



Memoria del Proyecto:

**Efectos de la aplicación cutánea de  
radiofrecuencia monopolar con el  
prototipo de radiofrecuencia (Exp.  
200703 I+D+i 0026.) en minipig**

*correspondiente a la empresa Study TDES, investigación  
tecnológica, S.L (Grupo Dercont)*

**Nombre comercial del prototipo**

**LipoSkin<sup>®</sup> /Thermospring<sup>®</sup> / Pielum<sup>®</sup> / Pielum TH<sup>®</sup>**



Hemos realizado el estudio bioquímico y morfológico de los efectos de la aplicación cutánea del prototipo de radiofrecuencia (Exp. 200703 I+D+i 0026) según el siguiente procedimiento experimental:

Los tres cerdos minipig utilizados en el experimento, procedentes del Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba, han sido mantenidos (con comida y bebida "ad libitum") y tratados durante todo el experimento en el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia (SAI, nº REGAES300305440012). Los animales utilizados para este estudio se han mantenido y utilizado siguiendo la guía establecida por la Unión Europea sobre la protección de los animales utilizados en experimentación (86/609/CEE).

Aplicamos 10 sesiones de 26 minutos con el citado equipo sobre un área cutánea de 15x15 cm. de la zona dorsal superior de la pata trasera de cada cerdo minipig una vez a la semana.

Se tomó la temperatura de cada uno de los animales y del electrodo del aparato con un termómetro RS Mini IR LASER (Raytek, Germany) inmediatamente antes y durante la sesión, a los 5, 10, 20 y 25 minutos (1 minuto antes de terminar la sesión) de comenzar la aplicación del equipo.

Asimismo, se realizó la extracción de sangre (5 ml.) del seno venoso oftálmico antes y a las 0, 2, 4, 48 y 72 horas de terminar la aplicación del equipo. Se determinaron los siguientes parámetros bioquímicos en suero:

- Función hepática: proteínas totales, albúmina, GOT y GPT.
- Metabolismo lipídico: colesterol, triglicéridos, HDL-colesterol, LDL-colesterol y lipasa.
- Enzimas: creatín-quinasa (CK).
- Marcadores de isquemia cardiaca: CK total, isoenzima MB de la CK y mioglobina.

Las determinaciones sanguíneas se realizaron en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia).

Por último, realizamos biopsias punch de 8 mm. de las zonas tratadas y controles antes de cada sesión e inmediatamente después y a la semana.

Todas las muestras cutáneas de las zonas traseras (tratadas y control) fueron medidas y, a continuación, fijadas en formol neutro tamponado al 10% al menos durante 24 horas. Posteriormente fueron procesadas por el método habitual de la Cátedra de Anatomía Patológica (Universidad de Murcia) para su inclusión en parafina. Realizamos secciones histológicas de 3  $\mu$ m. y las teñimos con las siguientes técnicas: hematoxilina-eosina (H.E.), tinción de van Gienson, tricrómico de Masson y tinción de Verhoeff.

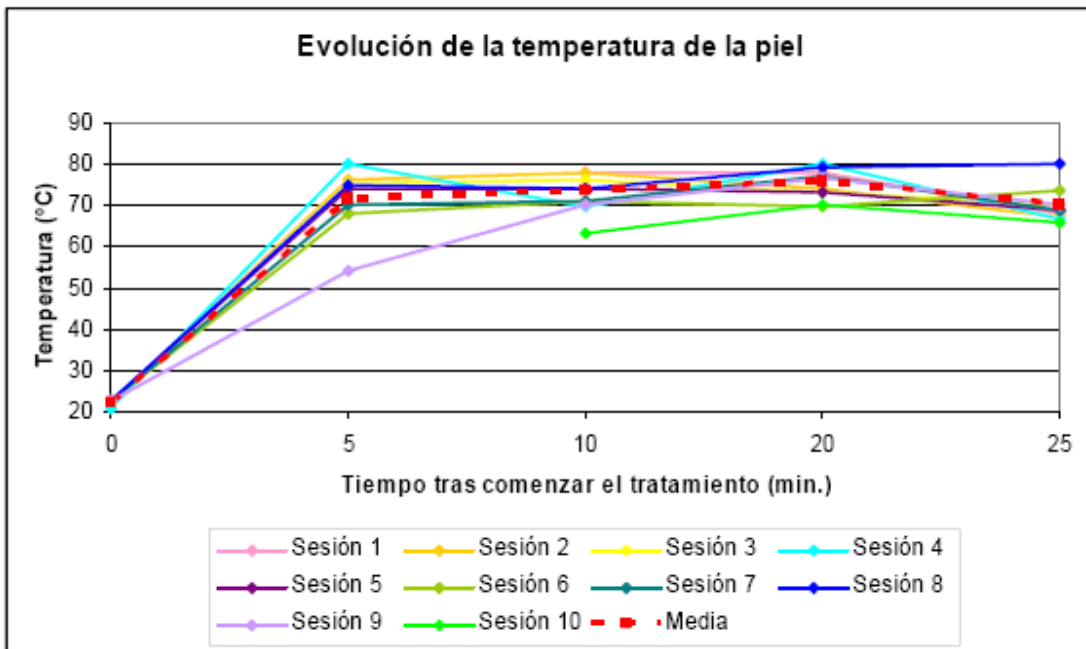
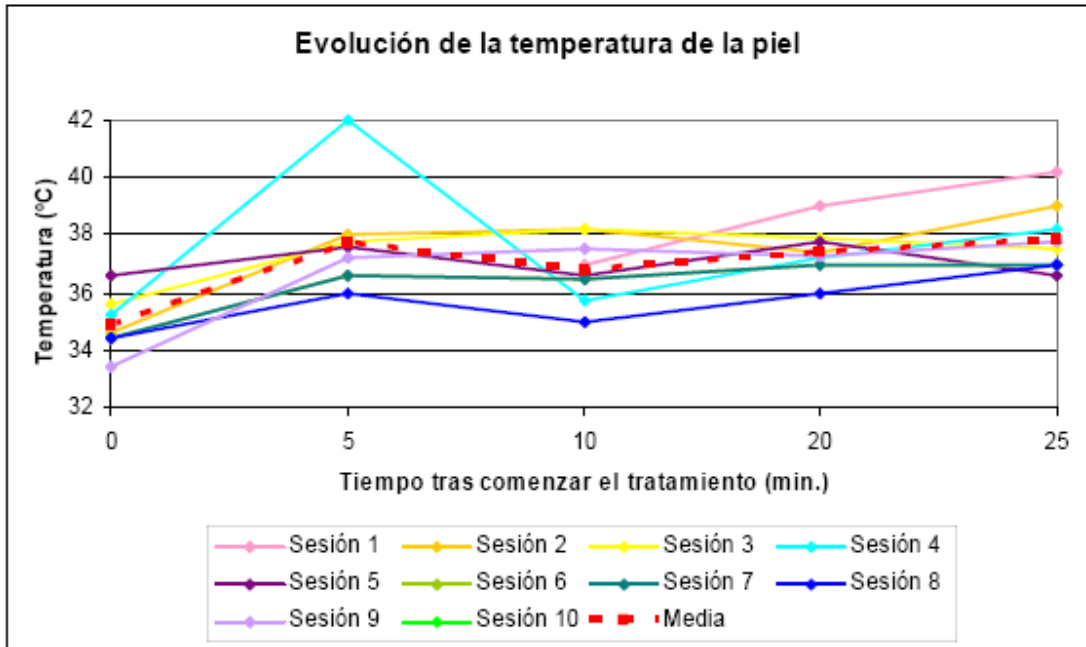
## **Resultados**

## TEMPERATURA

La temperatura cutánea del animal medida inmediatamente antes de la sesión osciló entre 33,4 y 36,6°C, con un valor medio de 34,8°C. La aplicación del equipo provocó una subida de la temperatura, que llegó hasta 42°C (Tabla 1, Figura 1).

		0	5	10	20	25
<b>1ª sesión</b>	T. animal	34,9	--	37	39	40,2
	T. electrodo	22	--	78	78	68
<b>2ª sesión</b>	T. animal	34,6	38	38,2	37,4	39
	T. electrodo	22	76	78	74	67
<b>3ª sesión</b>	T. animal	35,6	37,8	38,2	37,9	37,5
	T. electrodo	22	75,3	76	73	70
<b>4ª sesión</b>	T. animal	35,2	42	35,7	37,2	38,2
	T. electrodo	21	80	69,8	79,9	66,8
<b>5ª sesión</b>	T. animal	36,6	37,6	36,6	37,8	36,6
	T. electrodo	22,6	73,8	74	73	69
<b>6ª sesión</b>	T. animal	34,4	36,6	36,5	37	37
	T. electrodo	22,6	68	71	69,8	73,4
<b>7ª sesión</b>	T. animal	34,4	36,6	36,5	37	37
	T. electrodo	22,6	70	71	77,2	68,8
<b>8ª sesión</b>	T. animal	34,4	36	35	36	37
	T. electrodo	22,6	75	74	79	80
<b>9ª sesión</b>	T. animal	33,4	37,2	37,5	37,3	37,8
	T. electrodo	22,6	54	70	76,6	70
<b>10ª sesión</b>	T. animal					
	T. electrodo			63	70	66

**Tabla 1.** Medida de la temperatura cutánea del animal y de la temperatura del electrodo inmediatamente antes y durante la sesión (5, 10, 20 y 25 minutos de comenzar la aplicación del aparato).



