

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 937**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2009 E 09166054 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2147982**

54 Título: **Firma molecular representativa de disfunción de la homeostasis epidérmica**

30 Prioridad:

**22.07.2008 FR 0804169**

**09.09.2008 US 95360 P**

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

**21.07.2017**

73 Titular/es:

**L'OREAL (100.0%)**

**14, RUE ROYALE**

**75008 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**SEXTIUS, PEGGY;**

**BERNARD, BRUNO;**

**BERNERD, FRANÇOISE y**

**MARIONNET, CLAIRE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 625 937 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 representativa de disfunción de la homeostasis epidérmica

5 La presente invención se inscribe en el campo cosmético, y más particularmente en el campo de la piel. La invención se basa en la identificación, por los inventores, de 25 genes cuya cinética de modulación o nivel de modulación en la epidermis después de una agresión, refleja la homeostasis epidérmica de la piel y distingue entre una piel denominada "envejecida" y una piel denominada "joven".

10 El estrato córneo, o capa córnea, es la capa superficial de la epidermis situada en la interfaz entre el organismo y su entorno. Está compuesta por corneocitos, células anucleadas que resultan de la diferenciación de los queratinocitos epidérmicos. Los corneocitos son ricos en queratinas y están rodeados por una matriz lipídica impermeable. Debido a su composición en proteínas y en lípidos, el estrato córneo juega un papel esencial de barrera cutánea. Impide la intrusión de agentes microbiológicos y permite preservar la hidratación de la piel y, por lo tanto, del cuerpo en general.

15 Todas las agresiones físicas o químicas a la integridad del estrato córneo tienen como consecuencia un aumento de la pérdida de agua a través de la piel. De este modo, la aplicación tópica de acetona o de detergentes que provocan una deslipidación superficial del estrato córneo, o la abrasión con esparadrapo ("*tape stripping*"), aumentan de manera muy importante la pérdida insensible de agua (Grubauer, G y col., 1989; Kuss, O. y col., 1998; Pinnagoda, J y col., 1990; Tanaka, M. y col., 1997; Zhai H. y col., 1998). Dichas alteraciones perturban, de hecho, toda la homeostasis epidérmica e inducen en la epidermis una respuesta fisiológica con el fin de restaurar la integridad de la función barrera del estrato córneo. De este modo, los queratinocitos de las capas superficiales de la epidermis activan la secreción extracelular de cuerpos lipídicos para aportar rápidamente a la piel una nueva membrana impermeable y reducir, de este modo, de forma superficial la pérdida de agua (Grubauer, G. y col. 1987; Menon, G.K., 1985).

20 Por otro lado, la proliferación de los queratinocitos de la capa basal es activada para reemplazar las células del estrato córneo que han sido dañadas (Proksch E., 1991; Wood, L.CL y col., 1992).

La medida de "Pérdida Insensible de Agua" (PIA) es el método utilizado más frecuentemente para evaluar la integridad de la función barrera del estrato córneo (Piepkorn, M. y col., 1994). La PIA se mide con ayuda de un evaporímetro. Este aparato posee un detector de humedad y de temperatura que le permite medir el gradiente de evaporación del agua en la superficie de la piel. No obstante, las medidas de PIA están sometidas a numerosos factores de variaciones que limitan su precisión. La temperatura ambiente, la higrometría, la turbulencia del aire o la presión con la que se aplica el aparato inducen, en efecto, variaciones notables a nivel de estas medidas (Barel, A.O. y col., 1995). El estado de estrés del voluntario durante las medidas también tiene una influencia no despreciable, por tanto, se recomienda un tiempo de reposo suficiente antes de la lectura (Van, S. y col. 1994). Incluso en regiones tan semejantes como los antebrazos, se ha demostrado una necesidad indispensable de aleatorización de las medidas, estando la PIA aumentada significativamente en el antebrazo dominante (Treffel, P. y col. 1994). En este contexto, el desarrollo de un método de evaluación simple, fiable, reproducible y preciso del estado de la función barrera epidérmica y, por consiguiente, de la dinámica de su función homeostática, sería particularmente ventajoso.

30 En cuanto al envejecimiento de la piel y aparte de las consecuencias bien conocidas de la edad sobre el relieve de la piel, las personas de edad avanzada notifican numerosas molestias. Estas molestias encuentran su origen en una alteración de la función barrera y de la homeostasis epidérmica de su piel. Concretamente, se observa frecuentemente en las personas de edad avanzada una mayor prevalencia en las xerosis crónicas, caracterizadas por una mayor pérdida de agua a través de la piel. De hecho, el estrato córneo de las pieles envejecidas tiene un contenido de lípidos intercelulares reducido con respecto a las pieles jóvenes, particularmente durante el periodo invernal. Este cambio de composición del estrato córneo perturba sus propiedades físico-químicas de barrera cutánea. El estrato córneo se vuelve, concretamente, más sensible con la edad a las agresiones físicas o químicas tales como la abrasión con esparadrapo o la aplicación de acetona (Ghadially, R. y col., 1995) y su permeabilidad a los medicamentos y en particular a los compuestos hidrófilos disminuye. Por otro lado, la gravedad de las alergias de contacto se exagera en las pieles envejecidas debido a una renovación epidérmica más lenta y, por lo tanto, menos frecuente (Piaserico, S. y col., 2004). Finalmente, la velocidad de recuperación de la función barrera después de la alteración del estrato córneo se ralentiza con la edad, haciendo suponer una disfunción de la función homeostática de la epidermis (Denda, M., 2002; Ghadially, R. y col., 1995; Leveque, J.L., 2001). No obstante, a pesar de estas perturbaciones funcionales debidas al envejecimiento de la piel, se ha demostrado que el estrato córneo de las personas de edad avanzada tiene un grosor equivalente al de las pieles jóvenes (Lock-Andersen, J. y col., 1997) y una PIA constitutiva poco diferente (Ghadially, R. y col., 1996). Esto demuestra que la PIA no permite, en el caso preciso del envejecimiento, una evaluación completa de la funcionalidad de la barrera cutánea y de la homeostasis epidérmica de la piel de un sujeto.

45 Por contra, la mayor parte de los estudios clínicos descritos a día de hoy se basan en medidas de PIA para poner de manifiesto el efecto de tratamientos sobre la función barrera cutánea o para seguir el retorno de la epidermis a un estado homeostático normal después de una agresión. Durante un estudio que pretendía determinar la acción de diversos tratamientos cosméticos sobre la función de barrera de la epidermis humana, se realizó simultáneamente un análisis transcriptómico de la respuesta de la epidermis y de las medidas de PIA (Marionnet C. y col., 2004). De este modo se identificaron marcadores reproducibles y comunes a las diferentes agresiones, así como marcadores

específicos de cada una de las agresiones; sin embargo la PIA no permitió aportar elementos de comparación de los tratamientos cosméticos efectuados.

En estas condiciones, existe una necesidad de identificación de marcadores pertinentes, reproducibles y significativos que reflejen la homeostasis epidérmica y que permitan poner de manifiesto un eventual desequilibrio de la función barrera debido a la homeostasis epidérmica de la piel, tal como el desequilibrio debido a la edad.

Para ello, los inventores realizaron un estudio transcriptómico comparativo de la cinética de retorno a la homeostasis epidérmica de la epidermis humana después de la alteración del estrato córneo por abrasión con esparadrappo, entre individuos sanos jóvenes y otros de edad avanzada.

La expresión de varios cientos de genes varió con el paso del tiempo después de la abrasión con esparadrappo. Pero, de forma sorprendente e inesperada, los inventores observaron que 18 genes particulares muestran una cinética de modulación significativamente diferente de acuerdo con la edad del paciente. Los inventores demostraron también que otros 7 genes muestran sistemáticamente, en todo momento, un nivel de modulación significativamente diferente después de la abrasión con esparadrappo en función de la edad.

Los 25 genes identificados por los inventores permiten, por lo tanto, distinguir una piel joven de una piel envejecida en respuesta a una agresión y, por lo tanto, por ello evaluar la capacidad homeostática de la epidermis de un individuo. Se trata de una firma representativa de las diferentes de expresión génica que existen entre la piel humana joven y la piel envejecida tras una alteración de la función barrera por una agresión.

Definiciones:

En el marco de la presente solicitud, los términos a continuación tienen, más particularmente, el siguiente significado:

Abrasión con esparadrappo o "desprendimiento de la capa córnea con un adhesivo": se trata de un método para realizar una agresión física de la piel que consiste en eliminar los corneocitos con ayuda de un esparadrappo, llegado el caso reproduciendo varias veces el desprendimiento del adhesivo. La abrasión con esparadrappo se denomina de "control" cuando solamente altera el estrato córneo y eventualmente las capas superficiales de la epidermis malpighiana, sin alterar las capas más profundas de la epidermis.

Homeostasis epidérmica: Caracteriza el conjunto de las funciones de regulación de la epidermis que le confieren la capacidad de mantener un equilibrio fisiológico y un buen funcionamiento a pesar de las tensiones exteriores. La homeostasis de la epidermis está, entre otras cosas, garantizada por su función barrera que permite concretamente impedir la intrusión de agentes microbiológicos y preservar la hidratación de la piel impidiendo la pérdida de agua. Esta capacidad puede ser excelente o buena cuando, en respuesta a una agresión, la epidermis reacciona inmediata o rápidamente para reconstituir el equilibrio de funcionamiento, puede ser deficiente o inexistente cuando el retorno al equilibrio es tardío o no se consigue. Esta capacidad homeostática de la piel puede estar, por lo tanto, plenamente garantizada, caso de la piel joven normal, o ser defectuosa, caso de la piel envejecida o de todas las demás pieles que presentan un desequilibrio de funcionamiento.

La presente invención se refiere, por lo tanto, a la utilización de un nuevo procedimiento de evaluación clínica del estado de la epidermis a través de las deficiencias de su función homeostática, por medio del estudio del nivel de expresión de todos o parte de los 25 genes identificados por los inventores.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente solicitud se refiere a un método de evaluación de la homeostasis epidérmica de la piel de un sujeto, más particularmente de un ser humano.

De acuerdo con una primera implementación, dicho método comprende el análisis diferencial de la expresión de los genes ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y GSN, seleccionados entre los genes KRT6B, KRT16 (también conocido con la denominación K16), ESRRA, CBX3, MAP3K5, TRIO, PIK3CD, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, NID1, SMT3H2, LGALS2, DOC1, PRKCG, S100A8, S100A9, S100A2, S100A7, K15, SPRR1B y GSN, en respuesta a una agresión física o química del estrato córneo.

Los 25 genes mencionados anteriormente, a saber KRT6B, KRT16, ESRRA, CBX3, MAP3K5, TRIO, PIK3CD, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, NID1, SMT3H2, LGALS2, DOC1, PRKCG, S100A8, S100A9, S100A2, S100A7, K15, SPRR1B y GSN, se denominan los genes de la invención. Estos genes no son de la familia de las citocinas de tipo IL1.

La presente invención se refiere, por lo tanto, a la evaluación clínica de la homeostasis epidérmica y la puesta de manifiesto de sus disfunciones gracias al análisis diferencial de varios genes de la invención en respuesta a una agresión, preferentemente al menos dos genes.

Entre estos 25 genes identificados por los inventores, ya se ha descrito que algunos son específicos de la epidermis. Debe observarse, sin embargo, que no se había puesto de manifiesto nunca antes de la invención que su cinética de modulación o su nivel de modulación, en respuesta a una agresión física o química, variaba en función de la edad del individuo y permitía, por lo tanto, una evaluación de la homeostasis epidérmica.

Por otro lado, entre los genes identificados por los inventores, ciertos no habían sido descritos nunca como implicados de cualquier manera en la homeostasis epidérmica. Se trata de los genes ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y GSN. Estos genes son, más particularmente, preferidos en el marco de la presente invención.

De acuerdo con otra implementación, dicho método comprende una etapa de realización de una agresión del estrato córneo en una región de la piel de un individuo, y a continuación la determinación

- de la cinética de modulación de la expresión de los genes ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2 y DOC1, y
- del nivel de modulación de la expresión del gen GSN,

en la epidermis correspondiente a la región agredida y una etapa de comparación de la cinética o del nivel de modulación observado con la cinética de referencia o con el nivel de referencia para la modulación de la expresión de dichos genes.

