(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 469 240**

(21) Número de solicitud: 201231759

(51) Int. Cl.:

A61K 31/409 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

14.11.2012

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

17.06.2014

(56) Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070779

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID (57.5%)
Ciudad Universitaria Cantoblanco. C/ Einstein, 3
28049 Madrid ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (42.5%)

(72) Inventor/es:

ESPADA REGALADO, Jesús;
CARRASCO CERRO, Elisa;
CALVO SANCHEZ, María Inmaculada;
BLAZQUEZ-CASTRO, Alfonso y
JUARRANZ DE LA FUENTE, Angeles

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

(54) Título: **USO DE UN AGENTE FOTOSENSIBLE CAPAZ DE PRODUCIR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO ÚTIL PARA LA TERAPIA FOTODINÁMICA DE UNA ENFERMEDAD RELACIONADA CON CÉLULAS MADRE, USO "IN VITRO" Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA.**

(57) Resumen:

La presente invención es el uso de un agente fotosensible, o su precursor, capaz de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento por terapia fotodinámica (TFD) de una enfermedad relacionada con las células madre en un sujeto, preferiblemente células madre epidérmicas.

ES 2 469 240 A1

DESCRIPCIÓN

USO DE UN AGENTE FOTOSENSIBLE CAPAZ DE PRODUCIR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO ÚTIL PARA LA TERAPIA FOTODINÁMICA DE UNA ENFERMEDAD RELACIONADA CON CÉLULAS MADRE, USO "IN VITRO" Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

Campo de la Invención

La presente invención refiere a una segunda indicación médica de Especies Reactivas de Oxígeno ("Reactive Oxygen Species", ROS) en el campo médico de las enfermedades relacionadas con células madre en un sujeto.

Antecedentes

La Terapia Fotodinámica (TFD) es una modalidad terapéutica de uso clínico muy extendido para el tratamiento de distintas patologías cutáneas, incluyendo el cáncer.

La TFD se basa en la administración exógena de compuestos fotosensibles (FS) o precursores de los mismos que se acumulan por distintos mecanismos de forma preferente en los tejidos diana. La irradiación del tejido con luz de longitud de onda adecuada, generalmente en la región roja del espectro (λ≥600 nm) para una mayor penetración en el tejido, y en presencia de oxígeno intracelular induce la producción de especies reactivas de oxígeno ("Reactive Oxygen Species", ROS), en especial oxígeno singlete. La rápida acumulación intracelular de ROS por encima de un umbral crítico promueve una fuerte fotosensibilización que induce muerte celular.

El ácido 5-aminolevulínico (AAL) y, en mayor medida, su derivado metilado metilaminolevulinato (MAL), son dos de los compuestos más utilizados en la clínica en protocolos dermatológicos con TFD. Su bajo peso molecular determina una elevada absorción a través de la epidermis permitiendo su aplicación tópica. Estos compuestos no son fotoactivos por sí mismos, pero actúan como precursores del FS endógeno protoporfirina IX (PpIX). Una vez absorbidos por la célula se incorporan en la ruta metabólica de biosíntesis del grupo hemo promoviendo una acumulación anormal de PpIX que puede durar entre horas y días, con la consecuente fotosensibilización del tejido diana. El tratamiento TFD-MAL está muy extendido en dermatología clínica, en particular para el tratamiento de la queratosis actínica y el carcinoma basocelular.

Se ha descrito que el tratamiento experimental con fuentes exógenas de ROS en bajas cantidades, como el peróxido de hidrógeno, puede promover la proliferación celular en cultivos in vitro (Boonstra J, Post JA. “Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells”. Gene 337:1-13, 2004), incluyendo potenciales células progenitoras neurales crecidas mediante el sistema de neurosferas (Le Belle JE et al. “Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner”, Cell Stem Cell. 8:59-71, 2011).

Sin embargo, no existe hasta el momento ninguna evidencia experimental que indique una relación causal entre una producción endógena de ROS en un tejido y la activación funcional de algún tipo de célula madre contenida en dicho tejido que implique consecuencias fisiológicas, con potencial uso clínico, farmacológico o cosmético. En gran medida esto se debe a que no existe ningún procedimiento experimental “in vivo” que permita inducir una producción controlada de ROS endógena en un tejido.

Tampoco existen datos experimentales indicando que una acumulación de ROS endógena en tejidos pueda ser parte de un proceso homeostático normal funcionalmente dependiente de células madre. Al contrario, todos los resultados experimentales que muestran una acumulación “in vivo” de ROS en tejidos indican que esta acumulación es anormal y está asociada a condiciones patológicas y procesos de envejecimiento (Valko M et al. “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”, Int. J. Biochem. Cell Biol. 39: 44-84, 2007). Así mismo, el tratamiento tópico de un tejido con fuentes exógenas de ROS no puede considerarse en ningún caso biológicamente equivalente a una producción fisiológica de ROS endógeno.

Los inventores describen un procedimiento experimental que utiliza TFD-MAL para inducir una producción endógena de ROS en el folículo piloso capaz de activar las células madre epidérmicas contenidas en este nicho. Esta estimulación de las células madre epidérmicas se debe a la activación transcripcional por ROS en el tejido diana de genes de la familia prolactina 2, también conocidos como proliferinas,

particularmente proliferina-2 o Prl2c3. Teniendo en cuenta que se ha propuesto un papel potencial para Prl2c3 en la expansión in vitro de células madre hematopoyéticas (Choong ML et al. “A novel role for proliferin-2 in the ex vivo expansión of hematopoietic stem cells”, FEBS Lett. 550:155-62, 2003), la estimulación” in vivo” de genes de la familia proliferina por ROS asociada a una activación de células madre epidérmicas resulta un descubrimiento sorprendente y relevante por sí mismo.

En la técnica actual, uno de los usos más extendidos de las células madre epidérmicas en el área de la bioingeniería es la generación de equivalentes cutáneos de componente epidérmico o dermo-epidérmico (Shevchenko RV et al. “A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction”, J. R. Soc. Interface 7:229-58, 2010). Estos equivalentes cutáneos o pieles artificiales tienen aplicaciones muy importantes en medicina regenerativa, fundamentalmente para el tratamiento de quemaduras y heridas de gran extensión y profundidad. El tratamiento ideal para este tipo de lesiones es el autoinjerto con equivalentes cutáneos de diversos tipos generados a partir de piel del propio paciente. Dadas las restricciones establecidas en la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE) y otros países para el uso de animales de experimentación, otra aplicación fundamental de los equivalentes cutáneos es su uso como modelos biológicos para probar la viabilidad y toxicidad de compuestos farmacéuticos y cosméticos.

En este tipo de aplicaciones una limitación esencial es el tiempo de generación de un equivalente cutáneo funcional, que requiere la expansión “ex vivo” de los progenitores epidérmicos y la estratificación del componente epidérmico en contacto con el aire. En clínica los tiempos excesivamente prolongados en la producción de equivalentes para autoinjerto suponen un riesgo inmediato para el paciente, que obliga a utilizar terapias alternativas como injertos de piel de cadáver o equivalentes sintéticos poco humanizados. En farmacología y cosmética, el tiempo de generación de piel artificial está directamente relacionado con su coste de producción. Por ello, un problema que se plantea en la técnica es desarrollar un procedimiento experimental para acelerar estos procesos durante la formación del equivalente cutáneo.

Por otro lado, distintas evidencias experimentales indican que muchas patologías cutáneas, incluyendo distintos tipos de cáncer, alopecia y procesos como el envejecimiento pueden ser debidos a un defecto en la actividad de las células madre epidérmicas, y en particular de las que residen en el nicho del folículo piloso. Una limitación fundamental en el abordaje clínico de estas enfermedades es que los tratamientos disponibles actualmente son sintomáticos y no específicos, es decir que no están destinados a modular funcionalmente la actividad de las células madre epidérmicas.

El problema que se plantea en la técnica, por tanto, es desarrollar procedimientos más específicos y efectivos que los actuales para generar equivalentes cutáneos y tratar enfermedades relacionadas con células madre. La solución que aporta la presente invención es un tratamiento por un procedimiento TFD capaz de inducir la producción endógena de ROS y la activación de células madre epidérmicas.

Descripción

La presente invención es el uso de un agente fotosensible, o su precursor, capaz de producir especies reactivas de oxígeno en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento por terapia fotodinámica de una enfermedad relacionada con las células madre en un sujeto, preferiblemente células madre epidérmicas. En otra realización de la invención dichas células madre son células madre hematopoyéticas.

En la presente solicitud se entiende por “agente fotosensible” aquel compuesto capaz de producir ROS en presencia de oxígeno al ser irradiado con luz de una longitud de onda adecuada, que es administrado de forma exógena o producido por el propio organismo a partir de un precursor.

En la presente solicitud se entiende por “precursor de un agente fotosensible” aquel compuesto administrado por vía exógena del que resulta en la célula un compuesto fotosensible.

En la presente solicitud se entiende por “Especies Reactivas de Oxígeno” o ROS, los compuestos que presentan iones y radicales libres de oxígeno y peróxidos.

En la presente solicitud se entiende por “Terapia Fotodinámica” o TFD a un procedimiento por el cual se induce la producción de ROS en un tejido diana después de promover la acumulación en dicho tejido de un agente fotosensible e irradiarlo en presencia de oxígeno con luz de una longitud de onda adecuada.

