ADENDA

A1.La specificità della frequenza INDIBA®

Abbiamo detto in precedenza che le terapie capacitive a base termica utilizzano segnali che abbracciano un ampio intervallo di frequenze, dai kHz fino a vari MHz, mentre gli effetti terapeutici della stimolazione elettrica avrebbero luogo in un intervallo di frequenze più limitato. La frequenza INDIBA®, in grado di associare l'azione termica all'azione elettrica, si situa a 448 kHz. Analogamente, sono stati realizzati studi sperimentali in vitro. in condizioni non termiche, confrontando la risposta cellulare a due diverse frequenze all'interno dell'intervallo di applicazione di INDIBA®. Mentre un segnale di 570 kHz ha indotto una risposta esclusivamente antiproliferativa nelle cellule del neuroblastoma umano, una frequenza di 448 kHz ha provocato, oltre all'effetto antiproliferativo, una risposta citotossica (di morte per apoptosi) nello stesso tipo di cellule. Questi dati avvalorerebbero la specificità della frequenza nell'induzione di risposte cellulari di natura non termica o subtermica

A2. La risposta antiproliferativa in cellule umane di cancro vs la risposta proliferativa in cellule staminali: una contraddizione

Gli studi in vitro con la stimolazione INDIBA® hanno rivelato due diversi effetti in due diversi tipi di cellule umane: l'effetto antiproliferativo in cellule cancerose umane e l'effetto proliferativo in cellule staminali. Più che come effetti diversi, tali effetti si potrebbero interpretare erroneamente come antagonisti o contraddittori.

Occorre tuttavia segnalare che la regolazione della proliferazione nelle cellule cancerose è alterata. Inoltre, queste cellule sono prive dei meccanismi di controllo della divisione cellulare di cui sono invece dotate le cellule normali, cosa che dà luogo a una crescita incontrollata del tessuto canceroso e alla formazione di tumori. Il trattamento INDIBA® agisce potenziando l'espressione di molecole chiave per il controllo del ciclo cellulare come la p53, rallentando così il ciclo di divisione delle cellule cancerose. Per contro, nelle cellule staminali i meccanismi di regolazione del ciclo cellulare sono intatti e mantengono sotto controllo il tasso di proliferazione. In queste colture di cellule staminali normali il trattamento INDIBA® potenzia la proliferazione mediante l'attivazione della proteina P-ERK1/2, senza alterare la normale regolazione del ciclo cellulare né la capacità delle cellule trattate di differenziarsi (multipotenzialità) verso le corrispondenti forme cellulari specializzate.

Il parallelismo nelle risposte dei due tipi cellulari si constata quando si applica il trattamento INDIBA® su cellule staminali senescenti, che hanno sviluppato anomalie genetiche e presentano alterazioni nel controllo del loro ciclo di divisione. In queste condizioni, che assomigliano a quelle delle cellule cancerose, il trattamento induce nelle cellule staminali un effetto antiproliferativo simile a quello che presentavano le cellule cancerose

A3. La sinergia elettrotermica. A questo punto va ricordato che gli studi sperimentali riepilogati nel presente documento si riferiscono principalmente agli effetti elettrici e non termici di

INDIBA®. Abbiamo visto che questi effetti indicano risposte cellulari con applicazioni terapeutiche in oncologia, in riparazione e cicatrizzazione di diversi tessuti e in trattamenti medico-estetici di riduzione del pannicolo adiposo. A parte la sua azione di natura elettrica, però, INDIBA® è anche un trattamento termico, e le applicazioni dell'ipertermia in oncologia, nella rigenerazione dei tessuti e nell'eliminazione del grasso sottocutaneo, sono noti da molto tempo. Di conseguenza, è legittimo proporre che la spiccata efficacia di INDIBA® nelle sue applicazioni alle terapie citate nel presente documento potrebbe attribuirsi alle sinergie fra le due azioni simultanee del trattamento INDIBA®: quella di origine elettrica e quella di natura termica.