De acuerdo con otra implementación más, dicho método comprende la comparación de la cinética de modulación de la expresión de los genes ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2 y DOC1 en la epidermis correspondiente a una región de la piel después de una agresión del estrato córneo y la comparación del nivel de modulación de la expresión del gen GSN en la epidermis correspondiente a una región de la piel después de una agresión del estrato córneo, realizándose dicha comparación con respecto a la cinética de referencia o al nivel de referencia para la modulación de la expresión de dichos genes.

Dicho sujeto o individuo es un ser humano, preferentemente de al menos 20 años de edad y, más particularmente, de al menos 40 años, preferentemente de al menos 60 años. Puede tratarse de un hombre o de una mujer. La piel o la epidermis de este sujeto o individuo del que se hace referencia puede corresponder a cualquier región del cuerpo; preferentemente se trata de la piel o de la epidermis situada sobre uno de los miembros, y más particularmente de la piel o de la epidermis de los brazos, preferentemente de los antebrazos.

Por análisis diferencial de la expresión de un gen dado, se entiende el análisis de las diferencias entre la expresión (o bien la cinética de expresión o la tasa de expresión) de un gen en una región de piel que ha sufrido una agresión con respecto a una región de piel del mismo individuo que no ha sufrido una agresión.

Del mismo modo, por cinética de modulación o nivel de modulación de un gen dado, se entiende la diferencia entre la cinética de expresión o el nivel de expresión del gen en una piel agredida y aquella en una piel no agredida. La piel agredida y no agredida es la del mismo individuo.

Preferentemente, las zonas de piel agredida y no agredida son zonas de piel equivalentes, en términos de emplazamiento y de función; por ejemplo, se trata de zonas de piel situadas sobre miembros izquierdo y derecho, en lugares equivalentes, concretamente el interior del antebrazo.

De acuerdo con una realización preferida del método de la invención, la modulación de la expresión del o de los genes seleccionados se normaliza mediante referencia a la expresión de al menos un gen seleccionado entre S100A10, EIF1, ACTR1A, RPL28, RPL5, RPL35, RPS13, RPS23, RPS16, RPL18, RPS15A, RPL7A, RPS28, G3BP1, TMSB4X, HLA-C, DYNLL1, NACA, ARHA, BAI2, UBA52 y GNAS en la epidermis correspondiente a la región agredida. Preferentemente, la normalización se efectúa con ayuda de al menos un gen entre RPL28, RPL5, RPL35, RPS13, RPS23, RPS16, RPL18, RPS15A, RPL7A, RPS28, G3BP1, TMSB4X, HLA-C, DYNLL1, NACA, ARHA, BAI2, UBA52 y GNAS.

Los inventores mostraron, en efecto, que el nivel de expresión de estos genes era no solamente constante en el tiempo que sigue a la agresión, sino también semejante sea cual sea la edad del individuo; por consiguiente, el nivel de expresión de estos genes es perfectamente independiente de la homeostasis epidérmica. El nivel de expresión de estos genes está adaptado, por lo tanto, para efectuar la normalización de la cinética o del nivel de expresión de un gen seleccionado de acuerdo con la presente invención. Los 19 genes mencionados anteriormente pueden ser calificados de “genes de mantenimiento”.

En el método de acuerdo con la presente invención, la agresión del estrato córneo que se realiza a nivel de la piel es una agresión física o química. De acuerdo con una implementación preferida ilustrada más particularmente en la sección experimental de la solicitud, la agresión se realiza por “abrasión con esparadrapo”. De acuerdo con otras implementaciones, la agresión puede ser química y consistir, por ejemplo, en la aplicación de acetona, de un agente deslipidante (por ejemplo SLS, SDS,...) o de un agente químico abrasivo ácido o básico. La agresión también puede realizarse mediante un método mecánico, tal como abrasión o la utilización de micro-agujas; también puede realizarse mediante un método físico, tal como calor.

Otros medios convencionales para efectuar una alteración del estrato córneo son bien conocidos por el experto en la materia en el campo de la invención.

Preferentemente, la agresión del estrato córneo realizada en los métodos de la invención, conlleva una alteración fuerte del estrato córneo. De manera más particularmente preferida, la muy gran mayoría del estrato córneo está dañada, incluso totalmente retirada, en la zona que sufre la agresión.

Para limitar las molestias para el individuo, la zona que sufre la agresión puede estar, sin embargo, limitada a varios centímetros cuadrados, o incluso menos. Preferentemente, la zona tiene un diámetro mínimo de 3 mm.

5 Preferentemente, la agresión física o química del estrato córneo está limitada al estrato córneo y no daña las otras capas de la epidermis, ni la dermis. En la parte experimental de esta solicitud, se describe la realización de una abrasión con esparadrapo controlada que permite alterar solamente el estrato córneo. Las capas superficiales de la epidermis malpighiana pueden ser eventualmente afectadas, pero preferentemente, la agresión está controlada para evitar actuar sobre capas más internas de la epidermis.

10 Para los diferentes genes de la invención, en ciertas implementaciones de los métodos de la invención, se hace mención de cinética de referencia o de nivel de referencia para la modulación de la expresión del gen. Esta cinética de referencia o nivel de referencia corresponde a la modulación de la expresión de un gen de la invención, que se observa, después de la agresión física o química de la piel, y que caracteriza una homeostasis epidérmica normal, es decir una función barrera normal de la epidermis, tal como se encuentra en general para la piel de sujetos  
15 jóvenes.

Preferentemente, la cinética de referencia y/o el nivel de referencia para la modulación de los genes de la invención corresponden a los observados normalmente para la piel de un sujeto de aproximadamente 25 años de edad. Por "normalmente", se entiende la cinética o el nivel correspondientes a la media más o menos el 10 % de los niveles o  
20 cinéticas de al menos cinco, preferentemente una decena, incluso de al menos una veintena incluso una centena de individuos de aproximadamente 25 años de edad.

Esta cinética de referencia y/o este nivel de referencia para la modulación de un gen de la invención pueden determinarse en voluntarios jóvenes, preferentemente de menos de 25 años, en función de la agresión realizada.  
25 Los voluntarios tienen, preferentemente, más de 18 años.

La parte experimental de la presente solicitud muestra la determinación de la cinética y del nivel de modulación de los 25 genes de la invención en individuos de 25 años de edad (+/- 4 años), la cinética y el nivel de modulación observados pueden constituir, en la presente invención, una cinética de referencia y un nivel de referencia, para la  
30 modulación de los genes de la invención en respuesta a una abrasión con esparadrapo.

A la inversa, es posible definir la cinética de referencia y/o el nivel de referencia para la modulación de los genes de la invención, con respecto a la modulación de dichos genes en individuos que presentan una piel denominada envejecida es decir cuya homeostasis epidérmica, o función barrera homeostática, está alterada.  
35

Por ejemplo, en ciertas implementaciones de métodos de la invención, la cinética de referencia o el nivel de referencia corresponde a la cinética o al nivel de modulación de la expresión de dicho gen observado normalmente para una piel de un sujeto de aproximadamente 60 años de edad o más. Por normalmente, se entienden cinéticas o modulaciones observadas "de media", es decir en al menos 5, preferentemente al menos 10, incluso 20 o 100  
40 individuos de más de 60 años.

Se recuerda que, en el marco de la presente invención, los genes más particularmente preferidos entre los 25 genes puestos de manifiesto por los inventores, son los genes ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y GSN.  
45

Debido a esto, los métodos de la invención comprenden la comparación de la cinética de modulación de la expresión de los genes ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y la comparación del nivel de modulación de la expresión del gen GSN.

50 Los inventores de la presente invención han demostrado que, en respuesta a una agresión física o química del estrato córneo, la cinética y/o el nivel de modulación de estos 25 genes diferían en función de la capacidad homeostática de la epidermis de la piel examinada, lo que constituye, por lo tanto, una firma de las diferencias de expresión génica. No obstante, las modulaciones pueden ser diferentes de acuerdo con los individuos; además, otros factores pueden conducir a la modulación de un gen de la invención, sin que, no obstante, esta modulación esté necesariamente relacionada con la homeostasis epidérmica.  
55

En estas condiciones, se implementan métodos realizando el análisis diferencial o la comparación de los niveles o cinéticas de modulación de al menos dos genes diferentes seleccionados entre KRT6B, KRT16, ESRRA, CBX3, MAP3K5, TRIO, PIK3CD, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, NID1, SMT3H2, LGALS2, DOC1, PRKCG, S100A8, S100A9, S100A2, S100A7, K15, SPRR1B y GSN. Preferentemente, se seleccionan al menos 3 genes diferentes y su modulación es seguida en respuesta a una agresión del estrato córneo. La combinación de al menos dos genes, o más, puede seleccionarse más particularmente entre los genes ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y GSN.  
60

65 De acuerdo con otras implementaciones preferidas, se seleccionan los 25 genes de la invención.

Son combinaciones concretamente: al menos un gen entre los genes KRT6B y KRT16 combinado con al menos un gen entre los genes ESRRA, CBX3, MAP3K5, TRIO, PIK3CD, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, NID1, SMT3H2, LGALS2, DOC1, PRKCG y con al menos un gen entre los genes S100A8, S100A9, S100A2, S100A7, KRT15, SPRR1B y GSN.

Se prefiere que se seleccionen al menos dos genes. De acuerdo con una realización divulgada en el presente documento, al menos uno de los genes de la combinación se selecciona entre los genes KRT6B, KRT16, ESRRA, CBX3, MAP3K5, TRIO, PIK3CD, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, NID1, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y PRKCG y al menos un gen de la combinación se selecciona entre S100A8, S100A9, S100A2, S100A7, K15, SPRR1B y GSN. De acuerdo con otra realización, al menos un gen se selecciona entre ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y al menos otro gen se selecciona entre S100A8, S100A9, S100A2, S100A7, K15, SPRR1B y GSN.

De acuerdo con otros supuestos, al menos tres genes se seleccionan entre KRT6B, KRT16, ESRRA, CBX3, MAP3K5, TRIO, PIK3CD, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, NID1, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y PRKCG y al menos dos genes se seleccionan entre S100A8, S100A9, S100A2, S100A7, K15, SPRR1B y GSN, o bien al menos cuatro genes entre la primera lista y al menos tres genes entre la segunda lista.

Preferentemente, en el marco de los métodos de acuerdo con la invención, el análisis diferencial, la comparación de la cinética de modulación y/o la comparación de los niveles de modulación se realizan en las 72 horas siguientes a la agresión química o física, concretamente cuando dicha agresión es una abrasión con esparadrapo. En efecto, es en este intervalo de tiempo que los inventores pusieron de manifiesto las diferencias más importantes entre las pieles jóvenes y envejecidas y que reflejan, por lo tanto, las disfunciones de la homeostasis epidérmica. Preferentemente, los análisis diferenciales o comparaciones mencionadas anteriormente se realizan en las 36 horas que siguen a la agresión química o física.

Como se explica en la parte experimental de la solicitud, los inventores han destacado, además, que las diferencias más significativas se observaban 6 horas y 30 horas después de la agresión química o física del estrato córneo.

En estas condiciones, para los genes S100A8, S100A9, S100A2, S100A7, K15, SPRR1B y GSN, el análisis diferencial o la comparación del nivel de modulación se realiza, preferentemente, 6 horas o 30 horas después de la agresión, o bien sucesivamente 6 y 30 horas después de la agresión. Este análisis o comparación puede realizarse, en caso contrario, en cualquier momento preferentemente en las 36 primeras horas que siguen a la agresión del estrato córneo.

Para los genes seleccionados entre KRT6B, KRT16, ESRRA, CBX3, MAP3K5, TRIO, PIK3CD, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, NID1, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y PRKCG, el análisis diferencial o la cinética de modulación de la expresión del gen se determina preferentemente 6 horas y 30 horas después de la agresión física o química.

Los diferentes métodos de acuerdo con la presente invención necesitan la determinación de la modulación de la expresión de los genes ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y GSN, seleccionados entre los 25 genes de la invención. La expresión de los genes se cuantifica preferentemente mediante análisis de ARN mensajero (ARNm) transcrito en la epidermis. La cuantificación del ARNm transcrito se realiza por ejemplo con ayuda de la técnica de transferencia de Northern, transferencia por puntos, RT-PCR, hibridación en chips de ADN, método SAGE o mediante utilización de tarjetas microfluidicas.

Por supuesto, pueden utilizarse otras técnicas que permiten la cuantificación del ARNm. Todas estas técnicas son bien conocidas por el experto en la materia.

