

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 178**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01) **A61K 36/48** (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) **C12Q 1/6876** (2008.01)
A61K 31/155 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/381 (2006.01)
A61K 31/41 (2006.01)
A61K 31/4196 (2006.01)
A61K 31/4365 (2006.01)
A61K 31/7028 (2006.01)
A61K 35/32 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2012 PCT/FR2012/050861**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12172221**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012 E 12722444 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 2699222**

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

30 Prioridad:

22.04.2011 FR 1153535
22.04.2011 FR 1153534
08.06.2011 US 201161494447 P
08.06.2011 US 201161494443 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.07.2019

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

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 721 178 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 cutáneas pigmentarias, asociada con la organización de la matriz extracelular

5 La presente invención se encuentra en el campo cosmético y está relacionada con la piel. Se encuadra más generalmente en el contexto de la caracterización de manchas pigmentarias de la piel y del tratamiento de estas manchas.

10 El color de la piel se debe principalmente a la presencia de un pigmento, la melanina, que está presente en la epidermis. Células dendríticas específicas, localizadas en la capa basal de la epidermis, denominadas melanocitos, se encargan de sintetizar la melanina. La melanogénesis se produce en unos orgánulos denominados melanosomas que, cargados con melanina, se transfieren a las células epidérmicas adyacentes, denominadas queratinocitos, a través de las dendritas. El color de la piel, o la pigmentación constitutiva, varía según los individuos, dependiendo 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 implican enzimas, siendo las principales la tirosinasa y la proteína asociada a la tirosinasa (Tyrp-1). Por naturaleza, la exposición solar estimula la pigmentación de la piel, se trata del fenómeno del bronceado.

20 Sin embargo, hay situaciones en las que el proceso de pigmentación se ve afectado y puede conducir a defectos de pigmentación, hipopigmentaciones (vitiligo, albinismo) o, a la inversa, a un exceso de pigmentación, hiperpigmentaciones. Entre los trastornos hiperpigmentarios benignos, caracterizados por una acumulación anómala de melanina (excluyendo el bronceado), pueden mencionarse el léntigo actínico, el melasma, las secuelas pigmentarias del acné, la pigmentación postinflamatoria, la dermatitis de los prados y la pigmentación relacionada con la planta hiedra venenosa o incluso las discromías benignas faciales.

25 El léntigo actínico, también denominado léntigo senil o solar, mancha senil, mancha de la edad, o incluso comúnmente conocido como "suciedad senil", "margaritas de cementerio" o "flores de cementerio", es de lejos la lesión pigmentaria más frecuente. Este tipo de lesiones aparecen en zonas de la piel que han sido fotoexpuestas, tales como el rostro, el dorso de las manos, las extremidades superiores y especialmente el antebrazo dorsal, la espalda, y en particular, la parte superior de la espalda. Por lo general, afectan a individuos a partir de los 40 años.

30 Macroscópicamente, los léntigos actínicos están representados por máculas pigmentadas benignas de color marrón más o menos oscuro, cuyos bordes son claros pero irregulares. De tamaño muy variable, pueden extenderse desde unos pocos milímetros hasta más de dos centímetros. A pesar de su alta frecuencia, se han publicado pocos estudios sobre la fisiología y patogenia de los léntigos actínicos. Basándose en los escasos estudios histológicos existentes, se sabe que existe un aumento global de la carga melanoepidérmica, y más particularmente, a nivel de la capa basal. También existe un alargamiento de las crestas epidérmicas que pueden adquirir un aspecto en forma de garrote en la dermis papilar [Montagna 1980, ber Rahman 1996, Andersen 1997, Cario-Andre 2004]. Finalmente, puede haber anastomosis entre las crestas adyacentes dando un aspecto en forma de puente o red.

40 En la dermis también puede existir incontinencia pigmentaria con presencia de melanina y melanófagos.

Tratamientos actuales:

45 Generalmente, los trastornos cutáneos pigmentarios benignos se consideran antiestéticos.

50 Debido a la asociación confirmada entre la aparición de léntigos actínicos y la exposición crónica al sol, la prevención de su aparición generalmente implica la aplicación tópica de los denominados productos fotoprotectores, tales como las cremas solares. En el caso de los tratamientos "curativos", se han desarrollado numerosos procedimientos, principalmente con fines cosméticos, para intentar eliminarlos o reducir su presencia. La eliminación o reducción de la presencia de estos trastornos generalmente se basa en la aplicación de tratamientos despigmentantes, basados en la reducción de la actividad de la síntesis de melanina en los melanocitos. Las moléculas despigmentantes interfieren con una o más etapas de la melanogénesis. Una de las vías de los principales productos utilizados hasta ahora se basa en la inhibición de la tirosinasa, una de las enzimas clave del proceso de la melanogénesis. El propósito de estos tratamientos es reducir o incluso detener la síntesis de pigmento.

55 Las principales sustancias despigmentantes conocidas son la hidroquinona y sus derivados, ácido kójico, arbutina, iminofenoles, ácido ascórbico y sus derivados, la combinación de carnitina y quinona, derivados de aminofenol y derivados de benzotiazol, extractos naturales, corticoides. Los exfoliantes a menudo también se asocian con estos compuestos activos que permiten aumentar la descamación y, por lo tanto, eliminar más fácilmente la melanina presente en el estrato córneo.