BIBLIOGRAFIA

Hernández-Bule ML, Trillo MA, Bazán E, Martínez-Pascual MA, Leal J, Úbeda A. Niveles atérmicos de corrientes eléctricas usadas en terapia por trasferencia eléctrica capacitiva inducen efectos citotóxicos parciales en cultivos de neuroblastoma humano. Neurocirugía. Sociedad Luso Española de Neurocirugía 15: 366-371, 2004.

Úbeda A, Hernández-Bule ML, Trillo MA, Cid MA, Leal J. Cellular Response to Non-thermal Doses of Radiofrequency Currents Used in Electro-thermal Therapy. Journal of Japan Society for Laser Surgery and Medicine. 27(3):187, 2006.

Hernández-Bule ML, Trillo MA, Cid MA, Leal J, Úbeda A. Electrically-induced cytostasis in HepG2 hepatocarcinoma cells in vitro. International Journal of Molecular Medicine 20: Supplement 1. 2007.

Hernández-Bule ML, Trillo MA, Cid MA, Leal J, Úbeda A. In vitro exposure to 0.57-MHz electric currents exerts cytostatic effects in HepG2 human hepatocarcinoma cells. International Journal of Oncology 30: 583-592. 2007.

Hernández-Bule ML, Cid MA, Trillo MA, Leal J, Úbeda A. Cytostatic response of HepG2 to 0.57 MHz electric currents mediated by changes in cell cycle control proteins. International Journal of Oncology 37: 1399-1405. 2010.

Hernández-Bule ML, Roldan E, Matilla J, Trillo A, Úbeda A. Radiofrequency electric currents exerts cytotoxic effects in human neuroblastoma cells NB69 but not in peripheral blood cells PBMC. International Journal of Oncology 41: 1251-1259, 2012

Hernández-Bule ML, Trillo MA, Úbeda A. Molecular Mechanisms Underlying Antiproliferative and Differentiating Responses of Hepatocarcinoma.Cells to Subthermal Electric Stimulation. PLoS ONE 9(1): e84636. doi:10.1371/journal.pone.0084636, 2014.

Hernández-Bule ML, Paíno CL, Trillo MÁ, Úbeda A. Electric stimulation at 448 kHz promotes proliferation of human mesenchymal stem cells. Cell Physiol Biochem. 2014;34(5):1741-55.

MKT-2016-007 V1-2016.03.10 - IT



LA RICERCA BIOMEDICA DEL SISTEMA INDIBA® NELL'OSPEDALE RAMÓN Y CAJAL DI MADRID

SINTESI AGGIORNATA SETTEMBRE 2015

16 anni di ricerca avvalorano una delle tecnologie mediche che è stata -e continua ad essere- un punto di riferimento nella terapia riabilitativa, nella medicina estetica e della bellezza, per il suo prezioso contributo alla salute e al benessere dei nostri pazienti

INTRODUZIONE

Uno degli elementi distintivi del sistema INDIBA®, applicato nel campo biomedico, è la base tecnica e scientifica che avvalora la sua efficacia, sicurezza e innocuità.

Da più di 16 anni INDIBA® sviluppa un importante progetto di ricerca presso il Dipartimento di BioElettroMagnetismo dell'Ospedale Ramón y Cajal di Madrid.

Per la sua estrema specializzazione, la diffusione di tale ricerca solitamente si limita agli specialisti nel campo biosanitario, senza raggiungere un pubblico più ampio. Ciononostante, essa ha un'enorme importanza per comprendere il funzionamento del sistema, il perché delle differenze rispetto a molte altre tecnologie che si autodefiniscono "equivalenti" a INDIBA® senza però esserlo e, soprattutto, per constatare che la tecnologia di base va molto oltre le specifiche applicazioni mediche o estetiche nelle quali viene utilizzato.

Infatti, poiché incide sul meccanismo di base della nostra fisiologia, acquisendo con l'uso informazioni sempre più approfondite su tale meccanismo, è un sistema con un potenziale molto elevato, non solo per migliorare i risultati attuali, ma anche rispetto ad applicazioni future che senza dubbio contribuiranno a migliorare la qualità della vita dei nostri pazienti e utenti.