Por ejemplo, podrán utilizarse cebadores para el análisis mediante RT-PCR de la expresión génica que tienen las secuencias siguientes ilustradas en la tabla A (secuencias de los cebadores sentido (S) y antisentido (AS)).

Tabla A:

ESRRA	S: cctatctcagggaggaagg (SEQ ID N.º1), AS: tctccaagtcccactctgct (SEQ ID N.º2)
CBX3	S: ttggcagtttaggacctgct (SEQ ID N.º3), AS: gttcttctgcttttgctg (SEQ ID N.º4)
KRT6B	S: cttctcatcaatacctgttccactgag (SEQ ID N.º5), AS: atcaggacaactgactgtcagatgag (SEQ ID N.º6)
MAP3K5	S: cacatcacaccctcattgc (SEQ ID N.º7), AS: cgaagtcagctccagtttc (SEQ ID N.º8)
TRIO	S: aaagcttgccggtgaggtaga (SEQ ID N.º9), AS: ctgtcaaggagcgactcc (SEQ ID N.º10)
PIK3CD	S: ctccgtgagagctggaaaac (SEQ ID N.º11), AS: cgtttccgttatggctggt (SEQ ID N.º12)
TCRB	S: cccaaccagacctctctgt (SEQ ID N.º13), AS: tctgatggctcaaacacagc (SEQ ID N.º14)
PRRG2	S: tgggcagatgacctgaca (SEQ ID N.º15), AS: ttacgaagtgccctgtacc (SEQ ID N.º16)
ICP22BP	S: caccaagcgtgtgaagaaga (SEQ ID N.º17), AS: cctcagcctgtctaaacagg (SEQ ID N.º18)
K16	S: tccaacagcgaactggtacaga (SEQ ID N.º19), AS: gcatgcagtagcggcctt (SEQ ID N.º20)
GPX3	S: tgcaaccaatttgaaaaaca (SEQ ID N.º21), AS: ttcatgggttcccagaagag (SEQ ID N.º22)

GBA	S: gcagccagaacagaagtcc (SEQ ID N.º23), AS: atcaggggtgtctgcatagg (SEQ ID N.º24)
BPGM	S: ctctctggcgtctaaatgagc (SEQ ID N.º25), AS: ggagcaatcctttcattcca (SEQ ID N.º26)
NID1	S: atgggtgtgacaccaacgcggcc (SEQ ID N.º27), AS: gtagatacactgggcccgcctggg (SEQ ID N.º28)
SMT3H2	S: ggttccaccacatcctgact (SEQ ID N.º29), AS: tgagcatgccactaatggag (SEQ ID N.º30)
LGALS2	S: tggcactgatggctttgtaa (SEQ ID N.º31), AS: cagtgatcttcccgttgtt (SEQ ID N.º32)
DOC1	S: aaacgcctccataacaccag (SEQ ID N.º33), AS: aaccagtacagccaaaacc (SEQ ID N.º34)
PRKCG	S: ggtccagagaccacaccact (SEQ ID N.º35), AS: cctctggggaagaatcctc (SEQ ID N.º36)
S100A8	S: gggcaagttccgtgggcatcatgtg (SEQ ID N.º37), AS: ccagtaactcagctactctttgtggcttct (SEQ ID N.º38)
S100A9	S: gctcctcggctttgacagagtgaag (SEQ ID N.º39), AS: gcatttgggtccaggtcctccatgatgtg (SEQ ID N.º40)
S100A2	S: agctttgtggggagaaaagt (SEQ ID N.º41), AS: atccatggcaggaagtcaag (SEQ ID N.º42)
S100A7	S: ctgctgacgatgatgaagga (SEQ ID N.º43), AS: ctcccagcaaggacagaaac (SEQ ID N.º44)
KRT15	S: gagaactcactggccgagac (SEQ ID N.º45), AS: ctgaagaggcttccctgatg (SEQ ID N.º46)
SPRR1B	S: cattctgtctccccaaaaa (SEQ ID N.º47), AS: atgggggtataaggagctg (SEQ ID N.º48)
GSN	S: tgcagctgtagtactacctg (SEQ ID N.º49), AS: gaagctctcccaggacacag (SEQ ID N.º50)

También es posible cuantificar la tasa de transcripción de los genes mediante el análisis de la tasa de traducción y, por lo tanto, la cuantificación de proteínas producidas. Las técnicas apropiadas para este objetivo son también bien conocidas por el experto en la materia. Por consiguiente, la firma molecular puesta de manifiesto por los inventores se refleja también a nivel de las proteínas codificadas por los 25 genes de la invención.

El análisis de la tasa de transcripción de los genes de la invención se realiza en la epidermis, bajo el estrato córneo que ha sufrido la agresión. A tal efecto, se realizan tomas de muestras de epidermis o de piel por ejemplo mediante el método descrito en Marionnet C. y col., 2003, (tomas de muestras en el dermatomo, que es un instrumento que permite tomar muestras de bandas de piel muy finas, de varias decenas de milímetros de grosor) o cualesquiera otros métodos de toma de muestras (biopsias, sacabocados, queratomo o microqueratomo...).

Tal como se ha descrito anteriormente, los 25 genes de la invención constituyen, por lo tanto, una firma molecular de la piel, representativa de las diferencias de expresión génica que existen entre la piel humana joven y la piel envejecida tras una alteración de la función barrera por una agresión química o física, tal como por ejemplo abrasión con esparadrapo.

Esta firma molecular permite, por lo tanto, la evaluación de la función homeostática de una piel humana.

La presente invención tiene, por lo tanto, también por objeto la utilización de un análisis de la expresión génica de los genes ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y GSN, con un objetivo de diagnóstico de la función homeostática de la piel, siendo el nivel de expresión después de la abrasión con esparadrapo de todos o parte de estos genes después de varias horas, preferentemente a 06 h o a 30 h, característico de la edad del individuo o de las deficiencias de su función homeostática.

La técnica consiste en seguir después de varias horas, preferentemente a 6 h y/o 30 h, la expresión de los genes de la lista 1 que consiste en ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2 y DOC1 y del gen GSN, mediante cualquier técnica de cuantificación de la expresión de ARNm tales como transferencia de Northern, transferencia por puntos, RT-PCR, hibridación en chips de ADN, método SAGE, utilización de tarjetas microfluidicas... El estudio transcriptómico de estos genes se hace posible gracias a una estandarización con ayuda de los genes de mantenimiento identificados y enumerados en la lista 3 que consiste en S100A10, EIF1, ACTR1A, RPL28, RPL5, RPL35, RPS13, RPS23, RPS16, RPL18, RPS15A, RPL7A, RPS28, G3BP1, TMSB4X, HLA-C, DYNLL1, NACA, ARHA, BAI2, UBA52 y GNAS.

Por ejemplo, se podrán utilizar cebadores para el análisis mediante RT-PCR de la expresión génica correspondiente a los ilustrados en la tabla A.

La presente invención también se refiere a métodos de diagnóstico, que permiten poner de manifiesto deficiencias a nivel de la homeostasis epidérmica de una piel humana, tales como las deficiencias observadas para una piel envejecida. Dicho diagnóstico del estado de la epidermis de un individuo humano comprende la evaluación de la función homeostática u homeostasis epidérmica de la piel de dicho individuo de acuerdo con uno de los métodos descritos anteriormente. Mediante este método, la firma génica puesta de manifiesto por los inventores permite detectar individuos cuya función barrera y/o homeostasis de la piel presentan deficiencias y que, debido a esto, están debilitadas. Dicho diagnóstico puede permitir, por lo tanto, llegar a la conclusión de la necesidad de tratar la piel para reforzar en ella la homeostasis y/o la función barrera epidérmica y, de este modo, preservarlas. En efecto, una deficiencia en la homeostasis epidérmica es sinónimo de fragilización de la piel, y de molestias como aquellas que padecen las personas de edad avanzada.

Preferentemente, el diagnóstico se realiza en un individuo de al menos 20 años de edad, incluso de al menos 30, 40, 50, 55 o 60 años. El método de diagnóstico de acuerdo con la presente invención también puede ser apropiado para personas que se hayan sometido a tratamientos importantes susceptibles de haber modificado la homeostasis epidérmica, concretamente tratamientos tópicos.

5 De acuerdo con este método de diagnóstico de la invención, la piel diagnosticada es calificada como "piel envejecida" si el análisis diferencial de la expresión de al menos uno, preferentemente al menos dos de los genes seleccionados entre ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y GSN se diferencian en más del 50 % de la modulación media normalmente observada para una piel de un  
10 sujeto de aproximadamente 25 años de edad, preferentemente 30 horas después de la agresión física o química. La modulación media normalmente observada para un individuo de aproximadamente 25 años corresponde a la modulación denominada de referencia.

15 La diferencia de expresión entre un gen de la invención y la modulación media se calcula de la siguiente forma: [Intensidad de modulación observada - Intensidad de modulación de referencia]/Intensidad de modulación de referencia. Como se ha explicado en las partes anteriores, la intensidad de modulación se normaliza con ayuda del nivel de expresión de los denominados genes de mantenimiento que se seleccionan entre los genes: S100A10, EIF1, ACTR1A, RPL28, RPL5, RPL35, RPS13, RPS23, RPS16, RPL18, RPS15A, RPL7A, RPS28, G3BP1, TMSB4X, HLA-C, DYNLL1, NACA, ARHA, BAI2, UBA52 y GNAS, preferentemente seleccionados entre RPL28,  
20 RPL5, RPL35, RPS13, RPS23, RPS16, RPL18, RPS15A, RPL7A, RPS28, G3BP1, TMSB4X, HLA-C, DYNLL1, NACA, ARHA, BAI2, UBA52 y GNAS.

Preferentemente, el análisis diferencial de la expresión de al menos uno de los genes se diferencia en más del 60 % de la modulación de referencia, incluso en más del 90 % de la modulación de referencia.

25 De acuerdo con realizaciones más particularmente preferidas, se llega a conclusión de una piel que tiene un comportamiento de "piel envejecida" si al menos 8 o 10, 12 o 15 de los genes de la invención presentan una modulación fuertemente diferente de la modulación de referencia, incluso los 25 genes.

30 Otro objetivo de la presente invención es relativo a la utilización de un análisis de la expresión de los genes descritos en la presente invención para evaluar el efecto anti-edad de un producto (agente activo, molécula, extracto natural, combinación de agentes activos), pero también de un procedimiento (luz, inyección, incluso oral), solo o combinados, ensayando su capacidad para normalizar la respuesta de la epidermis a una agresión. El aporte beneficioso de dicho producto o procedimiento anti-edad se caracterizaría por su capacidad para

- 35
- i) inhibir la inducción a 30h de todos o parte de los genes ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2 y DOC1 después de abrasión con esparadrapo en los individuos de edad avanzada, y/o
  - 40 ii) normalizar la intensidad de modulación del gen GSN en los individuos de edad avanzada.

La presente invención también se refiere, por lo tanto, a un procedimiento de determinación de la eficacia de un tratamiento de la epidermis de un individuo, que comprende la evaluación de la función homeostática de la piel antes y después del tratamiento mediante un método tal como se ha descrito anteriormente. En efecto, la firma representativa de las diferencias de expresión génica tras una alteración del estrato córneo puede utilizarse para  
45 determinar la eficacia de un tratamiento de la epidermis. Con este fin, es preciso determinar dicha eficacia antes y después de la implementación del tratamiento cuya eficacia se busca determinar, preferentemente en una piel envejecida.

Preferentemente, el procedimiento de determinación de la eficacia de un tratamiento se implementa en la piel de un individuo de edad avanzada de al menos 20 o 30 años, preferentemente de al menos 40 años, incluso de al menos  
50 50 o 60 años.

Gracias a este método, de este modo es posible determinar la capacidad de ciertos tratamientos, concretamente composiciones cosméticas para aplicación tópica sobre la piel o suplementos alimenticios, o ciertos procedimientos de cosmética instrumental (luz, inyección, iontoforesis,...) para reforzar la homeostasis epidérmica y, por lo tanto, su capacidad para realizar un "rejuvenecimiento" de la piel. Por "rejuvenecimiento" de la piel, se entiende la mejora de la homeostasis epidérmica, tal como el comportamiento de la piel en respuesta a una agresión, se vuelve más próxima al comportamiento de una piel joven en respuesta a esta misma agresión.

