



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0512581-2 B1

(22) Data do Depósito: 21/06/2005

(45) Data de Concessão: 12/06/2018



(54) Título: USOS COSMÉTICOS DE RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA

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

(30) Prioridade Unionista: 24/06/2004 GB 04 14113.1

(73) Titular(es): VIRULITE DISTRIBUTION LIMITED

(72) Inventor(es): GORDON REX PATERSON DOUGAL

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USOS COSMÉTICOS DE RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA"**.

A presente invenção refere-se ao uso de radiação eletromagnética para a redução ou atenuação ou remoção ou diminuição de rugas ou linhas finas, especialmente, mas não exclusivamente, rugas faciais e do pescoço, e outros sinais de envelhecimento. A presente invenção também propõe o uso de radiação eletromagnética para rejuvenescer a pele, em geral, retardando os sinais de envelhecimento e melhorando a elasticidade, tônus e aparência da pele. A invenção também põe à disposição um método para tratar a pele, de modo a reduzir ou atenuar ou retardar ou reverter sinais visíveis de envelhecimento e para embelezar a pele e um aparelho para realizar esses tratamentos cosméticos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Na pele jovem, o colágeno, logo abaixo da superfície da pele forma uma rede organizada, com boa elasticidade e flexibilidade. Quando as mulheres passam pela menopausa e os homens envelhecem, ambos sentem um maior enrugamento da pele e menor espessura da pele. Durante o envelhecimento, o colágeno modifica sua estrutura, causando um impacto negativo sobre a aparência cosmética da pele. A modificação no colágeno também pode ser acelerada por exposição prolongada aos raios UV do sol. Bilhões de libras são gastos anualmente na indústria cosmética e calcula-se que a mulher média gaste em torno de 800 libras por ano com produtos de tratamento da pele e cosméticos.

Da técnica anterior é conhecido o uso de peelings químicos ou preparações cosméticas, tipicamente na forma de crês, para prevenir ou atenuar rugas e como agentes antienvelhecimento. Essas preparações podem conter produtos vegetais e/ou animais sintéticas ou de ocorrência natural. As composições são aplicadas topicamente e, normalmente, em base regular, afim de maximizar seus efeitos. Porém, existem poucas evidências de que, mesmo o uso persistente dessas composições, atenuem os sinais visíveis de envelhecimento.

Como alternativa a preparações cosméticas e liftings faciais ci-

rúrgicos, é conhecido usar uma fonte de radiação eletromagnética de baixo nível para obter reações fotoquímicas na pele, normalmente chamada de bioestimulação. A bioestimulação depende do conceito de replicação e síntese intensificadas, que resulta em maior produção de colágeno, maior estimulação de fibroblastos ou síntese de DNA aumentada. A energia luminosa é absorvida em citocromos e porfirinas dentro das mitocôndrias celulares e membranas celulares, produzindo uma pequena quantidade de singleto de oxigênio. Tipicamente, os pacientes necessitam de quatro a seis sessões para estados agudos e de seis a oito tratamentos para estados crônicos. Esse tipo de tratamento tanto é prolongado como oneroso.

Desde 1990, lasers têm sido usados para restauração e remoção de rugas. A remoção de rugas é uma técnica agressiva, na qual tecido é removido, camada por camada, invadindo a derme e efetivamente induzindo uma queimadura de segundo grau. O calor é depositado na derme contraindo o colágeno e retesando a pele. O laser induz a desnaturação do colágeno na derme e a formação de reticulações, que resultam em um efeito de retesamento, esticando a pele, desse modo reduzindo ou removendo as rugas. Esse processo é chamado de termólise e o aquecimento térmico dos tecidos é um pré-requisito para a terapia. Considera-se que o limite térmico para a termólise é de cerca de 70°C. Mas, o problema com o tratamento a laser tradicional é que o paciente pode sofrer queimaduras e, desse modo, ter uma pele pendente, crostas e vermelhidão por muitas semanas após o tratamento. Além disso, têm sido relatada uma alta incidência de hiperpigmentação, após o tratamento de remoção de rugas por laser de CO₂.

Existe, portanto, necessidade de um método alternativo, eficaz e seguro para reduzir ou atenuar ou remover ou diminuir rugas ou linhas finas, rejuvenescendo a pele, retardando os sinais de envelhecimento e melhorando a elasticidade, o tônus e a aparência da pele e para, em geral, embelezar a pele.

BREVE SUMÁRIO DA DESCRIÇÃO

De acordo com um primeiro aspecto da invenção, é posto à disposição um método para tratar cosmeticamente uma área superficial de uma

pele de mamífero, que compreende irradiar a pele com uma fonte de radiação eletromagnética divergente de entre 900 nm a 1500 nm.

Referência no presente a "tratar cosmeticamente" inclui reduzir ou atenuar ou remover ou diminuir rugas ou linhas finas, rejuvenescendo a pele, retardando os sinais visíveis de envelhecimento e melhorando a elasticidade, o tônus e a aparência da pele e para, em geral, embelezar.

Referência no presente a "pele" inclui a epiderme mais externa, a camada basal e derme da face, mama, braço, nádegas, coxa, barriga ou pescoço.

Ao longo da descrição e das reivindicações desta declaração, as palavras "compreendem" e "contêm" e variações das palavras, por exemplo, "compreendendo" e "compreende", significa "incluindo, mas não limitado a" e não pretende excluir (e não exclui) outras partes, aditivos, componentes, partes integrantes, ou etapas.

Ao longo da descrição e das reivindicações deste memorial descritivo, o singular abrange o plural, a não ser que o contexto o exija de outro modo. Particularmente, quando é usado o artigo indefinido, a descrição deve ser entendida como incluindo a pluralidade, bem como a singularidade, a não ser que o contexto o exija de outro modo.

Aspectos, partes integrantes, características, compostos, partes químicas ou grupos descritos em conjunto com um aspecto, modalidade ou exemplo específico da invenção devem ser entendidos como aplicáveis a qualquer outro aspecto, modalidade ou exemplo, descrito no presente, a não ser que seja incompatível com o mesmo.

Preferivelmente, a luz divergente é de entre 10° a 50°. Por divergente que se dizer que a radiação eletromagnética emitida da fonte eletromagnética tem um semi-ângulo divergente de pelo menos 5°. Preferivelmente, a divergência da radiação eletromagnética está no âmbito de 15° a 25° de semi-ângulo divergente.

Desse modo, entende-se que o método da presente invenção não inclui o uso de lasers como fonte de radiação eletromagnética.

Foi constatado, agora, surpreendentemente, que a radiação ele-

tromagnética de baixa intensidade de largura de faixa pequena (preferivelmente, em torno de 10 nm a 120 nm e, mais preferivelmente, 50 nm) é eficiente em tratar cosmeticamente a pele. Acredita-se que a maneira pela qual a radiação eletromagnética efetua sua ação é por meio de transmissão de energia através de componentes/organelas celulares, enzimas, tal como, mas não limitado a sintase de óxido nítrico indutível (iNOS). Uma molécula de água, pela qual é passada uma faixa de comprimentos de onda de radiação eletromagnética irá produzir diversos picos de transmissão. Esses picos de transmissão estão associados à faixa de comprimentos de onda da radiação eletromagnética terapêutica, preferida, da invenção, e, portanto, indica um papel para a molécula de água no mecanismo de ação geral.

Preferivelmente, o comprimento de onda da radiação eletromagnética está centralizada em torno de qualquer uma ou mais dos comprimentos de onda especificados, escolhidos do grupo que compreende 940 nm, 950 nm, 1040 nm, 1060 nm, 1072 nm e 1267 nm.

Nossos estudos mostraram que comprimentos de onda centralizados em torno desses comprimentos de onda especificados acima e, especialmente, em torno de luz de uma única largura de faixa restrita, centralizada em 1072 nm ou 1267 nm, são particularmente eficientes em reduzir o comprimento e a área das rugas. Deve ser observado que esses dois comprimentos de onda correspondem aos comprimentos de onda de emissão de pico de um perfil de transmissão de luz da molécula de água e, portanto, acreditamos que o mecanismo de ação está relacionados à água e, possivelmente, a membranas celulares.

Nossos estudos também mostraram que 1072 nm e 880 nm provocam efeitos opostas sobre a viabilidade de linfócitos *ex vivo*, sendo que o primeiro é protetor e o último comprimento de onda é citotóxico. Além disso, temos provas de que 1072 nm protege contra linfotoxicidade mediada por UV.

Preferivelmente, a radiação eletromagnética é contínua ou pulsada.

