

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 671**

51 Int. Cl.:

A61K 8/60 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2012** **PCT/FR2012/050860**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012** **WO12172220**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012** **E 12722443 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017** **EP 2699221**

54 Título: **Firma molecular de manchas pigmentarias cutáneas, asociada a la matriz extracelular**

30 Prioridad:

22.04.2011 FR 1153533

22.04.2011 FR 1153537

08.06.2011 US 201161494441 P

08.06.2011 US 201161494438 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
17.07.2017

73 Titular/es:

L'ORÉAL (100.0%)

14, rue Royale

75008 Paris, FR

72 Inventor/es:

BERNERD, FRANÇOISE;

DUVAL, CHRISTINE;

DE LACHARRIERE, OLIVIER;

NOUVEAU, STÉPHANIE y

MARAT, XAVIER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 624 671 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Firma molecular de manchas pigmentarias cutáneas, asociada a la matriz extracelular

- 5 La presente invención es en el campo cosmético, y es relativa a la piel. Está inscrita más generalmente en el marco de la caracterización de las manchas pigmentarias de la piel y del tratamiento de estas manchas.

10 El color de la piel es debido principalmente a la presencia de un pigmento, la melanina en la epidermis. La melanina es sintetizada por células dendríticas específicas localizadas en la capa basal de la epidermis, los melanocitos. La melanogénesis toma lugar en los organelos, los melanosomas, que, cargados de melanina, son transferidos a las células vecinas epidérmicas, los queratinocitos, a través de las dendritas. El color de la piel, o pigmentación constitutiva varía según los individuos en función de la cantidad de melanina producida así como de la naturaleza química de las melaninas. Las melaninas son macromoléculas formadas a partir de tirosina (eumelanina) o de tirosina y de cisteína (feomelanina). Los mecanismos de síntesis ponen en juego enzimas de las cuales las principales son la tirosinasa y la proteína asociada a la tirosinasa (Tyrp-1). Naturalmente, la pigmentación de la piel es estimulada por la exposición al sol, esto es, el fenómeno de bronceado.

20 Existen sin embargo situaciones en donde el proceso de pigmentación es alterado, y que pueden llegar a defectos de pigmentación, hipopigmentaciones, (vitíligo, albinismo) o a la inversa de un exceso de pigmentación, hiperpigmentaciones. Entre los desórdenes hiperpigmentarios benignos, caracterizados por una acumulación anormal (aparte del bronceado) de melanina, se puede citar el lentigo actínico, el melasma, las secuelas pigmentarias de acné, la pigmentación postinflamatoria, la dermatitis de los prados, la pigmentación relacionada con la planta venenosa hiedra o aún las discromías benignas del rostro.

25 El lentigo actínico, igualmente denominado lentigo senil o solar, mancha senil, mancha de envejecimiento, o aun comúnmente denominado "oscurecimiento senil", "margaritas de cementerio" o "flores de cementerio", es de lejos la más frecuente de las lesiones pigmentarias. Este tipo de lesiones aparece en zonas de la piel que han sido fotoexpuestas, tales como el rostro, el dorso de las manos, los miembros superiores y particularmente la cara dorsal de los antebrazos, la espalda, y en particular la parte alta de la espalda. Afectan en general a los individuos a partir de 40 años. Macroscópicamente, los lentigos actínicos son representados por máculas pigmentadas benignas de color marrón más o menos oscurecido, de las cuales los bordes son netos pero irregulares. De tamaño muy variable, pueden extenderse de algunos milímetros a más de dos centímetros. A pesar de su gran frecuencia, han sido publicados pocos estudios sobre la fisiología y la patogénesis de los lentigos actínicos. Sobre la base de los escasos estudios histológicos existentes, se sabe que existe un aumento de la carga melánica epidérmica global y más particularmente a nivel de la capa basal. Existe igualmente un alargamiento de las crestas epidérmicas que pueden tomar un aspecto contundente en la dermis papilar. [Montagna 1980, ber Rahman 1996, Andersen 1997, Cario-Andre 2004]. Finalmente, se puede tener anastomosis entre dos crestas adyacentes que dan un aspecto en punto o en red.

40 Puede existir igualmente en la dermis una incontinencia pigmentaria con presencia de melanina y de melanófagos.

Los tratamientos actuales:

45 Los problemas pigmentarios cutáneos benignos son generalmente considerados como antiestéticos.

Debido a la asociación probada entre la aparición de lentigos actínicos y la exposición crónica al sol, la prevención de su aparición pasa en general por la aplicación tópica de productos llamados fotoprotectores como las pantallas solares. En el caso de tratamientos "curativos", se han desarrollado por lo tanto numerosos procedimientos, principalmente con fines cosméticos, con el fin de intentar eliminarlos o reducir su presencia. La eliminación o la reducción de la presencia de estos problemas se basa, normalmente, en la aplicación de tratamientos despigmentantes, basados en la reducción de la actividad de síntesis de la melanina en los melanocitos. Las moléculas despigmentantes interfieren con uno o más de las etapas de la melanogénesis. Una de las formas de los principales productos utilizados hasta ahora se basa en la inhibición de la tirosinasa, una de las enzimas claves de los procesos de la melanogénesis. El objeto de estos tratamientos es disminuir, incluso detener, la síntesis de pigmento.

60 Las principales sustancias despigmentantes conocidas son la hidroquinona y sus derivados, el ácido kóyico, la arbutina, los iminofenoles, el ácido ascórbico y sus derivados, la asociación de carnitina y de quinona, los derivados de aminofenol, y los derivados de benzotiazol, extractos naturales, corticoides. Se encuentran a menudo también asociados a estos ingredientes activos exfoliantes que permiten aumentar la descamación, y así eliminar más fácilmente la melanina presente en el stratum corneum.

Otro método de tratamiento no cosmético consiste en destruir las lesiones por medios físicos o químicos utilizando láseres o descamadores. Sin embargo, estos son procedimientos demasiado rudos que no atacan la etiología del desorden. En la mayoría de los casos los lentigos actínicos reaparecen algún tiempo después del tratamiento.

Por otro lado, existen inconvenientes mayores a los tratamientos existentes. Las sustancias despigmentantes pueden presentar particularmente una cierta inestabilidad, una baja eficacia con baja concentración, una actividad biológica que afecta otras funciones, propiedades tóxicas o alergizantes.

- 5 Además debido a que no se dirigen a la causa profunda que ha ocasionado el desarreglo de la pigmentación, existe una gran heterogeneidad de respuesta a los diferentes tratamientos despigmentantes. Así, para un tratamiento dado, administrado por ejemplo de manera tópica, un problema pigmentario cutáneo benigno dado, como un lentigo actínico o un melasma, puede atenuarse o desaparecer, mientras que otro no evolucionará. Esta variabilidad puede ser observada entre lesiones en individuos diferentes pero también en un mismo individuo, entre diferentes lesiones.
- 10 Existen por lo tanto problemas pigmentarios cutáneos benignos para los cuales ningún tratamiento tópico es eficaz hasta ahora.

Existe por lo tanto una necesidad de encontrar tratamientos más eficaces y más inofensivos para este tipo de lesión.

- 15 Por esto, es necesario identificar las desregulaciones moleculares y las disfunciones funcionales que pueden existir en este tipo de desorden pigmentario con el fin de poder identificar nuevos objetivos y seleccionar los principios activos que corrigen estos defectos.

20 En el arte anterior, concerniente al tratamiento de las manchas pigmentarias y más particularmente los lentigos actínicos, se describe la estimulación a nivel genómico o proteínico de moléculas que están estrechamente asociadas a los melanocitos y a la melanogénesis (enzimas de la melanogénesis, proteína del melanosoma, factores paracrinos claves de la melanogénesis). Se encuentra en la epidermis o la dermis para las siguientes proteínas: Tirosinasa, TRP1, DCT, Pmel-17, POMC, ET1, ETBR, SCF, c-KIT, KGF, KGFR, Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF), MIA, TRPM1, Melan-A, Dilución de Ojo Rosa, P53 e IL1 α .

25 Por otra parte, otros estudios describen modificaciones moleculares o celulares en el lentigo solar o senil por análisis de la expresión de los genes o de las proteínas. Sin embargo, estos diferentes estudios no desprenden ningún mecanismo o disfunción funcional general que sustente la aparición de las manchas pigmentarias.

30 Ningún documento del arte anterior ha permitido poner en evidencia de manera fiable las desregulaciones moleculares o de las disfunciones funcionales que puedan existir en este tipo de desorden despigmentario, o más allá de las moléculas estrechamente asociadas a los melanocitos y la melanogénesis.

35 Los presentes inventores han puesto en evidencia por primera vez la implicación de los genes dérmicos unidos a la matriz extracelular y a la unión dermoepidérmica en los desarreglos pigmentarios que se traducen en manchas pigmentarias de la piel, y particularmente la implicación de los genes ligados a la ruta de señalización TGF-beta-SMAD.

40 La matriz extracelular asegura a nivel de la piel un papel estructural gracias a su capacidad para asegurar el soporte y la cohesión de los tejidos y las células y gracias a sus propiedades mecánicas que le permiten hacer resistencia a la tracción (particularmente debido a la presencia de colágenos), a la compresión (particularmente debido a la presencia de proteoglicanos).

45 La misma juega un papel biológico importante pues es también un actor principal de la regulación de la homeostasis epidérmica y dérmica. Gracias, entre otras, a sus propiedades de depósito de factores de crecimiento y de citoquinas, está implicada en la morfogénesis, la proliferación, la diferenciación celular, y la reparación de los tejidos.

50 La unión dermoepidérmica (JDE) en cuanto a sí misma es realizada por la membrana basal que está constituida de una hoja de matriz extracelular y que separa la epidermis de la dermis. Constituye una barrera de permeabilidad y regula los intercambios de moléculas, en particular de nutrientes, entre los dos tejidos. La misma asegura una función de adhesión y de anclaje de la epidermis a la matriz subyacente y de cohesión estructural del epitelio. La misma juega también un papel importante en la regulación de la diferenciación, y de la migración de las células epidérmicas así como de las etapas de morfogénesis de la epidermis.

55 El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) controla la proliferación, la diferenciación celular, y otras funciones en la mayor parte de las células. La misma juega un papel en la inmunidad, el cáncer.

60 Algunas células secretan los TGF- β , y tienen también receptores para el TGF- β . Los Smad comprenden la ruta de señalización de TGF- β . Permiten la transducción de la señal cuando el TGF- β se une a los receptores de membrana. Las respuestas celulares inducidas por esta ruta pueden variar para un mismo tipo celular según el contexto celular. Es un sistema de señalización muy dinámico.

65 En la ruta canónica, el TGF- β se une a un receptor de membrana de tipo II que forma un complejo bidérmico con un segundo receptor de tipo I. Un receptor de tipo III (betaglicano) ayuda a este proceso de unión captando TGF- β y presentándolo al complejo receptor bidérmico. El receptor de tipo II, unido a TGF- β , fosforila el receptor de tipo I que propaga la señal fosforilando a su vez las proteínas citosólicas, los Smad (Smad 2 y 3). Los Smad regulados por el

receptor de tipo I (R-Smad) se unen entonces a un Smad común, Smad 4 para componer un complejo activado. Este complejo entra en el núcleo celular en donde actúa como factor de transcripción de múltiples genes, y conduce a una respuesta de activación o de represión.

- 5 Los receptores de tipo I específicos, activados por otros ligandos tales como diversas BMP (proteínas morfogénicas óseas) activan la ruta de señalización por medio de otros Smad (1, 5, 8).

De una manera general, la activación de la ruta conduce también a la estimulación de Smad inhibidores tales como los Smad 6 y 7 que aseguran un retrocontrol negativo.

- 10 Entre los genes diana de la ruta TGF-beta, figuran numerosos genes que codifican para moléculas de la matriz extracelular, entre ellos, por ejemplo los colágenos, elastina, fibronectina, las trombospondinas que aseguran principalmente un papel de estructura, y simultáneamente, para proteínas de remodelación de matrices que participan en la renovación y en la degradación de las moléculas de la matriz.

- 15 Esta ruta tiene también una acción estimuladora o inhibidora en la producción de numerosos factores de crecimiento y de citoquinas por las células dérmicas.

- 20 Por primera vez, se ha mostrado por los presentes inventores que algunos genes unidos a la matriz extracelular o a la unión dermoepidérmica y particularmente a la ruta de señalización TGF- β -SMAD, tienen niveles de transcripción significativamente diferentes entre la piel sana y la piel proveniente de una macha pigmentaria, poniendo así en evidencia la unión entre la desregulación en el interior de la matriz extracelular y de la unión dermoepidérmica, particularmente la desregulación de la señalización de TGF- β -SMAD, y la modulación de la pigmentación que inducen particularmente la aparición de manchas pigmentarias.

- 25 Se puede pensar que el aumento y la disminución de ciertas proteínas implicadas en estas diferentes rutas, sean dependientes de TGF- β , sean de los BMP, pueden conducir a una señalización acrecentada y/o aberrante que pueden perturbar la homeostasis térmica, de las uniones y repercutir globalmente a nivel epidérmico.

- 30 Sin limitarse por lo tanto por una teoría cualquiera, las modificaciones de expresión de diferentes genes unidos a esta matriz extracelular y a la unión dermoepidérmica han conducido a los inventores a pensar que, debido al papel jugado por las proteínas de la matriz y de la unión dermoepidérmica, la desregulación de estos genes, signo de una modificación de todo el compartimiento dérmico, perturba la homeostasis de la epidermis y genera modificaciones importantes en particular de la arquitectura histológica de la epidermis en las manchas pigmentarias (elongación de las crestas epidérmicas en la dermis por ejemplo). En consecuencia, la carga melánica epidérmica se aumenta y da lugar a las manchas pigmentarias.

