistémica o cambios en los perfiles de lípidos en la sangre. Además, ningún participante informó eventos adversos.

## 7. Conclusión

[0042] Aplicaciones individuales de tejido abdominal local de refrigeración (método de criotermogenesis) se encontraron para producir una reducción significativa de tejido. Todos los sujetos respondieron a tratamientos individuales mediante una reducción en la circunferencia de la cintura (media ~ 3%) que fue estadísticamente significativa ( $P = <0,0001$ ). No hubo diferencia de género M/F evidente en la respuesta. Hubo una tendencia aparente hacia una reducción de la eficacia con la edad; sin embargo, la tendencia no fue estadísticamente significativa, y los participantes entre los más antiguos del grupo mostraron respuestas a tratamientos individuales.

[0043] Los resultados muestran una mayor pérdida progresiva de AT con múltiples aplicaciones. Se observó una reducción mayor en la circunferencia después de tres tratamientos (~ 4,2%), y esto fue acompañado por disminuciones tanto en el peso corporal (~ 0,75%) como en el IMC (< 0,8%) que fueron estadísticamente significativas. La reducción en el IMC indica pérdida selectiva del volumen de AT. La reducción en la circunferencia de la cintura después de tres tratamientos (~ 0,4%) fue consistente con la disminución del peso corporal total (~ 0,75%).

[0044] En cinco sujetos que recibieron rondas prolongadas de tratamiento (cuatro a siete), no había evidencia de decrementos progresivos en circunferencia de la cintura (~ 6% después de cinco tratamientos), argumentando que múltiples tratamientos a intervalos diarios producen beneficios acumulados. No se informaron cambios consistentes en los parámetros bioquímicos o eventos adversos para los participantes en este estudio. Estos resultados confirman que el enfriamiento local del tejido abdominal produce una pérdida selectiva de volumen de AT.

[0045] En contraste con los informes anteriores de que no hay un cambio evidente en la grasa corporal inmediatamente después del tratamiento, los resultados mostraron efectos beneficiosos significativos dentro de 1 h de tratamiento, un transcurso de tiempo demasiado rápido para ser explicado por células de la muerte y el aclaramiento. Además, múltiples tratamientos diarios produjeron pérdidas progresivas de circunferencia de la cintura, peso corporal e IMC, lo cual es incompatible con la disrupción celular. Además, el análisis bioquímico no reveló evidencia de marcadores de inflamación o activación de macrófagos en los sujetos tratados, mostrando una reducción del volumen de células adipocitarias mediante termogénesis, con conservación de la integridad celular. En apoyo, se registró el mantenimiento completo de la temperatura corporal central (+ 0,3°C) a pesar del intenso enfriamiento local, lo que demuestra que se está produciendo termogénesis. Por lo tanto, los resultados apuntan al gasto de energía a través del metabolismo de las grasas inducido por el frío y la termogénesis, con la consiguiente reducción en el volumen de células adipocíticas y la masa de AT.

[0046] En cuanto a la seguridad del método de acuerdo con la invención, no hay cambios consistentes en parámetros bioquímicos se observaron tras el tratamiento, incluyendo los marcadores de inflamación. Los participantes no informaron efectos adversos.

## Ejemplos 2 - Mediciones de biomarcadores inflamatorios

### Método

#### 1. Parámetros biomédicos

[0047] El análisis de sangre integral se llevó a cabo en los sujetos antes y 3 días después de que el tratamiento diario se aplica a diario durante 5 a 10 días. Todos los perfiles antes y después del tratamiento ( $\pm 4$  días) no fueron destacables. Es importante destacar que no hubo indicios de inflamación o activación de macrófagos.