**Figura 1.** Evolución de la temperatura cutánea y del electrodo a lo largo de cada sesión y valor medio.

## ESTUDIO BIOQUÍMICO

Los resultados obtenidos han demostrado que no existen alteraciones respecto a los parámetros sobre la función hepática (proteínas totales, albúmina, GOT y GPT) y la fracción lipídica (colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicéridos y lipasa) (Tabla 2, Figuras 2 y 3). Los valores están dentro de los intervalos normales de referencia dados por el laboratorio (Tabla 3) y no han sufrido modificaciones cuando comparamos los resultados obtenidos antes y después de la aplicación del equipo.

	Pretratamiento	Postratamiento					
		0h	4h	24h	48h	120h	144h
<b>Proteínas totales (g/dl)</b>	7,3	6,4	7,9	7,4	6,8	6,7	6,9
<b>Albúmina (g/dl)</b>	4,6	4,1	4,4	4,6	4,2	4,3	4,4
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	124	106	142	125	120	108	92
<b>HDL-colesterol (mg/dl)</b>	58	51	55	59	58	55	52
<b>LDL-colesterol (mg/dl)</b>	56	50	65	57	50	43	32
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	48	25	111	44	58	48	38
<b>GOT (U/l)</b>	*	27	*	*	*	*	22
<b>GPT (U/l)</b>	*	22	*	*	*	24	23
<b>CK total (U/l)</b>	1.097	897	2.921	3.800	3.222	196	201
<b>CKMb (ng/ml)</b>	0,7	0,9	0,5	0,7	0,7	0,8	0,9
<b>Mioglobina (ng/ml)</b>	21	21	21	22	21	21	21
<b>Lipasa (U/l)</b>	18	9	30	16	16	12	8

**Tabla 2.** Medida de los parámetros bioquímicos evaluados. \*: muestra hemolizada; la hemólisis interfiere con la realización del test.

Sin embargo, cuando estudiamos la CK total y la mioglobina (ambas proteínas musculares), encontramos que existe un aumento de las mismas después del tratamiento en comparación con los niveles obtenidos antes del tratamiento (Tabla 2, Figura 4). Además, al hacer determinaciones seriadas después de la administración del tratamiento, observamos que los niveles encontrados siguen

la cinética descrita para estas proteínas (Tabla 4). También medimos la isoenzima MB de la CK que no sufrió ninguna alteración por lo que el aumento de CK total se debe, fundamentalmente, a la isoenzima MM de la CK.

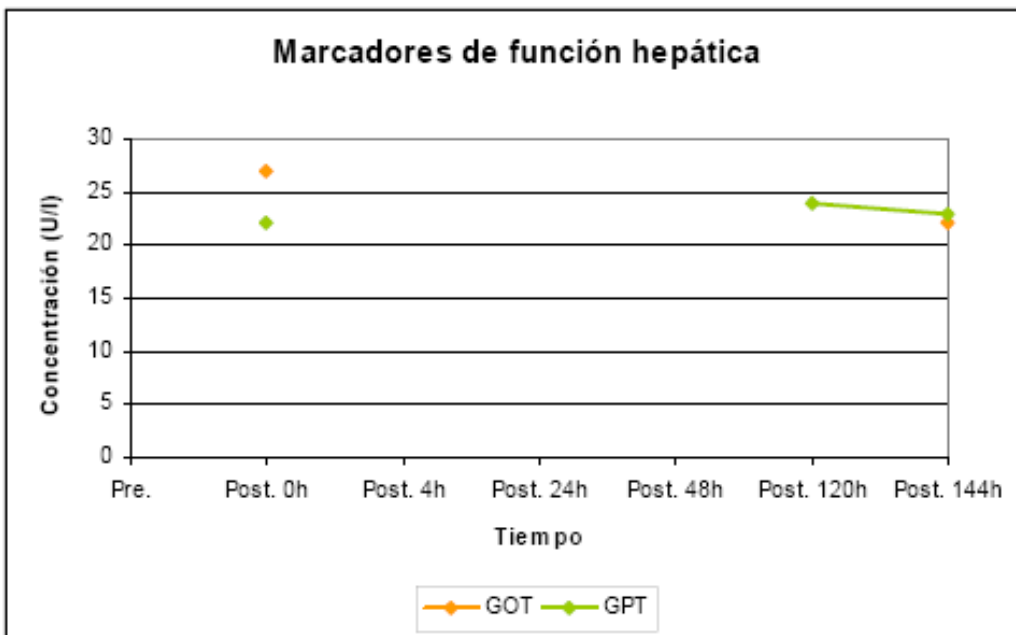
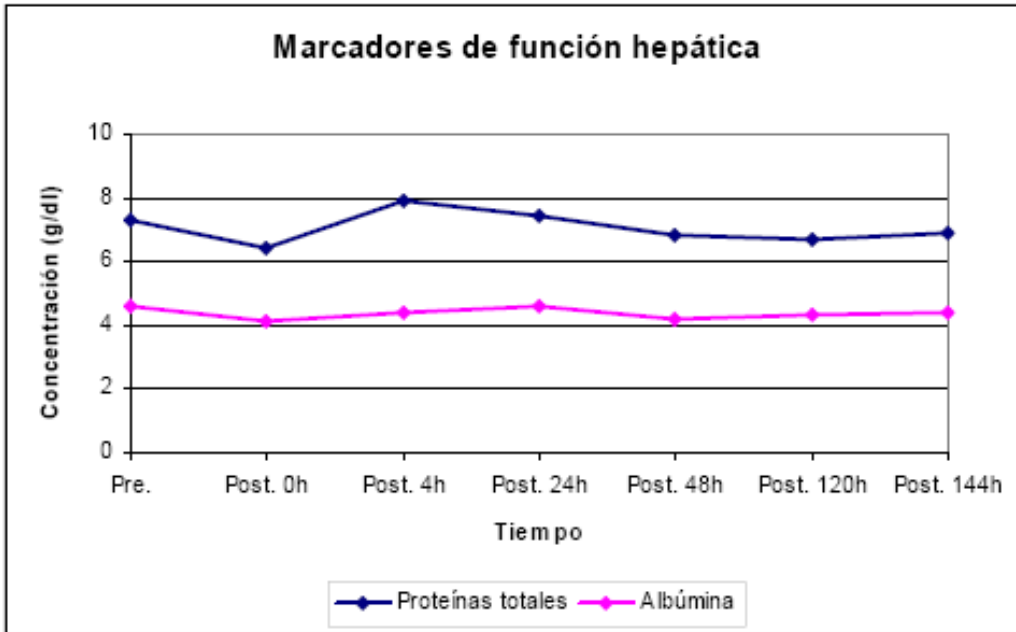
	<b>Cerdo</b>	<b>Humano</b>
<b>Proteínas totales (g/dl)</b>	6-8	6,4-8,3
<b>Albúmina (g/dl)</b>	1,8-3,3	3,4-4,8
<b>Colesterol (mg/dl)</b>		50-230
<b>HDL-colesterol (mg/dl)</b>		40-60
<b>LDL-colesterol (mg/dl)</b>		50-200
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>		50-200
<b>GOT (U/l)</b>	16-65	5-37
<b>GPT (U/l)</b>		5-41
<b>CK total (U/l)</b>	50-3531	38-174
<b>CKMb (ng/ml)</b>		0-6,73
<b>Mioglobina (ng/ml)</b>		28-72
<b>Lipasa (U/l)</b>		13-60