60 La presente invención también se refiere a un procedimiento de exploración de agentes activos para su acción beneficiosa sobre la homeostasis epidérmica de la epidermis humana, que comprende la evaluación de la homeostasis epidérmica de la piel de un individuo mediante un método de acuerdo con tal como se ha descrito anteriormente, antes y después de la aplicación de la molécula a explorar.

65 Tal como se ha detallado anteriormente, la firma representativa puesta de manifiesto por los inventores permite, en efecto, poner en evidencia la mejora de la homeostasis epidérmica y/o la función barrera de las pieles envejecidas.

Dicha mejora se caracteriza precisamente por una cinética de modulación o un nivel de modulación después del tratamiento más próximo a la cinética de modulación o al nivel de modulación observado para la piel de un sujeto joven.

5 La presente invención también tiene por objeto un procedimiento para ensayar tratamientos para su efecto beneficioso sobre la homeostasis epidérmica humana, que comprende la evaluación de la homeostasis epidérmica de la piel de un individuo mediante un método tal como se ha descrito anteriormente, antes y después de la implementación del tratamiento a ensayar. La utilización de la firma molecular definida por los inventores para este fin, es idéntica a la detallada anteriormente para el procedimiento de exploración de moléculas para su acción beneficiosa sobre la homeostasis epidérmica.

Preferentemente, un procedimiento de ensayo tal como se ha descrito se implementa en un individuo de al menos 20 o 30 años de edad, preferentemente de al menos 40 años, ya más preferentemente de al menos 50 incluso 60 años.

15 Los tratamientos que pueden ser evaluados de este modo para su acción positiva sobre la homeostasis epidérmica son, por ejemplo, la aplicación local de ondas electromagnéticas o de cualquier composición, producto o molécula química, o bien la inyección o la ingestión de una composición, producto o molécula química. Preferentemente, se trata de un tratamiento local tópico.

20 Por producto, se entiende tanto un ingrediente o un agente activo en una forma más o menos purificada, concretamente una molécula química, que presenta una actividad intrínseca *in vitro* o *in vivo*, como una formulación que comprende uno o varios de estos ingredientes y un soporte y adyuvantes adaptados a la aplicación prevista.

25 En los procedimientos de evaluación de la eficacia de acuerdo con la presente invención, el tratamiento o la molécula ensayada se considera eficaz si se observa:

- una inhibición de la inducción después de 30 horas de al menos un gen seleccionado entre ESRRA, MAP3K5, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2 y DOC1; y/o
- 30 – una modificación de la intensidad de modulación del gen GSN,

reduciendo dicha modulación la diferencia entre la intensidad de modulación observada y la intensidad de modulación de referencia característica de la piel de un sujeto de aproximadamente 25 años de edad.

35 También preferentemente, la inhibición de la inducción o la modificación de la intensidad de modulación observada después del tratamiento representa una variación de al menos un 30 % después de la aplicación de la molécula o del tratamiento. Preferentemente, las diferencias observadas son incluso superiores, preferentemente al menos un 50 %, aún más, por ejemplo al menos un 60 %.

40 Debido a que los inventores han determinado una firma representativa de la homeostasis epidérmica, también es posible, mediante los métodos de evaluación de la presente solicitud, objetivar la acción beneficiosa de un tratamiento, concretamente de un producto cosmético, por ejemplo de una composición cosmética. Los métodos de evaluación descritos anteriormente pueden utilizarse, en efecto, en un protocolo de ensayo que permite determinar los productos susceptibles de ser calificados de “activos sobre la función barrera de la piel” o bien “que tienen un efecto anti-edad” o “efecto de rejuvenecimiento de la piel”.

45 Por otro lado, por medio de este ensayo, es posible promover el producto entre los consumidores, poniendo de relieve los resultados obtenidos con este producto en los métodos de evaluación de la homeostasis epidérmica descritos en la presente invención.

50 La evaluación de la homeostasis epidérmica estará basada en el estudio de la expresión de los genes de la invención o de las proteínas codificadas por estos genes. La presente invención también proporciona, por lo tanto, un método que permite recomendar un producto señalando su efecto en un protocolo de ensayo constituido por un método de evaluación tal como se ha descrito anteriormente. La invención también tiene, por lo tanto, por objeto un método para la promoción de un producto cosmético que consiste en exponer una eficacia, acción o propiedad de dicho producto demostrado por al menos un ensayo llevado a cabo tal como se ha descrito anteriormente.

Dicha promoción del producto podrá realizarse mediante cualquier canal de comunicación.

60 Ésta podrá ser hecha concretamente por la vendedora, directamente en el punto de venta, por la radio y la televisión, concretamente en el marco de anuncios publicitarios. También podrá ser hecha mediante el canal de la prensa escrita, o por medio de cualquier otro documento, en particular con fines publicitarios (prospecto). Podrá ser hecha también a través de Internet, o mediante cualquier otra red informática adecuada. También podrá ser hecha directamente en el producto, concretamente en su embalaje o en cualquier folleto explicativo que pueda estar asociado con él.

La presente descripción describe también un kit que permite determinar el estado más o menos eficaz de la función homeostática de una piel sobre la base del análisis de la expresión de los genes que constituyen la firma representativa de las diferencias de expresión génica que existen entre la piel humana joven y la piel envejecida, tras una alteración de la función barrera, por ejemplo por abrasión con esparadrappo. Dicho kit para la evaluación de la homeostasis epidérmica de la piel de un sujeto, comprende un medio para realizar una agresión física o química del estrato córneo, un medio para realizar una toma de muestras de epidermis que es preferentemente distinta de la primera, y un medio para determinar el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado entre los genes KRT6B, KRT16, ESRRA, CBX3, MAP3K5, TRIO, PIK3CD, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, NID1, SMT3H2, LGALS2, DOC1, PRKCG, S100A8, S100A9, S100A2, S100A7, K15, SPRR1 B y GSN.

El kit comprende al menos un medio para determinar el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado entre los genes ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y GSN.

Preferentemente, por las razones mencionadas anteriormente en la solicitud, el kit comprende medios que permiten determinar el nivel de expresión de al menos 2, 3, 5, 10 o al menos 15 genes diferentes seleccionados entre KRT6B, KRT16, ESRRA, CBX3, MAP3K5, TRIO, PIK3CD, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, NID1, SMT3H2, LGALS2, DOC1, PRKCG, S100A8, S100A9, S100A2, S100A7, K15, SPRR1B y GSN, y más particularmente entre ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y GSN. Pueden tratarse de medios que permiten determinar el nivel de expresión de los 25 genes de la invención.

El kit puede comprender, por supuesto, elementos suplementarios, tales como diferentes controles, positivos o negativos. Ventajosamente, un kit comprende también un medio para determinar el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado entre los denominados genes de mantenimiento, es decir entre los genes S100A10, EIF1, ACTR1A, RPL28, RPL5, RPL35, RPS13, RPS23, RPS16, RPL18, RPS15A, RPL7A, RPS28, G3BP1, TMSB4X, HLA-C, DYNLL1, NACA, ARHA, BAI2, UBA52 y GNAS.

Preferentemente, un kit permite realizar dos tomas de muestras epidérmicas y permite determinar al menos dos veces el nivel de expresión del gen seleccionado, antes de la alteración del estrato córneo y después, bien en una zona agredida y en una zona no agredida.

El kit también puede comprender instrucciones relativas a su utilización y los tiempos a respetar entre las diferentes extracciones y la alteración del estrato córneo.

La presente descripción divulga también un chip de ADN o ARN que comprende sondas que hibridan específicamente con el ADNc o el ARNm de los genes KRT6B, KRT16, ESRRA, CBX3, MAP3K5, TRIO, PIK3CD, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, NID1, SMT3H2, LGALS2, DOC1, PRKCG, S100A8, S100A9, S100A2, S100A7, K15, SPRR1 B y GSN.

Un chip preferido en el marco de la presente descripción comprende sondas que hibridan específicamente con el ADNc o el ARNm de los genes ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y GSN.

En un aspecto, dicho chip comprende también sondas que hibridan con todo o parte de los ADNc o ARNm de los genes S100A10, EIF1, ACTR1A, RPL28, RPL5, RPL35, RPS13, RPS23, RPS16, RPL18, RPS15A, RPL7A, RPS28, G3BP1, TMSB4X, HLA-C, DYNLL1, NACA, ARHA, BAI2, UBA52 y GNAS.

La utilización de estos chips en el marco de los diferentes métodos de la invención aparece claramente con la lectura de lo anterior por el experto en la materia.

En todas las implementaciones de esta invención, el sujeto es preferentemente un ser humano.

La invención se describirá a continuación con más detalle en una de estas implementaciones.

Leyenda de las figuras:

Figura 1: perfil de expresión de los 18 genes cuya cinética de modulación entre 6 h y 30 h después de abrasión con esparadrappo es significativamente diferente de acuerdo con la edad del paciente:

Figura 1A) genes cuya expresión está modulada a 06 h y a 30 h en las dos poblaciones pero cuya cinética es diferente de acuerdo con la población.

Figura 1B) genes cuya expresión crece entre 06 h y 30 h en el sujeto de edad avanzada, mientras que no varía en el sujeto joven.

Figura 2: perfil de expresión de los 7 genes cuya intensidad de modulación después de abrasión con esparadrappo es significativamente diferente de acuerdo con la edad del paciente, sea cual sea el tiempo.

Figura 3: perfil de expresión de 4 genes cuya intensidad de modulación después de abrasión con esparadrappo no varía de forma significativa de acuerdo con la edad del paciente, sea cual sea el tiempo.

**Ejemplos:**

- 5 1. Metodología
- Se reclutaron voluntarios masculinos sanos para participar en un estudio transcriptómico de más de 4000 genes conocidos por ser expresados en la piel.
- 10 Reclutamiento de los voluntarios: 5 grupos de 6 individuos jóvenes (25 +/- 4 años) y 5 grupos de 6 individuos de edad avanzada (67 +/- 4 años) fueron reclutados para este estudio, después de la firma de un consentimiento informado.
- 15 Alteración del estrato córneo: se realizó una abrasión con esparadrappo sobre la cara interna de uno de sus antebrazos, seleccionado de forma aleatoria, hasta que el estrato córneo esté totalmente retirado y que la piel presente un aspecto liso y brillante (48 +/- 7 tiras de media). Para ello, se utilizó un esparadrappo 3M™ Blendederm™ (St Paul, MI, EE. UU.). El segundo antebrazo no se sometió a ningún tratamiento.
- 20 Tomas de muestras de epidermis: se tomaron muestras de epidermis de una superficie de 1,5 cm x 1,5 bajo anestesia local con ayuda de un dermatomo GA630 (AESLAP, Melsungen, Alemania). Las tomas de muestras tuvieron lugar en pieles con y sin abrasión. El grosor de toma de muestra se fijó a 200 µm de acuerdo con el protocolo descrito por Marionnet y col., en 2003, para tomar solamente muestras de la epidermis y reducir al mínimo la contaminación dérmica. Las tomas de muestras se efectuaron en los dos antebrazos 02 h, 06 h, 19 h, 30 h y 72 h después de la abrasión.
- 25 Extracción de los ARN: las muestras de epidermis se colocaron en el tampón de lisis Rneasy (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) inmediatamente después de la toma de muestras. Los tejidos se trituraron a continuación con ayuda de un mortero estéril. El lisado tisular se homogeneizó (columnas QIAshredder, Qiagen, Courtaboeuf, Francia) y los ARN totales se extrajeron de acuerdo con el método Rneasy (Qiagen, Courtaboeuf, Francia). Se efectuó una digestión del ADN para eliminar cualquier contaminación genómica (DNase1, Qiagen, Courtaboeuf, Francia). La concentración y la pureza de los ARN totales se determinaron mediante medición de absorbancia a 260 nm y 280 nm. La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa después del marcado con bromuro de etidio. Las muestras de ARN se precipitan a continuación con ayuda de una solución ácida fuertemente salina (0,1 volúmenes de acetato de sodio 2 M, pH4) y de etanol (2,5 volúmenes de etanol frío al 100 %). Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.
- 30 Hibridaciones en micromatriz de ADNc Dermarray: se tomaron alícuotas correspondientes a 2,5 µg de ARN y se precipitaron mediante centrifugado. Los ARN se lavaron, se secaron y a continuación se disolvieron en agua estéril libre de ARNasa. Se utilizaron oligonucleótidos (dT) 12-18-meros, una mezcla de dATP, dTTP y dGTP, la AMV transcriptasa inversa (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, Francia) y dCTP marcado con <sup>33</sup>P (Amersham) para la transcripción inversa de los ARNm de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. Las muestras de epidermis de control se retro-transcribieron simultáneamente a las muestras con abrasión. Las sondas realizadas de este modo se purificaron en columna de cromatografía biospin6 (Bio-Rad, Hercule, CA, EE. UU.). La incorporación a las sondas de <sup>33</sup>P se midió mediante β-escintilación. Se utilizó la misma cantidad de sonda de las muestras de control y con abrasión para la hibridación en membranas micromatriz de ADNc DermArray® (IntegriDerm, Birmingham, AL, EE. UU.), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- 35 Quantificación y corrección de la señal: los chips se analizaron utilizando un escáner Cyclone Phosphore Imager de 16 bits que permite un análisis con alta resolución (Packard Instruments, Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, EE. UU.). Las imágenes fueron importadas a continuación en el software Imagen 5 (Biodiscovery, El Segundo, CA, EE. UU.) para la cuantificación de la señal y, a continuación, las señales fueron corregidas con ayuda del software Genesight (Biodiscovery, El Segundo, CA, EE. UU.). Se ejecutó una corrección local del ruido de fondo y se normalizaron las señales positivas de una membrana de control con respecto a su control.
- 40 Análisis de los datos: Se calculó una relación de expresión dividiendo la señal corregida de la muestra tratada por la señal corregida de la muestra de control. Se calculó una relación media interindividual para cada momento para cada gen expresado en al menos el 50 % de los individuos de cada grupo.
- 45 Selección de los genes modulados en cada población: se consideró que un gen estaba modulado si su expresión es significativamente diferente entre epidermis con abrasión y epidermis de control (test de Student, p < 0,05); y si al menos el 50 % de los voluntarios del grupo presentan una relación superior a 2 y ninguno presenta una relación inferior a 0,5 (genes inducidos), e inversamente para genes reprimidos. Finalmente, se seleccionaron los genes modulados al menos una vez en el tiempo.
- 50
- 55
- 60
- 65