Preferivelmente, quando a radiação eletromagnética é contínua,

a intensidade é de pelo menos $500 \mu\text{Watts/cm}^2$ e até 500 mWatts/cm^2 ;

Preferivelmente, quando a radiação eletromagnética é pulsada, a intensidade é de pelo menos $500 \mu\text{Watts/cm}^2$ de potência máxima e a potência média é de até 500 mWatts/cm^2 . A potência média é a potência máxima multiplicada pela proporção do tempo total em que a radiação é aplicada. Por exemplo, se a potência máxima for $500 \mu\text{Watts/cm}^2$ e for pulsada por $10 \mu\text{segundos}$, já uma frequência de 600 Hz , então a potência média é de $30 \mu\text{Watts/cm}^2$.

Métodos da técnica anterior, que se baseiam em aquecimento término, especificam um limite inferior de $0,5 \text{ Watts/cm}^2$. A presente invenção, que procura evitar quaisquer efeitos térmicos, opera abaixo desse nível.

Preferivelmente, quando a radiação eletromagnética é pulsada a potência média da intensidade está na região de $50\text{-}100 \mu\text{ Watts/cm}^2$.

Foi constatado que a potência pode variar, apropriadamente, de $500 \mu\text{Watts/cm}^2$ de potência máxima a $500 \text{ miliwatts/cm}^2$ de potência contínua ou máxima, quando aplicada à pele. Tipicamente, 20 mWatts/cm^2 são usados na pele, mas esse valor depende de quão gordo ou musculoso é o indivíduo e, portanto, a que profundidade se encontra a ruga.

Preferivelmente quando a radiação eletromagnética é pulsada por períodos de até pelo menos $10\text{-}15 \square \text{ segundos}$ e mais preferivelmente é aplicada a uma frequência/taxa de repetição na faixa de $300\text{-}900 \text{ Hz}$ mais preferivelmente ainda a frequência/taxa de repetição é de ou de cerca de 600 Hz .

Nossos estudos mostram que a radiação eletromagnética pode ser tanto coerente ou não-coerente os resultados clínicos não são afetados por este parâmetro.

Preferivelmente a radiação eletromagnética é aplicada sobre a área afetada por pelo menos 30 segundos e até a alguns minutos. Um tempo de exposição típico situa-se na região de 3 minutos , todavia para rugas mais profundas este tempo é aumentado de acordo com a espessura da camada de gordura do indivíduo e a exposição pode atingir 10 minutos .

Deve ser entendido que a fonte de energia que emite a radiação

eletromagnética tem de produzir mais do que a intensidade necessária para o efeito clínico, uma vez que mostramos que aproximadamente 99% da luz é perdida sobre a superfície da pele durante o tratamento. Desse modo, a intensidade de radiação aplicada tem de ser corrigida quando é realizado um

tratamento.

Do exposto acima, compreende-se que a radiação eletromagnética poderá ser direcionada para o sítio alvo quer de forma contínua ou de forma comutada(pulsada). O principal benefício da comutação é a conservação da potência e facilita uma saída de potência de pico mais alta, melhorando por este meio a resposta cosmética.

Preferivelmente, a fonte de terapia por radiação eletromagnética inclui meios para reduzir a quantidade de radiação do ambiente, que invade o local de tratamento.

Preferivelmente, a fonte de radiação eletromagnética é um diodo emissor de luz. A radiação desses dispositivos pode ser operada eletricamente ou a radiação pode ser fornecida a um aplicador por meio de um sistema de fornecimento de fibra óptica.

Preferivelmente, o emissor da fonte de radiação inclui uma junção de PN, disposta para emitir radiação com um comprimento de onda centralizado nos ou em torno dos comprimentos de onda especificados, mencionados previamente. Um conjunto de diodo de luz individual pode incluir uma pluralidade de junções orientadas. Diodos emissores de infravermelho podem ser configurados, não apenas para emitir radiação a uma frequência específica, mas também para emitir um raio divergente de alta intensidade.

A luz divergente também pode ser derivada de polímeros emissores de luz.

A presente invenção refere-se a um método para tratar cosmeticamente a pele com radiação eletromagnética divergente, com um comprimento de onda na faixa de visível a infravermelho e centralizada em torno de 940 nm, 950 nm, 1040 nm, 1060 nm, 1072 nm ou 1267 nm. A radiação eletromagnética é aplicada a uma baixa intensidade, de modo que não é causado nenhum dano térmico ou aquecimento à pele ou qualquer outro tecido ou órgão em torno da área de tratamento. Desse modo, o método da presen-

te invenção difere da técnica anterior, uma vez que os efeitos são não térmicos e evitam a termólise. Além disso, a presente invenção é contra-intuitiva à bioestimulação, uma vez que o conceito de replicação e síntese intensificadas é evitado positivamente. Na verdade, foi constatado que os comprimentos de onda usados na presente invenção especificamente inibem a síntese de DNA, inibem a produção de colágeno e inibem a replicação de fibroblastos. Os resultados mostraram que a qualidade de tecido conjuntivo entre as células é surpreendentemente aperfeiçoada pela inibição da produção de colágeno, em vez de aumentar a densidade de colágeno para obter o efeito desejado, tal como pela técnica anterior.

De acordo com um segundo aspecto da invenção, é posto à disposição um método para aperfeiçoar as características elásticas de uma área superficial de uma pele de mamífero, que compreende irradiar a pele com uma fonte de radiação eletromagnética divergente de entre 900 nm a 1500 nm.

Foi constatado que usando o método da presente invenção, as fibras de elastina tornam-se menos fragmentadas e mais uniformes, portanto, aperfeiçoam as características elásticas da pele. Por exemplo, ao tratar a pele da mama, verificamos que não só a elasticidade da pele melhora, mas também o tônus do tecido. Também foi constatado que o método aperfeiçoa a viabilidade das células.

De acordo com um terceiro aspecto da invenção, é posto à disposição um método para reduzir a área de superfície e o volume de tecido de uma área superficial de pele de mamífero, que compreende irradiar a pele com uma fonte de radiação eletromagnética divergente de entre 900 nm a 1500 nm.

Os resultados obtidos pelo método da presente invenção demonstram que por redução do volume de pele acima dos olhos e abaixo dos olhos, podemos reduzir a aparência caída dos lados da face. Desse modo, mostramos que a redução do volume de tecido e área de superfície da pele, junto com as características elásticas aperfeiçoadas, proporciona os efeitos cosméticos desejados.

Deve ser observado que em um quarto aspecto do método da presente invenção, o mesmo também pode ser usado para evitar ou reduzir ou reverter danos à pele causados por luz UV ou fotoenvelhecimento.

De acordo com um quinto aspecto da invenção, é posto à disposição o uso de radiação eletromagnética divergente de entre 900 nm a 1500 nm, para tratar cosmeticamente uma área de pele superficial.

Preferivelmente, o segundo, terceiro, quarto e quinto aspectos da invenção incluem, ainda, qualquer um ou mais das características descritas no presente do primeiro aspecto da invenção.

Foi demonstrado que terapia com luz, tanto laser como LED, proporcionam benefícios clínicos em muitas áreas terapêuticas. Os efeitos de luz centralizada em torno de comprimentos de onda de 1072 nm e 880 nm, usando uma série de protocolos de irradiação simples ou múltiplos, foram testados em relação ao seu efeito sobre linfócitos humanos recém-preparados, estimulados com fito-hemaglutinina (PHA). Números de células viáveis permaneceram significativamente mais altos após a irradiação com 1072 nm e foram significativamente mais baixos após irradiação com 800 nm, em comparação com controles não tratados, após uma única irradiação diária por um período de cinco dias. Além disso, os números de células foram significativamente mais altos após tratamento prévio com 1072 nm e exposição a UVA, em comparação com células tratadas apenas com UVA. Células irradiadas duas vezes no Dia 3 pós-coleta com diversas faixas de ondas confirmam no dia 5, um aumento em % de viabilidade das células, após exposição a 1072 nm, e irradiação com 1072 nm, alternando com 1268 nm, e uma diminuição em % de viabilidade das células, após irradiação com 880 nm sozinha. Essas observações levaram-nos a acreditar que luz centralizada em torno de um comprimento de onda de 1072 nm pode ser útil em um método *ex vivo* para aperfeiçoar a viabilidade de células imunes.

De acordo com um sexto aspecto da invenção, é posto à disposição um método *ex vivo* de aperfeiçoar a viabilidade de células imunes, que compreende expor células mononucleares de sangue periférico à radiação eletromagnética divergente com largura de faixa estreita, centralizada em

torno de um comprimento de onda de 1072 nm.

Preferivelmente, as células mononucleares de sangue periférico são linfócitos.

Preferivelmente, as células mononucleares de sangue periférico são estimuladas com fito-hemaglutinina (PHA). Deve ser observado que as células podem ser depois reintroduzidas no indivíduo do qual foram coletadas, de modo a reforçar seu sistema imunológico.

De acordo com um outro aspecto da invenção, é posto à disposição um dispositivo emissor de luz portátil, para o tratamento cosmético da pele, sendo que o dispositivo compreende um meio de energia para fornecer energia a um dispositivo emissor de luz que produz radiação eletromagnética divergente de entre 900 nm a 1500 nm, um painel flexível ou moldado, através do qual passa a luz e uma carcaça à qual o painel flexível ou moldado está ligado, de modo que o dispositivo pode contornar uma parte do corpo que necessita de tratamento cosmético.