En la presente solicitud se entiende por “enfermedades relacionadas con células madre” aquellas enfermedades que cursan con defectos de funcionamiento en el mantenimiento homeostático de los tejidos y que, en consecuencia, implican directamente una pérdida o desregulación funcional de la actividad de dichas células madre (Wagers, AJ. “The stem cell niche in regenerative medicine”. Cell Stem Cell, 10:362-369, 2012).

En una realización preferible de la invención, dicho agente fotosensible es protoporfirina IX (PpIX). En otra realizacón preferible dicho precursor de un agente fotosensible es un precursor de PpIX, más preferiblemente aún ácido 5-aminolevulínico o sus derivados químicos, y entre estos derivados químicos el más preferible es el metilaminolevulinato (MAL).

En la presente solicitud se entiende por “derivado químico” del ácido 5-aminolevulínico (AAL) un compuesto orgánico que contiene la estructura química básica del AAL presentando uno o más sustituyentes o radicales químicos en alguno de los átomos de dicha estructura básica.

Otra realización preferible del uso de la invención es que dicho sujeto sobre el que se aplica la terapia fotodinámica es un mamífero, preferiblemente humano.

La invención describe una metodología adaptada de TFD que permite generar una producción controlada y endógena de ROS específicamente en la región prominente del folículo piloso. Como consecuencia, se produce una activación de la proliferación de las células madre epidérmicas contenidas en este nicho, una aceleración del crecimiento del pelo, un incremento de colágeno en la dermis y una inducción en la expresión de genes de la familia 2 de la prolactina (proliferinas), en particular de Prl2c3.

Las células madre epidérmicas son las responsables del mantenimiento homeostático de la piel, y su actividad está relacionada con todas las dermatosis que afectan a la homeóstasis de la piel, cancerosas o no, así como a procesos relacionados con el envejecimiento como arrugas o caída del pelo y a la cicatrización de heridas y quemaduras.

De forma que otra realización preferible más es que dicha enfermedad relacionada con las células madre es una dermatosis o enfermedad de la piel, más preferiblemente cáncer y más preferiblemente aún un carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular, enfermedad de Bowen, enfermedad de Paget extramamaria, melanoma o síndrome de Gorlin; o enfermedades del colágeno, adermatoglifia, acrocordón, una enfermedad del folículo piloso preferiblemente alopecia, síndrome de Bloom, dermatitis atópica, discromías, displasia pilosa, epidermólisis bullosa, estrías, fotoalergia, hemangiomas, hiperpigmentación, ictiosis, mucinosis folicular, necrobiosis lipoídica, nevus, psoriasis, queratosis, seborrea, síndrome de Graham-Little, síndrome del cabello anágeno suelto, vitíligo, xerosis o procesos degenerativos asociados al envejecimiento normal o patológico.

En otra realización preferible más dicho medicamento se administra por vía tópica.

Otra realización preferible de la invención es el uso de un agente fotosensible, o su precursor, capaz de producir ROS, y al menos otro agente terapéutico en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento por TFD de una enfermedad relacionada con las células madre en un sujeto, preferiblemente epidérmicas.

Otra realización preferible más de la invención es el uso de un agente fotosensible, o su precursor, capaz de producir ROS para la activación *"in vitro"* de células madre, y otra realización más, para la producción *"in vitro"* de proteínas de la familia 2 de la prolactina, más preferiblemente aún proliferina-2.

En la presente solicitud se entiende por "activación de células madre" a la estimulación de la proliferación y/o de los programas de diferenciación funcional de células madre.

La estimulación de células madre según la presente invención tiene una aplicación potencial directa en el área de la bioingenería para la aceleración del crecimiento de equivalentes cutáneos de componente epidérmico o dermo-epidérmico (pieles artificiales) utilizados en medicina regenerativa y como substratos para probar la viabilidad biológica de compuestos farmacológicos y cosméticos. De forma que una realización tecnológica de la invención es el uso de un agente fotosensible, o su precursor, capaz de producir ROS para la generación de equivalentes cutáneos dermo-epidérmicos o epidérmicos.

El uso terapéutico de la invención también se puede expresar como un método de tratamiento por TFD de una enfermedad relacionada con las células madre, preferiblemente células madre epidérmicas, en un sujeto preferiblemente humano, que comprende administrar a dicho sujeto afectado por la enfermedad una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente fotosensible o su precursor, capaz de producir ROS. En una realización preferible es un método de tratamiento por TFD de una enfermedad relacionada con las células madre, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica de un agente fotosensible o su precursor, capaz de producir ROS a un sujeto preferiblemente humano en necesidad de ella. En este sentido, la realización más preferible de la invención es un método de tratamiento por TFD de una enfermedad relacionada con las células madre epidérmicas en un humano, que comprende administrar a dicho humano afectado por la enfermedad una cantidad terapéuticamente efectiva de metilaminolevulinato.

El uso terapéutico de la invención también se puede expresar como un agente fotosensible o su precursor, capaz de producir ROS para uso en el tratamiento por TFD de una enfermedad relacionada con las células madre en un sujeto, preferiblemente células madre epidérmicas. Otra realización es que sean células madre hematopoyéticas.

Otra realización más de la invención es un agente fotosensible o su precursor, capaz de producir ROS y al menos otro agente terapéutico para uso en el tratamiento por

TFD de una enfermedad relacionada con las células madre en un sujeto, preferiblemente células madre epidérmicas.

Otra realización preferible es el agente fotosensible de la invención, o su precursor, capaz de producir ROS para la activación *"in vitro"* de células madre, y otra realización preferible más es que sea para la producción *"in vitro"* de proteínas de la familia 2 de la prolactina, más preferiblemente aún proliferina-2.

En este sentido, aún otra realización más es el agente fotosensible, o su precursor, capaz de producir ROS de la invención, para la generación de equivalentes cutáneos dermo-epidérmicos o epidérmicos.

La presente invención refiere a métodos para activar funcionalmente células madre que pueden ser aplicados en medicina regenerativa para el tratamiento y recuperación de heridas en la piel provocadas por quemaduras, abrasiones u otros tipos de daño epitelial. La invención representa la ventaja tecnológica definitiva sobre las técnicas de injerto que permite la estimulación in situ de las células madre del folículo piloso para contribuir a la regeneración epitelial sin extraerlas de su propio nicho, eliminando así todo riesgo asociado a la manipulación externa. Los resultados de los ejemplos aportados (Ejemplo 8) indican que la TFD es capaz de inducir la activación y movilización de las células madre epidérmicas residentes en la región prominente hacia la región del bulbo piloso, desde donde promueven el crecimiento del pelo.

Se propone además su aplicación para el tratamiento alternativo de úlceras, heridas crónicas de tamaño mediano o pequeño, así como para el tratamiento de patologías cutáneas asociadas a una disfunción o pérdida de células madre epidérmicas. También su uso como coadyuvante en tratamientos de dermatología estética tras la realización de intervenciones quirúrgicas en zonas expuestas y visibles, y en pacientes sometidos a procedimientos de cirugía estética.

Otras realizaciones preferibles de la invención refieren a la composición cosmética o farmacéutica que comprende una cantidad cosmética o farmacéuticamente eficaz de un agente fotosensible, o su precursor, y al menos un excipiente o adyuvante

cosmética o farmacéuticamente aceptable. En este sentido, una realización preferible de la invención es que el agente fotosensible de dicha composición sea la protoporfirina IX; o bien que el precursor de dicho agente fotosensible sea el ácido 5-aminolevulínico o sus derivados químicos, y entre estos derivados químicos preferiblemente el metilaminolevulinato (MAL).

Otra realización preferible es que el agente fotosensible de la invención, o su precursor, se encuentre incorporado a un sistema de vehiculización o a un sistema de liberación sostenida cosmética o farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo formado por liposomas, liposomas mixtos, oleosomas, niosomas, etosomas, milicápsulas, microcápsulas, nanocápsulas, esponjas, ciclodextrinas, vesículas, micelas, micelas mixtas de tensioactivos, micelas mixtas fosfolípido-tensioactivo, miliesferas, microesferas, nanoesferas, lipoesferas, microemulsiones, nanoemulsiones, minipartículas, milipartículas, micropartículas, nanopartículas, nanopartículas sólidas lipídicas y soportes lipídicos nanoestructurados.

Otra realización preferible más es que la composición cosmética o farmacéutica de la invención se presente en una formulación seleccionada del grupo formado por cremas, emulsiones múltiples, composiciones anhidras, dispersiones acuosas, aceites, leches, bálsamos, espumas, lociones, geles, geles crema, soluciones hidroalcohólicas, soluciones hidroglicólicas, hidrogeles, linimentos, sueros, jabones, champús, acondicionadores, serums, ungüentos, mousses, pomadas, polvos, barras, lápices, vaporizadores, aerosoles, cápsulas, cápsulas de gelatina, cápsulas blandas, cápsulas duras, comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, formas granuladas, gomas de mascar, soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, films de polisacáridos, jaleas y gelatina.

En otra realización preferible, dicha composición se encuentra incorporada a un producto seleccionado del grupo formado por correctores de ojeras, fondos de maquillaje, lociones desmaquillantes, leches desmaquillantes, sombras de ojos, barras de labios, brillos labiales, protectores labiales y polvos.