In questo documento presentiamo sinteticamente lo stato dell'arte delle ricerche effettuate e di quelle ancora in corso presso l'Ospedale Ramón y Cajal, sotto la guida del dott. Alejandro Úbeda e della dott.ssa María Luisa Hernández — Bule, allo scopo di farle conoscere a tutti gli utenti e a coloro che sono interessati al sistema INDIRA®

Speriamo che siano d'interesse per il lettore e per tutti i nostri clienti, a disposizione dei quali mettiamo questo importante mezzo scientifico che fa di INDIBA® il referente nella ricerca biomedica delle applicazioni della tecnologia di radiofrequenza.

Sant Quirze del Vallés, settembre 2015

1. LA RICERCA BIOMEDICA SPERIMENTALE NELLA TERAPIA ELETTROTERMICA INDIBA®

El sistema INDIBA® si basa sulle applicazioni mediche della tecnologia elettrotermica nota come Trasferimento Energetico Capacitivo Resistivo (TECAR o CRET in inglese). Si tratta, fondamentalmente, di una strategia non invasiva che consiste nell'elevare la temperatura degli organi o dei tessuti target sotto trattamento mediante l'azione di correnti elettriche a radiofreguenza. I risultati empirici raccolti nel corso di più di tre decenni hanno dimostrato l'efficacia dei trattamenti INDIBA® in medicina riabilitativa, rigenerativa ed estetica. Oggi, però, l'evoluzione dei concetti di biomedicina esige che i dati empirici sull'efficacia di qualsiasi agente terapeutico o strategia terapeutica siano corroborati dalla conoscenza dei meccanismi e dei fenomeni che, a livello cellulare e molecolare, spiegano e giustificano sia l'efficacia clinica sia l'innocuità del trattamento. Tali conoscenze sono accessibili solamente attraverso la ricerca biomedica traslazionale. È per questo che INDIBA®, dal 1998, sostiene la ricerca dei processi molecolari e cellulari coinvolti negli effetti medici delle sue terapie.

I risultati ottenuti fino ad oggi indicano che INDIBA® esercita la sua azione terapeutica attraverso due tipi di fenomeni biofisici:

- Fenomeni di natura termica, per l'effetto Joule dovuto al passaggio attraverso i tessuti trattati di correnti elettriche in un intervallo relativamente ampio di radiofrequenze. Sebbene continuino ad essere oggetto di ricerca, le proprietà terapeutiche dei trattamenti termici sono ampiamente descritte nella letteratura scientifica.
- Fenomeni di natura elettrica che generano risposte essenziali, sebbene più impercettibili di quelle indotte termicamente, dal momento che esercitano la loro azione a livello cellulare e molecolare. Tali risposte si generano preferibilmente o esclusivamente in presenza di correnti la cui frequenza rientra in un intervallo più specifico e limitato rispetto alle radiofrequenze che inducono effetti termici (nello spettro kHz – MHz).

Utilizzando una frequenza di 448 kHz, INDIBA® è in grado di combinare entrambi gli effetti.

¹«La sanità è uno stato di completo benessere fisico, mentale e sociale, e non consiste solo in un assenza di malattia o d'infermità».
Introduzione della Costituzione dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS), adottata dalla Conferenza Sanitaria Internazionale svoltasi a New York dal 19 giugno al 22 luglio del 1946, sottoscritta il 22 luglio del 1946 dai rappresentanti di 61 Stati (Official Records of the World Health Organization, № 2, p. 100) ed entrata in vigore il 7 aprile del 1948

Ciò fa di INDIBA® una terapia unica, elettrotermica, che si distingue da altre terapie orientate esclusivamente agli effetti termici.