- 35 Se describe una firma molecular representativa de las diferencias de expresión génica existente entre la piel proveniente de mancha pigmentaria y la piel sana adyacente, y a las diferentes aplicaciones y métodos que hacen uso del conocimiento de esta firma, particularmente para modular la pigmentación de la piel, en el tratamiento cosmético de las machas pigmentarias o para uniformizar la tez u homogenizar el color de la piel.

- 40 Esta firma está constituida de los siguientes genes: TGFBR2 (receptor II del factor de crecimiento transformante beta [70/80 kDa]), TGFBI (factor de crecimiento transformante beta inducido, 68 kDa), BMP2 (proteína morfogénica ósea 2), SMAD3 (miembro 3 de la familia SMAD), THBS2 (trombospondina 2), TGFBR3 (receptor III del factor de crecimiento transformante), SEMA5A (dominio sema, 7 repeticiones trombospondina, semaforina 5A), SMAD7 (miembro 7 de la familia SMAD), SOSTDC1 (proteína 1 que contiene un dominio para esclerostina), FRAS1 (síndrome 1 de Fraser), LEPREL1 (1 similar a leprecan), MATN2 (matrilina 2), DST (Distonina, conocida igualmente bajo el nombre de BPAG1 PLOD2 (procolágeno-lisina, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2), ITGA2 (integrina alfa 2 (CD49B, subunidad alfa 2 del receptor VLA-2)), COL6A3 (colágeno de tipo 6, alfa 3), CRTAP (proteína asociada al cartílago igualmente conocida bajo el nombre de LEPREL3), LAMC1 (laminina gamma 1, antiguamente LAMB2), LAMB3 (laminina beta 3), LAMA3 (laminina alfa 3), ITGAV (integrina alfa V (receptor vitronectina)), ITGB1 (integrina beta 1) y ACTN1 (actinina alfa 1). El gen ITGB1 puede ser excluido de esta lista. El gen SEMA5A y/o el gen ITGB1 pueden ser excluidos de esta lista.

- 55 Estos genes pueden ser reagrupados funcionalmente de la siguiente manera:

- Lista A: Genes que codifican para los factores implicados en la activación de la ruta de señalización TGF-beta-SMAD: TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, el gen SEMA5A que puede sin embargo ser excluido de esta lista A, y

- Lista B, que reagrupa los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1. El gen ITGB1 está eventualmente excluido de esta lista B. Entre la lista B, en los agrupamientos funcionales siguientes pueden ser efectuados:

- 65 - genes que codifican para colágenos, compuestos de la matriz extracelular, y más particularmente los colágenos

filamentosos del estroma o para moléculas asociadas a la biosíntesis y al ensamblaje de los colágenos: LEPREL1, PLOD2, COL6A3 y CRTAP;

- genes que codifican para lamininas, proteínas adhesivas de la matriz extracelular: LAMC1, LAMB3 y LAMA3;

- genes que codifican para proteínas de matriz asociadas a la zona de la membrana basal: FRAS1, MATN2 y DST;

- genes que codifican para las integrinas implicadas en la unión de las células a la matriz extracelular: ITGA2 e ITGAV, con eventualmente ITGB1; y

- gen que codifica para una actina, compuesto de la matriz extracelular: ACTN1.

Los genes preferidos del interior de los genes dérmicos TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, que constituyen la lista A, son los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 y TGFBR3.

Los genes preferidos al interior de los genes dérmicos FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, que constituyen la lista B, son los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 y ITGA2.

Los dichos genes se extienden a partir de los genes humanos denominados así.

La lista de los genes A y B están por otro lado ligadas por el número de interacciones conocidos entre los diversos genes que constituyen estas listas. Estas uniones pueden particularmente ser puestas en evidencia por una red de interacciones tal como generadas por ejemplo por el programa informativo IPA (Análisis de Ruta de Ingenuidad) que, a partir de datos bibliográficos, permite mostrar las diferentes uniones directas o indirectas existentes entre genes o proteínas. Una red de interacción generada por este programa informático IPA ha mostrado en efecto una unión, directa o indirecta, entre los genes y/o proteínas TGFBR2, TGFBR3, SMAD3, SMAD7, BMP2, THBS2 (lista A) y MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, LAMC1, LAMB3, ITGAV, ITGB1, ACTN1 (lista B).

Por otro lado, diferentes referencias bibliográficas ilustran igualmente las interacciones directas entre los genes mencionados en la lista A y los mencionados en la lista B, que concretizan así la unión funcional uniendo estas dos familias, particularmente entre los genes SMAD3 y COL6A3 (Verrecchia et al, 2001), entre los genes TGFBR2, THBS2 y COL6A3 (Berkling et al, 2001) y entre SMAD3 y LAMC1 (Kawata et al, 2002), a título ilustrativo.

Los inventores han puesto en efecto en evidencia la modulación significativa y reproducible del nivel de expresión de los genes de las listas A y B entre la piel proveniente de la mancha pigmentaria y de la piel sana correspondiente.

Por otro lado, la modulación de los genes de la lista A, implicados en la ruta de señalización TGF- β al interior de manchas hiperpigmentarias tiende al aumento de la señalización TGF- β -SMAD. Las modulaciones observadas para los genes de la lista A ponen por lo tanto en evidencia la unión entre la activación/estimulación de la ruta de señalización TGF- β -SMAD y aumento de la pigmentación, como es verificado por los inventores en el presente ejemplo 4.

Según un primer aspecto se describe un método de caracterización de una mancha pigmentaria cutánea. La presente invención se relaciona con un método de caracterización de una mancha pigmentaria de tipo lentigo actínico tal como se define en la reivindicación 1.

Un tal método permite entre otros confirmar la naturaleza de la mancha pigmentaria en el caso en donde esta última es ya evidente, por ejemplo visualmente a simple vista. El método permite igualmente predecir la aparición de una mancha, cuando esta última no es aún observada sino únicamente supuesta, o bien concluir que una piel se inclina a la formación de manchas cutáneas o está sujeta a defectos de pigmentación, por ejemplo cuando ninguna mancha es aún evidente.

Las manchas pigmentarias cutáneas concernientes son manchas hiperpigmentarias, o aun llamadas hiperpigmentadas, correspondientes a un exceso de pigmento, o bien manchas hipopigmentarias, o aun hipopigmentadas, correspondientes a los defectos de pigmentación. Las hipopigmentaciones son particularmente el vitíligo y el albinismo. Estos desórdenes hiperpigmentarios benignos caracterizados por una acumulación anormal (aparte del bronceado) de melanina, son por ejemplo el lentigo actínico, el melasma, las secuelas pigmentarias de acné, la pigmentación postinflamatoria, la dermatitis de los prados, la pigmentación ligada a la planta venenosa hiedra e incluso las discromías benignas del rostro. Las manchas pigmentarias engloban igualmente los defectos, imperfecciones o irregularidades de pigmentación que hacen la tinción no uniforme, o el color de la piel no homogéneo.

Las manchas pigmentarias en cuestión son preferencialmente manchas pigmentarias de la piel humana. Sin embargo, siendo totalmente generales los desórdenes a nivel de la matriz extracelular y de la ruta de señalización

TGF- β -SMAD en la dermis puesta en evidencia por los presentes inventores, pueden preverse métodos similares para otras especies animales afectadas igualmente por las manchas pigmentarias. En este caso, los diferentes métodos, utilizaciones o composiciones serán utilizados con los genes de la especie considerada, ortólogos a los genes humanos mencionados anteriormente.

Los métodos comprenden la comparación de los niveles de expresión en el interior de la piel proveniente de la dicha mancha y el interior de la piel no lesionada, preferiblemente adyacente, del mismo individuo, de al menos un gen dérmico unido a la matriz extracelular escogida entre la lista constituida de los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1. Alternativamente, el gen dérmico puede ser escogido entre la lista A constituido de genes unidos a la ruta de señalización TGF- β -SMAD; o bien entre la lista B constituida de los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV y ACTN1. Según algunas utilizaciones SEMA5A es excluida de estas listas. Puede alternativa o adicionalmente ser el mismo para el gen ITGB1. Los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1 que comparten un rol en la estructura ITGAV, ITGB1 y ACTN1 que comparten un rol en la estructura o la renovación de la matriz extracelular, particularmente se trata de genes implicados en la activación de la ruta de señalización TGF- β -SMAD, o genes que codifican para los compuestos de la matriz extracelular o genes que codifican para las proteínas implicadas en la síntesis de los compuestos de esta matriz, o bien unidos a la renovación de esta matriz conjuntiva o aun de genes que codifican para proteínas de matriz asociadas a la unión dermoepidérmica y a la zona de la membrana basal.

Por otro lado, los dichos genes son llamados genes dérmicos debido a que se trata de genes expresados principalmente en la dermis y que dan lugar a proteínas características del compartimiento dérmico o bien de la unión dermoepidérmica en cuanto a su cara dérmica; y esto por oposición por ejemplo a las proteínas queratinocitarias, proteínas intracelulares o proteínas epidérmicas particularmente, tales como las proteínas expresadas preferentemente en el stratum corneum.

Los niveles de expresión de uno al menos de los genes son medidos a nivel de la piel proveniente de la mancha probada o supuesta, y a nivel de la piel adyacente no lesionada. Preferiblemente, los niveles son medidos en muestras de piel prelavadas al interior de la mancha y al interior de una zona adyacente no lesionada. Las muestras son por ejemplo de biopsias de piel. Son suficientes biopsias de algunos milímetros de diámetro, por ejemplo una biopsia de 2 mm, o bien 3 mm de diámetro. Se puede considerar igualmente la escisión total de una lesión.

Los niveles de expresión de los genes de la invención se extienden desde los niveles de expresión al interior de las células de la dermis de la piel o de la muestra en estudio.

La zona no lesionada es preferiblemente una zona adyacente tan cercana como sea posible de la mancha pero con una distancia suficiente para que la zona o la muestra recogida no contenga ninguna célula susceptible de pertenecer a la mancha pigmentaria. Preferiblemente, la zona adyacente no lesionada es una zona que tiene una exposición a la luz y al sol comparable a la zona de la mancha pigmentaria. Alternativamente, la zona no lesionada puede provenir de una zona simétrica sobre la otra parte del sujeto, que tiene un emplazamiento perfectamente idéntico; por ejemplo en el caso de una mancha en la mano izquierda, la zona no lesionada puede ser la zona correspondiente en la mano derecha. En este caso, la zona no lesionada no es una zona adyacente propiamente dicha. Por no lesionada, se entiende una zona que no posee mancha pigmentaria, ni irregularidad pigmentaria, preferiblemente una zona homogénea en términos de pigmentación.

Debido a que la zona no lesionada sirve de referencia, en todos los casos también debe ser comparable tanto como sea posible a la zona de la mancha, pero desprovista de defecto pigmentario.

Por nivel de expresión de un gen, se entiende preferiblemente, en la presente descripción, el nivel de transcripción del dicho gen. Sin embargo, su nivel de expresión puede igualmente traducirse por su nivel de traducción, al suponer sin embargo que se trata de un gen que codifica para una proteína. Tal es el caso para los genes de la invención.

Con relación a la evaluación del nivel de transcripción del gen seleccionado, puede ser realizada por diferentes maneras bien conocidas del experto en el arte, directamente o bien después de la transcripción inversa. El nivel de transcripción puede ser evaluado particularmente por la utilización de kits de ARN o chips de ADN vendidos en el comercio para este efecto. Un método de evaluación posible se describe en la parte experimental.

Es importante resaltar igualmente que el método según la invención implica la comparación de los niveles de expresión de al menos uno de los genes de la lista A o de la lista B. Por este hecho, puede ser suficiente evaluar cuantitativamente o cualitativamente la diferencia entre los dos niveles de expresión, sin por lo tanto evaluar y cuantificar individualmente cada uno de los niveles de expresión.

Los niveles de expresión de al menos uno de los dichos genes pueden ser evaluados por referencia o después de la normalización con el nivel de expresión de otros genes, de los cuales el nivel de expresión se supone sensiblemente

idéntico al interior de la mancha y en la zona escogida de piel no lesionada. Tales genes para la normalización son bien conocidos del experto en el arte y pueden depender de la zona del cuerpo en donde se encuentra la mancha. A título de ejemplo, los siguientes genes pueden ser citados como susceptibles de servir a la normalización de los niveles de expresión de los genes descritos, que codifican para:

La proteína ribosómica L13a (RPL13A), la beta-2-microglobulina (B2M), la proteína ribosómica S9 (RPS9), la proteína ribosómica S28 (RPS28) y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

El método según la invención se practica *in vitro* o bien *ex vivo*.

Según un modo de realización del método de la invención, la mancha pigmentaria es una mancha no patológica, benigna, particularmente por oposición a las lesiones patológicas tales como los nevus; puede tratarse de una irregularidad en la pigmentación de la piel.

Preferiblemente, un método tal como se describe comprende la comparación de los niveles de expresión de al menos dos genes distintos entre los genes descritos, preferiblemente de al menos tres genes distintos, incluso cinco genes distintos. Es igualmente considerable comparar los niveles de expresión de al menos 6 genes, incluso de al menos 8 genes distintos o bien de 10, 12, 15, 20 o bien de todos los genes descritos.