60 Otro método de tratamiento no cosmético es destruir las lesiones por medios físicos o químicos utilizando láseres o exfoliaciones. Sin embargo, estos procedimientos son tan engorrosos que no abordan la etiología del trastorno. En la mayoría de los casos, los léntigos actínicos reaparecen algún tiempo después del tratamiento.

65

Además, existen importantes inconvenientes a los tratamientos existentes. Las sustancias despigmentantes pueden presentar especialmente una cierta inestabilidad, poca eficacia a baja concentración, una actividad biológica que afecta a otras funciones y propiedades tóxicas o alergénicas.

5 Además, debido a que no se dirigen a la causa subyacente que causó la alteración de la pigmentación, existe una gran heterogeneidad de respuestas a los diferentes tratamientos despigmentantes. Por lo tanto, para un tratamiento dado, administrado, por ejemplo, por vía tópica, un trastorno pigmentario cutáneo benigno dado, como un léntigo o melasma actínico, puede atenuarse o desaparecer, mientras que otro no evolucionará. Esta variabilidad entre diferentes lesiones, puede observarse entre lesiones en distintos individuos, aunque también en un mismo individuo.
10 Por lo tanto, existen trastornos pigmentarios cutáneos benignos para los cuales, actualmente, ningún tratamiento tópico es eficaz.

Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar tratamientos más eficaces e inocuos para este tipo de lesión.

15 Para esto, es necesario identificar las desregulaciones moleculares y las disfunciones funcionales que pueden existir en este tipo de trastorno pigmentario para poder identificar nuevas dianas y seleccionar compuestos activos que corrijan estos defectos.

20 En la técnica anterior, en relación al tratamiento de manchas pigmentarias, y más particularmente, de léntigos actínicos, se describe la estimulación a nivel genómico o proteico, de moléculas que están estrechamente asociadas con los melanocitos y con la melanogénesis (enzimas de melanogénesis, proteínas del melanosoma, factores paracrinos clave de la melanogénesis). En la epidermis o en la dermis, se encuentran 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 rosado, P53 e IL1 α .

25 Además, otros estudios describen modificaciones moleculares o celulares en el léntigo solar o senil mediante análisis de expresión de genes o de proteínas. Sin embargo, a partir de estos diferentes estudios, no destaca ningún mecanismo o disfunción funcional general que implique la aparición de manchas pigmentarias.

30 Ningún documento de la técnica anterior ha permitido demostrar fehacientemente las desregulaciones moleculares o las disfunciones funcionales que pueden existir en este tipo de trastorno pigmentario, más allá de las moléculas estrechamente asociadas a los melanocitos y a la melanogénesis.

35 El documento WO2009/140550 describe un método de caracterización de lesiones de la piel, especialmente de tipo léntigo solar, que comprende la comparación de los niveles de expresión de diferentes genes marcadores, en las células de la epidermis. No se divulga ninguna relación con una disfunción funcional.

40 Los presentes inventores han demostrado, por primera vez, la implicación de genes dérmicos relacionados con la matriz extracelular y con la unión dermoepidérmica en los desajustes pigmentarios que se traducen como manchas pigmentarias de la piel, y más particularmente, la implicación de genes relacionados con la organización de la matriz, especialmente genes relacionados con la remodelación de la matriz extracelular o genes de la familia de los proteoglicanos y de las glucoproteínas extracelulares.

45 La matriz extracelular garantiza, a nivel de la piel, un papel estructural gracias a su capacidad para garantizar el soporte y la cohesión de tejidos y células y gracias a sus propiedades mecánicas que la permiten resistir a la tracción (especialmente debido a la presencia de colágenos) y a la compresión (especialmente debido a la presencia de proteoglicanos).

50 Juega un importante papel biológico porque también constituye un actor principal en la regulación de la homeostasis dérmica y epidérmica. Gracias, entre otras cosas, a sus propiedades de reserva de factores de crecimiento y citocinas, interviene en la morfogénesis, en la proliferación, en la diferenciación celular y en la reparación tisular

55 La unión dermoepidérmica (UDE) está formada por la membrana basal, que está constituida por una capa de matriz extracelular que separa la epidermis de la dermis. Constituye una barrera permeable y regula el intercambio de moléculas, en particular, de nutrientes, entre los dos tejidos. Garantiza una función de unión y anclaje de la epidermis a la matriz subyacente y de cohesión estructural del epitelio. También juega un papel importante en la regulación de la diferenciación y de la migración de las células epidérmicas, así como en las etapas de morfogénesis de la epidermis.

60 La matriz extracelular y el tejido conectivo se renuevan continuamente mediante un proceso de síntesis y de degradación enzimática. Las proteínas están específicamente implicadas en este proceso.