Selección de los genes modulados de forma diferencial de acuerdo con la edad: la cinética de los genes modulados a la vez en los individuos jóvenes y de edad avanzada se comparó en los tiempos de 06 h y 30 h (tiempos en los que los perfiles eran los más diferentes entre jóvenes y de edad avanzada) con ayuda de un test ANOVA con dos factores (factor tiempo, factor edad e interacción;  $p < 0,05$ ). Se seleccionaron los genes cuya expresión es significativamente diferente de acuerdo con la edad del paciente. Una interacción significativa de las cinéticas refleja, además, un desfase en el tiempo de la modulación de los genes.

## 2. Resultados

573 genes son expresados en la epidermis de forma común a todos los voluntarios, ya sean jóvenes o de edad avanzada. La expresión de ciertos de ellos varía como consecuencia de la abrasión con esparadrapo en comparación con la piel de control (expresión inducida o reprimida), siguiendo una cinética específica.

De forma sorprendente e inesperada, los inventores identificaron 18 genes cuya cinética de expresión después de la abrasión con esparadrapo es significativamente diferente de acuerdo con la edad del voluntario (tabla 1). En particular, la expresión de los genes KRT6B y KRT16 es inducida a las 06 h y a las 30 h en las dos poblaciones, pero se observó un retardo significativo en su cinética de modulación en los individuos de edad avanzada (figura 1-A). Además, la expresión de los genes ESRRA, CBX3, MAP3K5, TRIO, PIK3CD, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, NID1, SMT3H2, LGALS2, DOC1, PRKCG crece de forma significativa entre 06 h y 30 h después de la abrasión con esparadrapo en el sujeto de edad avanzada mientras que permanece inalterada a lo largo del tiempo en el sujeto joven (véanse ejemplos en la figura 1-B).

Por otro lado, existe para los genes S100A8, S100A9, S100A2, S100A7, KRT15, SPRR1B y GSN (tabla 2) una cinética semejante entre 06 h y 30 h, pero una diferencia significativa de intensidad de modulación que va de 1,8  $\log(2)$  a 3,12  $\log(2)$  según que el individuo sea joven o de edad avanzada (véanse ejemplos en la figura 2).

Finalmente, 109 genes no mostraron ninguna diferencia significativa de expresión en función del tiempo ni en función de la edad. Estos últimos pueden considerarse genes de mantenimiento. Solamente 3 de entre ellos, los genes S100A10, EIF1 y ACTR1A, vieron variar su nivel de expresión tras la abrasión con esparadrapo, siendo esta variación constante en el tiempo. Los otros genes no son modulados. Los inventores seleccionaron de ellos 19 cuyo perfil está próximo entre jóvenes y de edad avanzada. Estos son, en su mayor parte, componentes ribosómicos conocidos como genes de mantenimiento (RPL28, RPL5, RPL35, RPS13, RPS23, RPS16, RPL18, RPS15A, RPL7A, RPS28). Los otros, G3BP1, TMSB4X, HLA-C, DYNLL1, NACA, ARHA, BAI2, UBA52, GNAS no eran conocidos ni utilizados como genes de mantenimiento (figura 3).

## 3. Conclusiones

Se establecieron 3 listas de genes de interés:

La Lista 1 (tabla 1) agrupa 18 genes cuya cinética de expresión después de la abrasión con esparadrapo es significativamente diferente entre individuos jóvenes y de edad avanzada.

La Lista 2 (tabla 2) agrupa 7 genes cuya intensidad de modulación difiere en todo momento según que el voluntario sea joven o de edad avanzada.

La Lista 3 (tabla 3) agrupa 22 genes de mantenimiento cuya expresión no varía según la edad de los voluntarios.

El nivel de expresión de los genes de la lista 1 y de la lista 2 en los sujetos de edad avanzada después de la abrasión con esparadrapo es el reflejo molecular de la disfunción de la función homeostática de la epidermis debida a la edad. El análisis de la expresión de estos genes constituye una nueva solución al problema que plantea la evaluación de la eficacia de agentes activos o de procedimientos anti-edad susceptibles de mejorar la renovación y la homeostasis epidérmica, y al problema que plantea el diagnóstico del estado de edad más o menos avanzada de la piel. El análisis de la expresión de estos genes puede realizarse y estandarizarse gracias a la presencia de genes de mantenimiento enumerados en la tabla 3.

Tabla 1: Lista de los 18 genes cuya cinética de modulación entre 6 h y 30 h después de la abrasión con esparadrapo es significativamente diferente de acuerdo con la edad del paciente:

Número de acceso	Símbolo del gen	Nombre
AA098896	ESRRA	estrogen-related_receptor_alpha
AA132226	CBX3	Human_heterochromatin_protein_HP1Hs-gamma_mRNA,_complete_cds
AA150532	KRT6B	keratin_6B
AA150828	MAP3K5	mitogen-activated_protein_kinase_kinase_kinase_5
AA191348	TRIO	ESTs,_Highly_similar_to_(define_not_available_3522970)__[H.sapiens]
AA281784	PIK3CD	phosphoinositide-3-kinase,_catalytic,_delta_polypeptide
AA284528	TCRB	T-cell_receptor,_beta_cluster
AA430552	PRRG2	proline-rich_Gla_(G-carboxylglutamic_acid)_polypeptide_2
AA488979	ICP22BP	cell_cycle-regulated_factor_(78_kDa)
AA596003	KRT16 (o K16)	keratin_16_(focal_non-epidermolytic_palmoplantar_keratoderma)

Número de acceso	Símbolo del gen	Nombre
AA664180	GPX3	glutathione_peroxidase_3_(plasma)
AA670347	GBA	glucosidase_beta_acid_(includes_glucosylceramidase)
AA678065	BPGM	2,3-bisphosphoglycerate_mutase
AA709414	NID1	nidogen_(enactin)
AA775415	SMT3H2	SMT3_(suppressor_of_mif_two_3_yeast)_homolog_2
AA872397	LGALS2	lectin_galactoside-binding_soluble_2_(galectin_2)
R78607	DOC1	deleted_in_oral_cancer_(mouse_homolog)_1
R89715	PRKCG	ESTs

Tabla 2: Lista de los 7 genes cuya intensidad de modulación a 6 h y 30 h es significativamente diferente de acuerdo con la edad del paciente:

Número de acceso	Símbolo del gen	Nombre
AA086471	S100A8	S100_calcium-binding_protein_A8_(calgranulin_A)
AA864554	S100A9	S100_calcium-binding_protein_A9_(calgranulin_B)
AA583574	S100A7	S100_calcium-binding_protein_A7_(psoriasin_1)
AA458884	S100A2	S100_calcium-binding_protein_A2
AA878048	KRT15 o K15	keratin_15
AA447684	SPRR1 B	small_proline-rich_protein_1_B_(cornifin)
H72028	GSN	gelsolin_(amyloidosis_Finnish_type)

5 Tabla 3: Lista de los 22 genes de mantenimiento:

Número de acceso	Símbolo del gen	Nombre
AA136500	G3BP1	ESTs
AA423800	TMSB4X	thymosin_beta_4_X_chromosome
AA444051	S100A10	S100_calcium-binding_protein_A10_(annexin_II_ligand,_calpactin_I_light_polypeptide_(p11))
AA464246	HLA-C	major_histocompatibility_complex_class_I_C
AA464731	EIF1	putative_translation_initiation_factor
AA486746	RPL28	ribosomal_protein_L28
AA496880	RPL5	ribosomal_protein_L5
AA625634	RPL35	ribosomal_protein_L35
AA629641	RPS13	ribosomal_protein_S13
AA634008	RPS23	ribosomal_protein_S23
AA644679	DYNLL1	dynein_cytoplasmic_light_polypeptide
AA664241	NACA	-nascent-polypeptide-associated_complex_alpha_polypeptide
AA668301	RPS16	ribosomal_protein_S16
AA676955	ARHA	ras_homolog_gene_family_member_A
AA775874	RPL18	ribosomal_protein_L18
AA777034	BAI2	ESTs_Highly_similar_to_BAI_2_[H.sapiens]
AA856556	RPS28	ribosomal_protein_S28
AA872341	RPS15A	ribosomal_protein_S15a
AA878561	U BA52	proteasome_(prosome_macropain)_subunit_alpha_type_7
H23422	RPL7A	ribosomal_protein_L7a
R40850	ACTR1A	H.sapiens_mRNA_for_alpha-centractin
R43581	GNAS	Human_guanine_nucleotide-binding_protein_G-s_alpha_subunit_mRNA_partial_cds

## REFERENCIAS

1. Barel, A. O. and Clarys, P.; Study of the stratum corneum barrier function by transepidermal water loss measurements: comparison between two commercial instruments: Evaporimeter and Tewameter; 1995; Skin Pharmacol; 8 (186-195)
2. Denda, M.; New strategies to improve skin barrier homeostasis; 1-11-2002; Adv Drug Deliv Rev; 54 Suppl 1 (S123-S130)
3. Ghadially, R., y col.; The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model; 1995; J Clin Invest; 95 (2281-2290)
4. Grubauer, G., Feingold, K. R., and Elias, P. M.; Relationship of epidermal lipogenesis to cutaneous barrier function; 1987; J Lipid Res; 28 (746-752)
5. Grubauer, G., y col.; Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier; 1989; J Lipid Res; 30 (89-96)
6. Kuss, O. and Diepgen, T. L.; Proper statistical analysis of transepidermal water loss (TEWL) measurements in bioengineering studies; 1998; Contact Dermatitis; 39 (64-67)
7. Leveque, J. L.; Quantitative assessment of skin aging; 2001; Clin Geriatr Med; 17 (673-89, vi)