**Tabla 3.** Valores de referencia de los parámetros estudiados para el cerdo y humanos.

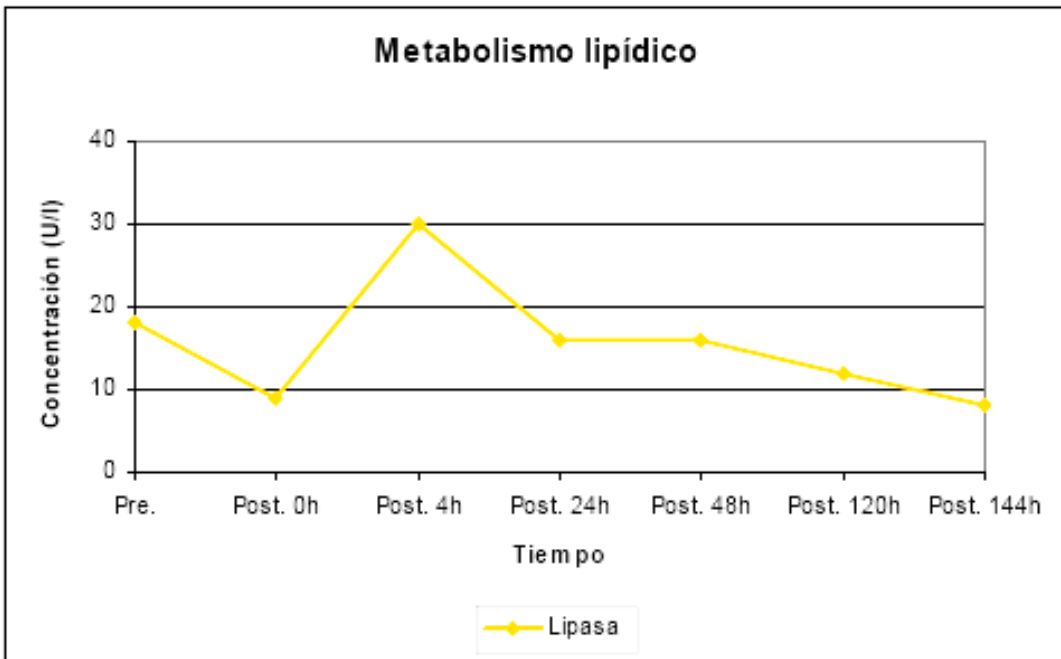
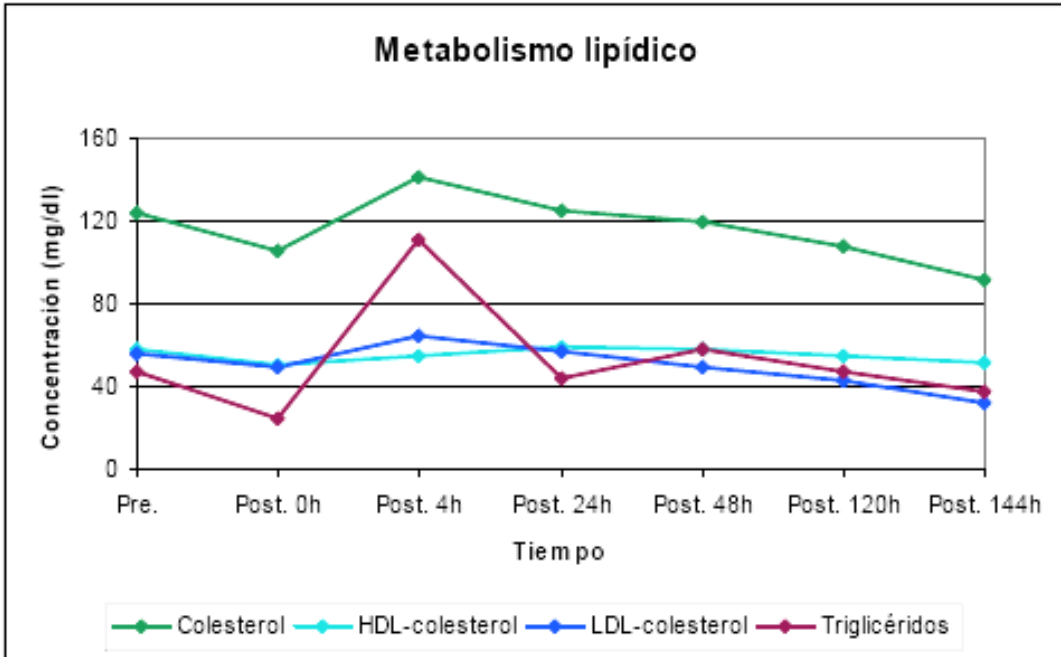
<b>CK</b>	<b>Mioglobina</b>
Aumento a las 4-6 h	Aumento a las 2-4 h
Pico máximo a las 24h	Pico máximo a las 6-8h
Descenso a las 48-72h	Descenso a las 24h

**Tabla 4.** Cinética descrita para las proteínas CK y mioglobina.

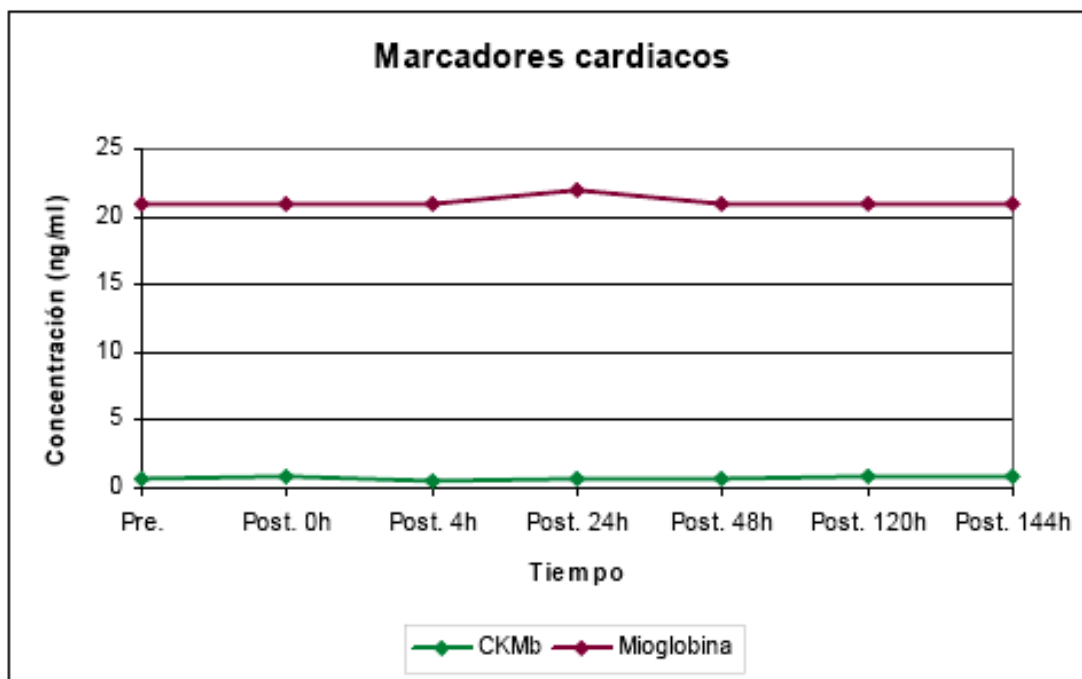
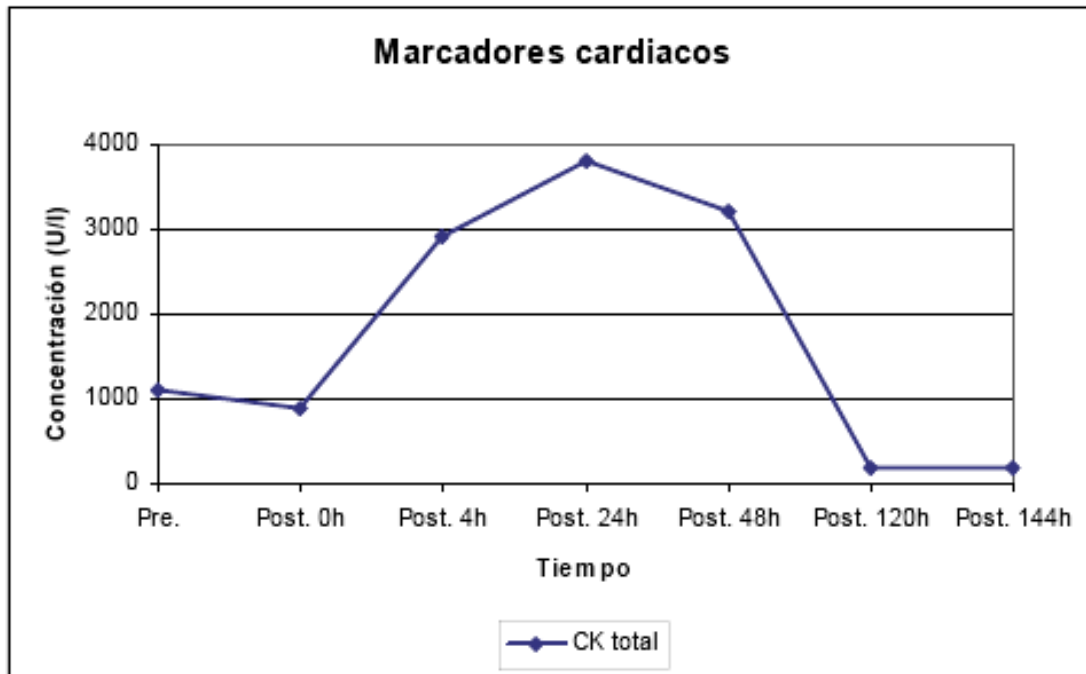