65 Entre las proteasas de degradación de la matriz pueden mencionarse la clase de metaloproteinasas (MMP) que están reguladas por inhibidores específicos (TIMP). Degradan más o menos específicamente moléculas muy variadas, tales como colágeno, gelatina, elastina, proteoglicanos, glucoproteínas, tales como fibronectina o laminina. Son enzimas líticas, es decir, transforman las macromoléculas en moléculas solubles de pequeño tamaño. Las enzimas de tipo

serina proteasas también están implicadas en la remodelación de la matriz. El activador de plasminógeno (urocinasa, PLAU), cuyos sustratos son la fibronectina y el plasminógeno, forma parte de este tipo de proteasas.

5 Otras proteasas, a diferencia de las primeras que se secretan en el medio extracelular, son enzimas intracelulares que actúan después de un proceso de internalización del sustrato que se va a someter a lisis, que están contenidas en gránulos y se excretan después de un estímulo. Tal es el caso de las catepsinas o lisozimas.

10 Los proteoglucanos son moléculas de membrana o intracelular, con localización extracelular, que consisten en una proteína denominada "proteína central" sobre la que se injertan cadenas de polisacáridos denominadas glucosaminoglucanos. La diversidad estructural de los proteoglucanos permite la constitución de sitios proteicos y/u osídicos, que interaccionan específicamente con otros componentes de la matriz o celulares, así como con mediadores solubles. Esta gran capacidad interactiva permite a los proteoglucanos participar en el ensamblaje de la matriz otorgando a la vez numerosas propiedades reológicas (hidratación, resistencia a las fuerzas de compresión, capacidad de filtración, transparencia). Los proteoglucanos también regulan muchas actividades celulares (proliferación, 15 diferenciación, adhesión, migración) y participan en el control de la actividad, biodisponibilidad y estabilidad de las citocinas.

20 Las glucoproteínas extracelulares son proteínas asociadas a los azúcares y permiten que las células se adhieran a la matriz extracelular.

Entre las glucoproteínas, las fibulinas constituyen una familia de moléculas secretadas asociadas a fibras elásticas, en particular, a la membrana basal.

25 La buena organización y el buen funcionamiento de la matriz extracelular dérmica son el resultado de un buen equilibrio entre la síntesis, el ensamblaje y la degradación de los diversos componentes de la matriz. Los proteoglucanos y las glucoproteínas tienen, especialmente, un papel en el ensamblaje y la cohesión de la matriz. A la inversa, los genes relacionados con la remodelación, actuarán sobre la degradación y el desensamblaje de los componentes de la matriz, y por consiguiente, más bien tienen, en su mayoría, un papel en la desestructuración de la matriz.

30 Por primera vez, los presentes inventores han demostrado que determinados genes relacionados con la matriz extracelular, y más particularmente, los relacionados con la remodelación de la matriz y los de la familia de los proteoglucanos y las glucoproteínas extracelulares, tienen niveles de transcripción significativamente diferentes entre una piel sana y una piel resultante de una mancha pigmentaria, destacando así la relación entre la desregulación de la función de remodelación o de los componentes de los proteoglucanos y glucoproteínas extracelulares dentro de la 35 matriz extracelular, y la modulación de la pigmentación que induce, especialmente, la aparición de manchas pigmentarias.

40 Se puede pensar que el aumento o la disminución de la cantidad de algunas de estas proteínas implicadas en la síntesis o degradación de las moléculas del estroma y de la unión dermoepidérmica, puede alterar la homeostasis dérmica, en los puntos de unión, y repercutir globalmente a nivel de la epidermis. De este modo, sin limitarse a ninguna teoría, las modificaciones de la expresión en la dermis de diferentes genes relacionados con la remodelación de la matriz o con los componentes proteoglucanos o glucoproteínas de esta matriz, llevaron a los inventores a pensar que, debido al papel que desempeñan las proteínas de esta familia en la organización de la matriz, la desregulación de 45 estos genes, signo de una modificación de todo el compartimento dérmico, altera la homeostasis de la epidermis y genera modificaciones importantes, en particular de la arquitectura histológica de la epidermis en las manchas pigmentarias (alargamiento de las crestas epidérmicas en la dermis, por ejemplo).

50 Además, la desregulación de los genes relacionados, por un lado, con el ensamblaje y la cohesión de la matriz, y por otro lado, de los genes relacionados con la degradación y con el desensamblaje de los componentes de la matriz, ocasiona una alteración del equilibrio entre la síntesis, el ensamblaje y la degradación de componentes. Esta desregulación genera alteraciones en la estructura y en la función de la matriz que conducen a una ruptura de la homeostasis pigmentaria dando lugar a la mancha pigmentaria.