Según una utilización, los genes distintos se escogen en entre de los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, o bien entre TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SMAD7 y SOSTDC1.

Cuando se seleccionan dos genes, son seleccionados preferiblemente entre las listas de los 6 genes preferidos siguientes: TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 y TGFBR3. Por ejemplo, los genes seleccionados pueden ser TGFBR2 y TGFBI, o bien TGFBR2 y BMP2, o bien TGFBI y BMP2, o bien TGFBR2 y TGFBR3. Todas las combinaciones dos a dos, entre los 6 genes preferidos, son combinaciones preferenciales para la utilización de la invención. Incluso todas las combinaciones implican uno de los 6 genes preferidos y uno de los otros genes de la lista A, son preferidas particularmente.

Para las combinaciones de 3 genes, están particularmente previstas las siguientes combinaciones: TGFBR2, TGFBI y BMP2; TGFBR2, TGFBI y SMAD3; TGFBR2, TGFBI y TGFBR3; SMAD3, SEMA5A y SMAD7; TGFBR2, MP2 y SOSTDC1; y TGFBI, BMP2 y SMAD3. Las combinaciones de 5 genes previsibles según la presente invención son particularmente las siguientes combinaciones: TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3 y THBS2; TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3 y TGFBR3; y TGFBR2, TGFBI, BMP2, THBS2 y TGFBR3.

Una combinación particular es la que comprende los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A y SMAD7, que tienen como punto común ser modulados de la misma manera, particularmente de ser sobreexpresados en el interior de manchas hiperpigmentarias, y de estar implicados en la ruta de señalización TGF-beta-SMAD. Otras combinaciones son igualmente previsibles en el interior de la presente invención, particularmente las combinaciones que comprenden al menos un gen entre TGFBR2, TGFBI, THBS2 y TGFBR3; y al menos un gen entre SMAD3, SEMA5A y SMAD7.

Los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1 tienen como punto común pertenecer a la ruta de señalización TGF-β-SMAD y ser modulados de manera cooperativa a nivel de manchas pigmentarias, es decir que los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A y SMAD7, que están positivamente implicados en esta ruta de señalización están todos modulados en el mismo sentido y están modulados en el sentido inverso de los genes SOSTDC1 que es un antagonista de BMP y por lo tanto negativamente implicado en esta ruta de señalización.

Según otro empleo, los distintos genes son seleccionados en el interior de los genes de la lista B, o bien entre la lista de 6 genes preferidos siguientes: FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 y ITGA2. Por ejemplo, los genes seleccionados pueden ser FRAS1 y LEPREL1, o bien FRAS1 y MATN2, o bien LEPREL1 y MATN2, o bien DST y PLOD2. Todas las combinaciones dos a dos, entre los 6 genes preferidos FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 e ITGA2, son combinaciones preferenciales para el empleo de la invención.

Igualmente, todas las combinaciones que implican uno de los 6 genes preferidos y uno de los otros genes de la lista B son preferidas particularmente.

Para las combinaciones de 3 genes, están particularmente previstas las siguientes combinaciones: FRAS1, LEPREL1 y MATN2; FRAS1, LEPREL1 y DST; FRAS1, LEPREL1 y PLOD2; FRAS1, MATN2, y PLOD2; LEPREL1, MATN2 y PLOD2.

Las combinaciones de 5 genes previsibles según la presente invención son particularmente las combinaciones siguientes: FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST y PLOD2; FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST y ITGA2; FRAS1, LEPREL1, MATN2, PLOD2 e ITGA2.

Una combinación particular es la constituida con los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV y ACTN1, que tienen como punto común, ser modulados de la misma manera, particularmente ser sobreexpresados en el interior de manchas hiperpigmentarias.

Otras combinaciones son igualmente previsibles, particularmente combinaciones que comprenden al menos un gen entre los que pertenecen a la familia de los colágenos, es decir entre LEPREL1, PLOD2, COL6A3 y CRTAP; al menos un gen entre los que pertenecen a la familia de las lamininas, es decir entre LAMC1, LAMB3 y LAMA3; al menos un gen entre los que codifican para proteínas de matriz asociadas a la zona de la membrana basal, es decir entre FRAS1, MATN2 y DST; al menos un gen de la familia de las integrinas, es decir entre ITGA2 y ITGAV, y eventualmente ITGB1; y el gen ACTN1.

Alternativamente, según un empleo preferido de la invención, el gen cuyo nivel de expresión es comparado entre la piel lesionada y la piel sana, preferiblemente adyacente, se selecciona entre el subgrupo constituido de los genes LEPREL1, PLOD2, COL6A3 y CRTAP. En efecto, estos genes tienen como punto común, pertenecer a la familia de los colágenos, particularmente a la familia de los colágenos fibrilares del estroma.

Otras combinaciones son igualmente previsibles dentro de la presente invención, particularmente las combinaciones que comprenden al menos un gen entre FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV y ACTN1; y el gen PLOD2.

Se prevén otras combinaciones, particularmente combinaciones que comprenden al menos un gen entre los implicados en la ruta de señalización TGF-beta-SMAD, es decir entre la lista A y al menos un gen entre la lista B, y preferiblemente entre FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 e ITGA2. Por ejemplo, una combinación prevista es la constituida de al menos dos genes entre TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV y ACTN1 que tiene como punto común ser expresado dentro de manchas hiperpigmentarias.

Otras combinaciones son particularmente combinaciones de 2 genes, uno proveniente de la lista A, y el otro proveniente de la lista B, combinaciones de 3 genes de los cuales dos en la lista A y uno en la lista B, o a la inversa; las combinaciones de 4 genes con 2 en cada una de las listas, o bien tres en la lista A y en la lista B o a la inversa.

Una combinación de 2 genes particularmente preferida es la combinación de genes TGFB2 y MATN2. Las combinaciones de 3 genes preferidos son particularmente la combinación TGFB2, BMP2 y MATN2 y la combinación TGFB2, MATN2 y LEPREL1. Las combinaciones de 4 genes preferidos son particularmente la combinación TGFB2, BMP2, SMAD3 y MATN2; la combinación TGFB2, MATN2, LEPREL1 y PLOD2; y la combinación TGFB2, BMP2, MATN2 y LEPREL1.

Todas las combinaciones o subgrupos de genes específicos preferidas en relación con este aspecto de la descripción son igualmente preferidas para los otros aspectos de la descripción.

La utilización del método descrito conduce a la conclusión que la mancha supuesta u observada es una mancha hiperpigmentaria si el nivel de expresión es

- superior en la piel proveniente de la mancha, o en la muestra de piel proveniente de la mancha, con respecto al nivel en la piel adyacente no lesionada, o en la muestra de piel adyacente no lesionada, si el gen se escoge entre TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, y

- inferior en la piel proveniente de la mancha o en la muestra de la piel proveniente de la mancha, con respecto al nivel en la piel adyacente no lesionada, o en la muestra de piel adyacente no lesionada, si el gen se escoge entre OSTDC1 y PLOD2.

En efecto, los presentes inventores han puesto en evidencia la sobreexpresión de los genes TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1 en la piel proveniente de la mancha hiperpigmentaria, particularmente de lentigo actínico, con relación al nivel de expresión en la piel adyacente no lesionada. Han puesto igualmente en evidencia la sobreexpresión de los genes OSTDC1 y PLOD2 en la piel proveniente de mancha hiperpigmentaria, particularmente de lentigo actínico, con respecto al nivel de expresión en la piel adyacente no lesionada.

A la inversa, la utilización del método descrito conduce a la conclusión de que la muestra supuesta u observada es una mancha hiperpigmentaria si el nivel de expresión es:

- inferior en la piel proveniente de la mancha, o en la muestra de piel proveniente de la mancha, con respecto al nivel en la piel adyacente no lesionada, o en la muestra de piel adyacente no lesionada, si el gen se escoge entre

TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, y

- 5 - superior en la piel proveniente de la mancha, o en la muestra de piel proveniente de la mancha, con respecto al nivel en la piel adyacente no lesionada o en la muestra de piel adyacente no lesionada si el gen se escoge entre SOSTDC1 y PLOD2.

10 Por superior o inferior, se entiende una diferencia de nivel de expresión que es estadísticamente significativo, superior al ruido y reproducible. Por ejemplo, la diferencia del nivel de expresión es de al menos 10%, es decir que si el nivel de expresión de un gen de la invención en la piel no lesionada se fija en 1, la tasa de modulación es de al menos 1,1 para un gen sobreexpresado en la piel lesionada y de al menos 0.9 para un gen sobreexpresado en la piel de la lesión.

15 Preferiblemente, el método descrito se emplea con al menos dos genes, el uno pertenece a la categoría de los genes sobreexpresados en las manchas hiperpigmentarias, y subexpresado en las manchas hipopigmentarias, y el otro pertenece a la categoría de los genes modulados a la inversa del primero en las manchas pigmentarias. Preferiblemente el método se emplea con al menos tres genes: dos genes escogidos entre TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, y un gen escogido entre SOSTDC1 y PLOD2, modulado a la inversa de los dos primeros en las manchas pigmentarias, o bien dos genes seleccionados entre TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A y SMAD7, y el gen SOSTDC1; o bien dos genes escogidos entre FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1 y el gen PLOD2, modulado a la inversa de los dos primeros en las manchas pigmentarias.

25 Preferiblemente, en el marco de este método de caracterización, el nivel de expresión de uno de los genes descritos es comparado dentro de la piel de un individuo de tipo caucásico. Preferiblemente el dicho individuo es de una edad de al menos cuarenta años, preferiblemente de al menos cincuenta años, incluso de sesenta años. El individuo considerado, en el marco de la presente invención, es preferiblemente de sexo femenino. Como se detalló precedentemente, el nivel de expresión de uno o de varios genes descritos puede ser comparado dentro de la muestra de piel del dicho individuo.

30 Por otro lado, los presentes inventores han puesto igualmente en evidencia la modulación diferencial de otros dérmicos entre de la piel proveniente de una mancha pigmentaria y de la piel no lesionada, preferiblemente adyacente. Los inventores han puesto en evidencia particularmente la modulación de los genes dérmicos siguientes, unidos a la matriz extracelular:

- genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2 que codifican para proteínas de la familia de los proteoglicanos y glicoproteínas extracelulares;

40 - los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1 que codifican para proteínas unidas al remodelaje de matriz.

45 Por consiguiente, el método de caracterización tal como se describe comprende igualmente la comparación de los niveles de expresión dentro de la piel proveniente de la dicha mancha y dentro de la piel no lesionada, preferiblemente adyacente, de al menos un gen dérmico seleccionado entre la lista constituida de los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1 y de al menos un segundo gen seleccionado entre la lista de los siguientes genes: EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2, MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1; por ejemplo el segundo gen se selecciona entre la lista de los siguientes genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2 o bien entre la lista de los siguientes genes: MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1.

50 Los genes preferidos dentro de la lista de los genes dérmicos EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2 son los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN y CHSY1; genes preferidos son también los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1.

55 Preferiblemente el segundo gen se selecciona entre los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2, y preferiblemente entre los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN y CHSY1. Alternativamente, el segundo gen se escoge entre los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1.

60 Según otro empleo, el primer gen se selecciona entre la lista A de genes dérmicos implicados en la ruta de señalización TGF- β -SMAD; el segundo gen se selecciona como se precisó más arriba. Según aun otra utilización, el primer gen se selecciona entre la lista B; siendo seleccionado el segundo gen como se precisó anteriormente.

65 Según una utilización particular, el método comprende la comparación de los niveles de expresión de al menos 3 genes distintos, uno seleccionado entre los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, un segundo seleccionado entre los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1

y FLRT2 y un tercero seleccionado entre los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1. Alternativamente, cuando se seleccionan 3 genes distintos, el primero puede ser seleccionado entre los genes de la lista B, siendo seleccionado el segundo y el tercero como se describe anteriormente. Según aún otra alternativa, el primer gen se escoge entre la lista de los genes que comprenden TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1; eventualmente SEMA5A es sin embargo excluido.

Según aún otra utilización, el método comprende la comparación de los niveles de expresión de al menos 4 genes distintos, siendo escogidos los tres primeros como se describe precedentemente y el 4º en la lista constitutiva de FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1.

Todas las asociaciones de genes descritas anteriormente son igualmente asociaciones preferidas en el marco de otros aspectos de la descripción.

Si un gen suplementario, o varios, se escogen entre los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2, MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1, entonces el método de caracterización conduce a confirmar una mancha hiperpigmentaria si el nivel de expresión es

- superior en la piel proveniente de la mancha, o en la muestra de piel proveniente de la mancha, con respecto al nivel en la piel adyacente no lesionada, o en la muestra de piel adyacente no lesionada, si el gen se escoge entre EFEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, MXRA5, LYZ, PLAUI y TIMP1, e

- inferior en la piel proveniente de la mancha, o en la muestra de piel proveniente de la mancha, con respecto al nivel en la piel adyacente no lesionada, o en la muestra de piel adyacente no lesionada, si el gen se escoge entre HS3ST6, FLRT2, ECM1 y CTSL2.

A la inversa, el método de evaluación conduce a confirmar una mancha hipopigmentaria si el nivel de expresión es:

- inferior en la piel proveniente de la mancha, o en la muestra de piel proveniente de la mancha, con respecto al nivel en la piel adyacente no lesionada, o en la muestra de piel adyacente no lesionada, si el gen se selecciona entre EFEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, MXRA5, LYZ, PLAUI y TIMP1, y

- superior en la piel proveniente de la mancha, o en la muestra de piel proveniente de la mancha, con respecto al nivel en la piel adyacente no lesionada, o en la muestra de piel adyacente no lesionada, si el gen se selecciona entre HS3ST6, FLRT2, ECM1 y CTSL2.