**Figura 2.** Evolución de los marcadores bioquímicos de la función hepática.



**Figura 3.** Evolución de los marcadores bioquímicos del metabolismo lipídico.



**Figura 4.** Evolución de los marcadores cardiacos.

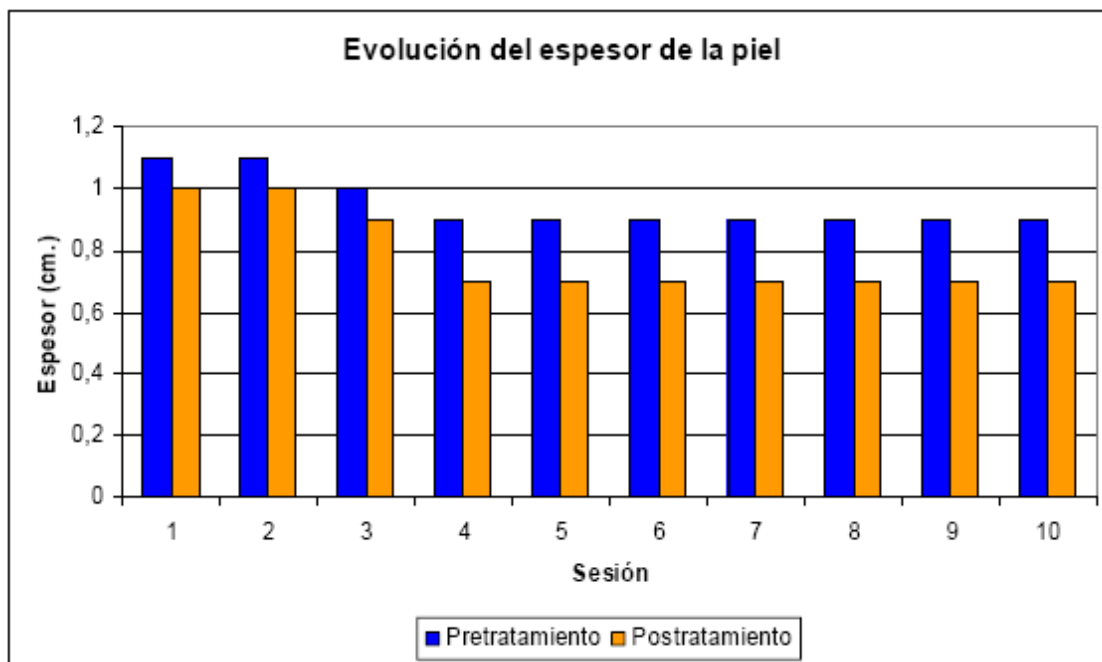
## ESTUDIO MORFOLÓGICO

**Macroscópico.** La aplicación del equipo no provocó daños ni quemaduras. En muy pocas ocasiones provocó un eritema leve que desaparecía en 15-30 minutos.

Al medir las muestras cutáneas desde la epidermis hasta el músculo prefascial, observamos una disminución progresiva a lo largo del estudio cada dos sesiones (Tabla 5, Figura 5).

	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
<b>Pretratamiento</b>	1,1	1,1	1	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
<b>Postratamiento</b>	1	1	0,9	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7

**Tabla 5.** Medida del espesor de la piel inmediatamente antes y después de cada sesión.



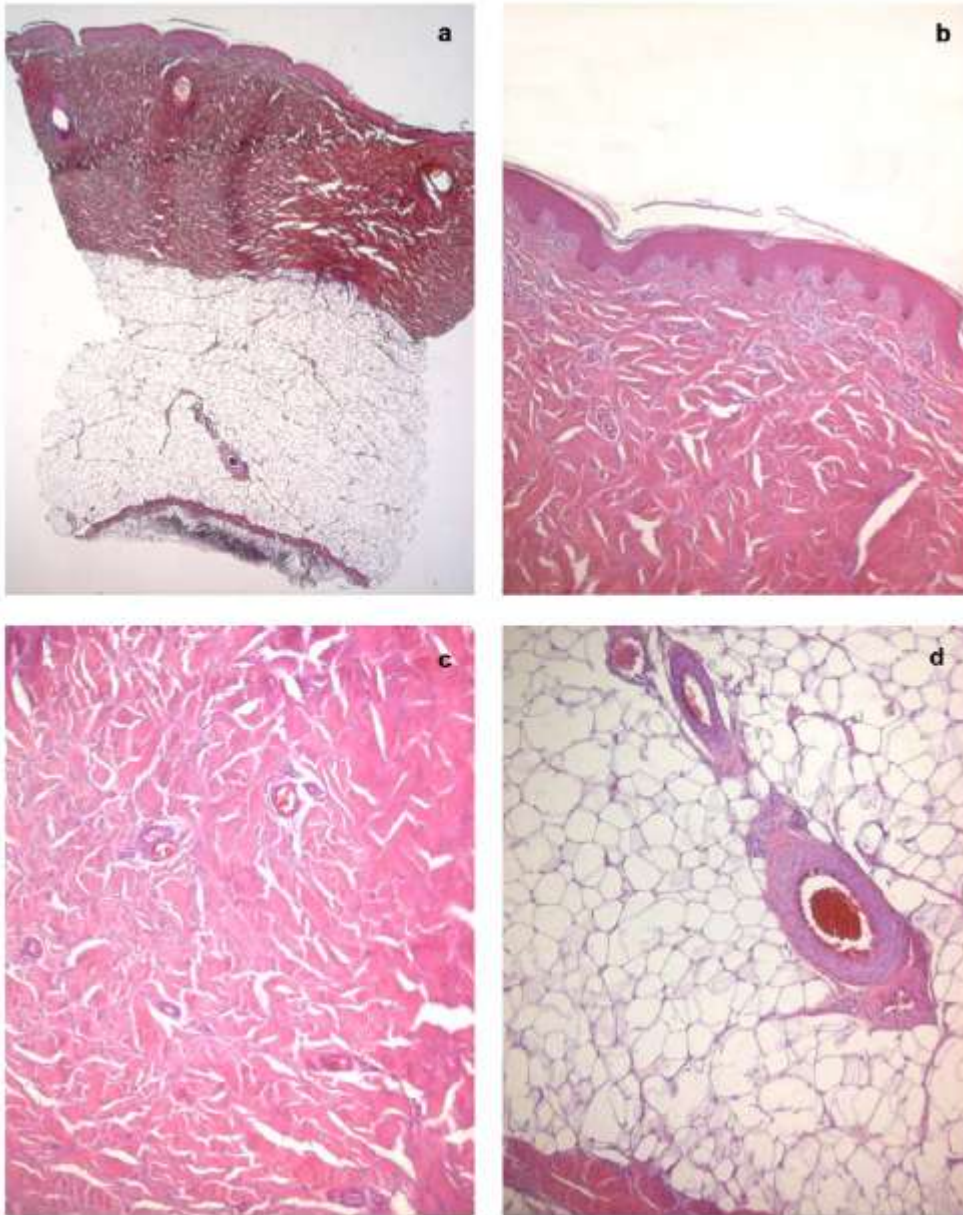
**Figura 5.** Evolución del espesor cutáneo a lo largo del experimento.

**Microscópico.** Las características más relevantes observadas al microscopio óptico correspondieron a la ausencia de cambios patológicos tisulares y celulares. No observamos respuesta inflamatoria aguda ni crónica a lo largo de todo el experimento.