55 En consecuencia, la carga melanoepidérmica aumenta y da lugar a manchas pigmentarias.

La presente descripción divulga una firma molecular representativa de diferencias de expresión génica que existen entre la piel resultante de una mancha pigmentaria y la piel sana adyacente, y las diferentes aplicaciones y métodos utilizando el conocimiento de esta firma, especialmente para modular la pigmentación de la piel, en el tratamiento cosmético de manchas pigmentarias o para igualar el tono u homogeneizar el color de la piel. Esta firma está 60 constituida por los 12 genes siguientes: MXRA5 (proteína de tipo 5 asociada a la remodelación de la matriz, "del inglés *matrix-remodeling associated 5*"), LYZ (Lisozima, amiloidosis renal), CTSL2 (catepsina L2), PLAU (activador de plasminógeno, urocinasa), TIMP1 (inhibidor tisular de metaloproteinasas-1), EFEMP1 (proteína 1 de la matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF, fibulina 3), ECM1 (proteína 1 de la matriz extracelular), ASPN (Asporina), HS3ST6 (sulfato de heparán (glucosamina) 3-O-sulfotransferasa 6), PAPLN (papilina, glucoproteína sulfatada similar a proteoglicano), CHSY1 (carbohidrato (condroitina) sintasa 1) y FLRT2 (proteína 2 transmembrana de fibronectina rica en leucina). 65

Estos genes se pueden agrupar funcionalmente de la siguiente manera:

- Lista A: cinco genes implicados en la remodelación de la matriz: MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1 y
- Lista B: siete genes de la familia de proteoglicanos y glucoproteínas extracelulares: EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2.

Los genes preferidos dentro del grupo EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2, son los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN y CHSY1.

Cabe señalar que tanto los genes de la lista A como los de la lista B están implicados en la organización de la matriz extracelular, teniendo papeles opuestos y, por consiguiente, complementarios sobre la organización y estructuración de la matriz. De hecho, mientras que los proteoglicanos y las glucoproteínas tienen especialmente un papel en el ensamblaje y la cohesión de la matriz, los genes relacionados con la remodelación actuarán, a la inversa, sobre la degradación y el desensamblaje de los componentes de la matriz, y por consiguiente, más bien tienen, en su mayoría, un papel en la desestructuración de la matriz. Por lo tanto, los genes de la lista A y los de la lista B comparten un papel en el equilibrio entre la síntesis, el ensamblaje y la degradación de los diversos componentes de la matriz extracelular.

Se entiende que dichos genes son genes humanos así denominados.

De hecho, los inventores han demostrado la modulación significativa y reproducible del nivel de expresión de estos genes entre la piel resultante de una mancha pigmentaria y la piel sana correspondiente.

Según un primer aspecto, se describe un método de caracterización de una mancha pigmentaria cutánea. La invención se refiere más particularmente a un método de caracterización de un léntigo actínico, senil o solar, aparente o sospechoso, en un ser humano, que comprende la comparación de los niveles de expresión, en muestras de piel resultante de dicha mancha y de piel adyacente intacta, en las células de la dermis, de al menos un gen dérmico implicado en la organización de la matriz extracelular seleccionado entre la lista constituida por los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1. Dicho método permite, entre otras cosas, confirmar la naturaleza de la mancha pigmentaria en el caso de que esta última ya sea evidente, por ejemplo, visualmente a simple vista. El método también permite predecir la aparición de una mancha, cuando esta última aún no se observa sino que solo se sospecha, o para concluir que una piel es proclive a la formación de manchas cutáneas, o propensa a defectos de pigmentación, por ejemplo, cuando aún no hay ninguna mancha aparente.

Las manchas pigmentarias cutáneas en cuestión son manchas hiperpigmentarias, o incluso denominadas hiperpigmentadas, que corresponden a un exceso de pigmento, o bien manchas hipopigmentarias, o incluso hipopigmentadas, que corresponden a defectos de pigmentación. Las hipopigmentaciones son, especialmente, el vitíligo y el albinismo. Los trastornos hiperpigmentarios benignos, caracterizados por una acumulación anómala (excluyendo el bronceado) de melanina, son, por ejemplo, el léntigo actínico, el melasma, las secuelas pigmentarias del acné, la pigmentación postinflamatoria, la dermatitis de los prados y la pigmentación relacionada con la planta hiedra venenosa o incluso las discromías benignas faciales. Las manchas pigmentarias también incluyen defectos, imperfecciones o irregularidades de pigmentación que hacen que el tono no sea uniforme, o que el color de la piel no sea homogéneo.

Las manchas pigmentarias en cuestión son, preferentemente, manchas pigmentadas de la piel humana. Aunque en la dermis, los trastornos a nivel de la matriz extracelular y de su organización, tanto en el proceso de remodelación de la matriz como a nivel de la familia de proteoglicanos y glucoproteínas extracelulares, son bastante generales, como demuestran los presentes inventores, pueden contemplarse métodos similares para otras especies animales también afectadas por las manchas pigmentarias. En este caso, los diferentes métodos, usos o composiciones, se aplicarán con los genes de la especie que se trate, ortólogos a los genes humanos descritos anteriormente.

El método comprende la comparación de los niveles de expresión en la piel resultante de dicha mancha y en la piel intacta, preferentemente adyacente, del mismo individuo, de al menos un gen dérmico relacionado con la organización de la matriz, más particularmente relacionado con la remodelación de la matriz o de la familia de los proteoglicanos y las glucoproteínas extracelulares, seleccionado entre la lista constituida por los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI, TIMP1, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2. Según la invención, el gen dérmico se selecciona de la lista A constituida por los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1.

Los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI, TIMP1, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2 comparten un papel en la organización de la matriz, más particularmente en el proceso de remodelado de la matriz o como constituyente de la matriz extracelular de la familia de los proteoglicanos y las glicoproteínas extracelulares. Los genes de la invención son los genes dérmicos denominados MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1.