### Resultados

#### [0048]

Tabla 1 - Medida de neopterin antes y después del tratamiento de criotermogénesis

		Neopterin (nmol/l)
Sujeto 1	antes de	3,3
	después	8
Sujeto 2	antes de	2,9
	después	5,2
Sujeto 3	antes de	9
	después	6,5
Sujeto 4	antes de	4
	después	6,6
Sujeto 5	antes de	8,1
	después	7,4

Tabla 2 - Medición de la velocidad de sedimentación (primera hora y segunda hora) y proteína C reactiva (PCR) antes y después del tratamiento de criotermogénesis

		Velocidad de sedimentación	de CRP
Sujeto a	antes de	7 y 19	<5
	después	6 y 13	<1
Sujeto b	antes de	4 y 9	3
	después	9 y 26	5
Sujeto c	antes de	3 y 6	<5
	después	3 y 6	<5
Sujeto d	antes de	6 y 14	<5
	después	6 y 15	2
Sujeto e	antes de	2 y 6	5 5
	después	3 y 5	<1

Conclusiones

[0049] Los resultados de la tabla 1 y 2 mostraron que el método de criotermogénesis no está asociado con la inflamación sistémica como neopterin (valor normal: < 25 nmol/l, las tasas de sedimentación (valores normales: primera hora 1 a 20 y segunda hora 4 a 40) y CRP (valor normal: <6 mg/L), que son bien conocidos por la persona experta, están en el rango de sus respectivos valores normales. Además, ningún participante informó eventos adversos.

Referencias

[0050]

M.M. Avram, R.S. Harry, Cryolipolysis for subcutaneous fat layer reduction. Lasers Surg.Med. 41 (2009) 703-708.

A. Bartelt, O.T. Bruns, R. Reimer, H. Hohenberg, H. Ilttrich, K. Peldschus, M.G. Kaul, U.I. Tromsdorf, H. Weller, C. Waurisch, A. Eychmuller, P.L. Gordts, F. Rinninger, K. Bruegelmann, B. Freund, P. Nielsen, M. Merkel, J. Heeren, Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. Nat.Med. 17 (2011) 200-205.

J. Dempersmier, A. Sambeat, O. Gulyaeva, S.M. Paul, C.S. Hudak, H.F. Raposo, H.Y. Kwan, C. Kang, R.H. Wong, H.S. Sul, Cold-inducible Zfp516 activates UCP1 transcription to promote browning of white fat and development of brown fat. Mol.Cell. 57 (2015) 235-246.

G. Haemmerle, A. Lass, R. Zimmermann, G. Gorkiewicz, C. Meyer, J. Rozman, G. Heldmaier, R. Maier, C. Theussl, S. Eder, D. Kratky, E.F. Wagner, M. Klingenspor, G. Hoefler, R. Zechner, Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. Science. 312 (2006) 734-737.

HR Jalian; MM Avram; L Garibyan; MC Mihm; R.R Anderson. Paradoxical Adipose Hyperplasia After Cryolipolysis. JAMA Dermatol. 2014;150(3):317-319.

SM Singh, ER Geddes, SG Boutros, RD Galiano, PM Friedman. Paradoxical adipose hyperplasia secondary to cryolipolysis: An underreported entity? Lasers Surg Med. (2015); 47(6):476-8.

L.A. Sonna, J. Fujita, S.L. Gaffin, C.M. Lilly, Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J.Appl.Physiol.*(1985.) 92 (2002) 1725-1742.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