2. LE BASI TERMICHE DEI TRATTAMENTI CON IN-DIRA®

- Effetto capacitivo (TEC): In questa condizione, la superficie dell'elettrodo attivo a contatto con il paziente è dotata di uno strato isolante che funge da dielettrico di un condensatore. La corrente elettrica (flusso di elettroni) con forma d'onda sinusoidale parte dal generatore e carica il condensatore. Nel semiperiodo positivo dell'onda, la parte metallica dell'elettrodo attivo ha carica positiva e la pelle ha carica negativa. Quando, nel semiperiodo negativo, si inverte la polarità dell'onda applicata, gli elettroni circolano in senso contrario e ciò che prima era carico positivamente, adesso si carica negativamente. La velocità del cambio di polarità è data dalla frequenza dell'onda o del segnale. Quando la corrente di elettroni giunge ai tessuti del paziente, queste correnti elettroniche si trasformano in correnti ioniche. È questo flusso di ioni e di molecole cariche che collidono con le particelle immobili dei tessuti che induce un aumento della temperatura della zona trattata. La temperatura raggiunta dipenderà dall'intensità della corrente e dalle caratteristiche elettriche e anatomiche dei tessuti trattati. Fondamentalmente. la tecnica capacitiva consente di accedere a zone anatomiche più superficiali e maggiormente vascolarizzate.
- Effetto resistivo (TER): In questa condizione l'elettrodo attivo non è dotato di dielettrico. In questo modo la corrente elettrica erogata dal generatore dà luogo a correnti ioniche nei tessuti, generando un aumento termico per l'effetto Joule. In questo caso, l'ipertermia raggiunge tessuti ubicati a una profondità maggiore rispetto a quella raggiunta dai trattamenti capacitivi. La corrente in queste condizioni consente di trattare tessuti più fibrotici, con maggiore resistenza-impedenza al passaggio della corrente e peggiore idratazione-vascolarizzazione.

3. LE BASI ELETTRICHE DEGLI EFFETTI ATERMICI NEI TRATTAMENTI CON INDIBA®

3.1. Studi sulla risposta cellulare alla stimolazione con INDIBA®; applicazioni nella valutazione di sicurezza e innocuità

Una priorità cruciale nello sviluppo e uso di qualsiasi terapia è garantire l'innocuità della sua applicazione a medio e lungo termine. Nel caso di INDIBA®, l'Agenzia Spagnola dei Farmaci e Prodotti Sanitari (AEMPS) del Ministero della Salute, ritiene che il centro d'interesse per quanto riguarda possibili effetti secondari nocivi sia l'effetto potenziale a livello cellulare delle correnti deboli, subtermiche, alle quali sono esposti i tessuti vicini all'organo o alla zona sottoposti a trattamento. E all'interno dello studio degli effetti a livello cellulare, la risposta delle cellule cancerose umane si considera di importanza primaria. Al Servizio di de BioElettroMagnetismo (BEM) dell'Ospedale Universitario Ramón y Cajal di Madrid sono state affidate le

ricerche sperimentali finalizzate a valutare un potenziale effetto delle correnti elettriche INDIBA® sulla proliferazione tumorale. I lavori realizzati in vitro nel corso di 8 anni su cellule cancerose di epatocarcinoma e neuroblastoma umani hanno rivelato che le correnti di INDIBA® in condizioni non termiche o subtermiche non solo non hanno alcun effetto promotore della proliferazione di queste cellule ma, al contrario, inducono in entrambi i tipi di cellule tumorali risposte antiproliferative.

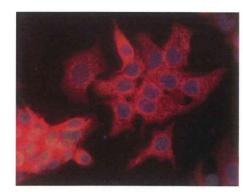


Fig. 1. Fotomicrografia di cellule HepG2 in coltura

Tali risposte, che corroborano le osservazioni empiriche precedenti su una possibile efficacia di INDIBA® come coadiuvante in trattamenti oncologici, sarebbero dovute a un rallentamento del ciclo di divisione cellulare. Le ricerche più recenti hanno permesso di determinare che tale rallentamento deriva dai cambiamenti indotti dalle correnti subtermiche nell'espressione di proteine che intervengono nella regolazione del ciclo cellulare (al termine dell'addendum al presente documento si allega un elenco bibliografico).