Asimismo, dichos genes se denominan genes dérmicos, debido a que son genes expresados mayoritariamente en la dermis y dan lugar a proteínas características del compartimento dérmico o bien de la unión dermoepidérmica en cuanto a su cara dérmica; y esto contrasta, por ejemplo, con las proteínas queratinocitarias, con las proteínas

intracelulares o con las proteínas epidérmicas especialmente, tales como las proteínas expresadas preferentemente en el estrato córneo.

5 Los niveles de expresión de al menos uno de los genes descritos, se miden al nivel de la piel resultante de una mancha confirmada o supuesta, y al nivel de la piel adyacente intacta. Preferentemente, los niveles se miden en muestras de piel extraídas dentro de la mancha y dentro de una zona adyacente intacta. Las muestras son, por ejemplo, biopsias de piel. Basta con que el diámetro de las biopsias sea de algunos milímetros, por ejemplo, de 2 mm o bien de 3 mm. También puede contemplarse la escisión total de una lesión.

10 Los niveles de expresión de los genes descritos se definen como niveles de expresión en el interior de las células de la dermis de la piel o de la muestra en estudio.

15 La zona intacta (no lesionada) es, preferentemente, una zona adyacente lo más cercana posible a la mancha, pero a una distancia suficiente para que la zona o muestra extraída no contenga ninguna célula que pueda pertenecer a la mancha pigmentaria. Preferentemente, la zona adyacente intacta es una zona que tiene una exposición lumínica y solar comparable a la de la zona de la mancha pigmentaria. Como alternativa, la zona intacta puede provenir de una zona simétrica sobre la otra parte del sujeto, que tenga una ubicación perfectamente idéntica; por ejemplo, en el caso de una mancha en la mano izquierda, la zona intacta puede ser la zona correspondiente en la mano derecha. En este caso, la zona intacta no es, en sentido estricto, una zona adyacente. Por zona "intacta" se entiende una zona que no tiene mancha pigmentaria ni irregularidad pigmentaria, preferentemente, una zona homogénea en cuanto a pigmentación.

20 Dado que la zona intacta sirve como referencia, en todos los casos debe ser lo más comparable posible a la zona de la mancha, pero debe carecer de defecto pigmentario.

25 Por nivel de expresión de un gen, se entiende preferentemente, en la presente descripción, el nivel de transcripción de dicho gen. Sin embargo, su nivel de expresión también puede traducirse por su nivel de traducción, suponiendo no obstante que se trate un gen que codifique a una proteína. Este es el caso de los genes mencionados anteriormente.

30 Con respecto a la evaluación del nivel de transcripción del gen seleccionado, esta puede llevarse a cabo de diferentes maneras bien conocidas por el expertos en la materia, directamente o bien después de la transcripción inversa. El nivel de transcripción se puede evaluar, especialmente, utilizando microplacas de ARN o de ADN, disponibles para este fin en el comercio. En la parte experimental se describe un posible método de evaluación.

35 Cabe destacar también, 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. Por lo tanto, puede ser suficiente evaluar cuantitativa o cualitativamente la diferencia entre los dos niveles de expresión, sin tener que evaluar y cuantificar individualmente cada uno de los niveles de expresión.

40 Los niveles de expresión de al menos uno de los genes descritos pueden evaluarse por referencia o después de la normalización con el nivel de expresión de otros genes, cuyo nivel de expresión se supone que es sustancialmente idéntico en el interior de la mancha y en la zona de la piel intacta seleccionada. Dichos genes para la normalización son bien conocidos por el experto en la materia y pueden depender de la zona del cuerpo donde se encuentra la mancha. Como ejemplo, pueden citarse los siguientes genes como adecuados para utilizarse en la normalización de los niveles de expresión de los genes descritos, que codifican:

45 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).

50 El método según la invención se realiza *in vitro* o *ex vivo*.

Según un modo de realización del método de la invención, la mancha pigmentaria es una mancha benigna, no patológica, especialmente lo contrario a las lesiones patológicas tales como los lunares (nevus); pudiendo tratarse de una irregularidad en la pigmentación de la piel.

55 Preferentemente, un método según la invención comprende comparar los niveles de expresión de al menos dos genes distintos, de preferencia al menos tres genes distintos, o incluso cuatro o cinco genes distintos, seleccionados de los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU y TIMP1.

60 Cuando se seleccionan dos genes, pueden considerarse las siguientes combinaciones: MXRA5 y LYZ; MXRA5 y CTSL2; MXRA5 y PLAU; MXRA5 y TIMP1; LYZ y CTSL2; LYZ y PLAU; LYZ y TIMP1; CTSL2 y PLAU; CTSL2 y TIMP1 o PLAU y TIMP1. Todas las combinaciones de dos en dos, entre los 5 genes de la lista A, son combinaciones preferidas para realizar la invención.

65 Para las combinaciones de 3 genes, se contemplan especialmente las siguientes combinaciones: MXRA5, LYZ y CTSL2; MXRA5, LYZ y PLAU; MXRA5, LYZ y TIMP1; LYZ, CTSL2 y PLAU; LYZ, CTSL2 y TIMP1; y CTSL2, PLAU y TIMP1.