Preferivelmente, o meio de energia é uma bateria ou é eletricidade de linha principal.

Preferivelmente, o dispositivo emissor de luz é um LED ou, mais preferivelmente, uma pluralidade de LEDs. Deve ser observado que o dispositivo da presente invenção não é um dispositivo de laser.

Preferivelmente, o dispositivo também pode compreender pelo menos uma ou mais junções de PN, dispostas para emitir radiação com comprimento de onda centralizado em ou em torno de qualquer um ou mais dos comprimentos de onda especificados, escolhidos do grupo que compreende 940 nm, 950 nm, 1040 nm, 1060 nm, 1072 nm e 1267 nm.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A invenção é descrita agora com referências as seguintes figuras, nas quais:

a Figura 1 mostra vistas de plano (1A), de lado (1B) e de secção transversal (1C e 1D) de um dos dispositivos para pôr o método da invenção em prática;

a Figura 2 mostra uma vista lateral de uma alternativa do dispo-

sitivo para pôr o método da invenção em prática;

a Figura 3 mostra uma vista frontal, a Figura 4, uma vista lateral e a Figura 5, uma vista posterior de ainda uma outra alternativa do dispositivo para pôr o método da invenção em prática;

5 a Figura 6, colunas 1 e 2, mostram o % da viabilidade de células de blastos de PHA, após um único tratamento de 3 min de IR1072 no Dia 3 e Dia 5, antes de fazer o teste em relação a apoptose no Dia 5. Os dados foram comparados com os respectivos controles e analisados usando um ANOVA, onde $*p < 0,05$. As colunas 3 e 4 mostram a % da viabilidade de células de blastos de PHA, após tratamentos múltiplos 5 x 3 min de IR1072 & IR880 NO Dia 3 e Dia 5, antes de testar a viabilidade de células no Dia 5. Os dados foram comparados com os respectivos controles e analisados usando um ANOVA, onde $*p < 0,01$.

A Figura 7 mostra a % da viabilidade de células de blastos de PHA, após tratamentos individuais, diários de 3 minutos, irradiados ou com IR1072 ou IR880. A viabilidade de células foi determinada usando o kit de apoptose Annexin V. Os dados de IR1072 foram analisados em comparação com os respectivos dados de IR880, suando um ANOVA, onde foram vistas diferenças significativas nos Dias 1, 3, 4 e 5 $*p < 0,01$, e uma tendência para significância no Dia 2.

A Figura 8 mostra blastos de PHA que foram tratados previamente 4 x 3 min no Dia 3 e 1 x 3 min no Dia 4 com IR1072, e depois as células foram incubadas por 4 horas, antes de exposição a UVA por 40 min. Amostras foram depois testadas em relação a viabilidade de células. Os dados foram analisados e comparados com tratamento com US sozinho, usando um ANOVA, onde $**p < 0,01$.

A Figura 9 mostra o efeito de diversas faixas de onda em blastos de PHA tratados no Dia 3 por 2 x 3 min e analisados. Os dados foram analisados e comparados com o controle não tratado, usando um ANOVA múltiplo, onde $**p < 0,01$.

A Figura 10 mostra um Western Blot mostrando o efeito do tratamento de IR sobre níveis de expressão de proteína de iNOS. Blastos de

PHA foram expostos diariamente a 1 x 3 min a uma fonte de infravermelho, IR1072 ou IR880 e testados nos Dias 3 e 5 em relação à expressão de proteína de iNOS, usando imunoblotting quantitativo com um anticorpo seletivo anti-iNOS (Autogen Bioclear, UK) (Imunoblots foram reexaminados e padronizados com um anticorpo de betaactina (Sigma, UK). Coluna 1, células de controle (Dia 5); Coluna 2, células tratadas com IR1072 (Dia 5); Coluna 3, células tratadas com IR880 (Dia 5). Os dados foram comparados por um ANOVA múltiplo, com um nível de significância ajustado em $p < 0.01$.

A Figura 11A mostra os efeitos após 2 meses de tratamento diário com 1072 nm, comparados com a Figura 11B do mesmo indivíduo, antes do começo do tratamento, A Figura 11C mostra uma superposição de uma foto antes e uma foto após 1 mês de tratamento, de tratamento com 1072nm do mesmo indivíduo.

A Figura 12 mostra uma representação esquemática do protocolo para os estudos humanos.

A Figura 13A (antes) e 13B mostram o efeito de tratamentos múltiplos e redução de bolsas abaixo dos olhos.

As Figuras 14A, B e C mostram um indivíduo diferente da Figura 12, que passou pelo mesmo protocolo.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Existem diversos produtos que alegam eficácia no tratamento de linhas e rugas utilizando luz não térmica nos comprimentos de onda azul, amarelo ou vermelho. Na presente invenção tentamos identificar qualquer resposta fisiológica que fosse dependente de comprimento de onda. Os comprimentos de onda usados variaram de 660 nm a 1268 nm, diversas larguras de faixa restritas foram examinadas, tanto sozinhas como em combinação. Foi constatado que uma única largura de faixa restrita de luz, centralizada em 1072 nm, pareceu ter um efeito positivo sobre linfócitos. Mostrou-se que esse comprimento de onda de luz protege os linfócitos humanos contra o efeito prejudicial de radiação de UV, um agente de fotoenvelhecimento conhecido.

O dispositivo preferido para pôr em prática o método da inven-

ção é um dispositivo emissor de luz 1 portátil, que pode ser operado tanto por bateria como por linha elétrica principal. O dispositivo acompanha os contornos da área a ser tratada 2, a face, olhos, braços, coxas ou mamas.

A Figura 1A mostra uma vista de plano, vista lateral (1B) e vistas em seção transversal (1C e 1D) de um dispositivo emissor de luz manual, portátil, que tem o formato conveniente de um olho. A luz infravermelha passa através do painel 3 transparente para a pele a ser tratada. O abastecimento de energia para a unidade está ligado através da área 4 e o dispositivo é mantido no lugar pelo corpo 5. O painel 3 é ligeiramente côncavo para acompanhar os contornos da área a ser tratada e para evitar pressão indevida sobre o olho quando colocado sobre a órbita. O espaço 6 contém os dispositivos eletrônicos de controle, que controlam a intensidade e a duração do ciclo de tratamento. Também aloja os LEDS 7. A Figura 2 mostra uma modalidade alternativa do dispositivo para colocar sobre uma parte maior de pele.

Com referência às Figuras 3 a 5 dos desenhos anexos, uma segunda modalidade de acordo com a presente invenção está na forma de uma fonte de radiação de comprimento de onda estreito, de painéis múltiplos. Nesse caso, uma pluralidade de painéis 7 é montada em uma relação lado a lado em articulações 8, que, por sua vez, estão ligadas a um suporte 9 por meio de braços 10 e 11. A disposição é de tal modo que os painéis podem mover-se um em relação ao outro e o suporte pode ser ajustado para alterar a direção da iluminação. O suporte estende-se do piso ou está ligado a uma cadeira ou cama.

A parede frontal de cada painel 7 é transparente e, montada abaixo da parede frontal, há uma série de dispositivos emissores de radiação 12.

Tal como com as modalidades do dispositivo, descritas previamente acima, essa modalidade da invenção inclui dispositivos eletrônicos de controle, para limitar o tempo da aplicação da radiação e para monitorar a radiação do ambiente e dar um alarme quando o valor limite da radiação do ambiente é excedido.

Os dispositivos da presente invenção podem ser usados para o aperfeiçoamento cosmético de celulite, que afeta as nádegas e pernas, e do tônus do tecido das mamas, e eles também podem ser usados para tratar a face como um todo.

5 Métodos e Materiais

Preparação das Células

Sangue integral humano, heparinizado, foi obtido de voluntários saudáveis e células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram separadas usando Lymphoprep (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Noruega) e centrifugadas a 400 x g por 25 min. Os PBMCs foram isolados da camada de contato, lavados duas vezes em banho de RPMI sem L-glutamina (Gibco®) e ressuspensos em RPMIcm (banho de RPMI + 10% v/v de Soro de Bezerro Fetal + 1% de Penicilina/Estreptomicina + 1% de L-Glutamina). A densidade das células foi ajustada correspondentemente para 1×10^8 células/ml com RPMIcm. 100 µl de PHA ('Lectin', Sigma) foram adicionados às células para fazer blastos de PHA. As células foram incubadas a 37°C em CO₂ de 5%.

Montagem Experimental

Os cinco protocolos foram montados tal como se segue:

1. Blastos de PHA foram expostos a uma fonte de luz infravermelha, IR1072m nos Dias 3, 4 e 5 após a coleta. Usando placas de cultura de 35 mm, todas as células foram expostas a um único tratamento de 3 min de luz infravermelha. Após tratamentos diários, amostras de células replicadas, individuais, foram analisadas quanto a % de viabilidade de células no Dia 5.