En otra realización más, el agente fotosensible de la composición de la invencón, o su precursor, se encuentra incorporado en un tejido, un tejido-no-tejido o un producto

sanitario, preferiblemente seleccionado del grupo formado por vendas, gasas, camisetas, medias, calcetines, ropa interior, fajas, guantes, pañales, compresas, apósitos, cubrecamas, toallitas, parches adhesivos, parches no adhesivos, parches oclusivos, parches microeléctricos y mascarillas faciales.

Una realización preferible es que el adyuvante de la composición de la invención esté seleccionado del grupo formado por proteínas de choque térmico, otros agentes estimuladores de la síntesis de las proteínas de choque térmico, inhibidores de la agregación de los receptores de acetilcolina, agentes inhibidores de la contracción muscular, agentes anticolinérgicos, agentes inhibidores de elastasa, agentes inhibidores de las metaloproteasas de matriz, agentes estimuladores o inhibidores de la síntesis de melanina, agentes blanqueantes o despigmentantes, agentes propigmentantes, agentes autobronceantes, agentes antienvejecimiento, agentes inhibidores de la NO-sintasa, agentes inhibidores de la 5α-reductasa, agentes inhibidores de lisil- y/o prolil-hidroxilasa, agentes antioxidantes, agentes capturadores de radicales libres y/o anticontaminación atmosférica, agentes capturadores de especies reactivas carbonilo, agentes antiglicación, agentes antihistamínicos, agentes antivirales, agentes antiparasitarios, agentes emulsionantes, emolientes, disolventes orgánicos, propelentes líquidos, acondicionadores de la piel, humectantes, sustancias que retienen la humedad, alfahidroxiácidos, betahidroxiácidos, hidratantes, enzimas epidérmicas hidrolíticas, vitaminas, aminoácidos, proteínas, pigmentos o colorantes, tintes, polímeros gelificantes, espesantes, tensioactivos, suavizantes, agentes antiarrugas, agentes capaces de disminuir o tratar las bolsas bajo los ojos, agentes exfoliantes, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, agentes fungistáticos, agentes bactericidas, agentes bacteriostáticos, agentes estimuladores de la síntesis de macromoléculas dérmicas o epidérmicas y/o capaces de inhibir o prevenir su degradación, agentes estimuladores de la síntesis de colágeno, agentes estimuladores de la síntesis de elastina, agentes estimuladores de la síntesis de decorina, agentes estimuladores de la síntesis de laminina, agentes estimuladores de la síntesis de defensinas, agentes estimuladores de la síntesis de aquaporinas, agentes estimuladores de la síntesis de ácido hialurónico, agentes estimuladores de la síntesis de fibronectina, agentes estimuladores de la síntesis de sirtuínas, agentes estimuladores de la síntesis de lípidos y componentes del estrato córneo, ceramidas, ácidos grasos, agentes

inhibidores de la degradación de colágeno, agentes inhibidores de la degradación de elastina, agentes inhibidores de proteasas de serina como catepsina G, agentes estimuladores de la proliferación de fibroblastos, agentes estimuladores de la proliferación de queratinocitos, agentes estimuladores de la proliferación de adipocitos, agentes estimuladores de la proliferación de melanocitos, agentes estimuladores de la diferenciación de queratinocitos, agentes estimuladores de la diferenciación de adipocitos, agentes inhibidores de la acetilcolinesterasa, agentes dermorelajantes, agentes estimuladores de la síntesis de glicosaminoglicanos, agentes antihiperqueratosis, agentes comedolíticos, agentes antipsoriasis, agentes reparadores del ADN, agentes protectores del ADN, estabilizantes, agentes antiprurito, agentes para el tratamiento y/o cuidado de pieles sensibles, agentes reafirmantes, agentes antiestrías, agentes astringentes, agentes reguladores de la producción de sebo, agentes lipolíticos o estimuladores de la lipólisis, agentes anticelulíticos, agentes antiperspirantes, agentes estimuladores de la cicatrización, agentes coadyuvantes de la cicatrización, agentes estimuladores de la reepitelización, agentes coadyuvantes de la reepitelización, factores de crecimiento de citoquinas, agentes calmantes, agentes antiinflamatorios y/o analgésicos, agentes anestésicos, agentes que actúen sobre la circulación capilar y/o la microcirculación, agentes estimuladores de la angiogénesis, agentes inhibidores de la permeabilidad vascular, agentes venotónicos, agentes que actúen sobre el metabolismo de las células, agentes destinados a mejorar la unión dermis-epidermis, agentes inductores del crecimiento del cabello, agentes inhibidores o retardantes del crecimiento del cabello, agentes retardantes de la caída del cabello, conservantes, perfumes, agentes quelantes, extractos vegetales, aceites esenciales, extractos marinos, agentes provenientes de un procedimiento de biofermentación, sales minerales, extractos celulares, filtros solares y agentes fotoprotectores de naturaleza orgánica o mineral activos contra los rayos ultravioleta A y/o B, o mezclas de ellos.

Dichos agentes antiarrugas y/o agentes antienvejecimiento se seleccionan del grupo formado por Acetil Hexapéptido-8, Acetil Heptapéptido-4, Acetil Octapéptido-3, Pentapéptido-18, Acetil Hexapéptido-25, Diaminopropionoil Tripéptido-33, Tripéptido-10 Citrulina, Acetil Tetrapéptido-5, Acetil Tripéptido-30 Citrulina, Acetil Tetrapéptido-30, Dimetilmetoxi Cromanol, Dimetilmetoxi Cromanil Palmitato, extracto del fermento de Pseudoalteromonas, antagonistas del canal de Ca^{2+}, retinol y sus derivados,

idebenona y sus derivados, Coenzima Q10 y sus derivados, ácido boswélico y sus derivados, GHK y sus derivados y/o sales, carnosina y sus derivados, enzimas reparadores del ADN, agonistas de canales de cloruro, la mezcla de Proteína de Trigo Hidrolizada, Proteína de Soja Hidrolizada y Tripéptido-1, la mezcla de Lisina HCl, Lecitina y Tripéptido-10 Citrulina y la mezcla de Extracto de Fermento de Pseudoalteromonas, Proteína de Trigo Hidrolizada, Proteína de Soja Hidrolizada, Tripéptido-10 Citrulina y Tripéptido-1.

En otra realización preferible dicho agente estimulador de la cicatrización y/o reepitelización o agente coadyuvante de la cicatrización y/o reepitelización se selecciona del grupo formado por extracto de fermento de Pseudoalteromonas y Tripéptido-10 Citrulina.

En otra realización más preferible, dicho adyuvante es de origen sintético o es un extracto vegetal o proviene de un procedimiento de biotecnológico o proviene de una combinación de un procedimiento sintético y un procedimiento biotecnológico.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1. La TFD induce proliferación celular en la región prominente del folículo piloso.

Se detectaron las células marcadas (Label Retaining Cells, LRCs) generadas mediante administración de inyecciones seriadas del análogo de timidina BrdU a ratones neonatos y posterior análisis a los 50 días, y cuantificaron por inmunofluorescencia en montajes “in toto” de epidermis de la cola de ratones adultos. Se observó un incremento significativo de LRCs en la región prominente del folículo piloso (FP) en telogén dos días después del tratamiento (TFD 2d) con respecto a los controles, lo que indica una estimulación de la proliferación de las células madre epidérmicas del FP en respuesta al tratamiento. Las barras indican el error típico. Barra de escala: 100 µm. ***: significativo, P<0,001.

Figura 2. La TFD induce cambios morfológicos transitorios en la piel.

A: En los cortes histológicos de piel dorsal del lomo se observó una hiperplasia transitoria en la epidermis a los dos días del estímulo fotodinámico, que revirtió seis

días después del mismo. Las regiones destacadas en los paneles superiores se muestran en detalle en los inferiores.

B: La fluorescencia de la eosina revela un incremento en la densidad de fibras de colágeno de la dermis observado 6 días después de la TFD. Tinción: H-E. Barra de escala: 20 µm.

Figura 3. La TFD induce el crecimiento del pelo.
A: Se rasuraron dos zonas independientes de la piel del dorso de los ratones y se aplicó tópicamente Metvix® sobre la región derecha, mientras que la izquierda, utilizada como control, se mantuvo sin tratar. Se comprobó la producción de PpIX en la región tratada con Metvix® (Día 0) mediante la emisión de fluorescencia roja bajo excitación con luz ultravioleta. Tras la TFD, se observó un crecimiento acelerado del pelo en la región de piel tratada con respecto a la control (Día 7 a 26).

B: Los cortes histológicos teñidos con H-E de muestras de piel dorsal obtenidas 26 días después del tratamiento mostraron el avance de la fase de anagén de los FPs en la piel tratada con TFD. Barra de escala: 100 µm.

Figura 4. La TFD provoca cambios en la expresión génica de la piel.
A: El análisis por PCR cuantitativa a tiempo real a partir de muestras de piel del lomo de ratones tratados y sus correspondientes controles mostró la inducción del mRNA de Prl2c3, que codifica la proliferina-2, dos días después de la aplicación de TFD-MAL.

B: Seis días después del tratamiento no se observaron cambios significativos en la expresión del mRNA Prl2c3. Para la normalización se utilizó como endógeno el RNA ribosómico 18S y la cuantificación relativa (RQ) se calculó en base al control. ***: significativo, P<0,001.