Las combinaciones de 4 genes que pueden contemplarse según la presente invención son especialmente las siguientes combinaciones: MXRA5, LYZ, CTSL2 y PLAUI; MXRA5, LYZ, CTSL2 y TIMP1; MXRA5, LYZ, PLAUI y TIMP1 y LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1.

5 Una combinación particular es la que comprende los genes MXRA5, LYZ, PLAUI y TIMP1, que tienen en común que se modulan de la misma manera, que se sobreexpresan especialmente en manchas hiperpigmentarias y que están implicados en la remodelación de la matriz.

10 También pueden contemplarse otras combinaciones, especialmente combinaciones que comprenden al menos uno de los genes MXRA5, LYZ, PLAUI y TIMP1; y el gen CTSL2.

Los 5 genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1 de la lista A tienen en común que están implicados en el proceso de remodelación de la matriz.

15 Según otra divulgación, los genes distintos se seleccionan de los genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2, o bien de la lista de los siguientes 6 genes preferidos de la lista B: EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN y CHSY1. Por ejemplo, los genes seleccionados pueden ser EFEMP1 y ECM1, o EFEMP1 y ASPN, o ECM1 y ASPN, o bien ECM1 y PAPLN. Todas las combinaciones de dos en dos, entre los 6 genes preferidos EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN y CHSY1, son combinaciones posibles.

20 Para las combinaciones de 3 genes, se contemplan especialmente las siguientes combinaciones; EFEMP1, ECM1 y ASPN; EFEMP1, ECM1 y HS3ST6; EFEMP1, ECM1 y PAPLN; ECM1, ASPN y HS3ST6; EFEMP1, ASPN y CHSY1; y ECM1, ASPN, HS3ST6 y PAPLN.

25 También pueden contemplarse combinaciones de 5 genes, en particular, las siguientes combinaciones: EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6 y PAPLN; EFEMP1, ECM1, ASPN, PAPLN y CHSY1; y ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN y CHSY1.

30 Una combinación particular es la constituida por los 4 genes EFEMP1, ASPN, PAPLN y CHSY1, que tienen en común que se modulan de la misma manera, que se sobreexpresan especialmente en manchas hiperpigmentarias y que forman parte de la familia de los proteoglucanos y glucoproteínas extracelulares. Otra combinación particular es la constituida por los 3 genes ECM1, HS3ST6 y FLRT2, que tienen en común que se modulan de la misma manera, que se subexpresan especialmente en manchas hiperpigmentarias y que forman parte de la familia de los proteoglucanos y glucoproteínas extracelulares.

35 También pueden contemplarse otras combinaciones, especialmente combinaciones que comprenden al menos uno de los genes EFEMP1, ASPN, PAPLN y CHSY1; y al menos uno de ECM1, HS3ST6, FLRT2.

40 Los 7 genes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2 tienen en común que pertenecen a la familia de los proteoglucanos y glucoproteínas extracelulares.

45 Se contemplan otras combinaciones, especialmente combinaciones que comprenden al menos un gen entre los implicados en la remodelación de la matriz, es decir, entre la lista A y al menos un gen de los que pertenecen a la familia de los proteoglucanos y glucoproteínas extracelulares, es decir, de la lista B, y preferentemente uno de EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN y CHSY1. Por ejemplo, una combinación contemplada es la constituida por al menos dos genes seleccionados entre MXRA5, LYZ, PLAUI, TIMP1, EFEMP1, ASPN, PAPLN y CHSY1, que tienen en común que se sobreexpresan dentro de manchas hiperpigmentarias.

50 Otras combinaciones son especialmente combinaciones de 2 genes, uno de la lista A y el otro de la lista B, combinaciones de 3 genes, siendo dos de la lista A y uno de la lista B, o a la inversa, combinaciones de 4 genes, siendo 2 de cada una de las listas, o bien tres de la lista A y uno de la lista B, o a la inversa.

55 Una combinación preferida de dos genes es la combinación de los genes PLAUI y ASPN. Las combinaciones preferidas de tres genes son especialmente la combinación de los genes PLAUI, CTSL2 y ASPN, así como la combinación de PLAUI, ASPN, EFEMP1. Las combinaciones preferidas de 4 genes incluyen la combinación de PLAUI, CTSL2, MXRA5 y ASPN, la combinación de PLAUI, ASPN, EFEMP1 y ECM1 y la combinación de PLAUI, CTSL2, ASPN y EFEMP1.

60 Cualquiera de las combinaciones o subgrupos de genes específicos preferidos relacionados con este aspecto de la invención, también se prefieren para los otros aspectos de la invención.

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

- superior en la piel resultante de la mancha, o en la muestra de piel resultante de la mancha, con respecto al nivel de la piel adyacente intacta, o en la muestra de piel adyacente intacta, si el gen se selecciona de MXRA5, LYZ, PLAU, TIMP1, EFEMP1, ASPN, PAPLN y CHSY1, e
- inferior en la piel resultante de la mancha, o en la muestra de piel resultante de la mancha, con respecto al nivel de la piel adyacente intacta, o en la muestra de piel adyacente intacta, si el gen se selecciona de CTSL2, ECM1, HS3ST6 y FLRT2.