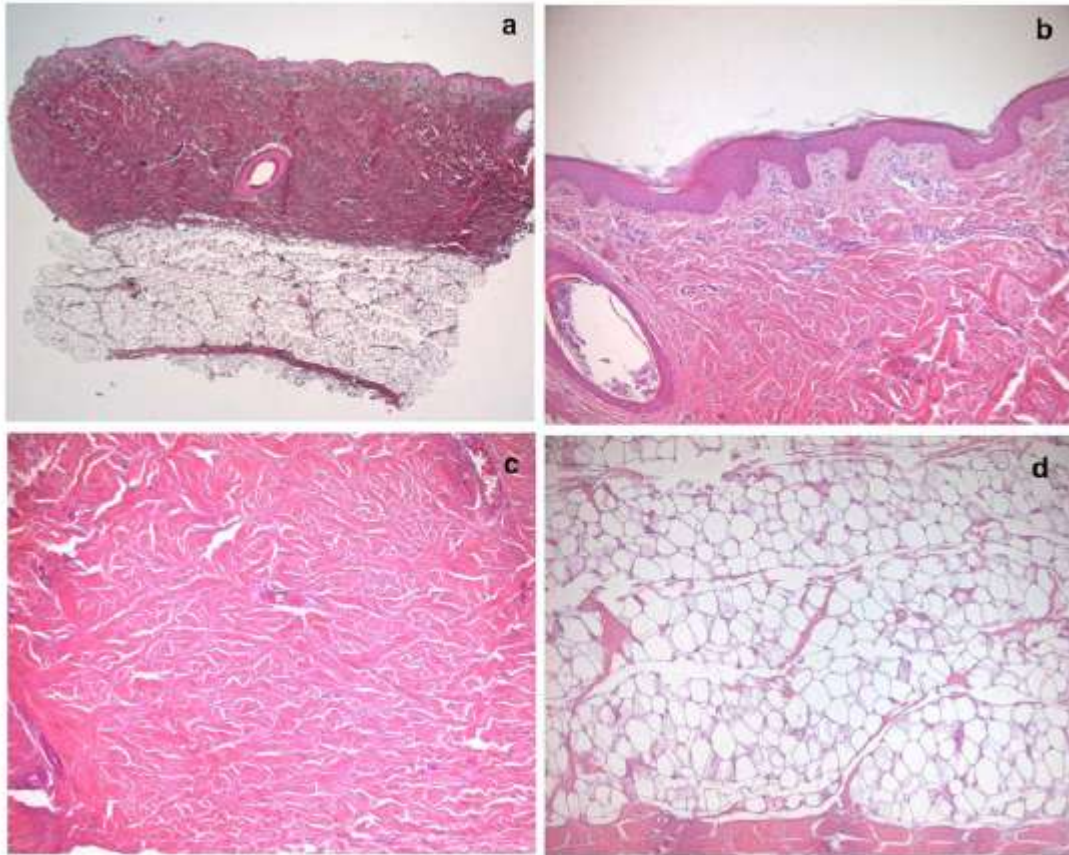
Las características estructurales y celulares de la piel del cerdo no sometida a la aplicación del equipo son totalmente superponibles a las de la piel humana, diferenciándose en pequeños aspectos, como el menor espesor de la dermis papilar y, fundamentalmente, el aspecto más compacto de la dermis reticular. Esta se encuentra constituida por densos haces de fibras colágenas y elásticas firmemente organizadas en diversas direcciones (longitudinal, transversal y oblicua) que le confieren un aspecto reticular compacto (Figura 6). El tejido celular subcutáneo, como en la piel humana, se dispone en lóbulos separados por finos tabiques conjuntivo-vasculares y muestra pequeñas proyecciones hacia la dermis reticular. Por debajo del mismo se sitúa el músculo suprafascial, que hemos considerado como referencia para las medidas del espesor.

La reducción del espesor cutáneo descrito en las zonas sometidas a la aplicación del equipo ensayado era debida a una ligera reducción de la dermis reticular y, fundamentalmente, a la disminución del tejido adiposo subyacente (Figura 7).

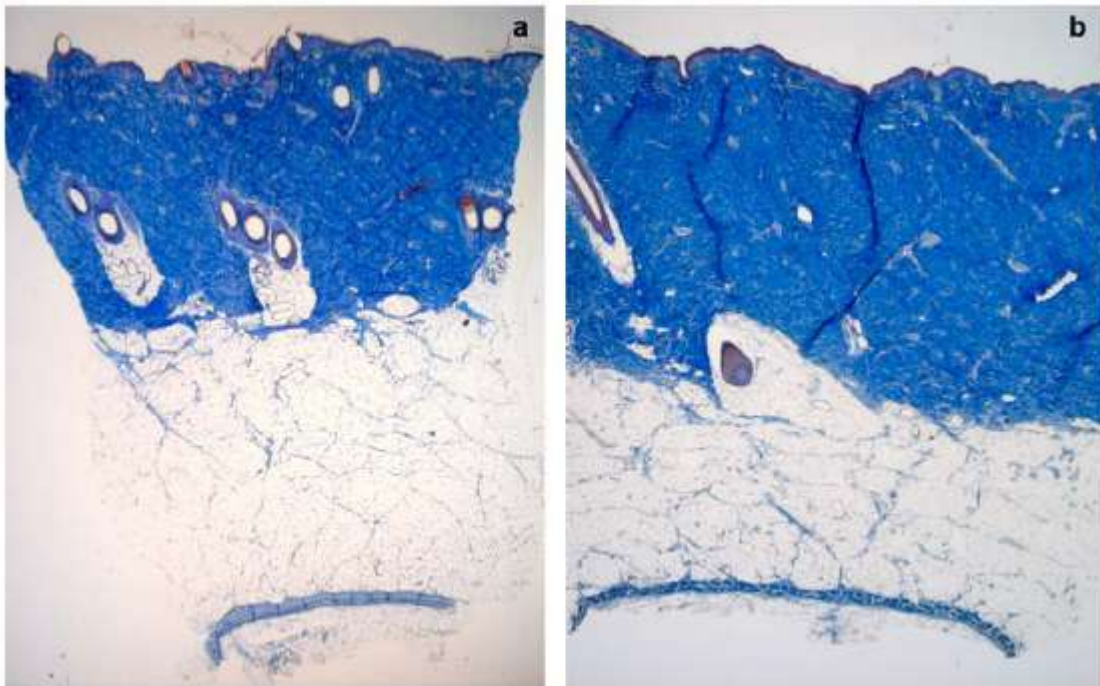
La reducción de la dermis reticular es debida a la contracción de los fascículos fibrilares, como se observa más detalladamente con las tinciones especiales utilizadas (Figuras 8 y 9), mientras que, la del tejido adiposo se debe a la reducción del volumen de los adipocitos. No hemos observado en las múltiples secciones histológicas observadas destrucción o fragmentación de los adipocitos ni la presencia de respuesta inflamatoria a cuerpo extraño.



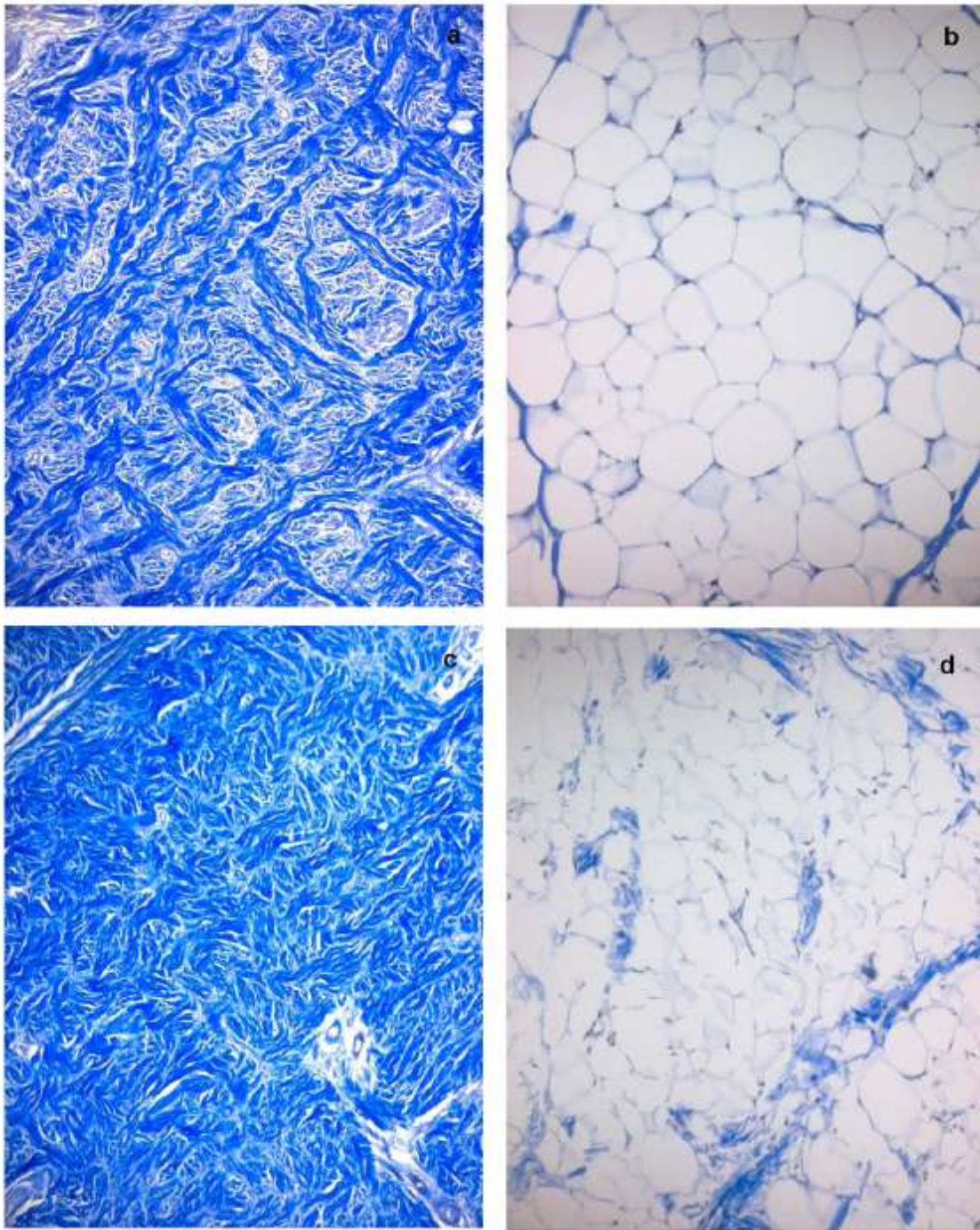
**Figura 6.** Piel control. a) Aspecto de la piel control (H.E., 16x). b) Epidermis y dermis papilar (H.E., 100x). c) Dermis reticular (H.E., 100x). d) Tejido adiposo subcutáneo (H.E., 100x).