8. Lock-Andersen, J., y col.; Epidermal thickness, skin pigmentation and constitutive photosensitivity; 1997; Photodermatol Photoimmunol Photomed; 13 (153-158)
9. Marionnet, C., y col.; Modulation of gene expression induced in human epidermis by environmental stress in vivo; 2003; J Invest Dermatol; 121 (1447-1458)
- 5 10. Menon, G. K., y col.; De novo sterologenesi en la piel. II. Regulaci3n por requisitos de barrera cut3nea; 1985; J Lipid Res; 26 (418-427)
11. Piaserico, S., y col.; Allergic contact sensitivity in elderly patients; 2004; Aging Clin Exp Res; 16 (221-225)
12. Piepkorn, M., Lo, C., and Plowman, G.; Amphiregulin-dependent proliferation of cultured human keratinocytes: autocrine growth, the effects of exogenous recombinant cytokine, and apparent requirement for heparin-like glycosaminoglycans; 1994; J Cell Physiol; 159 (114-120)
- 10 13. Pinnagoda, J., Tupker, R. A., Agner, T., and Serup, J.; Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis; 1990; Contact Dermatitis; 22 (164-178)
14. Proksch, E., y col.; Barrier function regulates epidermal DNA synthesis; 1991; J Clin Invest; 87 (1668-1673)
- 15 18. Tanaka, M., Zhen, Y. X., and Tagami, H.; Normal recovery of the stratum corneum barrier function following damage induced by tape stripping in patients with atopic dermatitis; 1997; Br J Dermatol; 136 (966-967)
19. Treffel, P., y col.; Hydration, transepidermal water loss, pH and skin surface parameters: correlations and variations between dominant and non-dominant forearms; 1994; Br J Dermatol; 130 (325-328)
- 20 20. Van, Sam, V., y col.; TEWL measurement standardization: kinetic and topographic aspects; 1994; Acta Derm Venereol; 74 (168-170)
21. Wood, L. C., y col.; Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice; 1992; J Clin Invest; 90 (482-487)
22. Zhai, H., Leow, Y. H., and Maibach, H. I.; Human barrier recovery after acute acetone perturbation: an irritant dermatitis model; 1998; Clin Exp Dermatol; 23 (11-13)

25

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> L'OREAL
- 30 <120> Firma molecular representativa de disfunci3n de la homeostasis epid3rmica
- <130> B07674A- CA/CS
- <150> FR08/04169
- 35 <151> 22-07-2008
- <150> US61/095.360
- <151> 09-09-2008
- 40 <160> 50
- <170> PatentIn versi3n 3.3
- <210> 1
- 45 <211> 20
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 50 <223> Cebador
- <400> 1
- cctatctcag ggaggaagg 20
- 55 <210> 2
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 60 <220>
- <223> Cebador
- <400> 2
- tctccaagtc ccactctgct 20
- 65 <210> 3

ES 2 625 937 T3

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 3  
 10 ttggcagttt aggacctgct 20  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 4  
 20 gttcttctg gcttttgctg 20  
 <210> 5  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 5  
 30 cttctcatca atacctgttc cactgag 27  
 <210> 6  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 6  
 40 atcaggacaa ctgactgtc agatgag 27  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 7  
 50 cacatcacia ccctcattgc 20  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 8  
 60 cgaagtccag ctccagtttc 20  
 <210> 9

ES 2 625 937 T3

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 9  
 aaagcttgcg gtgaggtaga 20  
 10 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 10  
 20 ctgtcaagg agcgactcc 20  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 11  
 ctccgtgaga gctggaaaac 20  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 12  
 cgttccggt tatggctgt 20  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
 50 <400> 13  
 cccaaccag acctctctgt 20  
 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 14  
 60 tctgatggct caaacacagc 20  
 65 <210> 15

ES 2 625 937 T3

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 15  
 10 tgggcagata tgacctgaca 20  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 16  
 20 ttacgaagtg cccctgtacc 20  
 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 17  
 caccaagcgt gtgaagaaga 20  
 <210> 18  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 18  
 cctcagcctt gctaaacagg 20  
 <210> 19  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
 50 <400> 19  
 tccaacagcg aactgtaca ga 22  
 <210> 20  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 20  
 60 gcatgcagta gcggcctt 19  
 65 <210> 21

ES 2 625 937 T3

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 21  
 10 tgcaaccaat ttgaaaaca 20  
 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 22  
 20 ttcatgggtt cccagaagag 20  
 <210> 23  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 23  
 gcagccagaa cagaagttcc 20  
 <210> 24  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 24  
 atcaggggtg tctgcatagg 20  
 <210> 25  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
 50 <400> 25  
 ctctggcgt ctaatgagc 20  
 <210> 26  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador  
 60 <400> 26  
 ggagcaatcc ttctattcca 20  
 65 <210> 27

ES 2 625 937 T3

<211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 27  
 atgggtgtga caccaacgcg gcc 23  
 10 <210> 28  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 28  
 20 gtagatacac tgggcccgct ggg 23  
 <210> 29  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 29  
 ggtccacca catcctgact 20  
 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 30  
 tgagcatgcc actaatggag 20 0  
 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
 50 <400> 31  
 tggcactgat ggcttgtaa 20  
 <210> 32  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador  
 60 <400> 32  
 caggtgatct tccggtggt 20  
 65 <210> 33

ES 2 625 937 T3

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 33  
 aaacgcctcc ataacaccag 20  
 10 <210> 34  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 34  
 aaccagtcac agccaaaacc 20  
 20 <210> 35  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 35  
 ggtccagaga ccacaccact 20  
 30 <210> 36  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 36  
 cctctgggga aagaatcctc 20  
 40 <210> 37  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 37  
 gggcaagttc cgtgggcac atgttg 26  
 50 <210> 38  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 38  
 ccagtaactc agctactctt tgggcttc t 31  
 60 <210> 39  
 65

ES 2 625 937 T3

<211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 39  
 gctcctcggc ttgacagag tgcaag 26  
 10 <210> 40  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 40  
 20 gcatttgtgt ccaggctctc catgatgtgt 30  
 <210> 41  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 41  
 agctttgtgg gggagaaagt 20  
 <210> 42  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 42  
 atccatggca ggaagtcaag 20  
 <210> 43  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
 50 <400> 43  
 ctgctgacga tgatgaagga 20  
 <210> 44  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 44  
 60 ctcccagcaa ggacagaaac 20  
 65 <210> 45

ES 2 625 937 T3

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 45  
 10 gagaactcac tggccgagac 20  
 <210> 46  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 46  
 20 ctgaagaggc ttcctgatg 20  
 <210> 47  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 47  
 cattctgtct cccccaaaaa 20  
 <210> 48  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 48  
 atgggggat aaggagctg 20  
 <210> 49  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
 50 <400> 49  
 tgcagctgga tgactacctg 20  
 <210> 50  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 50  
 60 gaagctctcc caggacacag 20  
 65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de evaluación *in vitro* de la homeostasis epidérmica de la piel de un sujeto humano que comprende el análisis diferencial de la expresión de los genes ESRRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2, DOC1 y GSN en respuesta a una agresión física o química del estrato córneo.
- 10 2. Método de evaluación de la homeostasis epidérmica de la piel de un sujeto humano de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la comparación:
- 15 - de la cinética de modulación de la expresión de los genes ESRRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2 y DOC1 en la epidermis correspondiente a una región de la piel después de una agresión física o química del estrato córneo y
- del nivel de modulación de la expresión del gen GSN en la epidermis correspondiente a una región de la piel después de una agresión física o química del estrato córneo,
- con la cinética de referencia o con el nivel de referencia para la modulación de la expresión de dichos genes.
- 20 3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la modulación de la expresión de los genes se determina mediante referencia a otra región de la piel que no ha sufrido la agresión.
- 25 4. Método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la modulación de la expresión de los genes se normaliza mediante referencia a la expresión de al menos un gen seleccionado entre S100A10, EIF1, ACTR1A, RPL28, RPL5, RPL35, RPS13, RPS23, RPS16, RPL18, RPS15A, RPL7A, RPS28, G3BP1, TMSB4X, HLA-C, DYNLL1, NACA, ARHA, BAI2, UBA52 y GNAS en la epidermis correspondiente a la región agredida.
- 30 5. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicha agresión física o química del estrato córneo es una abrasión con esparadrapo, la aplicación de acetona, de un agente deslipidante, de un agente químico abrasivo, o bien un método físico tal como calor.
- 35 6. Método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la cinética de referencia o el nivel de referencia corresponde a la cinética o al nivel de modulación de la expresión de dichos genes observado normalmente para una piel de un sujeto de aproximadamente 25 años de edad.
- 40 7. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende el análisis diferencial de la expresión de los genes KRT6B, KRT16, ESRRRA, CBX3, MAP3K5, TRIO, PIK3CD, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, NID1, SMT3H2, LGALS2, DOC1, PRKCG, S100A8, S100A9, S100A2, S100A7, K15, SPRR1B y GSN.
- 45 8. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho análisis diferencial o dicha comparación se realiza al cabo de 72 horas después de la agresión física o química, preferentemente al cabo de 36 horas.
- 50 9. Método de diagnóstico del estado de la epidermis de un individuo humano que comprende la evaluación de la homeostasis epidérmica de la piel de dicho individuo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8.
- 55 10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la piel diagnosticada se califica como "piel envejecida" si el análisis diferencial de la expresión de al menos uno de los genes seleccionados entre ESRRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2 y DOC1, se diferencia en más del 50 % de la modulación media normalmente observada para una piel de un sujeto de aproximadamente 25 años de edad, preferentemente de al menos dos o tres genes, preferentemente de al menos cinco genes, preferentemente de al menos 10 genes.
- 60 11. Procedimiento de determinación de la eficacia de un tratamiento de la epidermis de un individuo humano, que comprende la evaluación de la homeostasis epidérmica de la piel antes y después del tratamiento mediante un método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8.
12. Procedimiento de exploración de moléculas para su acción beneficiosa sobre la homeostasis epidérmica, que comprende la evaluación de la homeostasis epidérmica de la piel de un individuo humano mediante un método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, antes y después de la aplicación de la molécula a explorar.
13. Procedimiento para ensayar tratamientos para su efecto beneficioso sobre la barrera homeostática de la epidermis humana, que comprende la evaluación de la función homeostática de la piel de un individuo humano mediante un método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, antes y después de la implementación del tratamiento a ensayar.

14. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el tratamiento o la molécula ensayada se considera que es eficaz si se observa:

- 5
- una inhibición de la inducción, después de 30 horas, de al menos un gen seleccionado entre ESRRA, CBX3, TRIO, TCRB, PRRG2, ICP22BP, GPX3, GBA, BPGM, SMT3H2, LGALS2 y DOC1; y/o
  - una modificación de la intensidad de modulación del gen GSN, reduciendo dicha modulación la diferencia entre la intensidad de modulación observada y la intensidad de modulación de referencia característica de la piel
- 10 de un sujeto de aproximadamente 25 años de edad.