El método descrito es igualmente un método de prueba para la predicción de la formación de manchas cutáneas en un sujeto. Según esta utilización, el nivel de expresión de al menos uno, y preferiblemente varios, genes de la invención se compara en una muestra de piel, con su nivel de expresión en la piel normal. Una modulación significativa del nivel de expresión con respecto a la piel normal permite concluir que a la piel del sujeto probada se inclina la formación de manchas cutáneas.

Por piel normal, puede tratarse o bien de la piel del mismo sujeto, en una zona corporal notoriamente desprovista de manchas, por ejemplo de zonas no expuestas a la radiación solar, o bien de zonas poco inclinadas a la formación de manchas pigmentarias. Puede igualmente tratarse del nivel de expresión medio de los dichos genes, en la piel de personas desprovistas de manchas y que tienen preferiblemente el mismo tipo de piel que en sujeto probado. Los genes de normalización descritos más arriba podrán ser utilizados para normalizar las tasas de expresión de los genes de la invención.

La presente invención se relaciona igualmente, según un segundo aspecto, un método de evaluación de la eficacia de un tratamiento de lentigos actínicos según la reivindicación 5, que utilizan la firma puesta en evidencia por los inventores. El tratamiento evaluado puede ser un tratamiento que se dirige a la atenuación de mancha pigmentaria o cualquier otra modulación de la pigmentación, para particularmente uniformizar la tez, homogenizar el color de la piel o luchar contra las discromías. Según una primera utilización, este método de evaluación comprende una etapa de comparación de los niveles de expresión en la piel proveniente de una mancha pigmentaria, antes y después del tratamiento, de al menos un gen dérmico seleccionado entre los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1.

Según una utilización, el gen se escoge entre TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, o bien entre TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SMAD7 y SOSTDC1. Según otra utilización, el gen se selecciona entre FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1. SEMA5A y/o ITGB1 son eventualmente excluidos de la lista.

Según este método de evaluación, la comparación de los niveles de expresión de uno de los genes seleccionados

se realiza dentro de la piel proveniente de una mancha de envejecimiento, o bien dentro de una muestra correspondiente, antes y después del tratamiento. No hay por lo tanto comparación en un nivel de expresión dentro de la piel sana no lesionada.

- 5 Como sucede para el método de caracterización según el primer aspecto de la invención, los niveles de expresión son ventajosamente normalizados con la ayuda de los niveles de expresión de los genes que codifican para la proteína ribosómica L13a (RPL13A), la beta-2-microglobulina (B2M), la proteína ribosómica S9 (RPS9), la proteína ribosómica S28 (RPS28) y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).
- 10 Por el método de evaluación tal como se describe, un tratamiento dado se considera como eficaz para el tratamiento de una mancha hiperpigmentaria si el nivel de expresión es:
 - inferior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento, si el gen se selecciona entre TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST,
 - 15 ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, y
 - superior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento, si el gen se escoge entre SOSTDC1 y PLOD2.
- 20 Por el contrario por el método de evaluación de la invención, un tratamiento dado se considera como eficaz para el tratamiento de manchas hipopigmentarias cuando el nivel de expresión es:
 - superior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento, si el gen se escoge entre TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2,
 - 25 COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, e
 - inferior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento, si el gen se selecciona entre SOSTDC1 y PLOD2.
- 30 Un tratamiento será considerado como sin efecto si los niveles de expresión del gen seleccionado, antes y después del tratamiento son sensiblemente idénticos, o bien si las diferencias observadas no son significativas.

Cuando se comparan los niveles de expresión de más de un gen, el tratamiento se considera como eficaz para el tratamiento de una mancha o de una irregularidad pigmentaria sí, para la mayoría de los genes probados, y preferiblemente para el conjunto de los genes probados, se toma individualmente, el tratamiento se considera como eficaz. Para los otros genes seleccionados, el tratamiento debe ser preferiblemente sin efecto, pero sin tener el efecto contrario.
- 35 Según otra utilización, el método de evaluación de la eficacia y un tratamiento de las manchas pigmentarias cutáneas comprende la caracterización de una mancha o irregularidad pigmentaria según el método descrito, antes y después del tratamiento, y la comparación de las diferencias de los niveles de expresión observadas entre la piel lesionada y la mancha o irregularidad pigmentaria y la piel sana.
- 40 Según esta utilización de la evaluación de la eficacia de un tratamiento, el tratamiento se considera como eficaz y la diferencia entre los niveles de expresión del o de los genes seleccionados en la piel lesionada proveniente de la mancha con respecto a la piel sana, preferiblemente adyacente, es menor después del tratamiento con respecto a lo que había antes del tratamiento.
- 45 Cuando se comparan los niveles de expresión de más de un gen, es preferible concluir con la eficacia del tratamiento cuando para la mayoría de los genes seleccionados, y preferiblemente para el conjunto de los genes seleccionados, tomados individualmente, se puede concluir en un tratamiento eficaz.
- 50 Preferiblemente la comparación de los niveles de expresión o de los genes seleccionados se realiza sobre muestras de piel tomadas a partir de la mancha pigmentaria.
- 55 El tratamiento considerado, evaluado por el método de la invención, no está limitado a un tipo particular de tratamiento.
- 60 Puede tratarse de un tratamiento por una molécula química, un activo, un extracto natural, particularmente un aceite esencial, un ácido nucleico, particularmente un ARNi, un complejo proteico o cualquier otra molécula o combinación de moléculas. Puede igualmente tratarse de un tratamiento por un medio físico de ondas, particularmente electromagnéticas. Se trata preferiblemente de un tratamiento tópico, pero es igualmente previsible evaluar la eficacia de tratamientos administrados por vía oral, por inyección, o por cualquier otro medio de administración.
- 65 El tratamiento probado puede dirigirse en atenuar o hacer disparar una mancha cutánea, en modular la pigmentación de la piel, en uniformizar la tez, en homogenizar el color de la piel o en atenuar las discromías.

Los tratamientos particularmente preferidos en el marco de esta invención son tratamientos cosméticos, más particularmente tratamientos tópicos cosméticos. En este caso, la mancha pigmentaria considerada es un lentigo actínico, solar o senil.

Por los métodos de la invención, es igualmente posible evaluar la eficacia de la combinación de varios tratamientos, es en efecto posible evaluar combinaciones que permitan por medio de la restauración de los niveles de expresión de uno, varios o de todos los genes de la invención, o de la lista A o de la lista B, de tal forma que son expresados dentro de la piel no lesionada.

Por los métodos de evaluación descritos anteriormente, es posible evaluar la eficacia de un nuevo tratamiento previsto o bien igualmente cuantificar o cualificar la eficacia de tratamientos ya existentes contra las manchas pigmentarias, que sean hiperpigmentarias o bien hipopigmentarias. Por esta vía, puede también preverse combinaciones de tratamiento susceptibles de ser particularmente eficaces, sinérgicos o complementarios. Como ha sido explicado por los métodos de caracterización según el primer aspecto de la invención, es preferible comparar los niveles de expresión de más de un gen, preferiblemente de al menos dos, tres, cinco, seis, siete, diez, doce, quince, dieciocho o bien de todos los genes de la invención o bien de los genes de la lista A o bien de los genes de la lista B.

Los genes o combinaciones de genes particularmente preferidos han sido ya explicados con respecto al primer aspecto de la invención; los mismos genes o combinaciones son preferidos en este aspecto. Es particularmente preferido que el gen seleccionado este entre los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, muy particularmente entre los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 y TGFBR3, y todas las combinaciones dos a dos o tres a tres de los genes de estas listas son particularmente preferidos. Según otra utilización, el gen se selecciona entre los genes de la lista B, y particularmente entre la lista de los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 e ITGA2, y todas las combinaciones dos a dos o tres a tres de los genes de esta lista son particularmente preferidos.

Por otro lado, debido a los resultados complementarios obtenidos por los inventores relacionados de otros genes dérmicos cuyo nivel de expresión es modulado dentro de la mancha pigmentaria, los métodos de evaluación tales como los descritos son utilizados preferiblemente con:

- al menos un gen seleccionado entre los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, e incluso preferiblemente entre los genes de la lista A o entre los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 y TGFBR3, o entre los genes de la lista B, o aún entre los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 y ITGA2 y

- al menos un segundo gen seleccionado entre los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2, MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1. Alternativamente, el segundo gen puede ser escogido entre los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6,

PAPLN, CHSY1, FLRT2 o bien entre los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1. Los genes preferidos en los genes dérmicos EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2 son los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN y CHSY1.

Si un gen suplementario, o varios se escogen entre los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2, MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1, mientras el método de evaluación conduce a considerar un tratamiento eficaz para el tratamiento de manchas hiperpigmentarias y el nivel de expresión es

- inferior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento, si el gen se escoge entre EFEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, MXRA5, LYZ, PLAUI y TIMP1, y

- superior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento, si el gen se escoge entre HS3ST6, FLRT2, ECM1 y CTSL2.

Al contrario, el método de evaluación conduce a considerar un tratamiento eficaz para el tratamiento de manchas hipopigmentarias y el nivel de expresión es:

- superior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes el tratamiento, si el gen es seleccionado entre FEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, MXRA5, LYZ, PLAUI y TIMP1, e

- inferior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento, si el gen se selecciona entre HS3ST6, FLRT2, ECM1 y CTSL2.

La muestra de piel proviene preferiblemente de un ser humano de tipo caucásico preferiblemente de una edad de al

menos cuarenta años, preferiblemente de al menos cincuenta años, incluso al menos sesenta años.

Preferiblemente, en el marco de la presente invención y particularmente para el método de evaluación descrito, se trata de un tratamiento de manchas hiperpigmentarias de tipo lentigos actínicos solares o seniles.

El método de evaluación de la eficacia de un tratamiento según la presente invención se emplea de nuevo *in vitro* o *ex vivo*.

Es deseable que la muestra de piel antes de tratamiento y después del tratamiento sea tomada a partir de la misma mancha pigmentaria, o bien de una mancha pigmentaria muy cercana si el tamaño de la mancha no permite obtener fácilmente muestras antes y después del tratamiento.

La presente invención se relaciona igualmente con un método *in vitro* de evaluación de la eficacia de un tratamiento de lentigos actínicos; un tal método comprende la comparación, antes y después del tratamiento, del nivel de expresión en un modelo celular representativo de la piel, de al menos un gen dérmico escogido entre la lista constituida de los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, o bien del nivel de expresión o de actividad del producto de expresión del dicho gen seleccionado. Alternativamente, el gen puede ser seleccionado entre la lista A de genes dérmicos unidos a la ruta de señalización TGF-beta-SMAD, con o sin SEMA5A, o bien entre la lista B, o bien entre los diferentes subgrupos de esta última lista, a saber entre LEPREL1, PLOD2, COL6A3 y CRTAP, o bien entre LAMC1, LAMB3 y LAMA3, o bien entre FRAS1, MATN2 y DST, o bien entre ITGA2, ITGAV y ITGBL, o entre ITGA2 y ITGAV.

El modelo celular puede ser de cualquier tipo considerado como apropiado por el experto en el arte. Puede tratarse particularmente de modelos celulares mono o cocultivos, o bien modelos tridimensionales de piel reconstruida, o bien de piel cultivada *ex vivo*. Existen igualmente modelos celulares representativos de manchas pigmentarias, más particularmente de lentigos actínicos, que pueden ser utilizados en el marco de este método. Tales modelos celulares no tienen necesidad de imitar las manchas pigmentarias (o el lentigo) en su globalidad pero deben imitar eventos biológicos, características morfológicas o pigmentarias observadas en las manchas pigmentarias, particularmente el lentigo. Tales modelos *in vitro* son bien conocidos del experto en el arte.

Según una utilización preferida del método *in vitro* descrito anteriormente, comprende la comparación de los niveles de expresión de al menos dos genes, preferiblemente del menos tres, cinco o seis genes de la invención, como se ha explicado para los otros métodos de evaluación según la invención, siendo escogidos los dicho genes entre los genes de la invención, o bien entre los genes de la lista A, con o sin SEMA5A, o bien entre los genes de la lista B, con o sin ITGB1. Los genes particularmente preferidos son los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 y TGFBR3, así como los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 y ITGA2.

Incluso como se ha explicado para los otros métodos de evaluación, son utilizados preferiblemente con al menos dos genes,

- se escogen entre los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, o bien entre los genes de la lista B, o bien aún entre TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, y

- se escoge el segundo entre los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2, MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1, preferiblemente entre los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2 o bien entre los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1.

De una manera particularmente preferida, se escoge el primer gen entre TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 y TGFBR3 o bien entre FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 y ITGA2.

Con relación a los métodos de evaluación según la invención, según una utilización preferida, el primer gen se escoge entre el subgrupo constituido de los genes LEPREL1, PLOD2, COL6A3 y CRTAP, que pertenecen a la familia de los colágenos, particularmente a la familia de colágenos fibrilares del estroma.

Según otra utilización, el primer gen se escoge entre el grupo constituido de los genes LAMC1, LAMB3 y LAMA3, que codifica para láminas y se sobreexpresa a nivel de manchas hiperpigmentarias.

Según otra utilización, el primer gen se escoge entre el grupo constituido de los genes FRAS1, MATN2 y DST, que codifican para proteínas de matriz asociadas a la zona de la membrana basal y son subexpresados a nivel de manchas hiperpigmentarias.