25 2. Blastos de PHA foram expostos a IR 1072 & IR880 no Dia 3 e 5 para 5 x 3 min de tratamento e analisados no Dia 5. A viabilidade de células e expressão de iNOS foram determinadas após cada tratamento no Dia 5.

30 3. Blastos de PHA foram expostos diariamente, a partir do Dia 1, a uma única dose de 3 minutos de IR1072 e IR880. Após irradiação diária, as células foram analisadas com relação ao % de viabilidade de células.

4. Blastos de PHA foram expostos a IR1072 no Dia 3 por 4 x 3

min de tratamento e no Dia 4 a um único tratamento de 3 min. Depois, as células foram deixadas por 4 horas, antes da exposição a UVA por 40, e a viabilidade de células foi depois determinada.

5 Células foram incubadas até o Dia 3 em tubos de cultura de tecido e expostas a diversas faixas de onda por 2 x 3 minutos no Dia 3. As faixas de onda incluíram IR660nm, IR880nm, IR950 nm, IR 1267nm, IR1072nm, sendo que IR1072 foi alternado com IR1268nm, IR1072 e IR1267NM, 1 μ S de pulso de IR1072nm e 7 μ s de pulso de IR1072nm. As células foram analisadas quando ao % de viabilidade de células, imediatamente após a irradiação.

Notavelmente para todos os protocolos usados, a temperatura de todas as placas foi mantida à temperatura ambiente ao longo dos tratamentos com IR e de controle.

Kit de Apoptose Annexin V

15 As viabilidades das células foram analisadas usando o kit de Detecção de Apoptose Annexin V (Autogen Bioclear, UK). A apoptose pode ser detectada pela mudança na posição de fosfatidilserina (OS) na membrana celular. Em células não apoptóticas, a maioria das moléculas de OS está localizada na camada interna da membrana de plasma, mas logo depois de induzir a apoptose, PS se redistribui para a camada externa da membrana. O PS exposto pode ser facilmente detectado com Annexin V. Células que ligaram Annexin V mostram manchas verdes na membrana de plasma. Células que tinham perdido a integridade da membrana mostraram manchas vermelhas (PI) em todo o citoplasma e um halo de manchas verdes na superfície da célula (membrana de plasma). Células a 1×10^5 - 1×10^6 por placa foram lavadas e ressuspensas em Tamponador de Ligação de Teste. 5 μ l de Annexin V e 10 μ l de Iodeto de Propídio (PI) foram adicionados às células, antes de incubação à temperatura ambiente, no escuro, por 15-30 minutos. As células foram observadas sob um conjunto de filtro duplo para FITC & rodamina usando microscopia de fluorescência e foram contadas a cego por pelo menos dois observadores.

Análise de Western Blotting

Suspensões de pelotas de células descongeladas foram homogeneizadas em gelo com um homogeneizador Dounce. Os níveis de proteína na suspensão de células foram determinados usando o Teste de Lowry, usando albumina de soro bovino como padrão. Os níveis de proteína foram ajustados para 10µg de proteína foram carregados em cada fileiras. Eletroforese padrão foi realizada usando um gel de poliacrilamida de 6%. Após a eletroforese, a proteína foi transferida para uma membrana de nitrocelulose (NC) por 2,5 horas a 50V. A membrana de NC foi bloqueada com leite seco desengordurado de 5% em 1 x solução salina tamponada com Tris (TBS) contendo 0,2% de Tween 20 (Sigma, UK) por 1 hora à temperatura ambiente. A membrana de NC foi incubada com anticorpo primário iNOS (diluição de 1:2500) durante a noite, a 4°C. A membrana de NC foi lavada 4 x 10 min com anticorpo secundário ligado com peroxidase de armadilha anticeleste (diluição 1:2000) por 1 hora. A membrana de NC foi lavada 4 x 10 min com tamponador de lavagem. Os grupos de proteína da NC foram visualizadas usando um substrato de 68 mM de luminol, 1,25 mM de ácido p-coumarico, 30% de peróxido e hidrogênio. O imunoblot foi exposto a Hyperfilm® por 3 min em um cassete de filme e foi revelado e fixado à temperatura ambiente. Os grupos de proteína foram quantificados usando um densitômetro Image-Quant® na faixa linear do filme, para determinar a expressão relativa de iNOS. Valores de densidade óptica (padronizados com betaactina) foram comparados usando um ANOVA múltiplo, com um nível de significância de $p < 0.05$. Os dados foram obtidos de $n = 3$ experimentos replicados individuais.

Estatística

A apoptose foi medida usando % de viabilidade de células, isto é,

$$\% \text{ viabilidade de células} = [(N^\circ \text{ de células viáveis}) / (N^\circ \text{ de células totais})] * 100$$

Os dados são dados como o desvio médio \pm padrão.

Comparações entre células de controle e tratadas foram feitas por um ANOVA múltiplo e expressos como SD médio \pm , com um intervalo de segurança de 95%. A análise estatística foi realizada usando Prism 3.2.

Fontes de luz

Tanto as fontes de luz de 880 nm como de 1072nm emitiram luz em modo múltiplo, com largura de faixa menor que 50 nm, modo contínuo de potência óptica 5mw/cm².

Estudos Humanos

Os comprimentos de onda variaram de 660 nm a 1268 nm, diversas larguras de faixa restritas foram examinadas, tanto sozinhas como em combinação.

40 voluntários foram recrutados da população geral, com idade entre 45 anos e 65 anos, 38 mulheres, 2 homens. Cada indivíduo foi fotografado suando iluminação fixa e distância fixa. As vistas fotografadas foram: esquerda do centro da face; direita do centro da face; perfil esquerdo da face; e perfil direito da face. A distância e a iluminação constantes facilitaram uma comparação direta entre as fotografias do "Antes" e do "Depois".

Ao fazer as fotografias do "Depois", assegurou-se que os olhos estivessem abertos por uma quantidade semelhante, em compração com a fotografia do "Antes". Isso permitiu, depois, a comparação das dobras de pele acima e das bolsas abaixo dos olhos. Foi solicitado, especificamente, aos participantes que não sorrissem ou que tivessem qualquer expressão em seu rosto quando as fotografias foram feitas. A cada participante foi dado um dispositivo ativo e solicitou-se que tratassem a área da pele em torno dos olhos por aproximadamente 30 minutos a cada dia (15 minutos por área dos olhos). A pele em torno dos olhos foi escolhida por seu mais móvel e com maior probabilidade de demonstrar uma melhora na elasticidade da pele.

EXEMPLO 1

Usando uma série de protocolos, o tratamento com IR1072 consistentemente causou um efeito protetor sobre a sobrevivência de blastos de PHA. Em contraste, IR880 foi consistentemente citotóxico, em comparação com células de controle e tratada com IR1072.

Após a irradiação com IR1072, a % de viabilidade de células aumentou significativamente no Dia 5 ($p < 0,05$), em comapração com os dados de controle, após um protocolo de tratamento tanto único como múltiplo de 5 x 3 min, no Dia 3 e 5 (Figura 6). No protocolo seguinte, as células rira-

didadas com 5 x 3 min de IR1072 e IR880, a % de viabilidade de células diminuiu significativamente depois do tratamento com IR880 no Dia 5 ($p < 0.01$), em comparação com células tratadas com IR1072 (Figura 6). O protocolo de tratamento diário causou uma diminuição significativa na % de viabilidade de células para células tratadas com IR880 sobre um período de 8 dias [Dia 1 ($p < 0.01$), Dia 3 ($p < 0.01$), Dia 4 ($p < 0.05$), Dia 5 ($p < 0.05$), Dia 8 ($p < 0.05$), em comparação as irradiadas com IR1072 (Figura 7), em testes paralelos. Após tratamento prévio com IR1072, e subsequente exposição a UVA, a % de viabilidade de células permaneceu significativamente mais alto ($p < 0.01$), em comparação com células tratadas apenas com UVA (Figura 8). Após irradiação com diversas faixas de onda, novamente as células expostas a IR880 mostraram uma diminuição significativa na % de viabilidade de células ($p < 0.01$), enquanto a % de viabilidade de células foi mais alto, após tratamento com IR1072 ($p < 0.01$) e luz de faixa de onda alternada IR1072/IR1268 ($p < 0.01$), todos comparadas com controles não tratados (Figura 9). Todas os outros comprimentos de onda e condições testados não tiveram efeito significativo sobre a viabilidade das células.