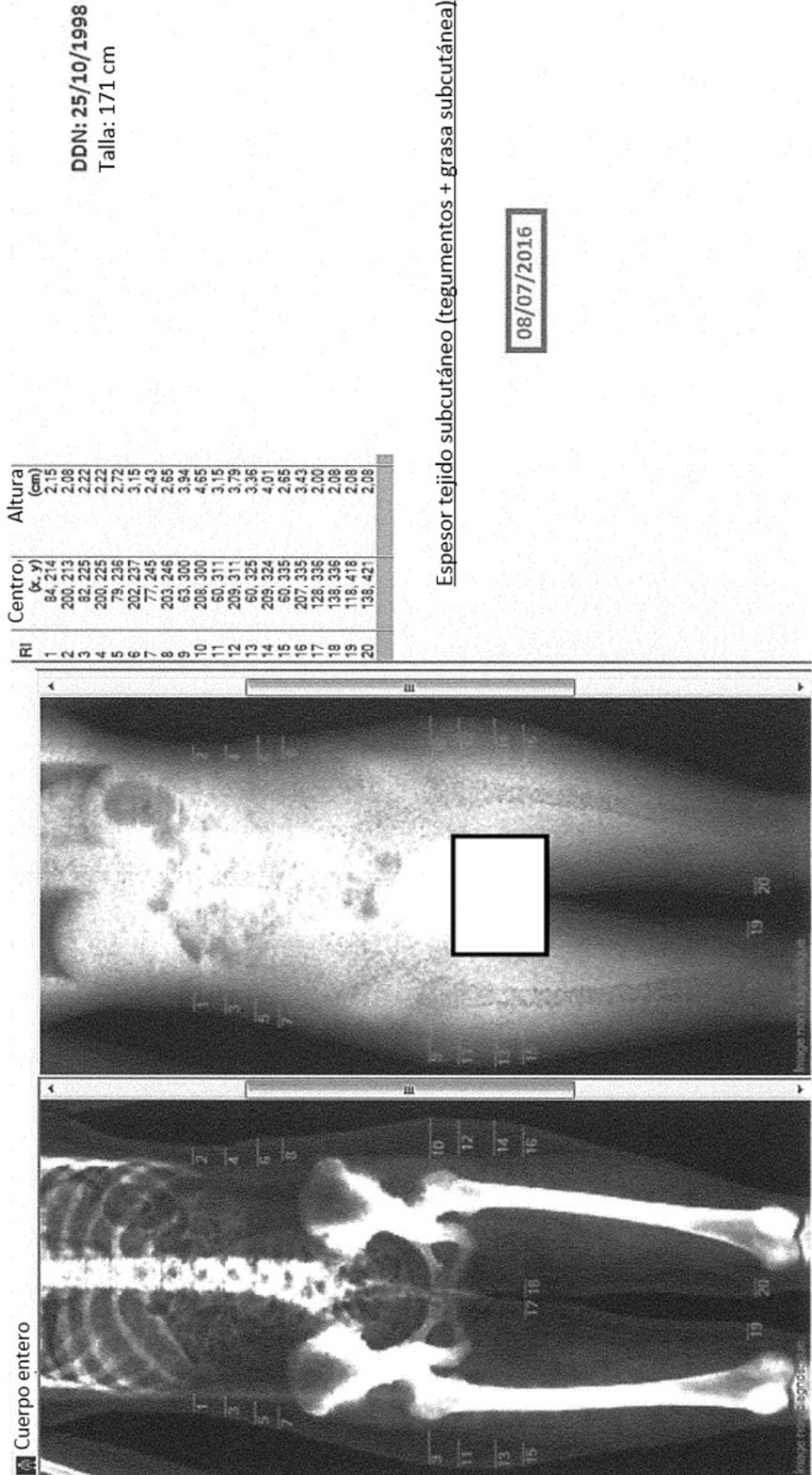
55

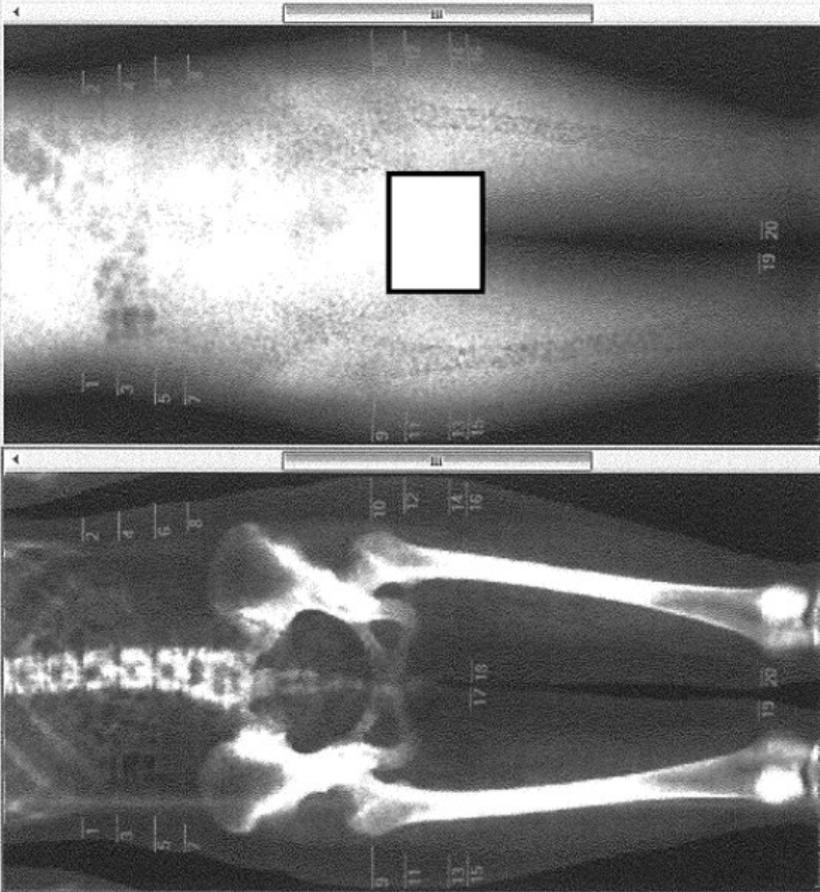
60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 **1.** Un procedimiento de criotermogénesis no terapéutica sin temblor para reducir localmente el tejido adiposo del cuerpo de un sujeto sin alteración celular rica en lípidos, la criotermogénesis sin temblor se define como un aumento inducido por el frío en la producción de calor no asociado con una actividad muscular de temblores, comprendiendo dicho método:
- 10 (a) aplicar al menos un aplicador de un medio de enfriamiento a la piel del sujeto a una región en la que el tejido de los adipocitos subcutáneos es tejido adiposo blanco (WAT) o contiene adipocitos de color amarillento o dorado que se refiere a la transformación de adipocitos blancos en adipocitos marrones por frío; y
- (b) aplicar al menos un aplicador adicional de dichos medios de enfriamiento a una región local en la que se desea la reducción del tejido adiposo, si dicha región local difiere de la definida en el paso (a);
- 15 (c) dicho aplicador de dicho enfriamiento significa mantener la temperatura superficial de la piel entre 4°C y 12°C, preferentemente entre 6°C y 10°C, más preferentemente aproximadamente 8°C; y
- (d) aplicar dichos aplicadores durante un período de tiempo total comprendido entre 20 y 60 min, preferentemente entre 30 y 50 min, más preferentemente aproximadamente 40 minutos.
- 20 **2.** El método de la reivindicación 1, en el que dicho aplicador aplica una temperatura comprendida entre -15°C a 5°C, preferentemente -12°C a 0°C, más preferentemente -9°C a -3°C.
- 3.** El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dichos períodos de tiempo del paso d) se dividen en dos o tres subperíodos, preferentemente tres subperíodos, cada uno de dichos subperíodos durante entre 10 y 20 minutos.
- 25 **4.** El método de la reivindicación 3, en el que dichos tres subperíodos consisten en:
- i. aplicar una temperatura de -10°C durante 10 minutos; y
- ii. aplicar una temperatura de -8°C durante 10 minutos; y
- iii. aplicar una temperatura de -7°C durante 20 minutos.
- 30 **5.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha región local se selecciona preferentemente del estómago, llantitas, muslos internos, rodillas internas, glúteos, brazos internos, mentón, área de los senos, espalda y cuello.