De hecho, los presentes inventores han demostrado la sobreexpresión de los genes MXRA5, LYZ, PLAU, TIMP1, EFEMP1, ASPN, PAPLN y CHSY1 en la piel resultante de una mancha hiperpigmentaria, especialmente léntigo actínico, con respecto al nivel de expresión en la piel adyacente intacta. También demostraron la subexpresión de los genes CTSL2, ECM1, HS3ST6 y FLRT2 en la piel resultante de una mancha hiperpigmentaria, especialmente léntigo actínico, con respecto al nivel de expresión en la piel adyacente intacta.

A la inversa, el método descrito lleva a la conclusión de que la mancha supuesta u observada es una mancha hipopigmentaria si el nivel de expresión es:

- inferior en la piel resultante de la mancha, o en la muestra de piel resultante de la mancha, con respecto al nivel en la piel adyacente intacta, o en la muestra de piel adyacente intacta, si el gen se selecciona de MXRA5, LYZ, PLAU, TIMP1, EFEMP1, ASPN, PAPLN y CHSY1, y
- superior en la piel resultante de la mancha, o en la muestra de piel resultante de la mancha, con respecto al nivel en la piel adyacente intacta, o en la muestra de piel adyacente intacta, si el gen se selecciona de CTSL2, ECM1, HS3ST6 y FLRT2.

Por superior o inferior se entiende una diferencia en los niveles de expresión que es estadísticamente significativa, 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 intacta, se fija a un valor de 1, el índice de modulación es de al menos 1,1 para un gen sobreexpresado en la piel con lesión y a lo sumo de 0,9 para un gen subexpresado en la piel con lesión.

Preferentemente, el método descrito se realiza con al menos dos genes, uno perteneciente a la categoría de genes sobreexpresados en las manchas hiperpigmentarias, y subexpresados en las manchas hipopigmentarias, y el otro perteneciente a la categoría de genes modulados de manera estrictamente inversa a la del primero en las manchas pigmentarias. Preferentemente, el método se realiza con al menos tres genes: dos genes seleccionados de MXRA5, LYZ, PLAU, TIMP1, EFEMP1, ASPN, PAPLN y CHSY1 y un gen seleccionado de CTSL2, ECM1, HS3ST6 y FLRT2, modulado a la inversa de los dos primeros en las manchas pigmentarias, o bien dos genes seleccionados de MXRA5, LYZ, PLAU y TIMP1, y el gen CTSL2; o bien dos genes seleccionados entre EFEMP1, ASPN, PAPLN y CHSY1 y un gen seleccionado entre ECM1, HS3ST6 y FLRT2 y modulado a la inversa de los dos primeros en las manchas pigmentarias.

Preferentemente, en el contexto de este método de caracterización, el nivel de expresión de uno de los genes descritos se compara dentro de la piel de un individuo caucásico. Preferentemente, dicho individuo tiene una edad de al menos cuarenta años, preferentemente de al menos cincuenta o sesenta años. El individuo en cuestión, en el contexto de la presente invención, es preferentemente del sexo femenino. Como se detalla anteriormente, el nivel de expresión de uno o más genes descritos se puede comparar dentro de muestra de piel de dicho individuo.

Además, los presentes inventores también han demostrado la modulación diferencial de otros genes dérmicos entre la piel resultante de una mancha pigmentaria y la piel intacta, preferentemente adyacente. Los inventores han demostrado especialmente, la modulación de los siguientes genes dérmicos relacionados con la matriz extracelular:

- Los genes TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, que codifican proteínas implicadas en la vía de señalización de TGF- β - SMAD;
- Los genes LEPREL1, PLOD2, COL6A3 y CRTAP que codifican colágenos, componentes de la matriz extracelular, y más particularmente, colágenos filamentosos del estroma y moléculas asociadas a la biosíntesis y al ensamblaje de colágenos;
- Los genes LAMC1, LAMB3 y LAMA3 que codifican lamininas, proteínas adhesivas de la matriz extracelular;
- Los genes FRAS1, MATN2 y DST que codifican proteínas de la matriz, asociadas a la zona de la membrana basal;
- los genes ITGA2, ITGAV e ITGB1 que codifican integrina, implicados en la unión de células a la matriz extracelular;
- El gen ACTN1 que codifica una actina, un componente de la matriz extracelular.

Por consiguiente, el método de caracterización, tal como se describe, también comprende la comparación de niveles de expresión dentro de la piel resultante de dicha mancha y dentro de la piel intacta, preferentemente adyacente, de al menos un primer gen dérmico relacionado con la remodelación de la matriz o de la familia de los proteoglicanos o glucoproteínas extracelulares, seleccionado de la lista constituida por los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU, TIMP1, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2 y por al menos un segundo gen seleccionado de la siguiente lista de 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; por ejemplo, el segundo gen se selecciona de la siguiente lista de genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1 o bien de la siguiente lista de genes: FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1.

Genes preferidos dentro de la lista TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1 son los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 y TGFBR3. Genes preferidos dentro de la lista FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1 son los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 e ITGA2.