Embora comprimentos de onda na faixa de 855 – 905 nm possam estimular a proliferação de fibroblastos, constatamos que luz nessa faixa parece ser linfotóxica. Os efeitos citotóxicos e protetores sobre as células são rápidos, uma vez que as análises foram realizadas no espaço de 2 horas de exposição à luz IR, e ambos os efeitos tiveram longa duração, sendo observados pelo menos 2 dias pós-tratamentos. Estudos demonstram claramente que luz na faixa de 1050nm – 1100nm melhora a viabilidade das células, após protocolos de tratamento tanto únicos como múltiplos. Manter a viabilidade de linfócitos na presença de fatores adversos é de importância, uma vez que endo- e exo-toxinas bacterianas são fatores leucotóxicos, cujo efeito pode ser reduzido pela irradiação das células inflamatórias pela luz de 1072nm \pm 25nm. Há muito tempo vinha sido postulado que luz IR tinha um efeito protetor contra UVA, mas a faixa de comprimentos de onda exata era desconhecida. Os presentes resultados sugerem luz de 1072nm \pm 25nm é protetora contra alguns dos efeitos nocivos de UVA.

EXEMPLO 2

Foi demonstrado que óxido nítrico é um inibidor potente de apoptose em diversos tipos de células. NO se difunde muito rapidamente, tanto através de água como de membranas celulares, e iNOS é produzido mais rapidamente e eficientemente do que eNOS e nNOS. iNOS pode funcionar sem a elevação de níveis de cálcio intracelulares e sua atividade é rapidamente indutível em células imunes, por exemplo, monócitos e macrófagos ativados primariamente, após exposição a citocinas e produtos microbianos.

A fim de esclarecer o mecanismo potencial subjacente à citoproteção de longa duração observada, causada por exposição a IR1072, foi realizado imunoblotting quantitativo, testando a expressão de iNOS, com comparação com o controle e IR880nm. Após pré-tratamento com IR1702, foi detectado um aumento significativo, de $4,9 \pm 2,1$ vezes ($p < 0.05$) na imunorreatividade de iNOS no Dia 5, comparada com o controle. Em contraste, não foi observado nenhum aumento significativo de iNOS com IR880 ($2,1 \pm 2,2$ vezes para Dia 5) ($p > 0.05$), realizado em estudos paralelos (Figura 10).

Bioquimicamente, os presentes resultados mostram que iNOS foi regulado para cima em um modo dependente de comprimento de onda, em comparação com controles não tratados. Acredita-se que NO aja como um inibidor de apoptose por dois mecanismos diferentes: em primeiro lugar, através de um mecanismo dependente de cGMP, onde NO aja ou no nível da ativação de protease semelhante a caspase-3 ou corrente acima dessa ocorrência, para evitar a ativação da protease; em segundo lugar, NOP também inibe a atividade da protease semelhante a caspase-3 por S-nitrosilação da enzima. A supressão da atividade semelhante a caspase-3 resgata a célula da morte celular programada.

EXEMPLO 3

Após o tratamento da pele da face e olhos com a fonte de luz, observamos uma redução na profundidade, comprimento e área das rugas, também observamos uma redução na área de superfície da pele acima dos olhos e uma redução na proeminência das bolsas a baixo dos olhos. Para garantir uma redução do artefato para o mínimo, foi usada uma caixa de luz

de iluminação constante. Isso facilitou uma distância constante da lente da câmara do indivíduo e uma exposição constante. Os indivíduos foram solicitados a focalizar no mesmo ponto e apoiar seus queixos em um ponto fixo, com seu nariz tocando um fio, para garantir uma rotação mínima entre as fotografias. Depois, foi dada aos indivíduos uma fonte de luz para que se tratassem a si próprios, pelo menos uma vez ao dia, mas, preferivelmente, duas vezes ao dia. Depois de um mês, foram tiradas fotografias de acompanhamento iniciais, seguidas de outra série de fotografias em 2 meses. Ao tirar a fotografia, em todos os casos era essencial, em todas as ocasiões, que o rosto estivesse vazio de expressão, os olhos estivessem abertos pela mesma quantidade, possibilitando uma comparação direta da pele acima dos olhos, e o olhar dirigido para o mesmo ponto na caixa de luz, em todos os casos. Foram tiradas 4 vistas, Frente Esquerda, Frente Direita, Perfil esquerdo e Perfil direito. Isso facilitou a comparação direta de bolsas abaixo dos olhos e do comprimento e profundidade das rugas. Rugas que não estavam no plano perpendicular ou horizontal não foram examinadas, uma vez que ligeiras diferenças na rotação iriam criar diferenças artefactuais. Foram observadas também melhoras do tônus do tecido e músculo em diversas outras partes do corpo, onde o tratamento cosmético eletromagnético foi aplicado. Os resultados mostram uma melhora qualitativa na redução de sinais visíveis de envelhecimento, redução em pele redundante, afetando as pálpebras superiores do olho, mantendo o tônus do tecido facial e, por conseguinte, mantendo sulcos nasolabiais e contornos da face jovens.

O método da invenção melhorou a textura da pele e os contornos, resultando em uma pele mais lisa. Esses efeitos podem ser mantidos por até um a três meses após o tratamento ser interrompido e são capazes de reverter os sinais visíveis de envelhecimento por até 10 anos, em alguns casos.

Ao aplicar a luz às coxas e nádegas, houve uma melhora significativa da celulite observada, uma redução no grau de caimento das nádegas sob a influência da gravidade.

Com referência à Figura 11A, são mostrados os efeitos depois

de 2 meses de tratamento diário com IR1072nm, em comparação com a Figura 11 do mesmo indivíduo, antes de começar o tratamento, a Figura 11C mostra uma superposição de uma fotografia de antes e uma fotografia de depois de 1 mês de tratamento, de tratamento com IR1072nm do mesmo indivíduo. Foi observada que depois de 1 mês de tratamento, as dobras de pele acima da pálpebra do olho podem ser diretamente comparadas, uma vez que a pálpebra superior corta a córnea no mesmo lugar e os reflexos de luz na córnea são idênticos, tanto nos casos de controle como de teste (Figura 11C). Foi Observado que a pálpebra superior está menos caída após o tratamento. O caimento é melhorado adicionalmente, após dois meses de tratamento (Figura 11A).

EXEMPLO 4

Com referência à Figura 13A, é mostrado um perfil lateral de um indivíduo, antes do tratamento, e na Figura 13B, o mesmo indivíduo pós-tratamento. O indivíduo tinha uma marca identificável de uma lesão pigmentada inferior ao limbo corneal. Foi traçada uma linha perpendicular à linha marcadora preta e foram feitas as seguintes medições:

	Figura 13A	Figura 13B
1. Ponta do nariz	34,2 mm	38,3 mm
2. Da linha para a lesão pigmentada	20,3 mm	28,6 mm
3. Da linha para a bolsa (7 mm abaixo da pálpebra)	18 mm	23,2 mm

Foi feito um ajuste devido à variação de escala (distância até o nariz) para a linha até a lesão pigmentada $(38,3/34,2) \times 20,3 = 22,7$ mm e da linha para a bolsa: $(38,3/34,2) \times 18 = 20,2$ mm

Resultados Corrigidos

	Antes	Depois
Linha até a Lesão Pigmentada	22,7 mm	28,6 mm
Linha até a Bolsa	20,2 mm	23,2 mm

Usando a técnica acima, a redução da bolsa foi medida em 8 voluntários. 7 demonstraram uma redução no tamanho das bolsas abaixo do olho.

EXEMPLO 5

Assegurando-se que a abertura dos olhos fosse idêntica tanto antes como depois da Figura 14C, uma parte de um olho é cortada na fotografia "antes" (Figura 14A) e fundida com o lado complementar do olho da fotografia "depois" (Figura 14B). A melhora na qualidade da pele pode ser vista facilmente.

As medidas resultantes, tamanho das bolsas e medição e dobras de pele soltas eliminaram a variabilidade inerente em meramente avaliar as rugas em torno dos olhos.

10

	Rugas	Bolsas abaixo dos olhos	Pele solta acima da pálpebra do olho
Melhorou	n=18	n=6	n=14
Não melhorou	n=2	n=1	n=2
	p=0.0004	p=0.1	p=0.004

19 de 20 participantes envolvidos no estudo ficaram satisfeitos de que a terapia com luz de 1072nm foi eficaz, p=0.00004.

Utilizando as fotografias de linha de base como o aspecto de controle do teste cosmético, os dados acima demonstram a eficácia do método e do dispositivo da presente invenção. Tratamentos diários resultaram no fato de que a maioria dos participantes obteve um resultado positivo com uma aparência mais jovem.