3.2. Studi sulla risposta cellulare alla stimolazione con INDIBA®; applicazioni nella rigenerazione tissutale di lesioni e miglioramento della cicatrizzazione

La terapia INDIBA® si impiega abitualmente nella riabilitazione fisica e nella medicina sportiva per il trattamento di lesioni dell'apparato locomotore, compresi muscoli, legamenti, articolazioni e ossa. Il sistema INDIBA® si è rivelato efficace anche nel trattamento di patologie vascolari. A differenza di altre terapie applicate in medicina rigenerativa, INDIBA® non induce effetti secondari quali edemi o ustioni di primo o secondo grado. Diversi studi clinici hanno dimostrato che il trattamento INDI-BA® accelera la riparazione di lesioni, riducendo in generale l'estensione della zona danneggiata, oltre ad avare un effetto analgesico e antinfiammatorio. Tali effetti osservati nei pazienti potrebbero essere attribuibili a un potenziamento, a livello ce-Ilulare, dei fenomeni coinvolti in processi rigenerativi. Analogamente, gli studi in vitro realizzati utilizzando cellule staminali di volontari adulti sani hanno rivelato che la stimolazione elettrica. subtermica, con INDIBA® incrementa significativamente la proliferazione di tali cellule. Tale incremento della popolazione di cellule staminali, a sua volta, promuoverebbe la rigenerazione tissutale grazie all'aumento della quantità di cellule disponibili per riparare i tessuti danneggiati. Inoltre, a differenza di quanto accade con altri metodi in grado di promuovere la moltiplicazione delle cellule staminali. la stimolazione con INDIBA® non

altera la capacità delle cellule trattate di differenziarsi (specializzarsi) nel tipo cellulare specifico del tessuto da riparare.

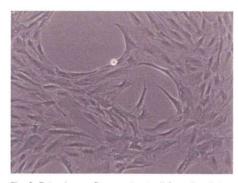


Fig. 2. Fotomicrografia a contrasto di fase di cellule staminali in coltura

3.3. Studi sulla risposta cellulare alla stimolazione con IN-DIBA®; applicazioni nella rigenerazione di lesioni dell'apparato locomotore

3.3.1. Rigenerazione di cartilagini. Il tessuto cartilagineo è un tessuto che per le sue caratteristiche intrinseche, come ad esempio il basso tasso di proliferazione e la scarsa vascolarizzazione, è altamente refrattario ai trattamenti rigenerativi standard. Per questo motivo, attualmente la ricerca di nuove strategie terapeutiche per la rigenerazione delle cartilagini è materia di primario interesse in medicina. Dal momento che esistono dati empirici indicativi del fatto che INDIBA® è efficace nella riparazione di lesioni delle cartilagini, è ragionevole chiedersi se, oltre al suo effetto generale che induce una risposta proliferativa delle cellule staminali, INDIBA® non possa favorire la rigenerazione di cartilagini grazie a: A) la differenziazione di cellule staminali in cellule proprie del tessuto cartilagineo. chiamate condrociti, e/o B) la sintesi da parte dei condrociti presenti nel tessuto di macrocellule specifiche della matrice extracellulare della cartilagine. I risultati sperimentali in vitro hanno fornito indizi utili sul fatto che la stimolazione di INDIBA® potrebbe esercitare entrambe le azioni a livello cellulare. Si è altresì osservato che dopo il trattamento elettrico, le cellule staminali presentano un incremento nell'espressione e attivazione della proteina Sox5, una delle principali molecole coinvolte nella condrogenesi o formazione del tessuto cartilagineo. Analogamente, si è riscontrato che nelle cellule staminali umane INDI-BA® promuove la sintesi delle macrocellule della matrice della cartilagine, come ad esempio il solfato di condroitina e altri glicosamminoglicani (GAG). L'induzione di entrambe le risposte, sia simultaneamente che consecutivamente, unita all'effetto proliferativo descritto sopra, comporterebbe un'accelerazione significativa della riparazione di lesioni in un tessuto con una capacità di rigenerazione molto scarsa.