Según aún otra utilización, el primer gen se escoge entre el grupo constituido de los genes ITGA2, ITGAV e ITGB1, que codifican para las integrinas y son subexpresados a nivel de manchas hiperpigmentarias.

Alternativamente, el método puede ser utilizado con el gen ACTN1, que codifica para una actina.

Todas las combinaciones de genes específicos descritos con relación a otros aspectos de la descripción son igualmente preferidas en el marco de este aspecto.

Por otro lado, por medio de estos métodos de evaluación es posible promover un tratamiento ante los consumidores, poniendo antes los resultados obtenidos con su tratamiento los métodos de evaluación de la eficacia descrita en la presente invención.

Se describe igualmente un método que permite recomendar un producto señalando su efecto en un protocolo de prueba constituido por un método de evaluación de la eficacia tal como se describe precedentemente, por ejemplo un método para la promoción de un producto cosmético o tratamiento cosmético que consiste en reportar una eficacia, acción o propiedad del dicho producto o tratamiento, demostrado por al menos un método operado tal como se describe precedentemente.

Una tal promoción del producto podrá hacerse por cualquier canal de comunicación. Podrá ser realizado particularmente por el vendedor o la vendedora, directamente sobre el punto de venta, por la radio y la televisión, particularmente en el marco de puntos publicitarios. Podrá ser hecho igualmente por el canal de la prensa escrita o bien por medio de cualquier otro documento, en particular con fines publicitarios (prospectos). Podrá hacerse igualmente por internet o por cualquier otra red informática adecuada. Podrá ser hecho igualmente de forma directa sobre el producto, particularmente en su empaque o sobre cualquier nota explicativa que pueda serle asociada.

La presente descripción se relaciona igualmente con un método de cribado de moléculas para el tratamiento de manchas pigmentarias cutáneas que comprenden la utilización de uno de los métodos de evaluación descritos precedentemente para determinar la eficacia de un tratamiento a base de esta molécula.

Según otro aspecto, la presente invención se relaciona igualmente con un método cosmético de tratamiento o de prevención de lentigo actínico no patológico de la piel humana, que comprende la modulación del nivel de expresión o de la actividad de un gen dérmico, en donde el dicho gen se escoge entre la lista constituida de los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV y ACTN1. Alternativamente, el gen puede ser seleccionado entre la lista A de genes dérmicos unidos a la ruta de señalización TGF-beta-SMAD, preferiblemente sin SEMA5A, o bien entre la lista de los genes dérmicos B, preferiblemente sin ITGB1, o bien entre los diferentes subgrupos de esta última lista, a saber entre LEPREL1, PLOD2, COL6A3 y CRTAP, o bien entre LAMC1, LAMB3 y LAMA3, o bien entre FRAS1, MATN2 y DST, o bien aún entre ITGA2, ITGAV y ITGB1, o entre ITGA2 y ITGAV.

Los lentigos actínicos no patológicos se consideran como manchas benignas, cuya eliminación es más que deseable por razones estéticas y en ningún modo por razones terapéuticas.

Los presentes inventores han mostrado el papel importante de los genes de la invención dentro de la dermis a nivel de las manchas pigmentarias, y particularmente unido entre desregulación del nivel de expresión de esos genes y aparición de manchas pigmentarias. Debido a esto suspender o disminuir la modulación de esos genes puede permitir disminuir o abolir las desregulaciones observadas y así permitir restaurar una situación a nivel de la matriz extracelular compatible con la ausencia de mancha pigmentaria, por lo tanto un tinte uniforme y un color de piel homogéneo.

Por las mismas razones explicadas en relación con otros aspectos de la invención, se selecciona preferiblemente más de un gen dentro de los genes de la invención, por ejemplo al menos dos genes, al menos tres, cinco, seis, ocho. Según una utilización, el método cosmético tiene por objeto modular el nivel de expresión de la integridad de los genes de la invención, o bien de la integridad de los genes de la lista A, con o sin SEMA5A, o bien de la integridad de los genes de la lista B. Preferiblemente, el gen ITGB1 es entonces excluido de la lista B. El método cosmético según la invención tiene por objeto restaurar los niveles de expresión próximos a los que son observados dentro de la piel sana, por ejemplo, adyacente de una mancha pigmentaria. Los genes particularmente preferidos son los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 y TGFBR3, así como los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 e ITGA2. En el caso de un lentigo actínico, senil o solar, la modulación buscada en los métodos cosméticos según la invención es:

- una inhibición total, parcial o temporal, de la expresión de al menos un gen escogido entre los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A y SMAD7, o bien entre los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, o bien entre los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1 o bien

- un aumento, eventualmente temporal de la expresión del gen SOSTDC1, o del gen PLOD2.

Preferiblemente, la inhibición no es una inhibición total sino parcial, que tiende a disminuir el nivel de expresión del gen seleccionado sin por ello inhibir enteramente su expresión.

Descrito igualmente es el caso de una mancha hipopigmentaria. En un caso tal, la modulación buscada es inversa con respecto a la situación precedente, particularmente un tal método que apunta a aumentar la expresión de al menos un gen seleccionado entre los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A y SMAD7, o bien entre los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, o bien entre los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, o bien en inhibir o disminuir el nivel de expresión del gen SOSTDC1 o del gen PLOD2.

Por aumento o disminución del nivel de expresión, se incluye el aumento o la disminución del nivel de transcripción de los dichos genes, y el aumento o la disminución del nivel de traducción de los dichos genes, así como el aumento o la disminución de la actividad de proteínas codificadas para estos genes.

Preferiblemente, concomitantemente a la modulación del nivel de expresión buscado para uno de los genes de la invención, un método cosmético según la invención comprende preferiblemente de manera igual la modulación de al menos otro gen dérmico, seleccionado entre los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2, MXRA5, LYZ, CTSL2 y PLA1 y TIMP1. Los genes preferidos dentro de esta segunda lista de genes dérmicos son los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN y CHSY1 y los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLA1 y TIMP1.

Las modulaciones aplicadas tratándose del tratamiento de una mancha hiperpigmentaria son la disminución del nivel de expresión para los genes EFEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, MXRA5, LYZ, PLA1 y TIMP1, y el aumento del nivel de expresión para los genes ECM1, HS3ST6, FLRT2 y CTSL2. En el caso de tratamiento de mancha hipopigmentaria, las modulaciones aplicadas son inversas.

Un método cosmético según la presente invención comprende por lo tanto la aplicación de un producto, particularmente molécula química, extracto natural, activo, ácidos nucleicos, péptidos, o de un tratamiento que modula el nivel de expresión o la actividad del producto de expresión de al menos uno de los genes dérmicos de la invención.

Las modulaciones son preferiblemente obtenidas gracias a la utilización de un antisentido, de un microARN o de ARNs dirigido contra al menos uno de los genes de la invención y que inhiben su expresión.

Tratándose de un producto, se aplica preferiblemente de manera tópica.

Preferiblemente, la modulación se efectúa gracias a la utilización de un modulador de uno de los genes de la invención. Tales moduladores se describen en el ejemplo 3 de la Tabla 3. Por ejemplo, un método cosmético tal como se describe comprenderá ventajosamente la aplicación de un compuesto seleccionado entre polvo óseo desmineralizado o "*Demineralized bone powder* (DBP)", Pioglitazona, GW0742, Cristata L flavonoide, Fenofibrado, oximatrina, ácido salvianólico B, SB-431542, un extracto de Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san, tetrandrina y N-acetilserilaspartil-lisil-prolina (Ac-SDKP), vitamina K2 menaquinona, beta-aminopropionitrila (bAPN) y Vandetanib (ZD6474 5), o bien la aplicación de ultrasonidos pulsados de baja intensidad, o bien aun asociaciones de al menos dos de esos moduladores. Por otro lado, un método cosmético es ventajosamente utilizado después de la caracterización de la mancha pigmentaria que se desea tratar por un método según el primer aspecto. En efecto, esta primera etapa permite caracterizar la mancha y por lo tanto detectar los genes cuyo nivel de expresión es fuertemente modulado entre la zona de la mancha y una zona no lesionada, preferiblemente adyacente. Es posible a continuación adaptar un tratamiento que permita tratar sobre la o los genes de la invención que son modulados diferencialmente dentro de esta mancha, aplicando específicamente moduladores para los dichos genes.

Cualquiera que sea el tratamiento considerado, el método cosmético puede igualmente comprender la aplicación de uno o varios compuestos activos adicionales que se dirigen a reforzar los efectos buscados por ejemplo, de cualquier sustancia descrita como despigmentantes, agentes queratolíticos y/o descamantes, antioxidantes, filtros solares químicos o físicos UV, agentes antiinflamatorios y/o calmantes, ácidos desoxirribonucleicos y sus derivados.

El método cosmético es igualmente aplicable en el caso de la prevención de la aparición de manchas pigmentarias o de otras irregularidades del tono o del color de la piel, y particularmente de manchas hiperpigmentadas tales como el lentigo actínico.

En efecto, los diferentes datos obtenidos por los inventores y detallados en la parte experimental revelan que los alcances a la matriz extracelular y particularmente a la ruta de señalización TGF- β -SMAD, a través de los genes puestos en evidencia por los inventores son susceptibles de sobrevenir corriente arriba, antes de la aparición de las manchas. Se puede pensar que la secuencia de eventos biológicos en las manchas hiperpigmentarias pueda ser la siguiente: 1) alteración de la dermis (debido a la modulación de la expresión de los genes identificados en esta solicitud) que conduce a 2) modificación de la epidermis con formación de cresta epidérmica en la dermis que lleva a

3) que lleva a un aumento de la longitud de la unión dermoepidérmica y la formación de redes completas que conducen a 4) un aumento de la carga melánica.

La presente invención se relaciona igualmente con la utilización de un modulador de nivel de expresión o de la actividad de producto de expresión de al menos un gen dérmico seleccionado entre la lista constituida de los genes TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, para una aplicación cosmética en el tratamiento de lentigos actínicos no patológicos, estando el dicho modulador en antisentido, un microARN o un ARNsi dirigido contra el gen dérmico seleccionado y que inhibe la expresión del dicho gen.

Alternativamente, el gen puede ser seleccionado entre la lista A de genes dérmicos unidos a la ruta de señalización TGF-beta-SMAD, con o sin SEMA5A, o bien entre la lista B de genes dérmicos, o bien entre los diferentes subgrupos de esta última lista, a saber entre LEPREL1, PLOD2, COL6A3 y CRTAP, o bien entre LAMC1, LAMB3 y LAMA3, o bien entre FRAS1, MATN2 y DST, o bien aún entre ITGA2, ITGAV e ITGB1, o entre ITGA2 e ITGAV. El ITGB1 puede ser excluido de las diferentes listas.

Para el tratamiento de manchas hiperpigmentarias, el modulador el cual se usa de hecho usado, es un inhibidor de al menos un gen seleccionado entre TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1 o bien un activador del gen SOSTDC1 o de gen PLOD2. Preferiblemente, el inhibidor es un inhibidor parcial que conduce a la disminución del nivel de expresión o a la disminución de la actividad del producto de expresión del dicho gen, sin por lo tanto abolir enteramente la expresión o la actividad de este gen. El modulador es un inhibidor de al menos un gen seleccionado entre TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A y SMAD7, o sin SEMA5A, o bien un activador de SOSTDC1. El modulador puede también ser un inhibidor de al menos un gen seleccionado de entre FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV y ACTN1, o bien un activador de PLOD2.

Al contrario, para el tratamiento de manchas hipopigmentarias, el modulador se ha usado como un activador de al menos un gen seleccionado entre TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, o bien un inhibidor del gen SOSTDC1 o gen PLOD2. El modulador es un activador de al menos un gen seleccionado entre TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A y SMAD7, o sin SEMA5A, o bien un inhibidor de SOSTDC1. En otro caso, el modulador es un activador de al menos un gen seleccionado entre FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV y ACTN1, o bien un inhibidor de PLOD2.

Los ejemplos de inhibidores o de activadores ya conocidos y caracterizados se divulgan en el ejemplo 3 de la parte experimental. Tales moduladores pueden particularmente ser el ácido salvianólico B, el extracto Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san o los ultrasonidos pulsados de baja intensidad para uso en el tratamiento cosmético de manchas hiperpigmentarias.

Los moduladores bien conocidos son igualmente moléculas antisentido, de los ARNsi, y los microARNs. Los moduladores previstos son particularmente los antisentidos, los microARNs o los ARNsi dirigidos contra al menos uno de los genes de la invención e inhiben su expresión.

Los moduladores son particularmente el polvo óseo desmineralizado o "*Demineralized bone powder (DBP)*", Pioglitazona, GW0742, Cristata L flavonoide, Fenofibrato, oximatrina, ácido salvianólico B, SB-431542, un extracto de Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san, tetrandrina, N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina (Ac-SDKP), vitamina K2 menaquinona, beta-aminopropionitrilo (bAPN) y Vandetanib (ZD6474 5), o bien la aplicación de ultrasonidos pulsados de baja intensidad. Es igualmente previsible utilizar una asociación de al menos dos de estos moduladores.

Las cantidades eficaces de los moduladores son para adaptar en función del resultado buscado y del tipo y del número de moduladores utilizados; pueden estar comprendidos entre 0.001% y 30% en peso.

Los moduladores tal como se describen pueden ser utilizados en los métodos cosméticos descritos en asociación con los moduladores de los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2, o bien de los moduladores de los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLA2 y TIMP1.