15

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar cosmeticamente uma área superficial de uma pele facial de mamífero por meio da redução ou alívio ou remoção ou diminuição de rugas ou linhas finas que ocorrem como resultado do envelhecimento, **caracterizado pelo fato de que** compreende irradiar a pele com uma fonte de radiação eletromagnética divergente, centrada em 1072 nm e que possui uma largura de banda entre 10 e 120 nm com uma intensidade de pelo menos 500 $\mu\text{Watts/cm}^2$ a até 500 mWatts/cm^2 .
2. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de que** a pele facial é selecionada do grupo que compreende pele ao redor, acima ou abaixo de um olho e pele de um pescoço.
3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado pelo fato de que** a radiação eletromagnética é aplicada pelo menos uma vez por dia.
4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pelo fato de que** o período de tratamento é de pelo menos um mês.
5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo fato de que** a luz divergente está entre 10° e 50° .
6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado pelo fato de que** a radiação eletromagnética é contínua e pulsada.
7. Método de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo fato de que** quando a radiação eletromagnética é pulsada, ela é aplicada por períodos de pelo menos 10-15 $\mu\text{segundos}$.
8. Método de acordo com a reivindicação 6 ou 7, **caracterizado pelo fato de que** quando a radiação eletromagnética é pulsada, a taxa de frequência / repetição está na faixa de 300 a 900 Hz.
9. Método de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo fato de que** a taxa de repetição / frequência é de, ou cerca de, 600 Hz.
10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado pelo fato de que** a radiação eletromagnética é aplicada à

pele por pelo menos 30 segundos e até alguns poucos minutos.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado pelo fato de que** a fonte de radiação eletromagnética é um diodo emissor de luz.

5 12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado pelo fato de que** o emissor de fonte de radiação inclui pelo menos uma ou mais junções de PN, configuradas para emitir radiação com um comprimento de onda centralizado em 1072 nm.

10 13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizado pelo fato de que** o comprimento de onda centralizado no ou em torno do comprimento de onda especificado tem uma faixa de onda estreita de cerca de 50 nm.

15 14. Uso de radiação eletromagnética divergente **caracterizado pela** radiação ser centralizada em 1072 nm e que possui entre 10 e 120 nm com uma intensidade de pelo menos 500 $\mu\text{Watts}/\text{cm}^2$ a até 500 $\text{mWatts}/\text{cm}^2$ para tratar cosmeticamente uma área de pele facial superficial de um mamífero por meio da redução ou alívio ou remoção ou diminuição de rugas ou linhas finas que ocorrem como resultado do envelhecimento.