Figura 5. La TFD provoca cambios en la expresión y localización de proliferina-2 en la piel. La inmunofluorescencia en cortes histológicos de piel mostró un aumento de expresión de proliferina-2 en la epidermis tras la aplicación de TFD-MAL y una

novedosa localización nuclear de esta proteína como consecuencia del tratamiento. Barra de escala: 50 µm.

Figura 6. Inducción del crecimiento y expansión "in vitro" de células madre epidérmicas por Prlc3. Se aislaron células madre epidérmicas de piel de ratón y se crecieron en medio de cultivo condicionado conteniendo altas cantidades de Prl2c3 o en medio control. En estos cultivos se cuantificó a los siete días el número de colonias con un mínimo de cuatro células, indicador de actividad proliferativa sostenida. Los resultados indicaron un incremento significativo en el número de colonias en los cultivos de células madre epidérmicas tratados con medio de crecimiento condicionado por Prl2c3.

Modos de Realización Preferente

Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Animales de experimentación

Se emplearon ratones de la línea C57BL/6 neonatos de diez días de edad para los experimentos de marcaje de células madre epidérmicas, y adultos de 7 semanas para el resto de ensayos. Los animales empleados en cada experimento fueron hermanos de camada y las comparaciones se establecieron entre individuos del mismo sexo, para evitar diferencias atribuibles a este factor. Los experimentos se realizaron conforme a las normativas que regulan la manipulación y cuidado de los animales de laboratorio (Real Decreto 1201/2005).

Ejemplo 2: Aplicación de la terapia fotodinámica.

Se rasuró la piel del lomo de los ratones y se aplicó crema depilatoria (Veet®). Al día siguiente, se administró sobre la piel del lomo y de la cola el derivado metilado del ALA (MAL) en forma de crema comercial (Metvix®, Galderma) y se incubó en oscuridad durante 5 h, tras lo cual se eliminó el exceso de Metvix® lavando con PBS. La producción endógena de PpIX en la piel del lomo se comprobó por la emisión de fluorescencia roja característica de la PpIX bajo excitación con luz ultravioleta (UV) de 407 nm, utilizando una cámara digital provista de dos lámparas de dicha longitud de onda. A continuación, los animales fueron anestesiados mediante inyección

intraperitoneal (i.p.) de una solución 3:1 de Imalgene 500 (Merial) y Domtor (Pfizer) (50 µl/ratón; 0,864 mg de clorhidrato de ketamina y 0,005 mg de clorhidrato de medetomidina por cada 10 g de peso corporal). La irradiación con luz roja de 636 nm se realizó uniformemente sobre la superficie dorsal de la cola y el lomo durante 3,5 min, utilizando una lámpara de diodos de 36 J/cm2 (Aktilite®) situada a unos 5 cm del animal. Tras la exposición a luz roja, los animales recibieron una inyección subcutánea de Antisedan (Pfizer) 2:1 con respecto al volumen de Domtor administrado, y se mantuvieron sobre mantas térmicas hasta su total recuperación. Transcurrido el tiempo determinado por cada ensayo, los animales fueron sacrificados en cámara de CO_2 y la piel se procesó para los distintos análisis.

En el caso de los experimentos funcionales de inducción capilar, la piel del lomo se rasuró previamente en dos zonas separadas y se aplicó Metvix® únicamente en la región derecha, manteniendo la mitad izquierda como control.

Ejemplo 3: Marcaje de células madre epidérmicas identificadas como "Label Retaining Cells" (LRCs).

Las células madre epidérmicas se marcaron e identificaron según el protocolo de Braun (Braun el al, "Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis". Development. 130:5241-55, 2003). Los ratones neonatos recibieron una vez al día, durante cuatro días consecutivos, una inyección i.p. de 50 mg/Kg de peso corporal BrdU (Sigma-Aldrich) (80 µl de BrdU 6,25 mg/ml) en PBS, con el fin de marcar extensivamente el DNA en todas las células de la piel. Al cabo de 7 semanas, las células madre epidérmicas se identificaron en función de la baja tasa de replicación que las caracteriza como aquellas células capaces de retener la marca de BrdU ("Label Retaining Cells", LRCs) durante un período prolongado de tiempo debido a la replicación esporádica de su DNA. La identificación y cuantificación de LRCs después del tratamiento TFD-MAL se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia en montajes in toto de epidermis de la cola que se observaron en un microscopio confocal.

Ejemplo 4: Procesamiento de la piel, histología e inmunofluorescencia.

Inmediatamente después de sacrificar al animal, se separó la cola del cuerpo y se realizó una incisión con bisturí en la zona ventral de la misma, escindiéndose manualmente la piel en una única pieza. Ésta se incubó en 10 ml de EDTA 5 mM en PBS durante 6 h a 37ºC y, a continuación, se separó la epidermis de la dermis con ayuda de unas pinzas. Las muestras de epidermis se dividieron transversalmente en dos porciones: una se congeló a -80ºC para la extracción de RNA y la otra se fijó en formaldehído 3,7% en PBS durante 48 h a 4ºC, se lavaron en PBS y se almacenaron en PBS-azida sódica 0,02% para la preparación de montajes “in toto”.

Por otra parte, se extrajo la piel del lomo y se fijó en formaldehído 3,7% en PBS durante al menos 48 h a 4ºC. A continuación, se incluyeron en parafina siguiendo los protocolos habituales y se elaboraron secciones histológicas de 4 µm que fueron teñidas con hematoxilina-eosina (HE) o procesadas para inmunofluorescencia (IF), utilizando en este último caso portaobjetos tratados con poli L-lisina. Para los ensayos de IF, las secciones desparafinadas e hidratadas se permeabilizaron en Triton X-100 0,1% en PBS, se eliminó la autofluorescencia mediante incubación con NH4Cl 50 mM (10 min a temperatura ambiente) y se bloquearon en albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) 0,3% en PBS (1 h a temperatura ambiente). Las muestras bloqueadas se incubaron toda la noche a 4ºC con un anticuerpo policlonal (Santa Cruz Biotechnology) contra proteínas de la familia 2 de la prolactina (proliferinas), incluyendo la proliferina-2 (Prl2c3). Seguidamente se lavaron en PBS y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Por último, las muestras se lavaron en PBS y se montaron con Vectashield (Vector Labs) conteniendo 5 ng/ml de DAPI (Merck). Para la detección de LRCs mediante inmunofluorescencia en montajes in toto, las piezas de epidermis de la cola se incubaron con HCl 1 N (45 min a 37ºC) y con Tris-Borato-EDTA (5 min a temperatura ambiente), efectuando sendos lavados breves con agua destilada después de cada incubación. Posteriormente fueron permeabilizadas y bloqueadas en tampón PTG (0,5% Triton X-100, 0,2% gelatina en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente, tras lo cual se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-BrdU conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Roche), durante toda la noche a 37ºC. A continuación, se lavaron repetidamente en PBS y se montaron con Vectashield-DAPI. Las muestras de inmunofluorescencia se analizaron en un microscopio confocal espectral Leica TCS-SP2-AOBS, empleando

los láseres de excitación de 488 nm para el FITC, 633 nm para el Cy3 y UV para el DAPI. Las reconstrucciones tridimensionales se realizaron con ayuda del programa LCS Suite versión 2.61 (Leica) y posteriormente fueron procesadas con el programa Photoshop CS3 Extended versión 10.0.1 (Adobe). Las secciones histológicas teñidas con HE se analizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 acoplado a una cámara de captura digital Olympus DP50, utilizando campo claro y luz de excitación azul (filtro de excitación BP 460-490 y filtro de barrera BA 520IF).

Ejemplo 5: Extracción de RNA de Prl2c3, análisis de patrones de expresión génica a gran escala y qRT-PCR

La purificación de RNA de Prl2c3 a partir de la epidermis de la cola y de la piel del lomo se realizó mediante una extracción orgánica con TriPureTM Isolation Reagent (Roche) seguida de una purificación en columna (RNeasy Mini kit, QIAGEN). El tejido se disgregó con tijeras y se homogeneizó en TriPure con un Polytron (PT 1200 E, Kinematica). El homogeneizado se separó en fases en cloroformo:isoamílico (Merck) y el RNA de la fase acuosa se purificó por columna. La concentración y pureza del RNA (ratio A260:A280 ≥ 1,8) se determinaron mediante espectrofotometría (Nanodrop ND1000, Nanodrop Technologies). El análisis de expresión génica a gran escala se realizó mediante matrices (“arrays”) de Agilent Technologies (Agilent.SingleColor.14868). Los análisis de expresión por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se llevaron a cabo utilizando el sistema de Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR con SYBR Green.

Resultados:

Ejemplo 6: Inducción de proliferación de las células madre residentes en la región prominente del folículo piloso por el tratamiento TFD-MAL.

Para analizar el efecto del tratamiento TFD-MAL en la actividad de las células madre epidérmicas se utilizó como modelo el folículo piloso (FP), cuya región prominente constituye el principal reservorio de células madre de la piel. Las células madre se identificaron gracias a su baja tasa de proliferación característica, que permite la retención de una marca nuclear de BrdU durante un período de tiempo prolongado después de la administración seriada del análogo de nucleótido en edad neonatal, permitiendo identificarlas como LRCs (Braun et al, “Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in

wholemounts of mouse epidermis". Development. 130:5241-55, 2003; Cotsarelis et al, "Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis". Cell 61,1329-37, 1990). Como se muestra en la Fig.1, el análisis por inmunofluorescencia en montajes in toto de epidermis de la cola de ratones control y sometidos a TFD-MAL mostró un aumento significativo (P<0,001) del número de LRCs en la región prominente de los FPs.