3.3.2. Rigenerazione ossea. Gli stessi argomenti sintetizzati nel punto precedente sono, in buona misura, validi nell'ipotesi formulata sulla capacità di INDIBA® di accelerare la riparazione dei danni arrecati al tessuto osseo sia da eventi traumatici che da processi degenerativi. I risultati preliminari a questo riguardo hanno mostrato che nelle cellule staminali in processo di differenziazione verso osteoblasti (cellule che producono il tessuto

osseo), la stimolazione con INDIBA® aumenta l'attività della fosfatasi alcalina e la formazione di depositi di calcio nelle colture. Poiché entrambe le risposte indicano chiaramente una mineralizzazione dei tessuti, è legittimo ipotizzare che il trattamento INDIBA® possa promuovere la riparazione dell'osso attraverso la formazione di tessuto osseo mediata da un'accelerazione della mineralizzazione.

3.4. Studi sulla risposta cellulare alla stimolazione con IN-DIBA®; applicazioni nei trattamenti anticellulite e ad azione antiadipogenica

Lrisultati empirici mostrano che INDIBA® è anche efficace in trattamenti di medicina estetica che comprendono la riduzione e il modellamento del pannicolo adiposo addominale o la riduzione della cellulite. I processi cellulari e molecolari soggiacenti alla risposta a tali trattamenti sono oggetto di studi sperimentali su cellule staminali ottenute da tessuto adiposo di donatori adulti sani. L'obiettivo degli studi è quello di determinare se il trattamento INDIBA® è in grado di: A) interferire nella formazione di nuovo tessuto grasso (adipogenesi) e/o B) potenziare la distruzione di tessuto adiposo già formato (lipolisi). A tutt'oggi dai risultati ottenuti in vitro è emerso che i trattamenti INDIBA® riducono la quantità di acidi grassi sintetizzati e accumulati dalle cellule madre nelle prime fasi della loro differenziazione verso cellule grasse. Tale riduzione di acidi grassi è mediata da una sottoespressione (diminuzione dell'espressione, o depressione nel funzionamento) di molecole che promuovono la formazione di tessuto grasso, come la cosiddetta PPARgamma. D'altra parte, oltre a quanto detto finora, in fasi più avanzate della differenziazione delle cellule staminali si è riscontrato che lo stimolo INDIBA® induce una riduzione dell'espressione della perilipina, molecola protettrice delle vescicole di grasso presenti nel citoplasma cellulare. Questo risultato è indice del fatto che il trattamento INDIBA® potrebbe indurre anche la degradazione o mobilizzazione del grasso nel tessuto adiposo maturo. Il calo dell'espressione della perilipina, infatti, agevolerebbe l'azione delle lipasi, enzimi responsabili della degradazione dei lipidi negli adipociti, con la conseguente riduzione di grasso nei tessuti

In definitiva, dagli studi sperimentali con cellule staminali è emerso che, nel tessuto adiposo in formazione, INDIBA® inibirebbe la sintesi e l'accumulo di grasso intracellulare, mentre nel tessuto adiposo in una fase di maturazione più avanzata, il trattamento elettrico potrebbe favorire la distruzione del grasso presente all'interno delle cellule.

3.5. Studi sulla risposta cellulare e la stimolazione con INDIBA®; applicazioni in altri trattamenti rassodanti e rimodellanti

Gli effetti -descritti nei paragrafi precedenti- di promozione della differenziazione e proliferazione delle cellule staminali, o di sintesi della matrice extracellulare, potrebbero, mediante uno specifico approfondimento delle ricerche nelle rispettive materie, avvalorare le applicazioni di INDIBA® in altre terapie, come ad esempio quelle volte al rassodamento e/o al rimodellamento dei tessuti, sia in processi traumatici, degenerativi o pre/post operatori. tivos o pre/post quirúrgicos.