**Figura 7.** Piel tratada. a) Aspecto de la piel tratada; reducción del espesor de la dermis reticular y del tejido adiposo subcutáneo (H.E., 16x). b) Epidermis y dermis papilar (H.E., 100x). c) Dermis reticular (H.E., 100x). d) Tejido adiposo subcutáneo (H.E., 100x).



**Figura 8.** Tricrómico de Masson. a) Aspecto de la piel control (16x). r. b) Aspecto de la piel tratada; reducción del espesor de la dermis reticular y del tejido adiposo subcutáneo (16x).



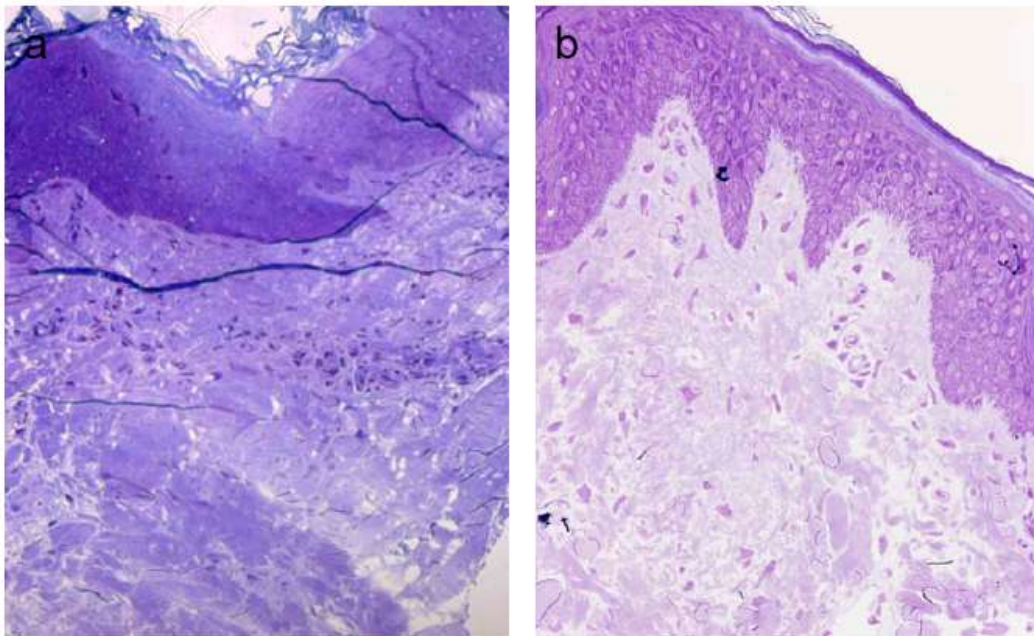
**Figura 9.** Tricrómico de Masson. a) Dermis reticular de la piel control (100x). b) Tejido adiposo subcutáneo de la piel control (200x). c) Dermis reticular de la piel tratada; contracción de las fibras de colágeno (100x). d) Tejido adiposo subcutáneo de la piel tratada; disminución del volumen de los adipocitos (200x).



## Estudio ultraestructural

Las secciones semifinas demuestran la **preservación arquitectural en todas las muestras cutáneas** de los dos grupos estudiados (controles y tratados), tanto de la epidermis como la dermis (Fig. 1) y el tejido celular subcutáneo (Fig. 2). Asimismo, no observamos modificaciones patológicas relevantes tisulares ni celulares.

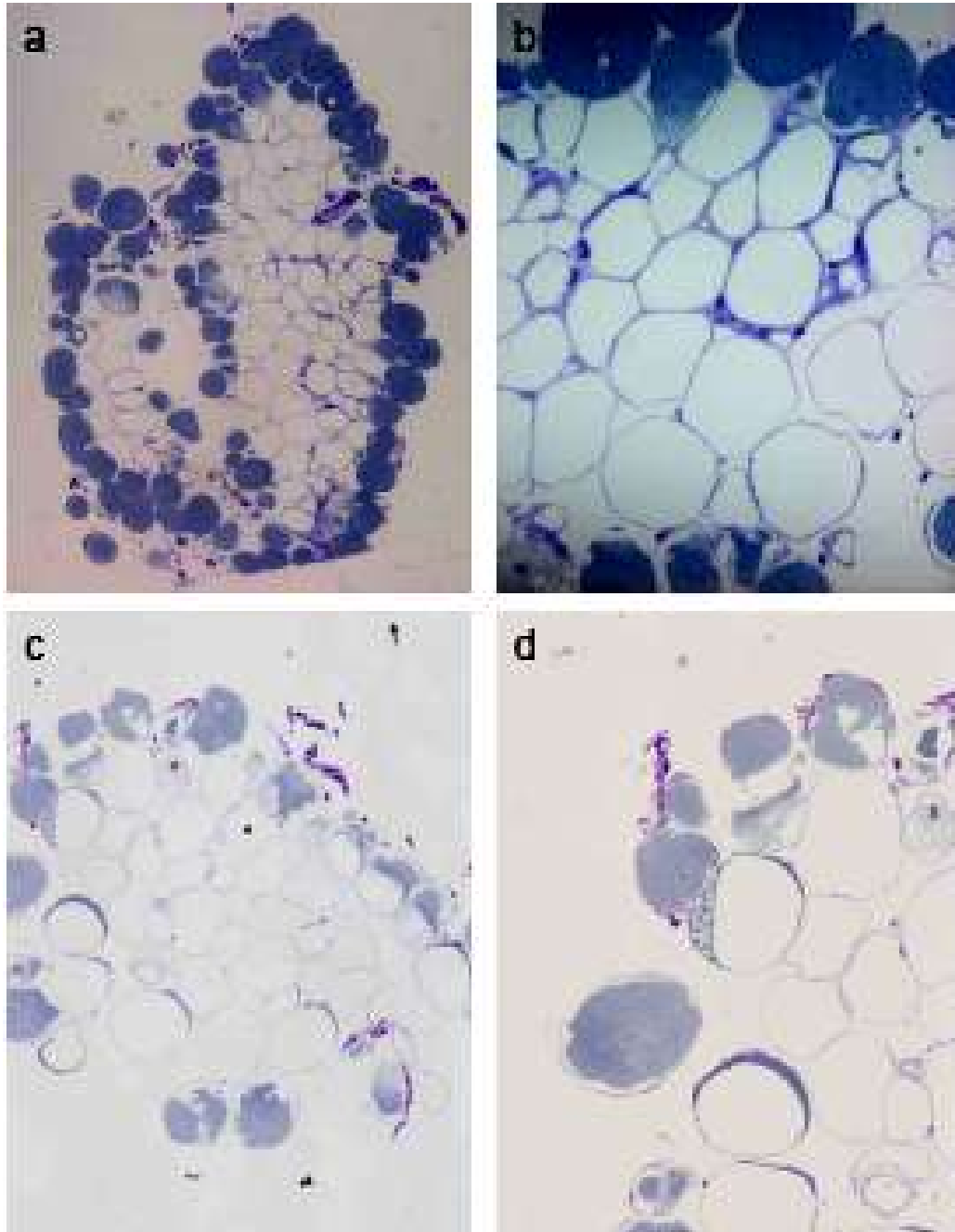
El estrato córneo de las muestras tratadas y controles estaba constituido por 8-10 láminas córneas sin alteraciones. La epidermis no presentaba variaciones patentes en las zonas tratadas respecto a las controles (Fig. 1).



**Figura 1.** Secciones semifinas de epidermis y dermis de muestras controles (a) y tratadas (b) (azul de toluidina, 200x).