Ya se han descrito las combinaciones de los genes preferidos.

Los moduladores pueden ser utilizados en asociación con otros productos, ingredientes activos o excipientes. Preferiblemente, están condicionados bajo una forma adaptada a una aplicación tópica, por ejemplo bajo forma de pomada, crema o ungüento, o bajo cualquier forma adaptada para el cuidado tal como loción, serum, jabón etc.

Las diversas utilizaciones detalladas en la sección relativa a los métodos cosméticos son aplicables a las utilizaciones para las aplicaciones cosméticas descritas anteriormente.

Los moduladores descritos anteriormente pueden ser utilizados particularmente en aplicaciones cosméticas con el fin de uniformizar la tez, homogenizar el color de la piel o luchar contra las discromías.

Por otro lado, la presente descripción describe moduladores del nivel de expresión o de la actividad del producto de expresión de al menos un gen dérmico seleccionado entre los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV y ACTN1 para una aplicación en el tratamiento de manchas pigmentarias cutáneas, por ejemplo en el marco de tratamientos terapéuticos. Las dichas manchas pueden ser manchas hiperpigmentarias, o bien manchas hipopigmentarias. Alternativamente, el gen puede ser seleccionado entre la lista A de genes dérmicos ligados a la ruta de señalización TGF-beta-SMAD, o bien entre la lista de genes dérmicos B, o bien entre los diferentes subgrupos de esta última lista, a saber entre LEPREL1, PLOD2, COL6A3 et CRTAP, o bien entre LAMC1, LAMB3 y LAMA3, o bien entre FRAS1, MATN2 y DST, o bien aún entre ITGA2, ITGAV e ITGB1, o entre ITGA2 y ITGAV.

Los moduladores preferidos han sido ya descritos anteriormente.

Pueden ser asociados de otros productos, ingredientes activos o excipientes. Preferiblemente están condicionados bajo una forma adaptada a una aplicación tópica, por ejemplo bajo forma de pomada, crema o ungüento, o bajo cualquier forma adaptada para el cuidado tal como loción, serum, jabón, etc.

En los diferentes métodos y aplicaciones descritas, las manchas pigmentarias consideradas son preferiblemente manchas hiperpigmentarias y preferiblemente de lentigos actínicos, solares o seniles. Los métodos y aplicaciones descritas se basan en la puesta en evidencia por los inventores de una firma de tales manchas pigmentarias.

Esta firma se caracteriza por el hecho que puede estar constituida por el conjunto de la lista o una parte de los genes citados.

Igualmente se describe la utilización de esta firma como nuevo procedimiento de selección y predicción del lentigo actínico a través de las deficiencias de sus funciones biológicas. Este nuevo procedimiento se basa en el estudio del nivel de expresión de todo o parte de los genes descritos en una lesión hiperpigmentada versus una piel no lesionada adyacente.

Esta divulgación se describe igualmente en el marco del tratamiento del lentigo actínico, gracias a la utilización de estos genes como firma molecular de las diferencias de expresión génica existente entre una lesión y la piel sana adyacente. Esta firma constituye igualmente un avance evidente para determinar la selección del tratamiento apropiado y medir el efecto de un producto (ingrediente activo, molécula, extracto natural), pero también de un procedimiento (luminosidad luz, inyección, vía oral) que sea benéfico para la piel. La presente invención permite en efecto la evaluación de la eficacia de un producto o procedimiento destinado para tratar el lentigo actínico modulando a nivel de la lesión la expresión de todo o parte de los genes descritos de manera que su perfil de expresión se aproxime al de la piel sana.

La descripción consiste también en un método de criba de factores de inhibición o prevención de los lentigos actínicos. Consiste en evaluar compuestos sobre su poder de inhibición o de aumento de la expresión de los genes citados y/o de la expresión o la actividad de los productos proteicos de los dichos genes y para seleccionar en tanto que factores que permiten prevenir o tratar el lentigo actínico. La verificación de la eficacia de los compuestos puede ser realizada sobre modelos celulares mono o cocultivos, o modelos tridimensionales de piel reconstruida o de la piel *ex vivo*, o *in vivo*.

La divulgación tiene también por objeto la utilización de compuestos que modulan la expresión de genes identificados entre los biomarcadores del lentigo actínico, para prevenir o corregir la lesión con el fin de reencontrar un estado normal de la piel, es decir reencontrar una expresión que se aproxima a la expresión de la piel sana no lesionada. En particular, no se han propuesto jamás compuestos que actúan sobre las proteínas identificadas para prevenir o tratar las discromías pigmentarias (hiperpigmentación o hipopigmentación). Tales compuestos existen y están reportados en la Tabla 3 del ejemplo 3.

Los agentes seleccionados son particularmente moduladores negativos de proteínas subexpresadas en relación con la matriz extracelular, particularmente proteínas de la ruta de señalización TGF- β -SMAD o de los moduladores positivos de proteínas subexpresadas.

Entre los moduladores negativos de las proteínas unidas a la matriz extracelular y particularmente a la ruta de señalización TGF- β -SMAD se podrá citar particularmente los inhibidores de síntesis, y/o de la secreción y/o activadores de la degradación de proteínas reencontradas sobreexpresadas en el lentigo.

Al contrario, entre los moduladores positivos, se podrán citar estimulantes de síntesis, inductores de secreción, o inhibidores de la degradación de proteínas subexpresadas en el lentigo.

Leyenda de las figuras:

Figura 1: Esta figura ilustra el protocolo de tratamiento de las Pielles Reconstruidas Pigmentadas (PRP) por el TGFbeta. En la gráfica, T significa tratamiento al TGFbeta, a 200 pg/mL, teniendo por vehículo HCl 4 mM y 1 mg/mL de BSA. El medio es el MEM 3F' con 2% de FBS. Las dermis equivalentes se trataron durante 3 días consecutivos. A J0i, la dermis equivalente es sembrada con queratinocitos y melanocitos (K+M en la gráfica) y mantenida en inmersión durante 7 días. El cultivo se mantiene a continuación en inmersión, durante 2 semanas.

Figura 2: Esta figura representa fotos de las pieles reconstruidas pigmentadas después del tratamiento con un control (2% SVF HCl/BSA) o con TGFbeta (200 pg/mL) según el protocolo descrito en el ejemplo 4. Las dos fotos superiores corresponden a la reacción Dopa, en la epidermis separada. Las dos fotos inferiores corresponden a una coloración Fontana Masson.

Figura 3: Esta figura ilustra los resultados de luminancia (gráficas A y C) y la cuantificación de melanina (gráficas B y D), para pieles reconstituidas pigmentadas tratadas conforme al protocolo descrito en el ejemplo 4. El control corresponde a un tratamiento con 2% de SVF HCl/BSA, TGFB corresponde a un tratamiento con TGF-beta de 200 pg/mL. Las 2 gráficas superiores y las 2 gráficas inferiores corresponden a dos experimentos idénticos e independientes.

Parte experimental:

Ejemplo 1: Estudio transcripcional

Se realizó un estudio comparativo del perfil de expresión génica de la piel proveniente de una lesión de lentigo actínico (PL) y de piel adyacente no lesionada (PN).

El objeto de este estudio es identificar marcadores pertinentes, reproducibles y significativos que reflejan las alteraciones asociadas con la formación del lentigo actínico, con el fin de utilizarlos como objetivos para tratamientos eficaces, o como biomarcadores para analizar la eficacia de un tratamiento dado.

En resumen, se reclutaron 15 voluntarias femeninas sanas con el fin de participar en un estudio transcriptómico "genoma completo" (chips Afimetrix). Para cada voluntaria, se diagnosticó una lesión de tipo lentigo actínico en el dorso de la mano y el diagnóstico del lentigo actínico se verificó por epiluminiscencia. Este examen permite

1°) verificar el diagnóstico clínico de la lesión (lentigo actínico exclusivamente) según los criterios patrón de la unión dermoepidérmica) estructura pigmentada en red, "estructura similar a huellas dactilares") a diferencia de las efélides (ausencia de estructura pigmentada en red, pigmentación homogénea en zonas de "bordes de polilla") y queratosis seborreica planas (quistes o pseudoquistes múltiples tipo miliar, zonas de "bordes de polilla", aberturas pseudofoliculares y patrón tipo huella dactilar) [Menzies et al; Stolz et al; Carli et al].

2°) limitar las zonas homogéneas en términos de estructura/patrón en el inferior de esas lesiones en donde serán hechas las biopsias cutáneas,

3°) establecer un valor fenotípico basado en un análisis de imágenes cuantitativo con el programa informático que se ha desarrollado sobre Matlab® (programa SQA, CMLA, ENS Cachan, UMR CNRS 8536).

Se realizó una biopsia de 3 mm centrada en la lesión así como una biopsia de tamaño idéntico en una zona de piel adyacente no lesionada. Los ARN totales de esta toma se extrajeron y amplificaron. Los sondeos se generaron por hibridación sobre los chips Afimetrix, los perfiles de expresión de los genes se generaron para cada uno de las 30 biopsias (2 biopsias por voluntario), y se realizó un análisis comparativo entre PN o PL por voluntaria y sobre el conjunto de las voluntarias. Los genes estadísticamente expresados de manera diferencial (media geométrica de las pacientes) se compilaban en listas y reagruparon por familias funcionales.

De manera sorprendente e inesperada, los inventores encontraron una expresión diferencial para varias centenas de genes entre el PN y el PL. Se constituyó una lista de 437 genes y representó una firma molecular grande de la lesión lentigo actínico. Entre los 437 genes identificados, 169 genes se revelaron regulares de manera positiva ("sobrerregulados") en la lesión "lentigo actínico" comparada con la piel la sana mientras que 269 genes eran regulares de manera negativa en el lentigo actínico ("subregulados").

El conjunto de estos genes se subdividió en varias familias funcionales.

Entre los genes funcionales o los procesos biológicos identificados, los inventores han encontrado de manera sorprendente una familia de genes que reflejan a nivel molecular un disfuncionamiento de la matriz extracelular y de la unión dermoepidérmica en el lentigo actínico. Estos genes reagrupados en esta familia funcional nominada "matriz extracelular" no han sido descritos jamás anteriormente, asociados con el lentigo actínico y están listados más abajo en las Tablas 1 y 2:

Genes subexpresados en el lentigo actínico con respecto a la piel sana TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, EFEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, MXRA5, LYZ, PLAUI, TIMP1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1.

Genes subexpresados en el lentigo actínico con respecto a la piel sana SOSTDC1, ECM1, HS3ST6, FLRT2, CTSL2 y PLOD2.

Estos genes codifican para los componentes de la dermis o de las proteínas implicadas en la síntesis de los componentes de la matriz extracelular, relacionados con la renovación o a la remodelación de esta matriz conjuntiva, así como los genes que codifican para las proteínas de matriz asociadas a la unión dermoepidérmica y la zona de la membrana basal. Esta familia contiene también genes unidos a la ruta del TGFbeta, implicada en la síntesis de los componentes de la matriz extracelular. Los genes de esta familia son sobreexpresados principalmente en el lentigo actínico.

Esta familia de genes es totalmente original en un desorden pigmentario e implica un papel preponderante del estroma en el lentigo actínico.

Tabla 1: Lista de los genes de la familia "matriz extracelular" encontrados sobreexpresados en el lentigo actínico

Subfamilia ruta/función	Denominación	Número de acceso	Nombre completo	Tasa de modulación
TGFb/SMAD	THBS2	NM_003247	Trombosfondina 2	3.41
	TGFBI	NM_000358	Factor de crecimiento de transformación beta inducido, 68 kDa	2.22
	BMP2	NM_001200	Hueso morfogénico proteína 2	2.03
	SMAD3	NM_005902	SMAD miembro de familia 3	1.76
	TGFBR3	NM_003243	Factor de crecimiento de transformación, beta receptor III	1.68
	TGFBR2	D50683 NM_001024847 NM_003242	Factor de crecimiento de transformación, beta receptor II (70/80kDa)	1.61
	SEMA5A	NM_003966	Sema dominio, siete trombosfondina repite (semaforina) (semaforina 5A, semaforina F)	1.56
	SMAD7	NM_005904	SMAD miembro familia 7	1.52
Colágenos	LEPREL1	NM_018192	Leprecan como 1	2.64
	COL6A3	NM_004369	Colágeno tipo VI, alfa 3	1.90
	CRTAP	NM_006371	cartílago asociado a proteína (LEPREL3)	1.60
Lamininas	LAMC1	NM_002293	laminina, gama 1 (antiguamente LAMB2)	1.96
Lamininas	LAMB3	L25541 NM_000228 NM_001017402 NM_001127641	laminina, beta 3	1.94
		LAMA3	laminina, alfa 3	1.64

Subfamilia ruta/función	Denominación	Número de acceso	Nombre completo	Tasa de modulación
Integrinas	ITGA2	NM_002203	integrina, alfa 2 (CD49B, alfa 2 subunidad de VLA-2 receptor)	1.62
	ITGAV	NM_001145000 NM_001144999 NM_002210	integrina, alfa V (vitronectina receptor,)	1.62
	ITGB1	NM_133376	integrina, beta 1	1.55
Remodelación de matriz	MXRA5	NM_015419	Matriz remodelante asociada 5	2.40
	LYZ	NM_000239	lisozima (renal amiloidosis)	2.33
	TIMP1	NM_003254	TIMP metalopeptidasa inhibidor 1	2.26
	PLAU	NM_002658	Plasminógeno activador, uroquinasa	1.81
Proteoglicanos y glicoproteínas extracelulares	EFEMP1	NM_001039348 NM_001039349 NM_004105	EGF que contiene fibulina como proteína 1 matriz extracelular (FIBULINE 3)	3.86
	ASPN	NM_017680	Asporina	2.77
	PAPLN	NM_173462	papilina, proteoglicano como glicoproteína sulfatada	2.51
	CHSY1	NM_014918	carbohidrato (condroitina) sintasa 1	1.50
Membrana basal	FRAS1	NM_025074	Fraser síndrome 1	4.59
	MATN2	NM_002380	Matrilina 2	2.61
	DST	NM_001723 NM_015548	Distonina = BPAG1	2.24
Actina	ACTN1	NM_001130005 NM_001130004 NM_001102	Actinina, alfa 1	1.58