Ejemplo 7: Inducción de hiperplasia transitoria en la epidermis e incremento en la densidad de fibras de colágeno en la dermis por el tratamiento TFD-MAL.

Los cambios morfológicos a gran escala producidos por TFD-MAL se caracterizaron en secciones histológicas de piel dorsal del lomo teñidas con HE. El análisis de estas secciones indicó que el tratamiento induce una hiperplasia transitoria en la epidermis, observándose la respuesta más evidente a los 2 días del tratamiento y revirtiendo a un estado normal 7 días después del mismo (Fig.2A). También se observaron cambios muy acentuados en la morfología de la dermis, que presentó un fuerte incremento en la densidad de fibras de colágeno 7 días después del tratamiento MAL-TFD, caracterizada como un aumento en la emisión fluorescente específica de la eosina al intercalarse en la fibras de colágeno (Espada et al. "Selective fluorescence of eosinophilic structures in grasshopper and mammalian testis stained with haematoxylin-eosin" Histochemistry 99:385-390, 1993) (Fig.2B).

Ejemplo 8: Aceleración del crecimiento del pelo por el tratamiento TFD-MAL.

Con el fin de analizar la dinámica de crecimiento del pelo en la piel sometida a TFD-MAL, se procedió a rasurar la piel del lomo de los ratones y se aplicó tópicamente Metvix® sobre la región dorsal derecha, manteniendo la izquierda como control, como se ha detallado en el Ejemplo 2. Transcurridas 5 horas de incubación en oscuridad se determinó la producción de PpIX mediante el análisis de la emisión fluorescente roja característica de este compuesto. Los resultados obtenidos mostraron que la producción de PpIX a partir de MAL en la epidermis tuvo lugar en presencia de Metvix®, como indicó la señal fluorescente observada bajo luz de excitación UV (Fig.3A, día 0). A continuación, se completó la TFD irradiando el lomo de los ratones con luz roja. La evolución observada en los días posteriores mostró un crecimiento del pelo notablemente acelerado en la mitad tratada con respecto a la

piel control (Fig.3A, días 7 a 26). Los cortes histológicos correspondientes a muestras de piel tomadas 26 días después de la TFD ponen de manifiesto el desarrollo alcanzado por los FPs (Fig.3B). Así, mientras que los FPs en la piel control se mantienen en reposo (telogén) y en ningún caso sobrepasan la dermis, en la piel tratada se aprecia el progreso de la fase de crecimiento (anagén) y la región del bulbo piloso llega a penetrar ampliamente en la capa subyacente a la dermis.

Ejemplo 9: Inducción específica del gen de la Prl2c3 por el tratamiento TFD-MAL.

Para determinar los cambios en el patrón de expresión génica inducidos en la piel por el tratamiento TFD-MAL, se llevó a cabo un análisis a gran escala en micromatrices ("arrays") de RNA utilizando mRNA obtenido a partir de la piel del lomo y de la epidermis de la cola. Mediante esta aproximación se identificó el producto del gen Prl2c3 como el mRNA cuya expresión se vio más fuertemente modificada en respuesta al tratamiento TFD-MAL, resultado que se validó por qRT-PCR (Fig.4). La inmunolocalización de la proteína Prl2c3 en cortes histológicos de piel dorsal mostró un patrón de baja intensidad y difuso en citoplasma en la epidermis de los animales control, mientras que se confirmó el incremento en los niveles de expresión tras el tratamiento, revelando una novedosa localización nuclear de esta proteína en los animales sometidos a TFD-MAL (Fig.5).

Ejemplo 10: Inducción del crecimiento y expansión *"in vitro"* de células madre epidérmicas por un medio de cultivo conteniendo altas cantidades de Prl2c3.

Se procedió, en primer lugar, al aislamiento del cDNA de Prl2c3 mediante RT-PCR, posterior clonaje en el vector de expresión pcDNA3.1A y transfección de este vector en células HEK293T. Mediante inmunoblot se comprobó que el medio de cultivo condicionado por el crecimiento de células transfectadas con el vector clonado contenía de media hasta 10 veces más proteína Prlc3 que un medio control de células transfectadas con el vector vacío. Posteriormente, se aislaron células madre epidérmicas a partir de piel de ratón según protocolos establecidos (Espada et al. "Nuclear envelope defects cause stem cell dysfuction in premature-aging mice" J. Cell Biol. 181:27, 35, 2008). Estos cultivos se trataron con medio condicionado. Los cultivos con medio condicionado mostraron un número significativamente mayor de

colonias de más de 4 células que los cultivos controles, tratados con medio de células transfectadas con el vector vacío (Fig. 6).

Reivindicaciones

1. Uso de protoporfirina IX, o su precursor, capaz de producir especies reactivas de oxígeno en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento por terapia fotodinámica de una enfermedad relacionada con las células madre epidérmicas en un sujeto.
2. Uso según la reivindicación 1, en que dicho precursor de protoporfirina IX es ácido 5-aminolevulínico o sus derivados químicos.
3. Uso según la reivindicación 2, en que dicho derivado químico del ácido 5-aminolevulínico es metilaminolevulinato.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que dicho sujeto es un mamífero.
5. Uso según la reivindicación 4, en que dicho mamífero es un humano.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que dicha enfermedad relacionada con las células madre epidérmicas es una dermatosis.
7. Uso según la reivindicación 6, en que dicha dermatosis es una enfermedad del colágeno.
8. Uso según la reivindicación 6, en que dicha dermatosis es una enfermedad del folículo piloso.
9. Uso según la reivindicación 8, en que dicha enfermedad del folículo piloso es alopecia.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en que dicho medicamento se administra por vía tópica.
11. Uso de protoporfirina IX, o su precursor, capaz de producir especies reactivas de oxígeno, y al menos otro agente terapéutico en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento por terapia fotodinámica de una enfermedad relacionada con las células madre epidérmicas en un sujeto.
12. Uso de protoporfirina IX, o su precursor, capaz de producir especies reactivas de oxígeno para la activación *"in vitro"* de células madre epidérmicas.
13. Uso de protoporfirina IX, o su precursor, capaz de producir especies reactivas de oxígeno para la producción *"in vitro"* de proteínas de la familia 2 de la prolactina.
14. Uso según la reivindicación 13, en que dicha proteína de la familia 2 de la prolactina es proliferina-2.

15. Uso de protoporfirina IX, o su precursor, capaz de producir especies reactivas de oxígeno para la generación de equivalentes cutáneos dermo-epidérmicos o epidérmicos.
16. Composición cosmética o farmacéutica que comprende una cantidad cosmética o farmacéuticamente eficaz de protoporfirina IX, o su precursor, y al menos un excipiente o adyuvante cosmética o farmacéuticamente aceptable.
17. Una composición según la reivindicación 16, caracterizada por que dicho precursor de protoporfirina IX es ácido 5-aminolevulínico o sus derivados químicos.
18. Una composición según la reivindicación 17, caracterizada por que dicho derivado del ácido 5-aminolevulínico es metilaminolevulinato.
19. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, caracterizada por que dicha protoporfirina IX, o su precursor, se encuentra incorporado a un sistema de vehiculización o a un sistema de liberación sostenida cosmética o farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo formado por liposomas, liposomas mixtos, oleosomas, niosomas, etosomas, milicápsulas, microcápsulas, nanocápsulas, esponjas, ciclodextrinas, vesículas, micelas, micelas mixtas de tensioactivos, micelas mixtas fosfolípido-tensioactivo, miliesferas, microesferas, nanoesferas, lipoesferas, microemulsiones, nanoemulsiones, minipartículas, milipartículas, micropartículas, nanopartículas, nanopartículas sólidas lipídicas y soportes lipídicos nanoestructurados.
20. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, caracterizada por que se presenta en una formulación seleccionada del grupo formado por cremas, emulsiones múltiples, composiciones anhidras, dispersiones acuosas, aceites, leches, bálsamos, espumas, lociones, geles, geles crema, soluciones hidroalcohólicas, soluciones hidroglicólicas, hidrogeles, linimentos, sueros, jabones, champús, acondicionadores, serums, ungüentos, mousses, pomadas, polvos, barras, lápices, vaporizadores, aerosoles, cápsulas, cápsulas de gelatina, cápsulas blandas, cápsulas duras, comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, formas granuladas, gomas de mascar, soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, films de polisacáridos, jaleas y gelatina.
21. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, caracterizada por que se encuentra incorporada a un producto seleccionado del

grupo formado por correctores de ojeras, fondos de maquillaje, lociones desmaquillantes, leches desmaquillantes, sombras de ojos, barras de labios, brillos labiales, protectores labiales y polvos.

22. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, caracterizada por que dicha protoporfirina IX, o su precursor, se encuentra incorporado en un tejido, un tejido-no-tejido o un producto sanitario.