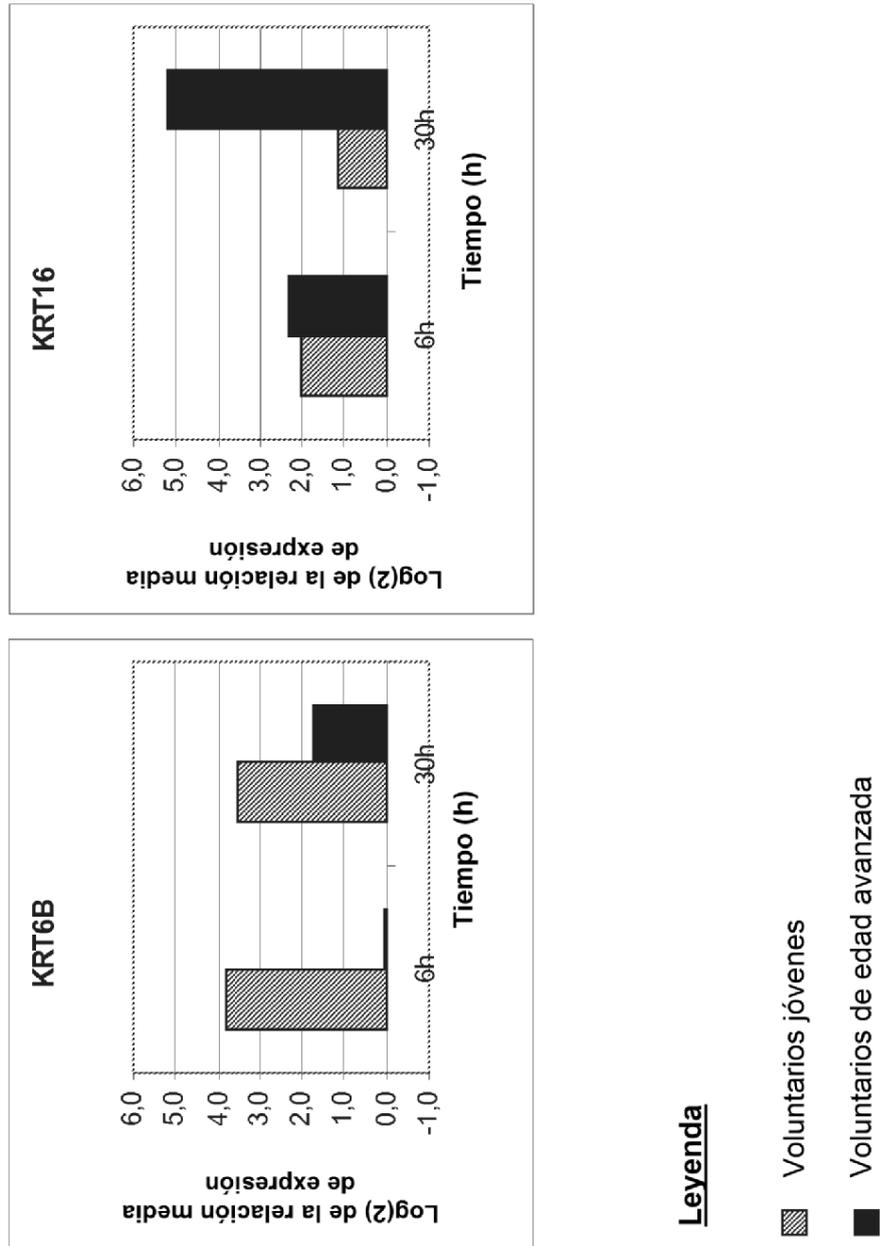


FIGURA 1A

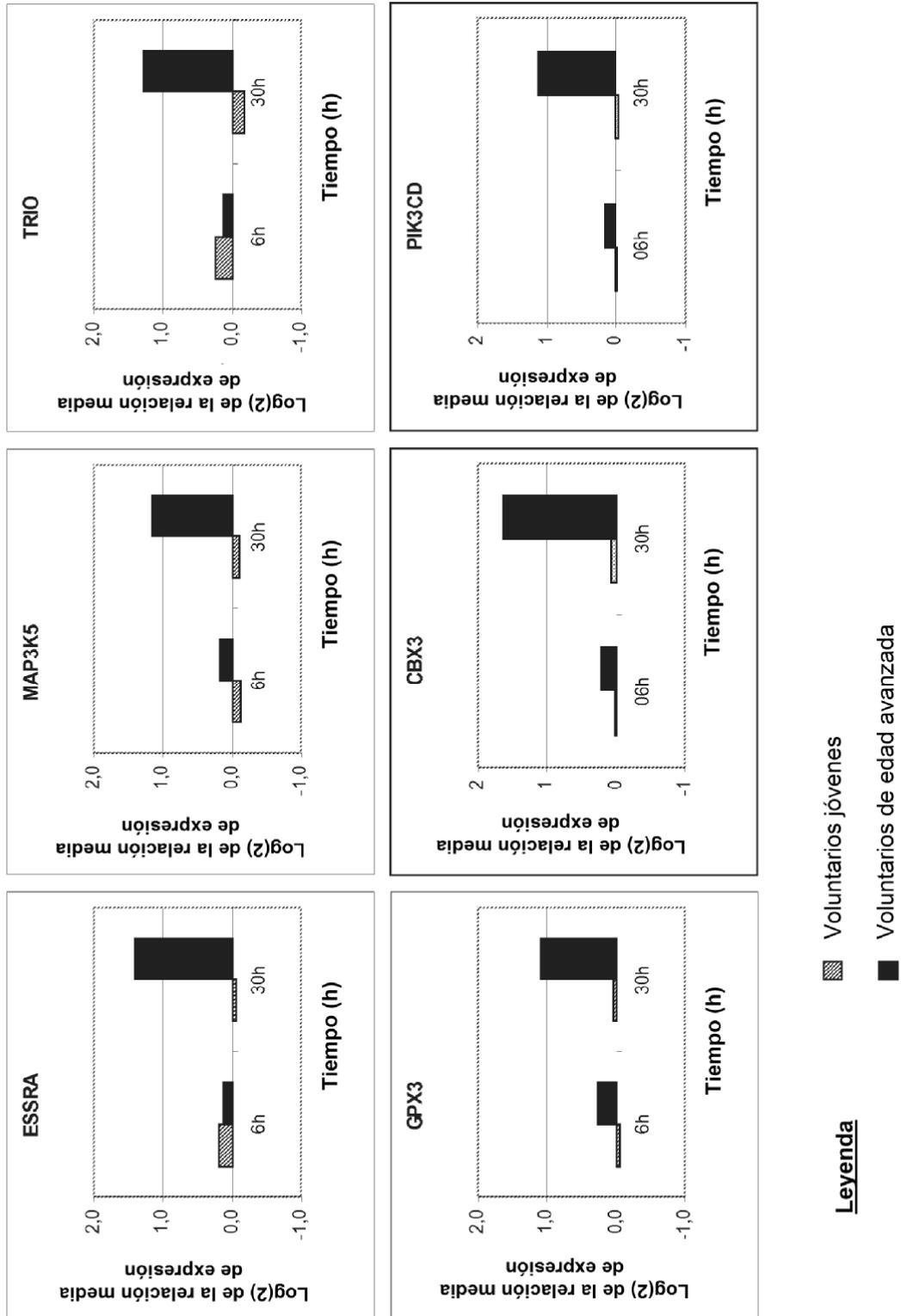


FIGURA 1B (1)

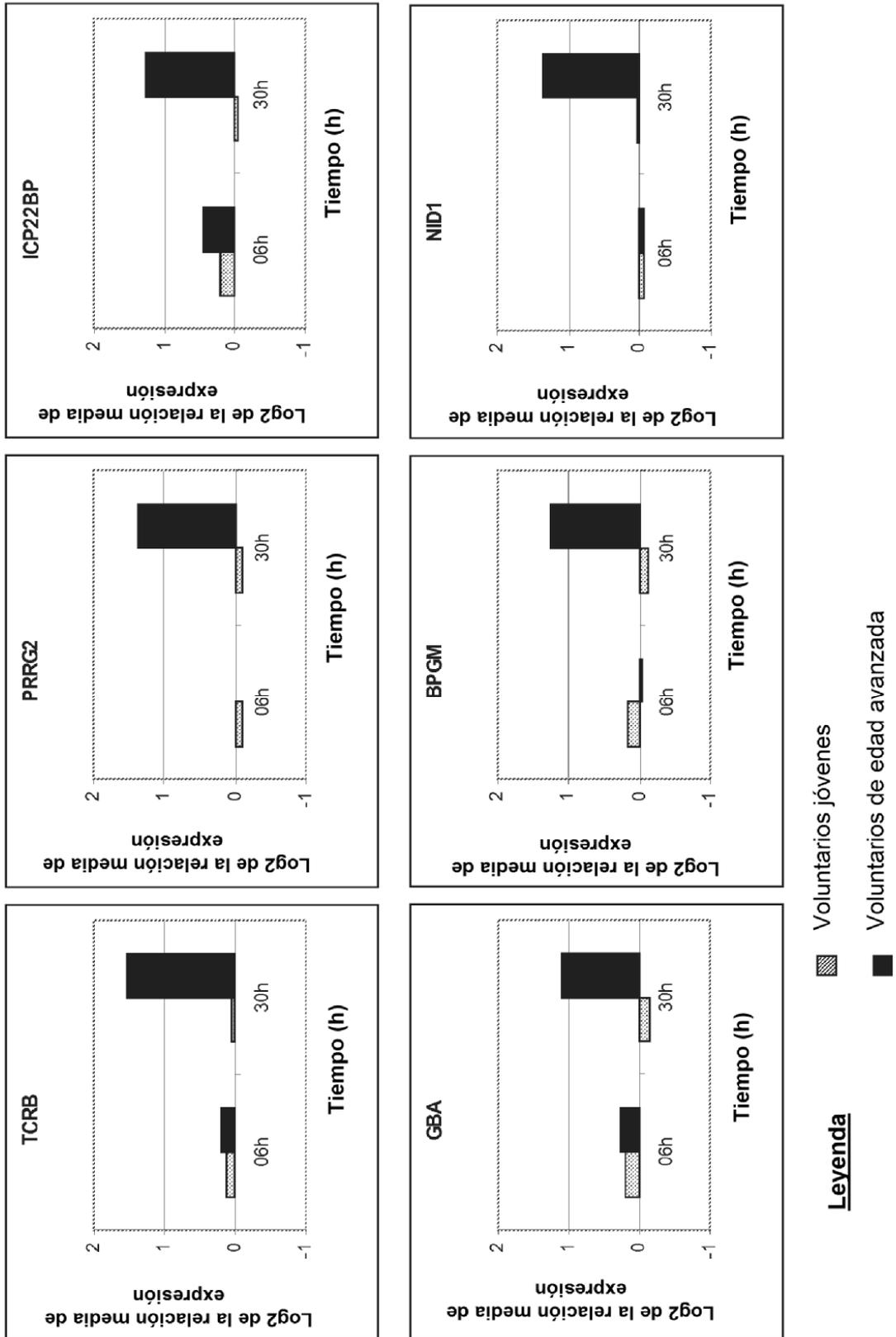


FIGURA 1B (2)

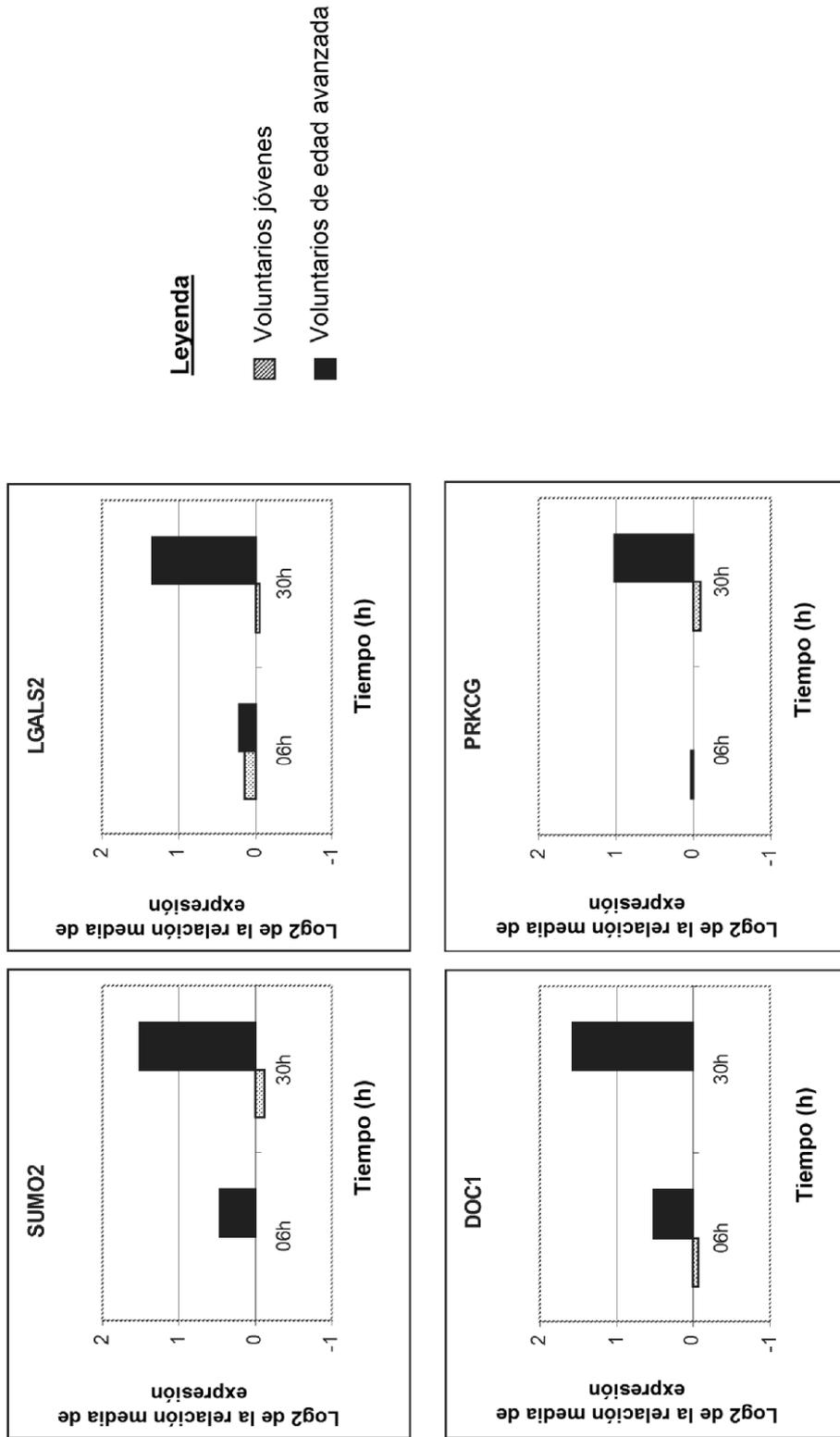


FIGURA 1B (3)