Tabla 2: Lista de los genes de la familia “matriz extracelular” encontrados subexpresados en el lentigo actínico

Subfamilia ruta/función	Denominación	Número de acceso	Nombre completo	Tasa de modulación
Proteoglicanos	HS3ST6	NM_001009606	Heparan sulfato (glucosamina) 3-O- sulfotransferasa 6	0.44
Colágenos	PLOD2	NM_000935 NM_182943	procolágeno-lisina, 2-oxoglutarato 5- dioxigenasa 2	0.45
Proteoglicanos	FLRT2	NM_013231	Proteína 2 transmembrana rica en fibronectina leucina	0.47

Subfamilia ruta/función	Denominación	Número de acceso	Nombre completo	Tasa de modulación
Remodelación de matriz	CTSL2	NM_001333	cathepsina L2 (degradación por peptidasa MEC)	0.54
Proteoglicanos	ECM1	U65932 NM_004425 NM_022664	Matriz extracelular proteína 1	0.54
TGFb/SMAD	SOSTDC1	NM_015464	Esclerostina campo que contiene 1 (ectodina, BMP antagonista)	0.62

Ejemplo 2: Materiales y métodos

5 Se han seleccionado 15 voluntarias, mujeres, fototipos II a IV, edades de 50 a 70 años.

Los lentigos actínicos se escogen del dorso de la mano, de tamaño mínimo de 3 mm. Se caracterizan por epiluminiscencia. Los diferentes avances de la caracterización por epiluminiscencia se presentan en el ejemplo 1.

10 Se realizaron dos biopsias de 3 mm de diámetro en una de las manos de cada paciente. Para cada voluntario, una de las biopsias corresponde a la lesión del lentigo actínico (PL) y otra a una zona adyacente de piel no lesionada (PN) verificada igualmente en epiluminiscencia).

15 Las biopsias de 3 mm se colocan, desde la toma, en el *RNAlater* (Quiagen referencia 76106), de 16 a 24 horas a 4°C. Al día siguiente las muestras se colocaron a -20°C hasta las etapas de homogenización y extracción. Para la descongelación, las muestras se cortaron con escalpelo para facilitar la homogenización, antes de transferirlas en el regulador de lisis. La homogenización se realizó con un torno (Fisher Labosi ref A6391000) con pistones en polipropileno libre de RNasa (Fisher Labosi ref A1419753) permitiendo la homogenización directa en los tubos Eppendorf 1.5 mL.

20 El ARN se extrajo con los kits RNeasy micro (Qiagen ref: 74004) siguiendo las instrucciones del proveedor. La cuantificación de los ARNs se realiza por una dosificación Ribogreen (Molecular Probes ref: R11490). La calidad se validó con un bioanalizador Agilent 2100 que da la relación de las intensidades de los ARNs ribosómica es 28S en 18S así como un Número de Integridad de ARN (RIN) que tiene en cuenta la degradación de los ARNs. Un ARN de buena calidad tiene una relación >1.5 y un RIN >7.

25 Se realiza una reacción de transcriptasa reversa (RT) para obtener los ADNc correspondientes.

30 Se sintetizaron dos sondas para muestras a partir de 50 ng de ARNs con una etapa de amplificación. Los ADNc son marcados por fluorocromos e hibridados sobre chips de ADN Affymetrix® que permiten revelar el nivel de expresión del conjunto de los genes del genoma humano. (Biochips de ADN de tipo Affymetrix U133A 2.0 U133A 2.0 que contienen 54.000 sondas, que permiten hacer el estudio de la expresión de 47.000 transcritos, que incluyen 38.500 genes caracterizados). Affymetrix Microarray Suite (Mas 5.0) permite obtener, para cada transcritos, una señal de detección. Después de la revelación de las hibridaciones específicas y el tratamiento de los datos brutos (extracción, sustracción del ruido de fondo, normalización), la expresión de los genes se comparó entre la piel sana y la piel lesionada. Se han hibridado 2 chips Affymetrix HG_U133 más por las muestras.

35 La calidad de hibridación se efectuó por el método AffyPLM (Bolstad et coll., 2005) y por el método ACP (Análisis en Componentes Principales).

40 Los pacientes no son retenidos para la continuación del análisis si los 2 chips de Affymetrix tienen una calidad de hibridación correcta. Para el presente estudio, han podido ser analizados 13 pacientes de los 15 iniciales.

45 La realización de un perfil transcriptómico de la piel sana y de la piel correspondiente al lentigo actínico ha permitido generar listas de genes diferencialmente expresados en las dos situaciones, e identificar biomarcadores del lentigo actínico. Las listas son generadas bajo forma de relación de expresión entre PL (piel lesionada) versus PN (piel normal). Se retiene la relación que representa la media geométrica de los 13 pacientes.

50 Generación de las listas de los genes diferencialmente expresados entre piel lesionada y piel sana. Etapas:

- Filtros de los que identifican Affymetrix (ProbeSets): solo se retienen las ProbeSets que se presentan en las dos réplicas de al menos una biopsia. Después este filtro se retienen 23968 ProbeSets.

5 - Supresión del efecto paciente: Con el fin de suprimir el efecto paciente observado en los resultados de los análisis diferenciales, la expresión de cada ProbeSet se dividió por la media geométrica de 4 valores de ProbeSets correspondientes a los 4 chips.

10 - Análisis diferencial: Se ha generado un reagrupamiento de las listas obtenidas por 2 métodos, el análisis cNMF (consensos No Negativos Matriz de Factorización (Lee et Seung (1999), Brunet et coll. (2004), Fogel et coll. (2007), Fogel et coll. (2008)).) que ha identificado 2638 ProbeSets (de las cuales 1521 inducidos y 1117 reprimidos) y el método PLS (Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados) que ha identificado 610 módulos ProbeSets. La unión de 2 listas ha permitido obtener una lista de 3248 ProbeSets.

15 - Filtro en la modulación: Para los genes inducidos, selección de las ProbeSets que tienen una media geométrica de 13 veces corregida (FC) ≥ 1.5 : lista de 562 ProbeSets inducidas. Para los genes reprimidos, selección de las ProbeSets que tienen una media geométrica de 13 veces corregidas FC ≤ 0.67 : lista de 807 ProbeSets reprimidos. Para un total: $562 + 807 = 1369$ ProbeSets modulados, sean 1007 ProbeSets después de la eliminación de las duplicaciones (1002 se aproxima cNMF + 5 aproximaciones PLS)

20 - Filtro en los 13 pacientes: Visualización de las modulaciones de 1007 ProbeSets bajo la forma de histogramas y selección de módulos ProbeSets en el mismo sentido en los 13 pacientes. Lista final de 132 ProbeSets que diferencian las biopsias lesionadas de las biopsias no lesionadas y que son moduladas en los mismos sentidos de los 13 pacientes del estudio.

25 - Análisis de la lista de 1007 ProbeSets

30

- Se ha aplicado un filtro en el valor P (≤ 0.00001) con el fin de no retener más que los genes más discriminantes, a la lista de 1002 ProbeSets un filtro sobre el valor P, $P \leq 0.00001$. Después de este nuevo filtro 827 ProbeSets a los cuales se han agregado las 5 ProbeSets provenientes de la aproximación PLS $\Rightarrow$ lista de 832 ProbeSets

Después de la búsqueda de anotaciones, eliminación de los genes no anotados y eliminación de los doblones, se ha establecido una lista de 437 genes diferencialmente expresados entre PL y PN. 169 genes son sobreexpresados en el LA y 269 son subexpresados.

35 Con la ayuda de las herramientas, Gene ontology, PubMed, Scopus se buscan las funciones de los genes y los genes son clasificados por familias funcionales.

Ejemplo 3: Moduladores:

40 Existen compuestos conocidos para modular en el sentido de búsqueda de las proteínas desreguladas en el lentigo. Para la familia de los genes/proteína de la matriz celular, se podrán citar:

- fibratos de los cuales por ejemplo el fenofibrato que elimina la expresión de SMAD3,
- 45 - alcaloides de los cuales la oximatrina que disminuye SMAD3, o los polifenoles como por ejemplo el ácido salviánico B que disminuye SMAD3 y TGFBR2,
- extractos naturales particularmente hierbas medicinales como la Wen-pi-tang-hab-wu-ling-san que disminuye SMAD3,
- 50 - compuestos de la familia de los imidazoles antagonistas de TGF- β R1 como el SB-431542 que disminuye SMAD3,
- ciertos ARNm, particularmente los miR183 y miR29b que disminuyen ITGB1,
- 55 - los inhibidores de uroquinasa tipo plasminógeno activador (uPA) como la p-aminobenzamidina o la B428 benzo[b]tiofeno-2-carboxamodina sustituida en 4 que disminuye la actividad de PLAU,
- compuestos de la familia de los fenilacetatos como el NaPA que disminuye la expresión de PLAU,
- 60 - compuestos de la familia química de las tiazolidinodionas de las cuales por ejemplo la pioglitazona que disminuye BMP2 y COL6A3,
- compuestos de la familia química de los tiazoles de los cuales por ejemplo el GW-0742 que disminuye la expresión de BMP2,
- 65 - compuestos de la familia de los tetrazoles como el Valsartan que disminuye TIMP1.

Con relación a la proteína enzimática PLOD2 de la familia extracelular subexpresada en el lentigo, se podrán emplear los compuestos siguientes para restaurar su tasa:

- 5 - compuestos de la familia de las quinazolininas como el Vandetanib (ZD64745 5) que aumenta PLOD2.

Pueden emplearse igualmente otros tipos de moduladores para permitir la corrección de expresión/cantidad o actividad de las proteínas desreguladas. Se pueden citar:

- 10 - ácidos nucleicos (preferiblemente ARN antisentido o ARNi), anticuerpos neutralizantes,
- medios eléctricos, luminoso, mecánico o térmico. A título de ejemplo, podrán utilizarse ultrasonidos pulsados de baja intensidad (LIPUS) para aumentar la cantidad o la actividad de PLOD2.
- 15 Al contrario en caso de mancha hipopigmentaria, los módulos preferidos serán aquellos que aumentan la tasa de expresión o de actividad de las proteínas provenientes de los genes TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7, EFEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, MXRA5, LYZ, PLA2, TIMP1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1 y aquellos que disminuyen la tasa de expresión o de actividad de las proteínas provenientes de los genes SOSTDC1, ECM1, HS3ST6, FLRT2, CTS2 y PLOD2.
- 20

En la Tabla 3 se reportan igualmente ejemplos de tales moduladores.

Tabla 3. Lista de moduladores de genes implicados en el lentigo actínico

Subfamilia/ Función	Nombre	Modulador gen/proteína	Sentido de la modulación
TGFB/ SMAD	TGFB1, Factor β de crecimiento transformante, 68kDa	Polvo óseo desmineralizado (<i>Demineralized bone powder</i> , DBP)	Aumenta expresión
TGFB/SMAD	BMP2, proteína 2 morfogénica de hueso	Pioglitazona	Disminuye expresión
		GW0742	Disminuye expresión
		Cristata L flavonoide	Aumenta expresión
	SMAD3, miembro 3 de la familia SMAD	Fenofibrato	Disminuye expresión
		Oximatrina	
		Ácido Salvianólico B (Sal B), componente de Danshen (una hierba tradicional china utilizada para las enfermedades renales crónicas) antioxidante y de protección celular.	
		SB-431542 (un inhibidor específico de T β R-I quinasa)	
		Extracto de Wen-pi-tang-Hab-Wu- ling-san (WHW)	Disminuye fosforilación
TGFB/ SMAD	TGFB2, Factor de crecimiento transformante, β receptor II (70/80kDa)	Ácido salvianólico B (SA-B)	Disminuye expresión
TGFB/ SMAD	SMAD7, miembro 7 de la familia SMAD	Oximatrina	Aumenta expresión
		3-desoxiglucosona (Precursor de producto final de glicación avanzada)	
		Tetrandrina	
		N-acetil-seril-aspartil-lisil- prolina(Ac-SDKP)	
Colágeno	COL6A3, colágeno, tipo VI, alfa 3	Pioglitazona	Disminuye expresión
Integrina	ITGB1, integrina, beta	miR-183 , miR-29b	Disminuye expresión
Remodelación de matriz	LYZ, lisozima (amiloidosis renal)	Polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria (PACAP) PACAP38	Aumenta expresión

Subfamilia/ Función	Nombre	Modulador gen/proteína	Sentido de la modulación
Remodelación de matriz	TIMP1, Inhibidor 1 de metalopeptidasa	Valsartan, (bloqueador del receptor de angiotensina II tipo 1 ARB) Extracto vegetal de Lupinus albus LU10	Disminuye expresión.
		Polvo óseo desmineralizado (<i>Demineralized bone powder</i> , DBP)	Aumenta expresión.
Remodelación de matriz	PLAU, activador de plasminógeno, uroquinasa	Fenilacetato de sodio (NaPA)	Disminuye expresión
		P-aminobenzamidina (Inhibidor del activador de plasminógeno tipo Uroquinasa (uPA)):B428 4, B392 benzo[b]tiofen-2-carboxamidas sustituidas. (Inhibidor del activador de plasminógeno tipo Uroquinasa (uPA))	Disminuye actividad
		Tienopiridina SR 25989 (Inhibidor de angiogénesis derivado esterificado de ticlopidina), Notoginsenosido R1 (procedente de PANAX notoginseng)	Aumenta expresión
Asimilado Proteoglicano	ASPN, Asporina	letrozol, anastrozol	Aumenta expresión
Membrana basal	MATN2, matrilina 2	Vitamina K2 menaquinona	Aumenta expresión
Colágeno	PLOD2 , procollagenolisina, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2	beta-aminopropionitrilo (bAPN)	Disminuye expresión
		Ultrasonido pulsado de baja intensidad <i>Low-intensity pulsed ultrasound</i> (LIPUS)	Aumenta expresión/actividad
		Vandetanib (ZD6474 5)	
Remodelación de matriz	CTSL2 ,cathepsina L2	Derivados de fenilalanina	Disminuye actividad

Ejemplo 4: Estimulación de la pigmentación de las pieles reconstruidas pigmentadas por tratamiento al TGFbeta

5 1) Protocolo de tratamiento.