23. Una composición según la reivindicación 22, caracterizada por que dicho tejido, tejido-no-tejido o producto sanitario se selecciona del grupo formado por vendas, gasas, camisetas, medias, calcetines, ropa interior, fajas, guantes, pañales, compresas, apósitos, cubrecamas, toallitas, parches adhesivos, parches no adhesivos, parches oclusivos, parches microeléctricos y mascarillas faciales.

24. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, caracterizada por que dicho adyuvante está seleccionado del grupo formado por proteínas de choque térmico, otros agentes estimuladores de la síntesis de las proteínas de choque térmico, inhibidores de la agregación de los receptores de acetilcolina, agentes inhibidores de la contracción muscular, agentes anticolinérgicos, agentes inhibidores de elastasa, agentes inhibidores de las metaloproteasas de matriz, agentes estimuladores o inhibidores de la síntesis de melanina, agentes blanqueantes o despigmentantes, agentes propigmentantes, agentes autobronceantes, agentes antienvejecimiento, agentes inhibidores de la NO-sintasa, agentes inhibidores de la 5α-reductasa, agentes inhibidores de lisil- y/o prolil-hidroxilasa, agentes antioxidantes, agentes capturadores de radicales libres y/o anticontaminación atmosférica, agentes capturadores de especies reactivas carbonilo, agentes antiglicación, agentes antihistamínicos, agentes antivirales, agentes antiparasitarios, agentes emulsionantes, emolientes, disolventes orgánicos, propelentes líquidos, acondicionadores de la piel, humectantes, sustancias que retienen la humedad, alfahidroxiácidos, betahidroxiácidos, hidratantes, enzimas epidérmicas hidrolíticas, vitaminas, aminoácidos, proteínas, pigmentos o colorantes, tintes, polímeros gelificantes, espesantes, tensioactivos, suavizantes, agentes antiarrugas, agentes capaces de disminuir o tratar las bolsas bajo los ojos, agentes exfoliantes, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, agentes fungistáticos, agentes bactericidas, agentes bacteriostáticos, agentes estimuladores de la síntesis de macromoléculas dérmicas o epidérmicas y/o capaces de inhibir o prevenir su

degradación, agentes estimuladores de la síntesis de colágeno, agentes estimuladores de la síntesis de elastina, agentes estimuladores de la síntesis de decorina, agentes estimuladores de la síntesis de laminina, agentes estimuladores de la síntesis de defensinas, agentes estimuladores de la síntesis de aquaporinas, agentes estimuladores de la síntesis de ácido hialurónico, agentes estimuladores de la síntesis de fibronectina, agentes estimuladores de la síntesis de sirtuínas, agentes estimuladores de la síntesis de lípidos y componentes del estrato córneo, ceramidas, ácidos grasos, agentes inhibidores de la degradación de colágeno, agentes inhibidores de la degradación de elastina, agentes inhibidores de proteasas de serina como catepsina G, agentes estimuladores de la proliferación de fibroblastos, agentes estimuladores de la proliferación de queratinocitos, agentes estimuladores de la proliferación de adipocitos, agentes estimuladores de la proliferación de melanocitos, agentes estimuladores de la diferenciación de queratinocitos, agentes estimuladores de la diferenciación de adipocitos, agentes inhibidores de la acetilcolinesterasa, agentes dermorelajantes, agentes estimuladores de la síntesis de glicosaminoglicanos, agentes antihiperqueratosis, agentes comedolíticos, agentes antipsoriasis, agentes reparadores del ADN, agentes protectores del ADN, estabilizantes, agentes antiprurito, agentes para el tratamiento y/o cuidado de pieles sensibles, agentes reafirmantes, agentes antiestrías, agentes astringentes, agentes reguladores de la producción de sebo, agentes lipolíticos o estimuladores de la lipólisis, agentes anticelulíticos, agentes antiperspirantes, agentes estimuladores de la cicatrización, agentes coadyuvantes de la cicatrización, agentes estimuladores de la reepitelización, agentes coadyuvantes de la reepitelización, factores de crecimiento de citoquinas, agentes calmantes, agentes antiinflamatorios y/o analgésicos, agentes anestésicos, agentes que actúen sobre la circulación capilar y/o la microcirculación, agentes estimuladores de la angiogénesis, agentes inhibidores de la permeabilidad vascular, agentes venotónicos, agentes que actúen sobre el metabolismo de las células, agentes destinados a mejorar la unión dermis-epidermis, agentes inductores del crecimiento del cabello, agentes inhibidores o retardantes del crecimiento del cabello, agentes retardantes de la caída del cabello, conservantes, perfumes, agentes quelantes, extractos vegetales, aceites esenciales, extractos marinos, agentes provenientes de un procedimiento de biofermentación, sales minerales,

extractos celulares, filtros solares y agentes fotoprotectores de naturaleza orgánica o mineral activos contra los rayos ultravioleta A y/o B, o mezclas de ellos.

25. Una composición según la reivindicación 24, caracterizada por que dicho adyuvante se selecciona del grupo formado por agentes antiarrugas y/o agentes antienvejecimiento.

26. Una composición según la reivindicación 25, caracterizada por que dichos agentes antiarrugas y/o agentes antienvejecimiento se seleccionan del grupo formado por Acetil Hexapéptido-8, Acetil Heptapéptido-4, Acetil Octapéptido-3, Pentapéptido-18, Acetil Hexapéptido-25, Diaminopropionoil Tripéptido-33, Tripéptido-10 Citrulina, Acetil Tetrapéptido-5, Acetil Tripéptido-30 Citrulina, Acetil Tetrapéptido-30, Dimetilmetoxi Cromanol, Dimetilmetoxi Cromanil Palmitato, extracto del fermento de Pseudoalteromonas, antagonistas del canal de Ca2+, retinol y sus derivados, idebenona y sus derivados, Coenzima Q10 y sus derivados, ácido boswélico y sus derivados, GHK y sus derivados y/o sales, carnosina y sus derivados, enzimas reparadores del ADN, agonistas de canales de cloruro, la mezcla de Proteína de Trigo Hidrolizada, Proteína de Soja Hidrolizada y Tripéptido-1, la mezcla de Lisina HCl, Lecitina y Tripéptido-10 Citrulina y la mezcla de Extracto de Fermento de Pseudoalteromonas, Proteína de Trigo Hidrolizada, Proteína de Soja Hidrolizada, Tripéptido-10 Citrulina y Tripéptido-1.

27. Una composición según la reivindicación 24, caracterizada por que dicho adyuvante se selecciona del grupo formado por agentes estimuladores de la cicatrización y/o reepitelización y agentes coadyuvantes de la cicatrización y/o reepitelización.

28. Una composición según la reivindicación 27, caracterizada por que dicho agente estimulador de la cicatrización y/o reepitelización o agente coadyuvante de la cicatrización y/o reepitelización se selecciona del grupo formado por extracto de fermento de Pseudoalteromonas y Tripéptido-10 Citrulina.

29. Una composición según la reivindicación 24, caracterizada por que dicho adyuvante se selecciona del grupo formado por agentes retardantes de la caída del cabello o inductores del crecimiento del cabello.

30. Una composición según la reivindicación 24, caracterizada por que dicho adyuvante se selecciona del grupo formado por filtros solares.

31. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 30, caracterizada por que dicho adyuvante es de origen sintético o es un extracto vegetal o proviene de un procedimiento de biotecnológico o proviene de una combinación de un procedimiento sintético y un procedimiento biotecnológico.