- 35 **6.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se aplican al menos 2 aplicadores a la piel de dicho sujeto, preferiblemente de 5 a 14, más preferiblemente de 8 a 12.
- 7.** Un método de criotermogénesis para reducir el tejido adiposo del cuerpo de un sujeto, que comprende el paso de:
- 40 (a) aplicar primero el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 a la parte posterior del sujeto desde el cuello hasta la parte inferior de la espalda o la pelvis; y luego
- (b) en segundo lugar, aplicar el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 a la parte anterior del sujeto desde el cuello hasta la parte inferior de la espalda o la pelvis.
- 45 **8.** Un método de criotermogénesis para reducir localmente el tejido adiposo del cuerpo del sujeto, que comprende repetir el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 a la piel del sujeto varias veces hasta que se haya logrado la reducción deseada en el tejido adiposo en una región local, dicha reducción del tejido adiposo se determina midiendo el grosor de la piel en la región local con un adipómetro o midiendo la circunferencia de la parte del cuerpo tratada del sujeto, en donde dicha aplicación puede repetirse tan pronto como dicho tejido adiposo recupere su temperatura de antes de dicho paso (a) o (b).
- 50 **9.** El método de la reivindicación 7, en el que dicha pluralidad de tiempos están separados de intervalos de tiempo de 1 hora, intervalos de tiempo de 12 horas o intervalo de tiempo de 1 día, preferiblemente intervalo de tiempo de 1 día.
- 55 **10.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6, en el que dichos aplicadores de dicho enfriamiento medio cubren entre 30% y 70% preferentemente entre 40% y 55% de la parte posterior o anterior de la parte superior del cuerpo del sujeto.
- 60 **11.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6, en el que dichos aplicadores de dicho enfriamiento medio cubren entre el 19% y el 33,5%, preferiblemente entre el 22,5% y el 30% de la parte posterior del sujeto.
- 12.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6, en el que dichos aplicadores de dicho enfriamiento medio cubren entre 14% y 31,5%, preferentemente entre 17,5% y 25% de la parte anterior de la sujeción.
- 65