1/9

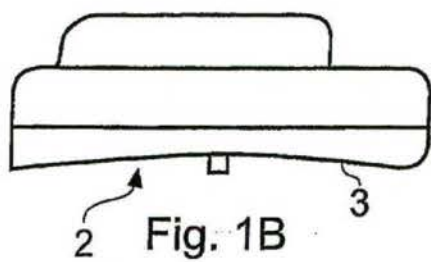


Fig. 1B

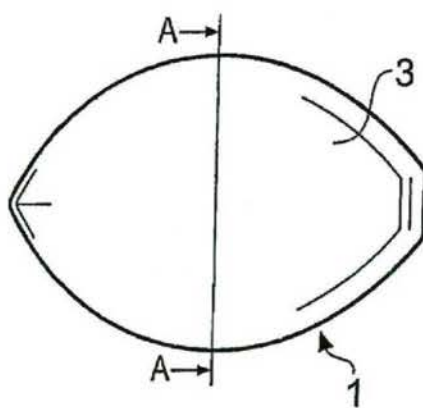


Fig. 1A

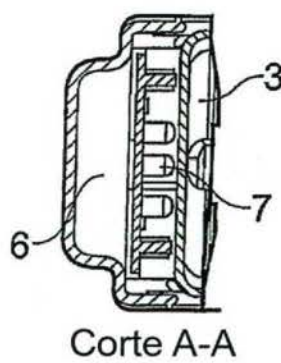


Fig. 1C

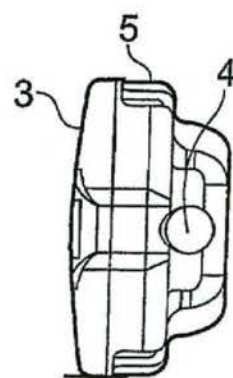


Fig. 1D

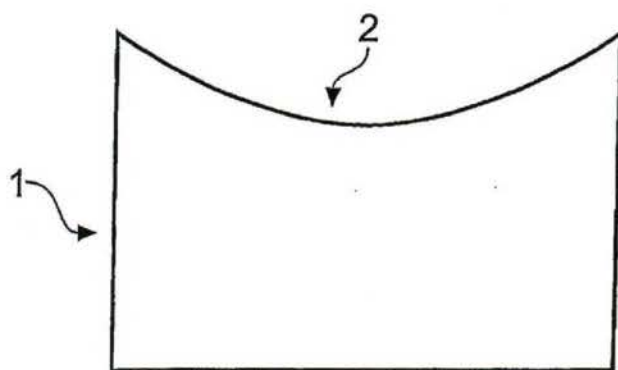


Fig. 2

2/9

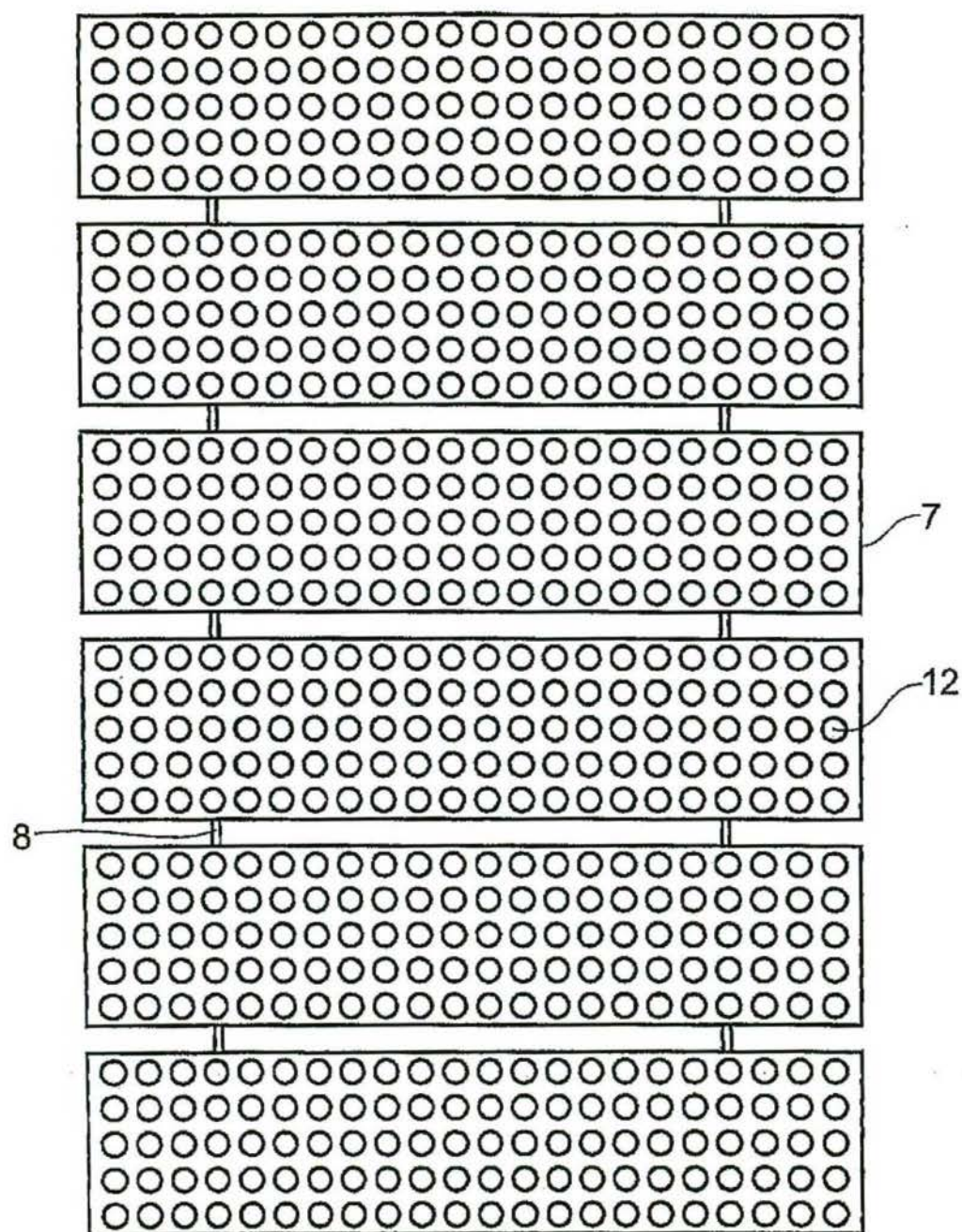


Fig. 3

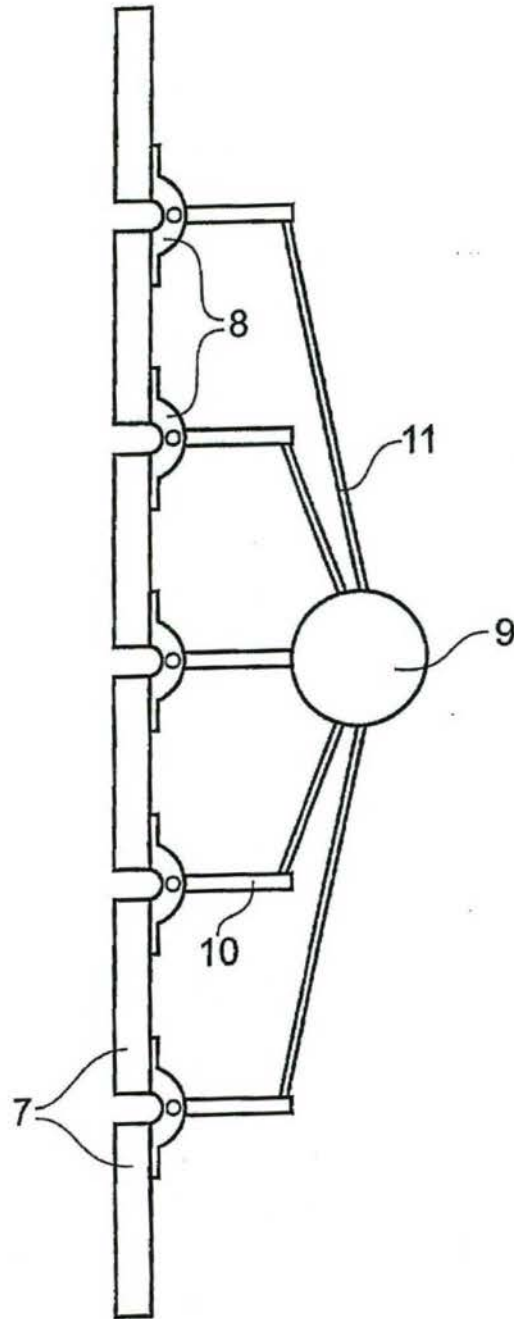


Fig. 4

4/9

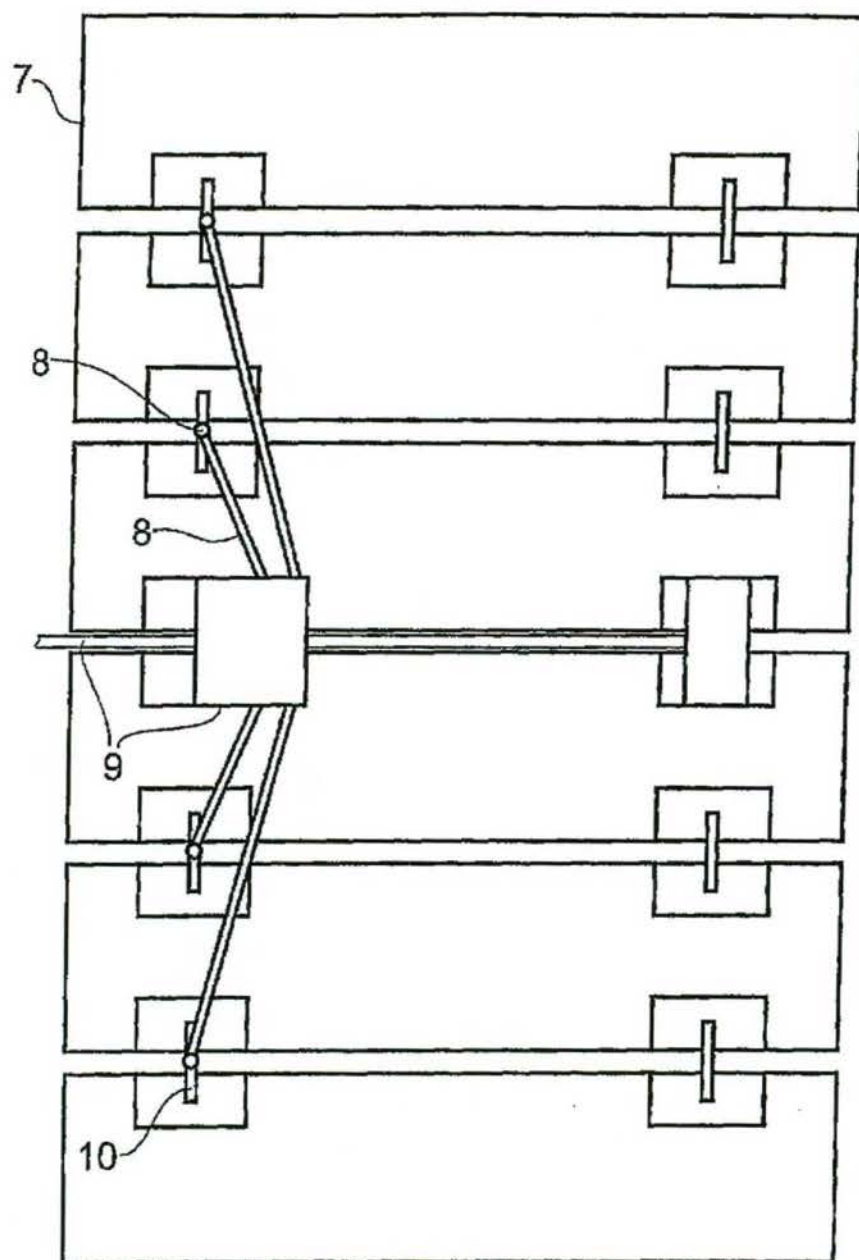


Fig. 5

5/9

Fig.6

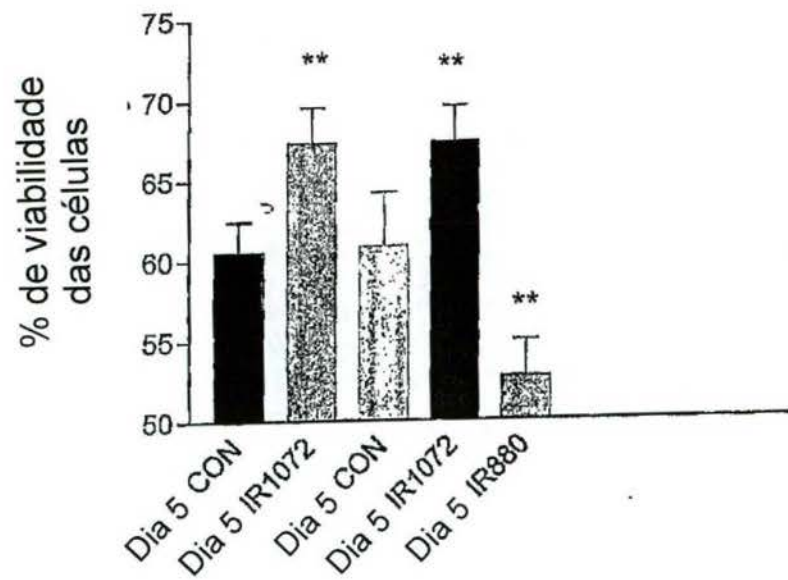
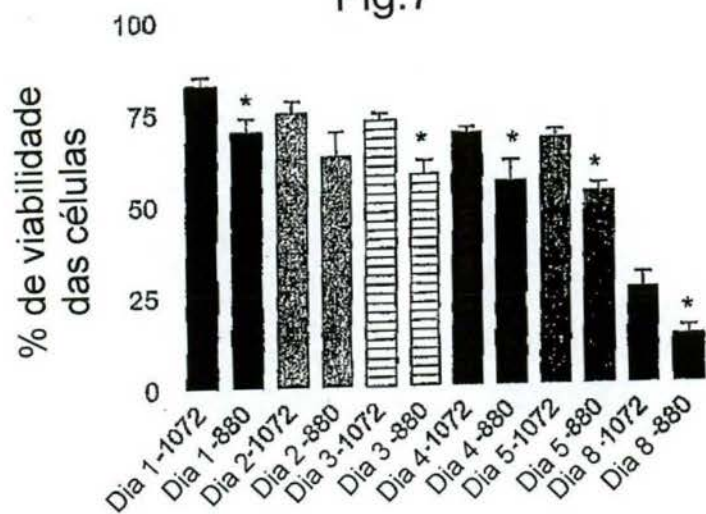