El protocolo de tratamiento de las pieles reconstruidas pigmentadas (PRP) a TGFbeta se ilustra en la figura 1 y es el siguiente:

- 10 Las dermis equivalentes (redes) que contienen fibroblastos que viven en una matriz de colágeno son adheridas en el fondo de una caja de petri (J-4) y son tratadas con TGFbeta1 (T en la figura 1) en la concentración de 200 pg/mL (vehículo: HCl 4 mM y 1 mg/mL de BSA; medio: MEM 3F con 2% de FBS), durante 3 días (J-3; J-2 y J-1 en la figura 1). Luego la epidermis pigmentada se reconstruye sobre la dermis equivalente sembrando los queratinocitos y los melanocitos (J-0). El cultivo se mantiene en inmersión durante 1 semana y en emergencia durante 2 semanas (figura 1).

Se toman muestras para análisis de la pigmentación:

- 20 - la integración y la morfología de los melanocitos se observan después de la reacción Dopa sobre la epidermis desprendida;
- la medida colorimétrica de la luminancia informa sobre el grado de claridad de las muestras (cuanto más baja es L* más oscuras son las muestras);
- 25 - la presencia de melanina se observa después de la coloración Fontana Masson de los cortes de piel; y

- la cantidad de melanina presente en la epidermis se mide por análisis de imágenes.

2) Resultados:

Los resultados muestran que después de un tratamiento con el TGFbeta 1 a 200 pg/mL y comparativamente al control (figuras 2 y 3):

- los melanocitos están siempre presentes en la epidermis y conservan una morfología correcta dendrítica;

- los depósitos de melanina son más importantes en la epidermis;

- la luminancia de las muestras disminuye (oscurecimiento de las pieles reconstruidas tratadas);

- el contenido de melanina se aumenta, visiblemente por observación de los cortes coloreados con Fontana Masson y es objetivado por la cuantificación de la melanina por análisis de imágenes.

El experimento se renueva una segunda vez y confirma los resultados obtenidos (figura 3).

Los resultados demuestran que una activación de la ruta de señalización del TGF-beta es responsable de una pigmentación más importante de la piel en comparación con la ausencia de activación de esta ruta de señalización.

Bibliografía:

Andersen WK, Labadie RR, Bhawan J. « Histopathology of solar lentigines of the face: a quantitative study." J Am Acad Dermatol. 1997 Mar;36(3 Pt 1):444-7.

Ber Rahman S, Bhawan J. Lentigo. Int J Dermatol. 1996 Apr;35(4):229-39. Review.

Berking C, Takemoto R, Schaidler H, Showe L, Satyamoorthy K, Robbins P, Herlyn M. "Transforming Growth Factor-β1 Increases Survival of Human Melanoma through Stroma Remodeling". Cancer Res (2001); 61: 8306-8316.

Cario-Andre M, Lepreux S, Pain C, Nizard C, Noblesse E, Taïeb A. « Perilesional vs. lesional skin changes in senile lentigo. » J Cutan Pathol. 2004 Jul;31(6):441-7.

Carli P, Salvini C. "Lentigines including lentigo simplex, reticulated lentigo, and actinic lentigo." In Color Atlas of melanocytic lesions of the skin. Soyer H.P., Argenziano G., Hofman-Wellenhof R., Johr R. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007: 290-294.

Kawata Y, Suzuki H, Higaki Y, Denisenko O, Schullery D, Abrass C, Bomsztyk; "Bcn-1 Element-dependent activation of the laminin gamma 1 chain gene by the cooperative action of transcription factor E3 (TFE3) and Smad proteins". J Biol Chem. 2002; 277(13):11375-84.

Menzies SW, Crotty KA, Ingvar C, McCarthy WH. "Benign pigmented macules." In An atlas of surface microscopy of pigmented skin lesions: Dermoscopy. Eds Menzies SW, Crotty KA, Ingvar C, McCarthy WH. McGraw-Hill book company Australia Pty Limited, North Ryde, Australia. 2003: pp 53-60

Montagna W, Hu F, Carlisle K. «A reinvestigation of solar lentigines ». Arch Dermatol. 1980 Oct;116(10):1151-4.

Stolz W, Braun-Falco O, Bilek P, Landthaler M, Burgdorf WHC, Coggnetta AB. "Differential diagnosis of pigmented skin lesions" In Color atlas of dermatology. Eds Stolz W, Braun-Falco O, Bilek P, Landthaler M, Burgdorf WHC, Coggnetta AB. Blackwell Wissenschafts- Verlag, Berlin, Germany.2002: pp41-66.

Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. "Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach". J. Biol. Chem. (2001) 276 : 17058-17062.

REIVINDICACIONES

1. Método de caracterización de una mancha pigmentaria cutánea aparente o supuesta en un ser humano, que comprende la comparación de los niveles de expresión, en las muestras de piel proveniente de la dicha mancha y de la piel adyacente no lesionada, dentro de las células de la dermis, de al menos un gen dérmico unido a la matriz extracelular seleccionado entre:
 - A. la lista constituida por los genes TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, o bien entre
 - B. la lista constituida por los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1,
 en el que la dicha mancha pigmentaria cutánea es un lentigo actínico.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende la comparación de los niveles de expresión y al menos dos genes distintos preferiblemente de al menos cinco genes distintos seleccionados entre uno y/u otro de las listas A y B.
3. Método según la reivindicación 1, en donde el dicho gen se selecciona entre la lista constituida de los genes TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2 y TGFB3.
4. Método según la reivindicación 1, en donde la dicha mancha se confirma como lentigo actínico cuando el nivel de expresión es
 - superior en la muestra proveniente de la mancha con respecto al nivel en la muestra de piel adyacente no lesionada, si el gen es seleccionado entre TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, e
 - inferior en la muestra de piel proveniente de la mancha con respecto al nivel en la muestra de piel adyacente no lesionada, si el gen se escoge entre SOSTDC1 y PLOD2.
5. Método *in vitro* de evaluación de la eficacia de un tratamiento de los lentigos actínicos, que comprende la comparación de los niveles de expresión dentro de las células de la dermis en una muestra de piel proveniente de un tal lentigo, antes y después del tratamiento, de al menos un gen dérmico unido a la matriz extracelular seleccionado entre la lista constituida por los genes TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, o bien entre la lista constituida de los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1.
6. Método según la reivindicación 5, en donde el dicho tratamiento se considera como eficaz para el tratamiento de lentigos actínicos cuando el nivel de expresión es:
 - inferior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento, si el gen se selecciona entre TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, y
 - superior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento si el gen se selecciona entre SOSTDC1 y PLOD2.
7. Método *in vitro* de evaluación de la eficacia de un tratamiento de los lentigos actínicos, que comprende la comparación, antes y después del tratamiento, del nivel de expresión en las células de la dermis en un modelo celular representativo de la piel de al menos un gen dérmico unido a la matriz extracelular seleccionado entre la lista constituida por los genes TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, o bien entre la lista constituida de los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, o bien del nivel de expresión o de actividad del producto de expresión del dicho gen seleccionado.
8. Método cosmético de tratamiento o de prevención del lentigo actínico no patogénico de la piel humana, que comprende la modulación del nivel de expresión o de la actividad de un gen dérmico unido a la matriz extracelular, en donde el dicho gen se selecciona entre la lista constituida por los genes TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1 o bien entre la lista constituida de los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV y ACTN1.
9. Método según la reivindicación 8, en donde el dicho método comprende la modulación de al menos dos genes, preferiblemente de al menos cinco genes distintos, seleccionados entre la lista constituida por los genes TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1 y/o entre la lista constituida de los genes

FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV y ACTN1, en donde la dicha modulación es una inhibición si el gen es seleccionado entre TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV y ACTN1, y un aumento del nivel de expresión o de la actividad si el gen se selecciona entre SOSTDC1 y PLOD2.

5

10. Utilización de un modulador del nivel de expresión o de la actividad del producto de expresión de al menos un gen dérmico seleccionado entre la lista constituida por los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, o bien entre la lista constituida de los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV y ACTN1, para una aplicación cosmética en el tratamiento de lentigos actínicos no patogénicos, siendo el dicho modulador un antisentido, un microARN o un ARNsi dirigido contra el gen dérmico seleccionado y que inhibe la expresión del dicho gen.

10

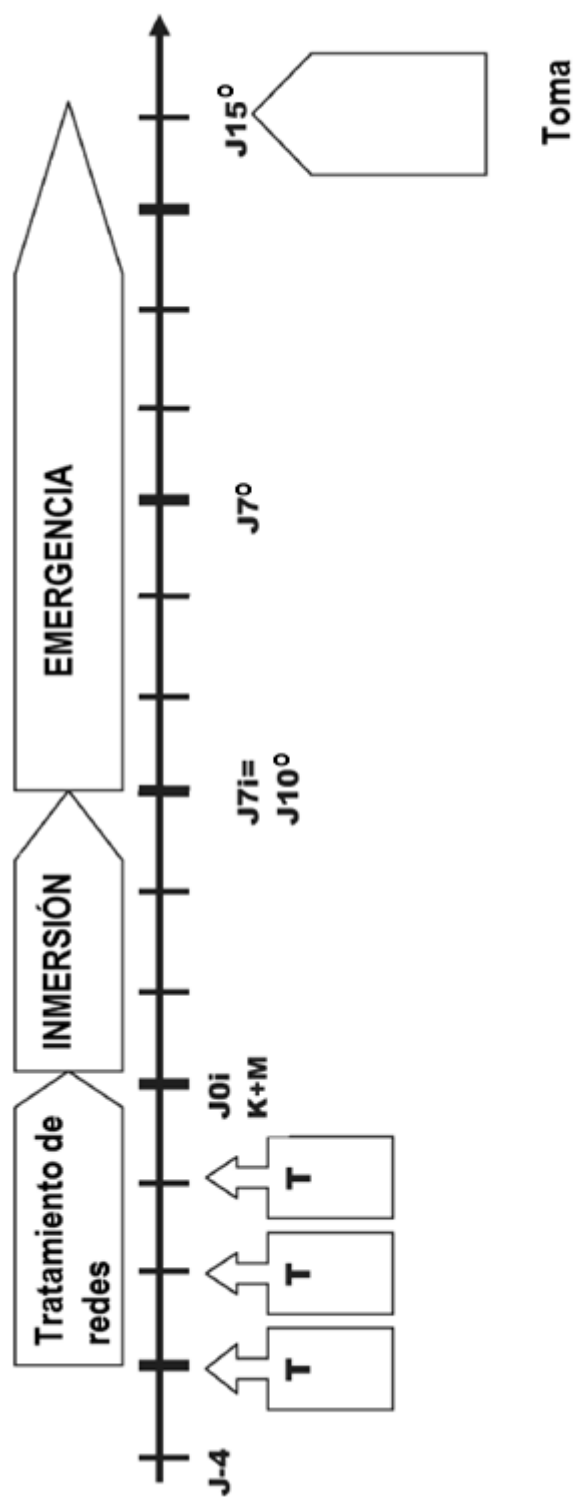


FIG.1

FIG.2

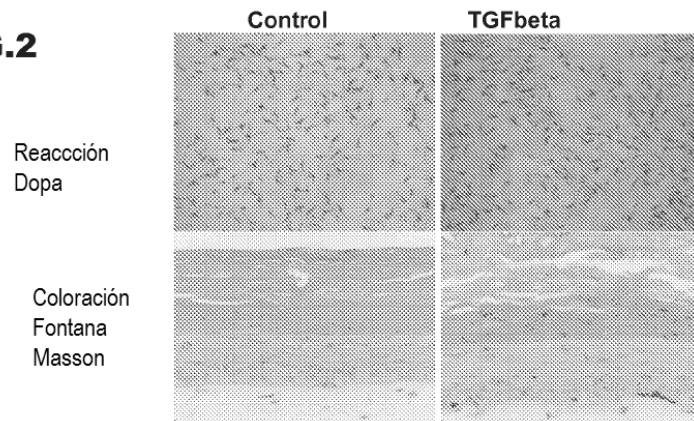


FIG.3