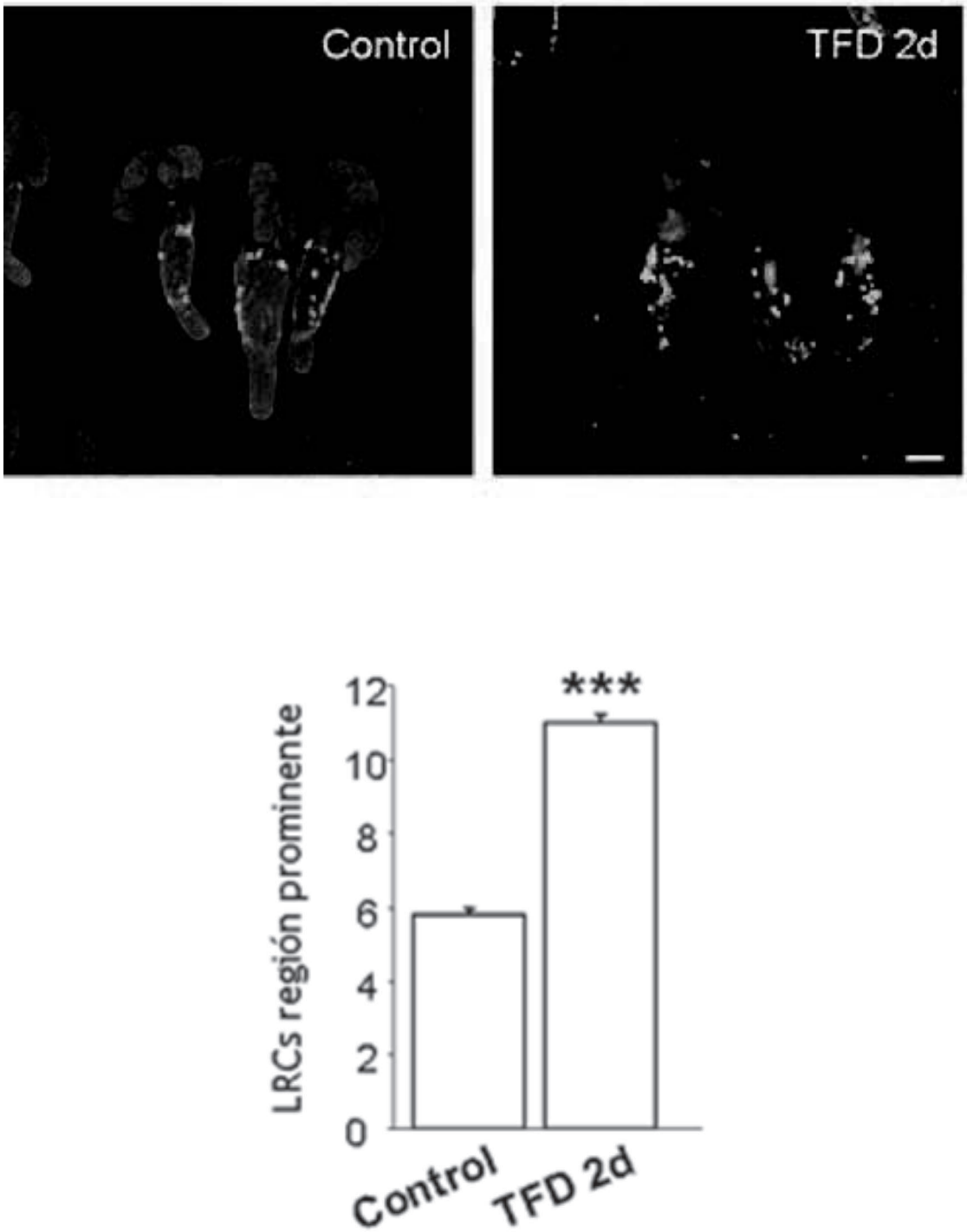
Control
TFD 2d
***
LRCs región prominente
12
10
8
6
4
2
0
Control
TFD 2d