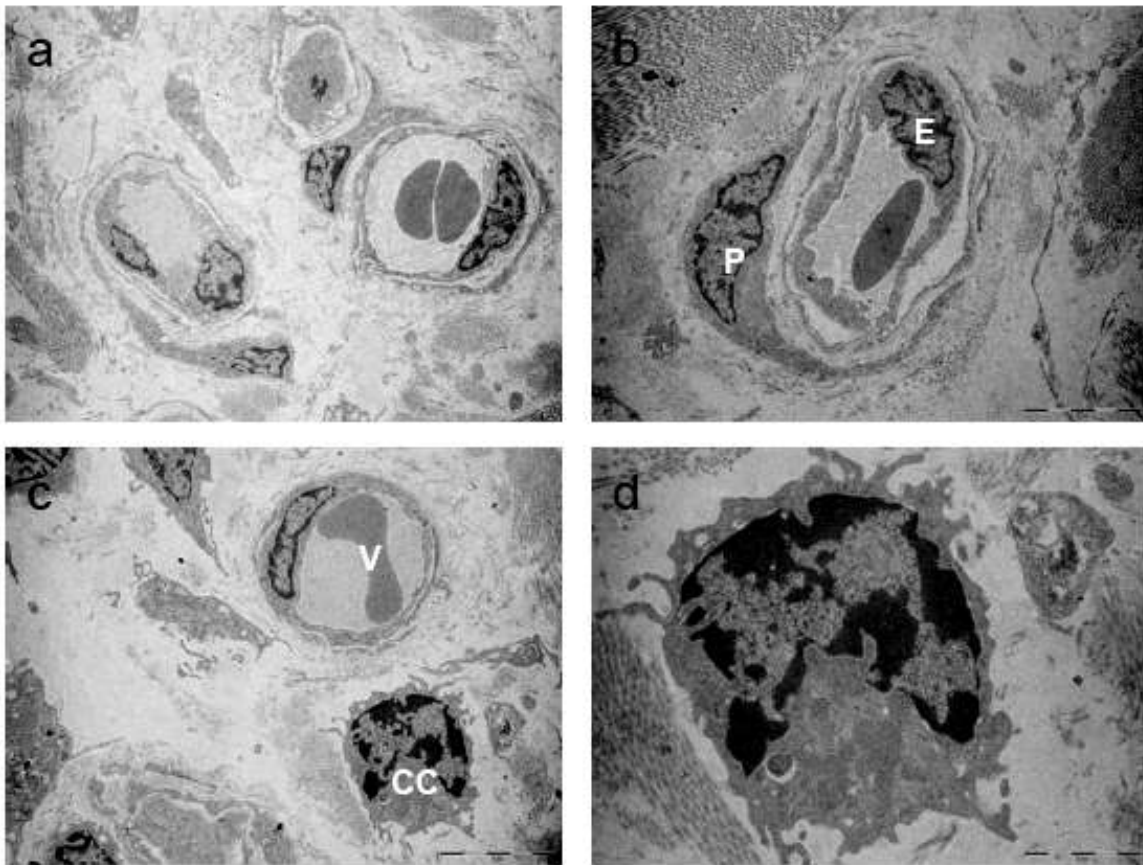
**En cuanto al tejido adiposo**, también destacaba la preservación de la arquitectura tanto en los controles como en los tratados (Fig. 2), correspondiendo las diferencias más relevantes entre ambos grupos al contenido y al tamaño de los adipocitos. **En los controles** se mantenía el contenido celular preferentemente en las células de la periferia de los grupos de adipocitos y ocupaba de manera homogénea todo el citoplasma (**Fig. 2a y b**), mientras que en las **muestras tratadas** tanto la disposición como la homogeneidad del contenido celular eran irregulares (**Fig. 2c y d**).

En cuanto al tamaño celular, mientras que en **los controles** era bastante uniforme, en las zonas tratadas existía una gran variabilidad, predominando los de pequeño tamaño, así como la observación de adipocitos multivacuolados.



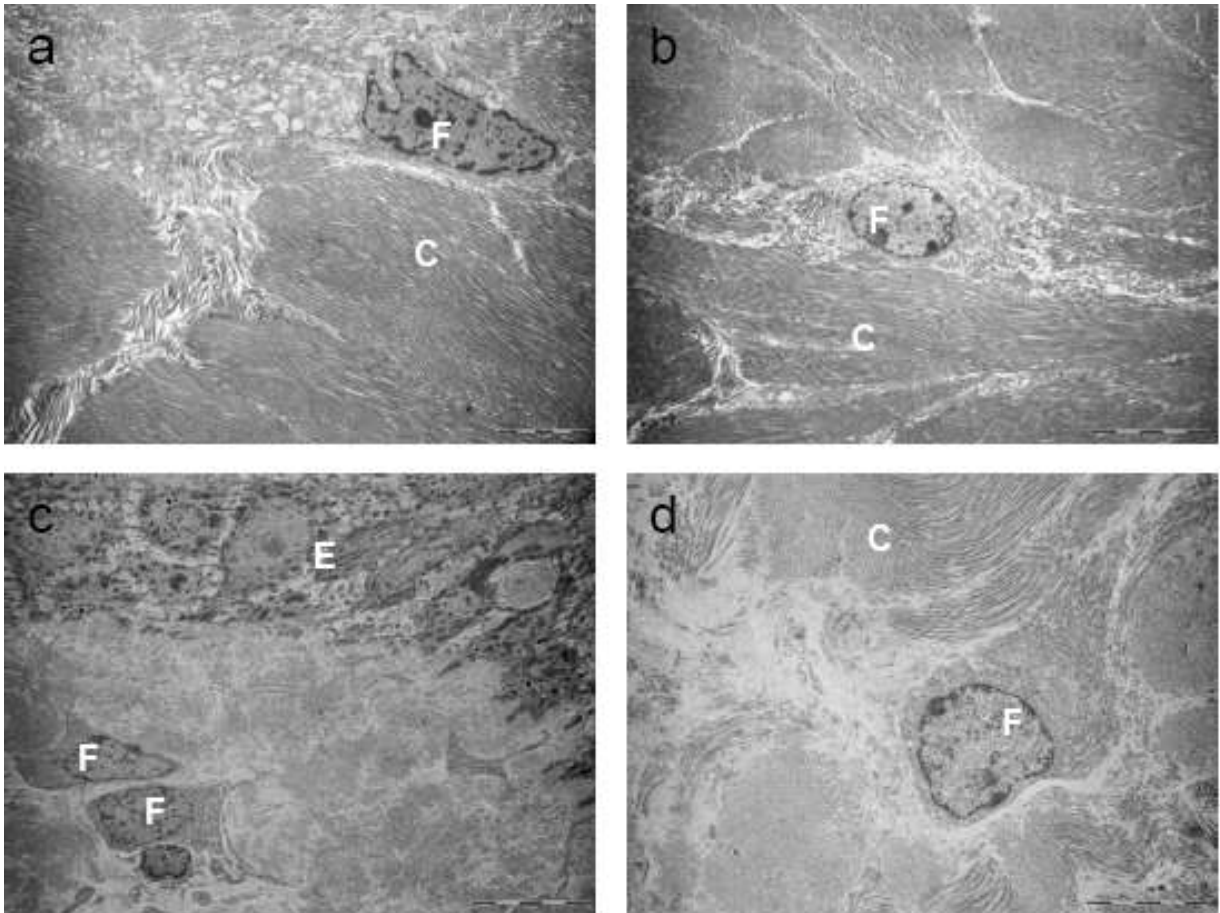
**Figura 2.** Secciones semifinas de tejido adiposo subcutáneo de muestras control (a y b) y tratada (c y d) (azul de toluidina, a y c: 100x; b y d: 200x).

En el estudio de las secciones ultrafinas destacaba también la conservación del patrón arquitectural de los distintos componentes cutáneos en ambos grupos de muestras estudiadas. En las **muestras correspondientes a las zonas tratadas**, destacaba la observación frecuente de vasos capilares en grupos de 3 a 5 situados en la dermis papilar, con varias células cebadas en su proximidad (**Fig. 3**).