Fig.7



6/9

Fig.8

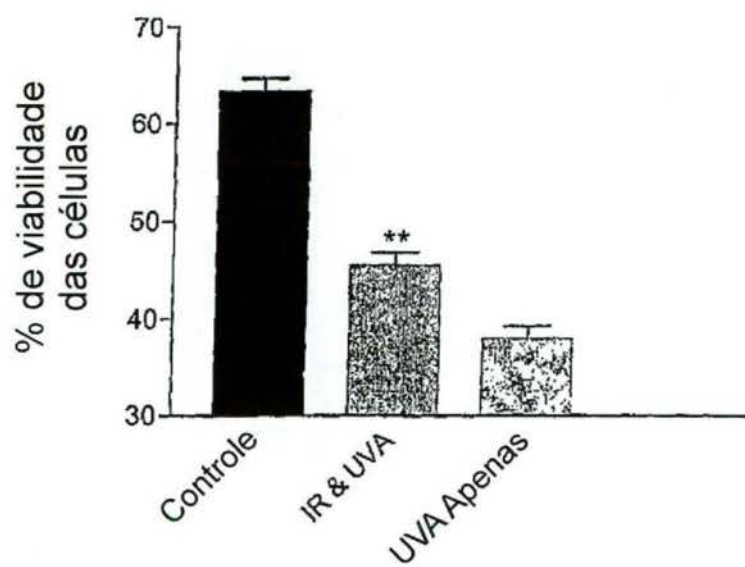
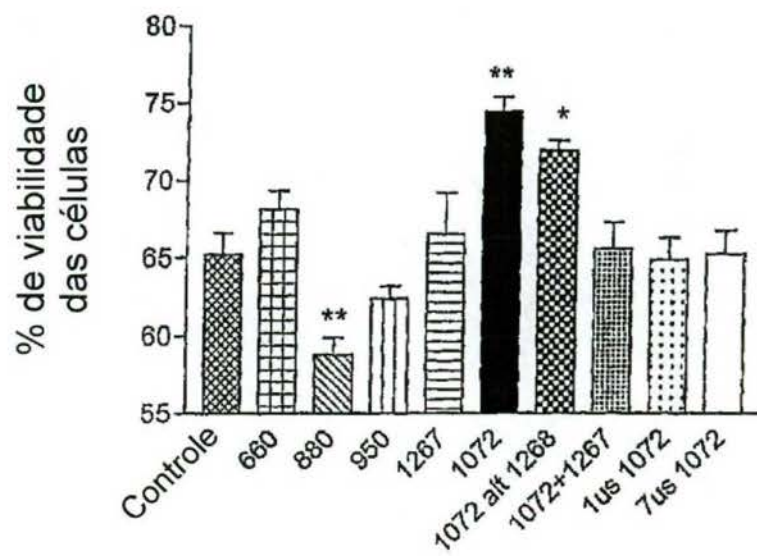


Fig.9



7/9

Fig.10

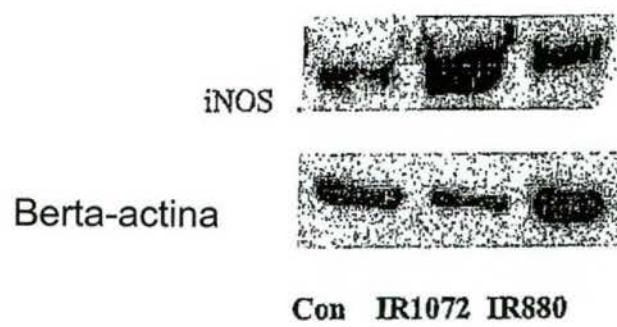


Fig.11A

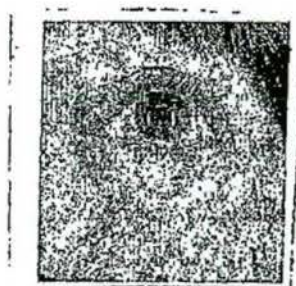


Fig.11B



Fig.11C

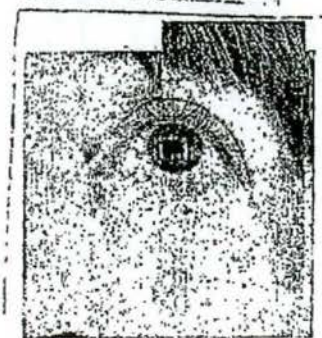
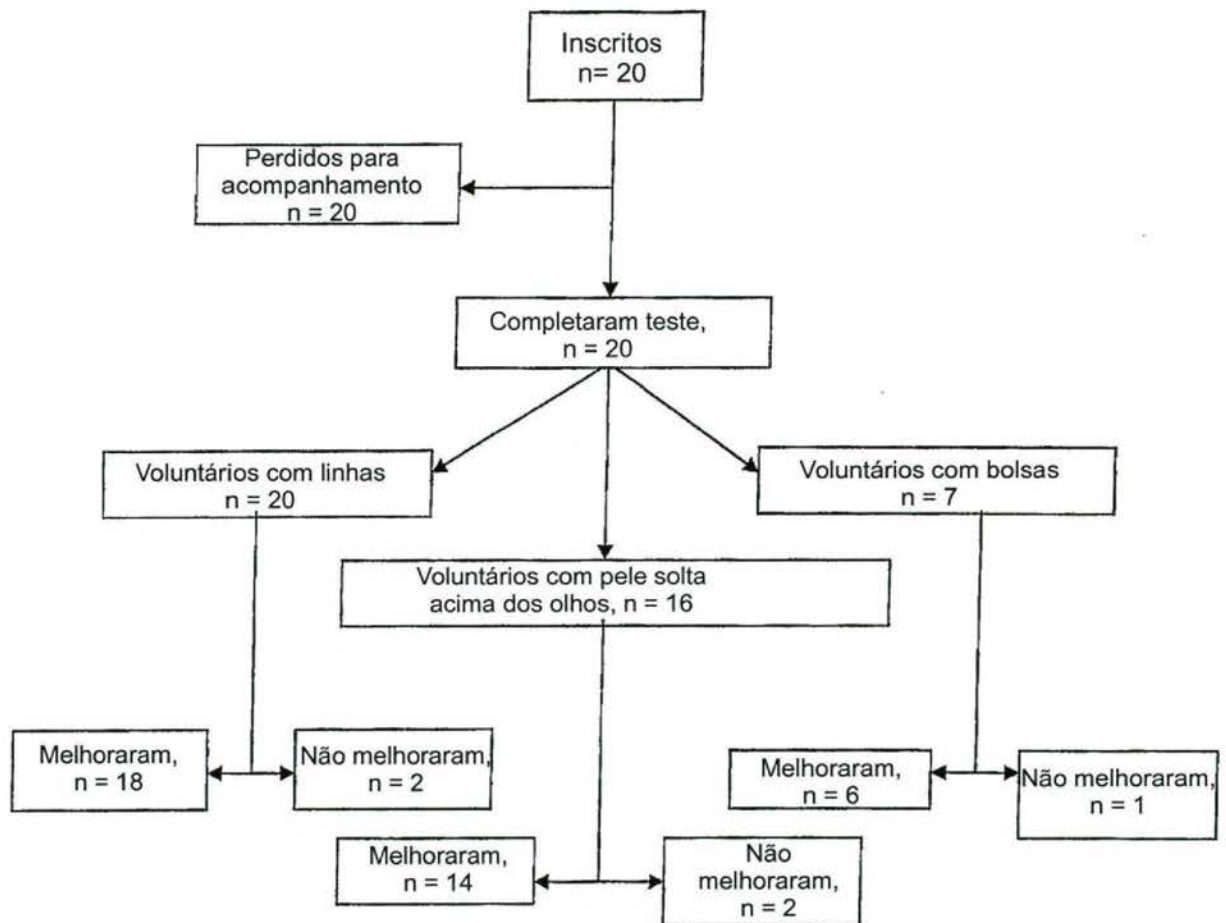


Fig.12



9/9

Fig.13A



Fig.13B



Fig.14A

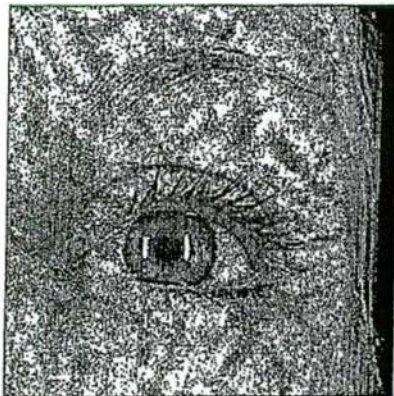


Fig.14B

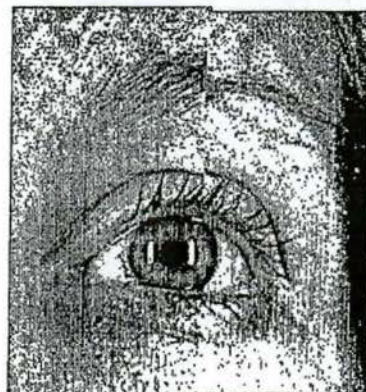
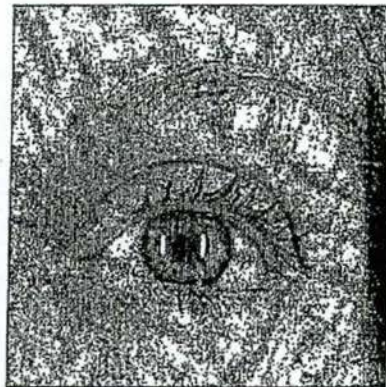


Fig.14C