**Cuerpo entero**

RI	Centro (x, y)	Altura (cm)
1	83,233	1,83
2	200,233	2,34
3	83,243	2,56
4	202,244	2,85
5	81,255	3,29
6	204,255	3,22
7	80,264	2,63
8	205,265	2,71
9	80,322	4,02
10	212,321	4,17
11	67,332	3,15
12	214,331	3,44
13	67,345	3,00
14	213,345	3,36
15	67,351	2,93
16	213,350	3,22
17	135,352	2,12
18	145,352	2,12
19	130,440	1,95
20	143,441	1,90

**NGC MITE**  
**DDN: 25/10/1998**  
**Talla: 171 cm**

**01/07/2016**

**Esponsor tejido subcutáneo (tegumentos + grasa subcutánea)**  
**Medidas de referencia, antes de atención**

RI	Centro, (x, y)	Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Ángulo (grado)
1	142,234	0,00	29,88	0
2	143,244	0,00	30,90	0
3	143,255	0,00	32,18	0
4	142,263	0,00	32,82	0
5	143,270	0,00	33,20	0
6	141,322	0,00	38,31	0
7	142,331	0,00	38,82	0
8	140,345	0,00	38,31	0
9	100,351	0,00	18,64	180
10	101,351	0,00	18,52	0
11	109,438	0,00	11,88	0
12	164,440	0,00	12,00	0

**MEDIDAS MORFOLÓGICAS**  
Antes de la atención

**01/07/2016**

**NGORMIE**  
DDN: 25/10/1998  
Talla: 170cm

Masa total: 66,910 kg  
Masa grasa total: 25,624 kg  
Masa ginoide total: 11,200 kg  
Masa androide total: 4,599 kg  
Masa grasa androide: 5,010 kg  
Masa magra total: 2,183 kg

Masa total: 39,7%  
Masa ginoide total: 41,9%  
Masa androide total: 43,9%

**Cuerpo entero**

RI	Centro (x, y)	Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Ángulo (grado)
1	143,214	0,00	30,42	0
2	141,225	0,00	30,82	0
3	141,226	0,00	32,42	0
4	140,245	0,00	32,81	0
5	139,249	0,00	33,21	0
6	136,301	0,00	38,93	0
7	136,311	0,00	39,32	0
8	135,324	0,00	39,46	0
9	93,335	0,00	18,73	180
10	175,336	0,00	19,26	0
11	97,418	0,00	11,56	0
12	159,421	0,00	12,22	0

**MEDIDAS MORFOLÓGICAS**

Antes de 3 sesiones, antes de la 4ª sesión

**08/07/2016**

**Masa total:** 66,520 kg

**Masa grasa total:** 25,074 kg (39%)

**Masa ginoide total:** 11,350 kg

**Masa androide total:** 4,494 kg (40,3%)

**Masa grasa androide:** 5,080 kg

**Masa magra total:** 2,187 kg (43,4%)

XXXXXXXXXX

DDN: 25/10/1998

Talla: 170cm