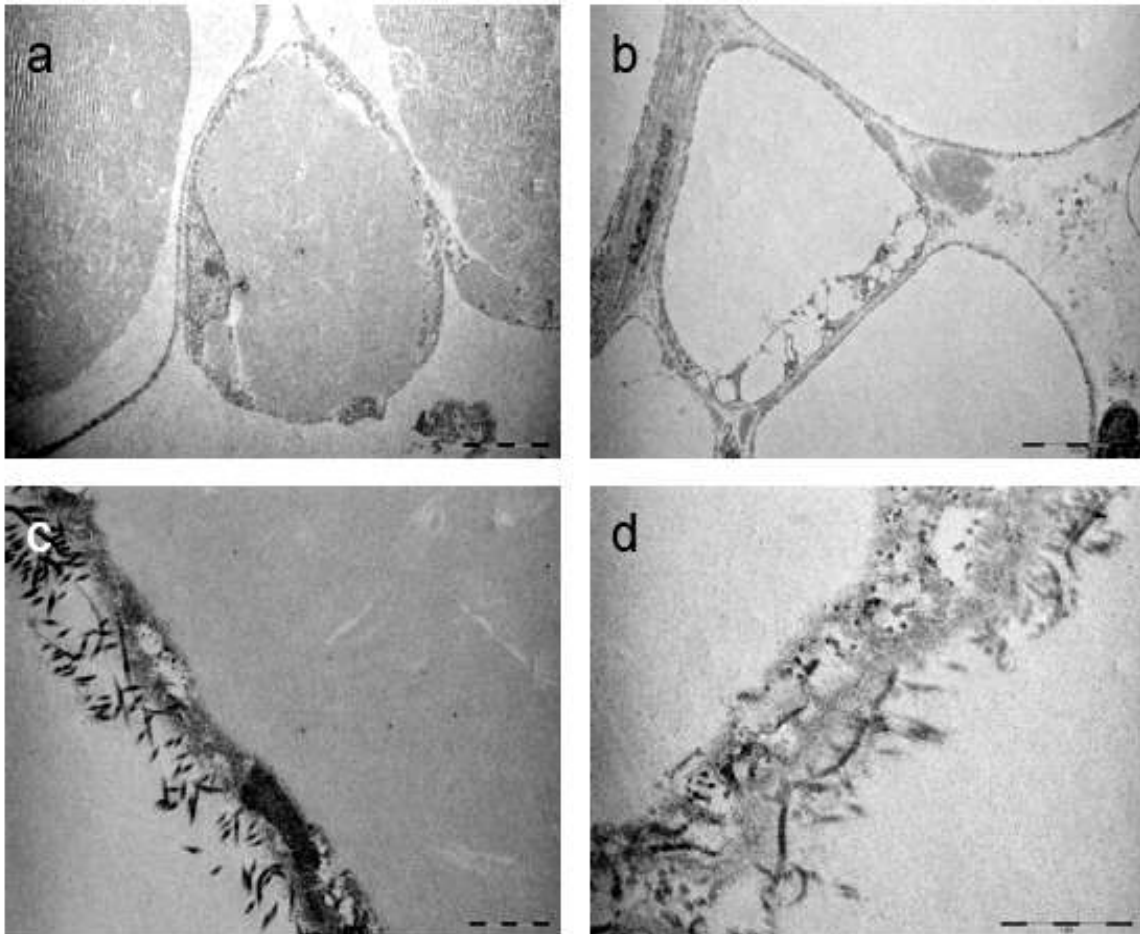
**Figura 3.** Vasos en la dermis papilar de piel tratada. a) Grupo de 3 vasos (MET, 2850x); b) Vaso; E: célula endotelial; P: pericito (MET, 3900x); c) Vaso (V) y célula cebada (CC) (MET, 3900x); d) Detalle de la célula cebada (MET, 9700x).

También sobresalía la **presencia de fibroblastos activos, de morfología poligonal**, con abundantes cisternas de retículo endoplasmático rugoso y ribosomas; los fibroblastos se encontraban inmersos en abundante sustancia intercelular de aspecto laxo (Fig. 4c y d). **Los fibroblastos de las muestras control, en contraste, presentaban morfología fusiforme y escaso citoplasma**, y se localizaban en íntimo contacto con los paquetes de fibras colágenas (Fig. 4a y b), orientados en diversas direcciones.

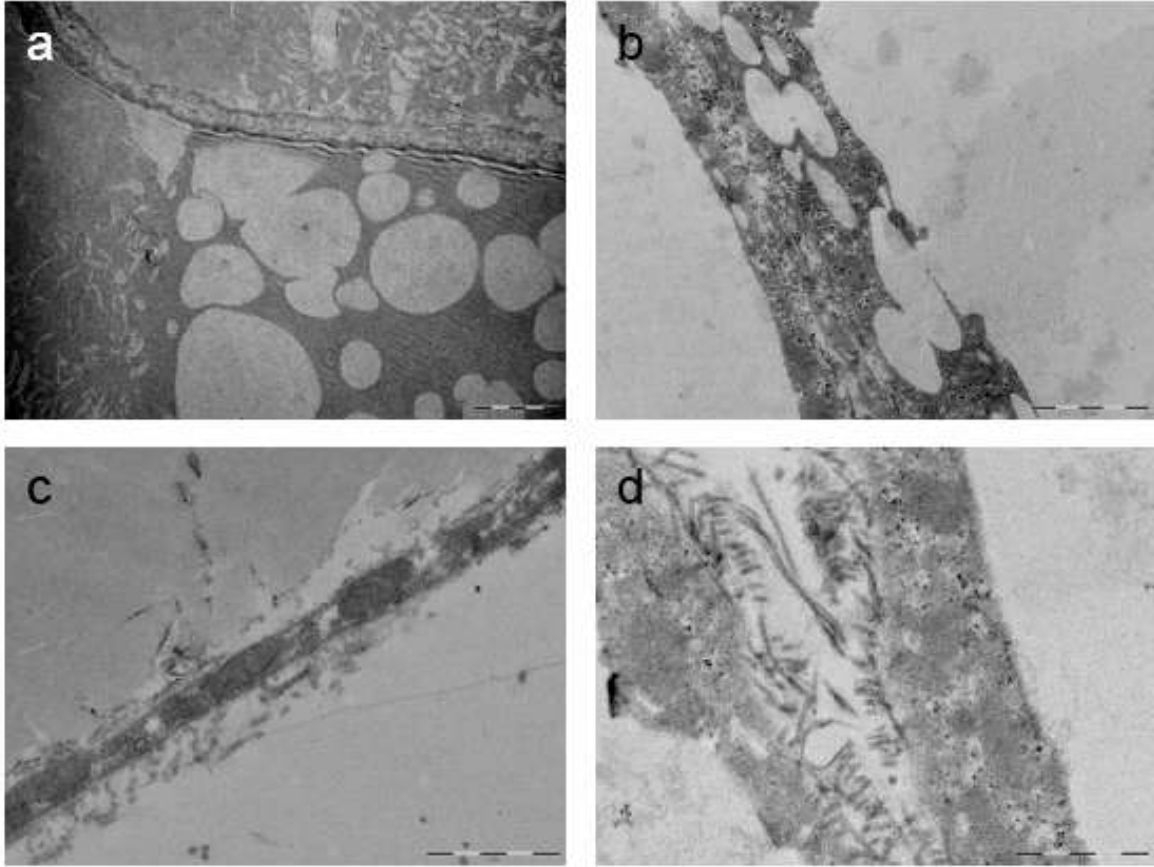


**Figura 4.** Fibroblastos (F) entre las fibras de colágeno dérmicas (C) en secciones ultrafinas de piel control (a y b) y tratada (c y d); en la figura c se observa parte de la epidermis (E) (MET a, b y c:1850x;d:3900x).

Ultraestructuralmente, no se observaban diferencias arquitecturales ni celulares en el tejido adiposo de ambos grupos, destacando en las células de las zonas tratadas la deplección total o parcial de los citoplasmas y la microvacuolización.



**Figura 5.** Tejido adiposo subcutáneo en piel control. a) Adipocito con el contenido celular distribuido homogéneamente (MET, 1450x); b) Adipocito tratado que ha perdido su contenido celular y presenta una zona de microvacuolización del citoplasma “**vaciado adipocitario**” (MET, 1850x); c y d) Membranas de adipocitos (MET, c:13500x;d:23000x).



**Figura 6.** Tejido adiposo subcutáneo en piel tratada. a) Adipocitos con el contenido celular distribuido no homogéneamente (MET, 2850x); b) Microvacuolización del citoplasma de un adipocito (MET, 9700x); c y d) Membranas de adipocitos (MET, 23 000x).

## CONCLUSIONES:

La aplicación del prototipo de radiofrecuencia monopolar (**nombre comercial: LipoSkin / Thermospring / Pielum**) en cerdos minipig correspondiente al proyecto de investigación: Exp. 200703 I+D+i 0026, originó:

1º.- Disminución del espesor cutáneo a expensas fundamentalmente del tejido adiposo. Los adipocitos disminuyen de volumen y contenido citoplasmático sin rotura de las membranas celulares **“vaciado adipocitario sin muerte celular”**.

2º.- Aumento de capilares sanguíneos y de células cebadas, así como activación de los fibroblastos y síntesis de colágena.

3º.- No se observan alteraciones de los parámetros de la función hepática (proteínas totales, albúmina, GOT y GPT) y fracción lipídica (colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicéridos y lipasa), ni alteraciones morfológicas celulares ni tisulares (M.O. / M.E.) respecto a los controles.

En Murcia, a 6 de octubre de 2008.



A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, overlapping loops and lines.

Fdo.: Dr. D. Vicente Vicente Ortega