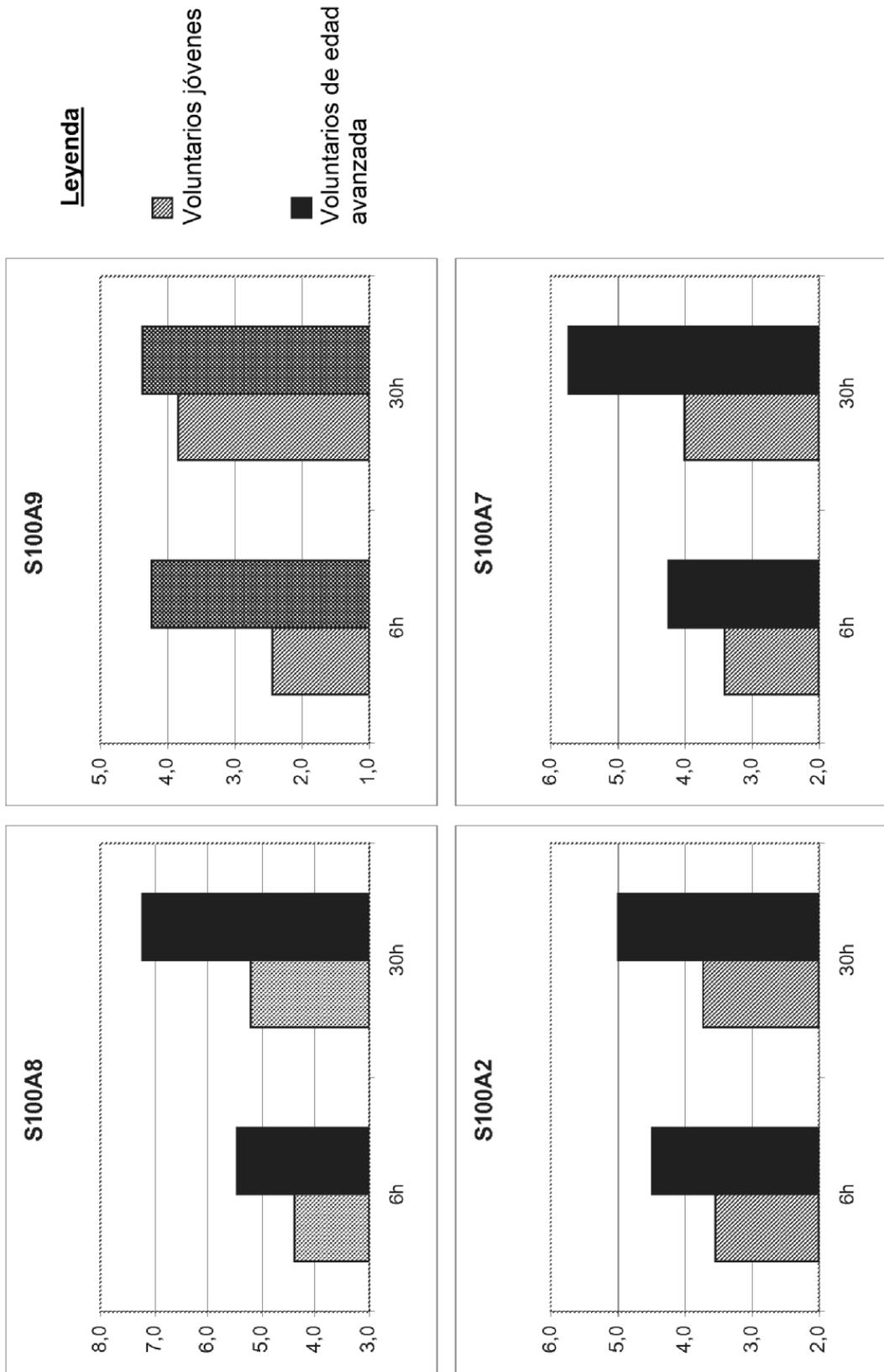


FIGURA 2 (1)

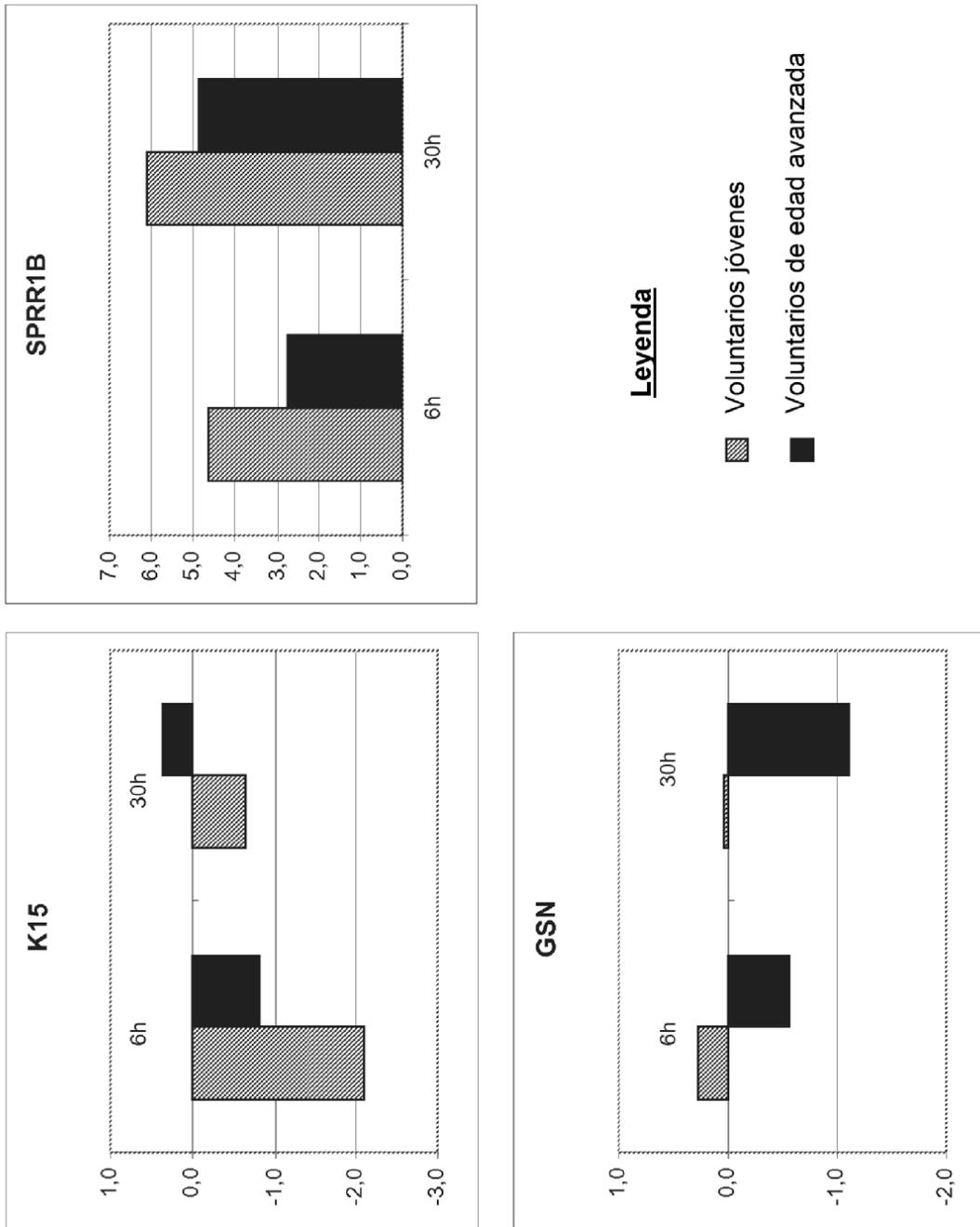
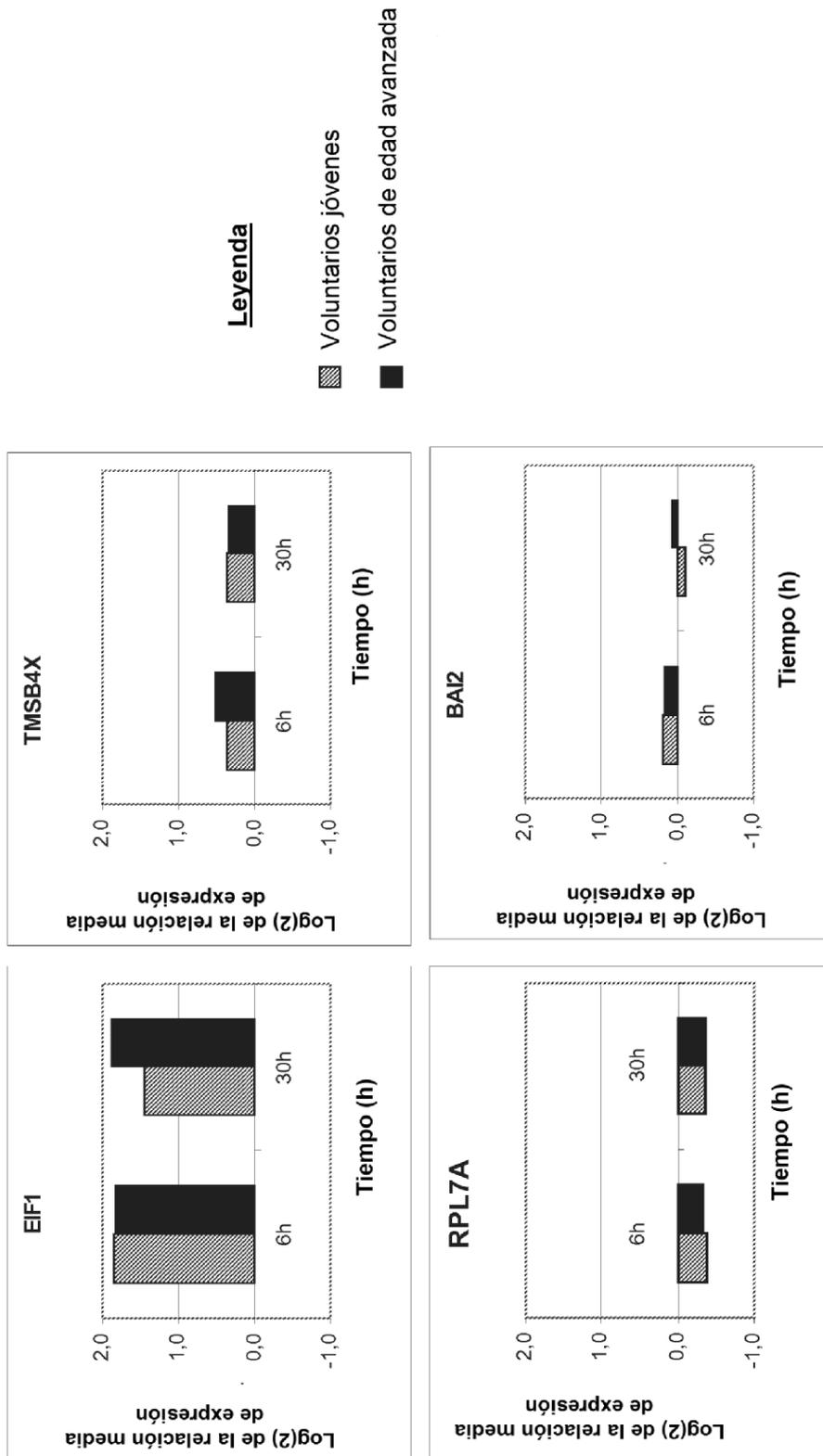


FIGURA 2 (2)



**FIGURA 3**