Fig. 1

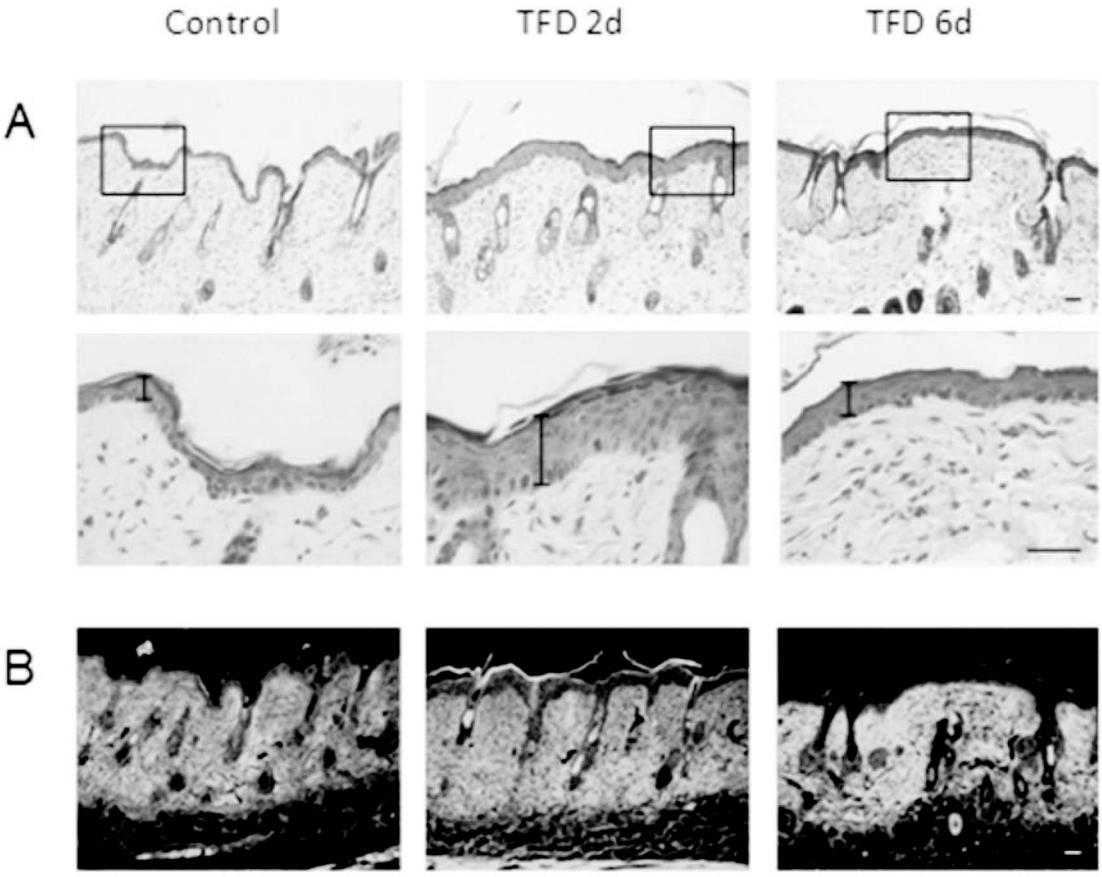

Fig. 2

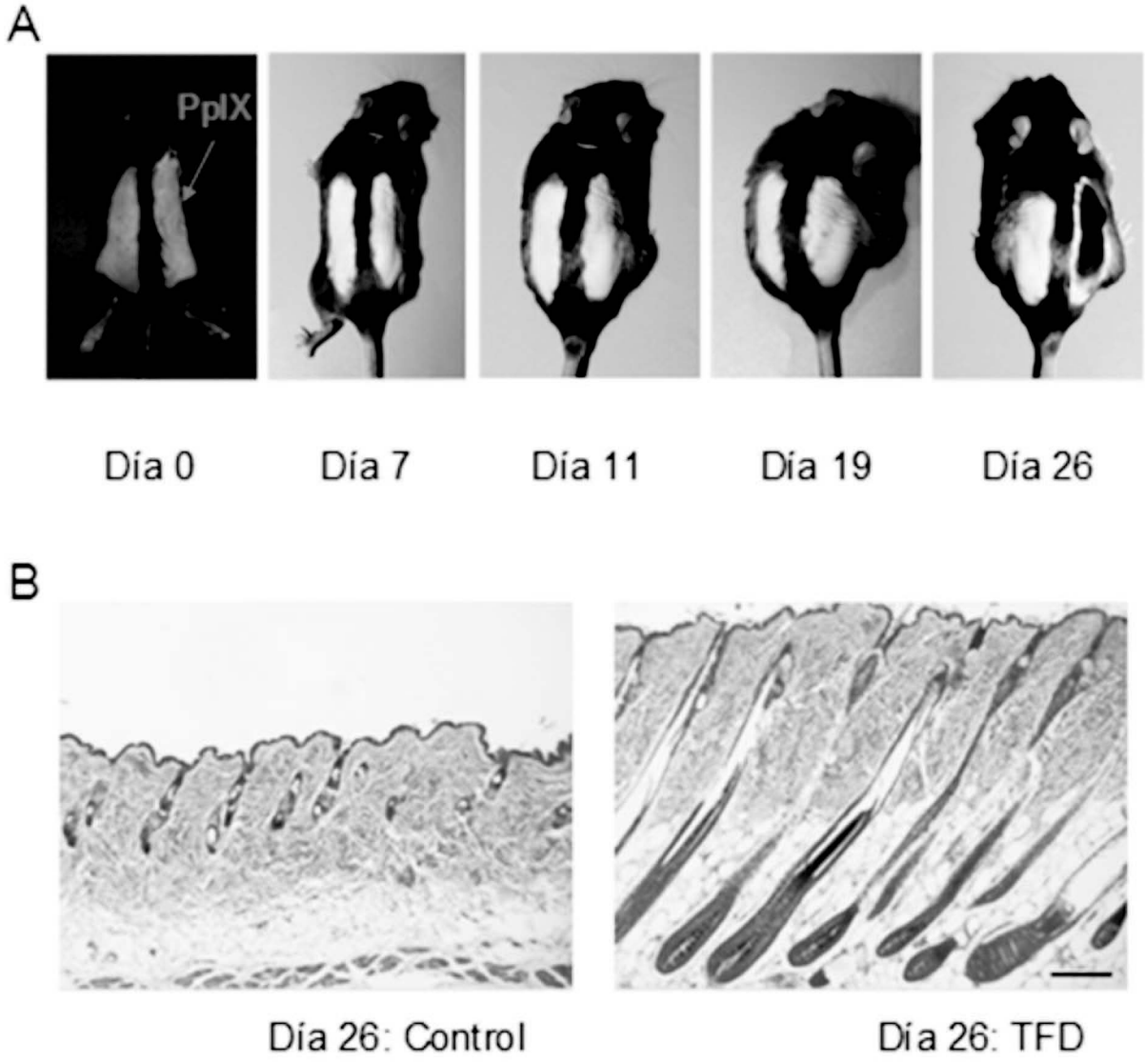

Fig. 3

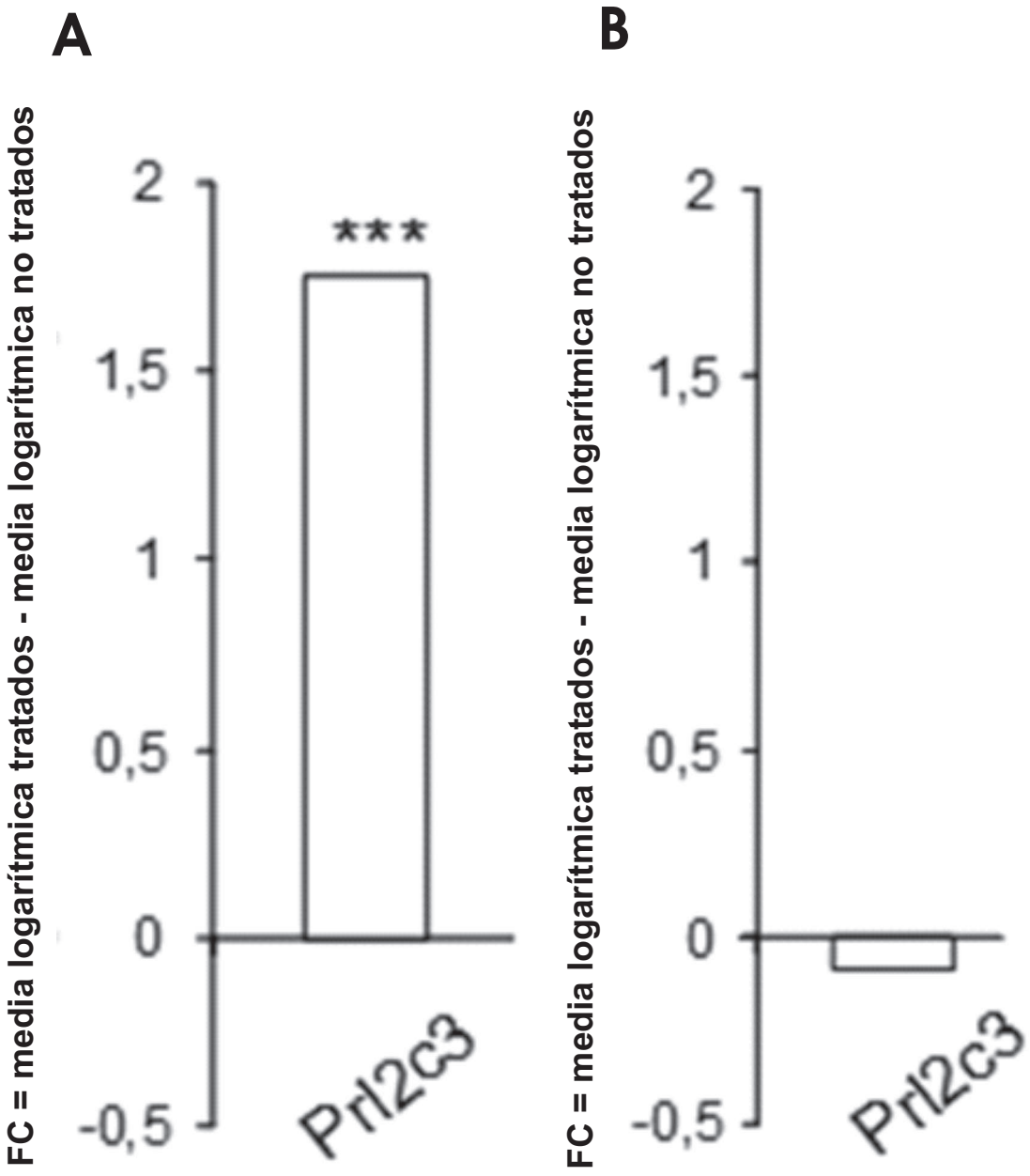
A
B
FC = media logarítmica tratados - media logarítmica no tratados
2
1,5
1
0,5
0
-0,5
***
Prl2c3
FC = media logarítmica tratados - media logarítmica no tratados
2
1,5
1
0,5
0
-0,5
Prl2c3

Fig. 4

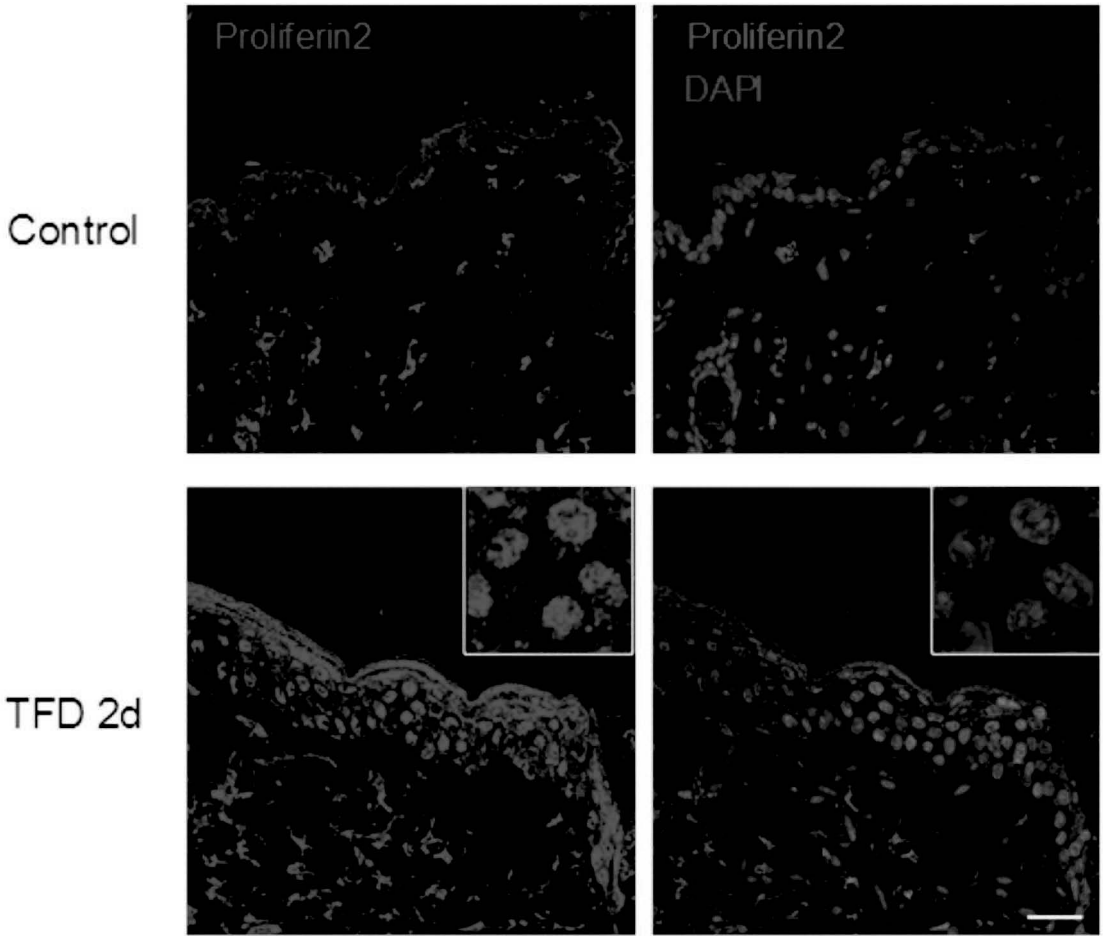

Fig. 5

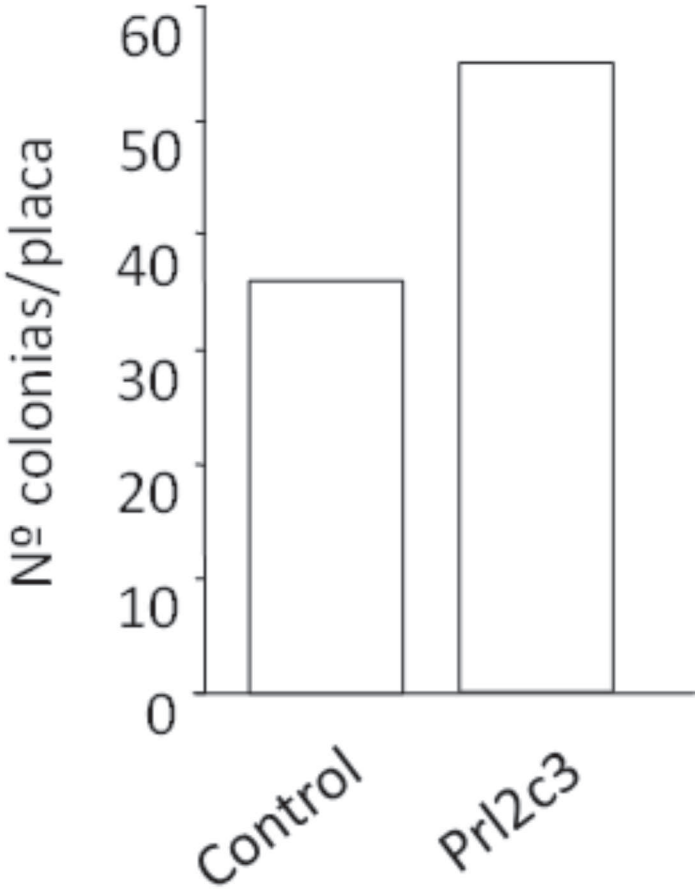

Fig. 6