Preferentemente, el segundo gen se selecciona de genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1; y preferentemente de los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 y TGFBR3.

Según otra realización más, el segundo gen se selecciona de los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, y preferentemente de los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 e ITGA2. Como alternativa, el segundo gen puede seleccionarse de LEPREL1, PLOD2, COL6A3 y CRTAP, o bien de LAMC1, LAMB3 y LAMA3, o bien de FRAS1, MATN2 y DST, o bien incluso de ITGA2, ITGAV e ITGB1, o bien puede ser el gen ACTN1.

Según otra realización, el primer gen se selecciona de la lista A de genes dérmicos; seleccionándose el segundo gen como se especificó anteriormente. Según otra realización más, el primer gen se selecciona de la lista B de genes dérmicos; seleccionándose el segundo gen como se especificó anteriormente.

Según una realización particular, el método comprende la comparación de los niveles de expresión de al menos 3 genes distintos, uno seleccionado de los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU y TIMP1, un segundo gen seleccionado de los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1 y un tercer gen seleccionado de los genes, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2. Según otra realización más, el método comprende la comparación de los niveles de expresión de al menos 4 genes distintos, seleccionándose los tres primeros como se ha descrito anteriormente, y el cuarto de la lista constituida por FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1.

Todas las combinaciones de genes descritas anteriormente también son combinaciones preferidas en el contexto de otros aspectos de la invención.

Si uno o más genes adicionales se seleccionan de los genes THBS2, TGFBI, BMP2, SMAD3, TGFBR2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, entonces el método de caracterización lleva a confirmar una mancha hiperpigmentaria si el nivel de expresión es

- superior en la piel resultante de la mancha, o en la muestra de piel resultante de la mancha, con respecto al nivel en la piel adyacente intacta, o en la muestra de piel adyacente intacta, si el gen se selecciona de THBS2, TGFBI, BMP2, SMAD3, TGFBR2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, e
- inferior en la piel resultante de la mancha, o en la muestra de piel resultante de la mancha, con respecto al nivel en la piel adyacente intacta, o en la muestra de piel adyacente intacta, si el gen se selecciona de SOSTDC1 y PLOD2.

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

- inferior en la piel resultante de la mancha, o en la muestra de piel resultante de la mancha, con respecto al nivel en la piel adyacente intacta, o en la muestra de piel adyacente intacta, si el gen se selecciona de THBS2, TGFBI, BMP2, SMAD3, TGFBR2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, y
- superior en la piel resultante de la mancha, o en la muestra de piel resultante de la mancha, con respecto al nivel en la piel adyacente intacta, o en la muestra de piel adyacente intacta, si el gen se selecciona de SOSTDC1 y PLOD2.

El método descrito es también un método de ensayo para predecir la formación de manchas cutáneas en un sujeto. Según esta realización, el nivel de expresión de al menos un gen, y preferentemente de varios genes, de la invención, se compara en una muestra de piel, con su nivel de expresión en piel normal. Una modulación significativa del nivel

de expresión con respecto a la piel normal permite concluir que la piel del sujeto de ensayo es propensa a la formación de manchas cutáneas.

5 Por piel normal puede tratarse o bien de piel del mismo sujeto, en una zona corporal notoriamente desprovista de manchas, por ejemplo, zonas no expuestas a la radiación solar, o bien zonas poco propensas a la formación de manchas pigmentarias. También puede tratarse del nivel promedio de expresión de dichos genes, en la piel de personas sin manchas y que tienen preferentemente el mismo tipo de piel que el sujeto de ensayo. Los genes de normalización descritos anteriormente podrán utilizarse para normalizar los índices de expresión de los genes de la invención.

10 La presente invención también se refiere, según un segundo aspecto, a un método de evaluación de la eficacia de un tratamiento de manchas o de irregularidades pigmentarias, utilizando la firma demostrada por los inventores y más específicamente a un método de evaluación de la eficacia de un tratamiento de un léntigo actínico, senil o solar, que comprende comparar, antes y después del tratamiento, los niveles de expresión, dentro de las células de la dermis en una muestra de piel resultante de una mancha, de al menos un gen dérmico implicado en la organización de la matriz extracelular seleccionado entre la lista constituida por los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU y TIMP1. El tratamiento evaluado puede ser un tratamiento dirigido a la atenuación de manchas pigmentarias o cualquier otra modulación de la pigmentación, especialmente para igualar el tono, homogeneizar el color de la piel o para combatir las discromías. Según una primera realización, este método de evaluación comprende una etapa de comparación de los niveles de expresión en la piel resultante de una mancha pigmentaria, antes y después del tratamiento, de al menos un gen dérmico seleccionado entre MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU, TIMP1, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2.

25 Según la invención, el gen se selecciona de MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU y TIMP1.

Según este método de evaluación, la comparación de los niveles de expresión del gen o genes seleccionados se realiza dentro de la piel resultante de una mancha pigmentaria, que es un léntigo actínico, senil o solar, o bien dentro de un muestra correspondiente, antes y después del tratamiento. Por lo tanto, no hay comparación a un nivel de expresión dentro de la piel sana intacta.

30 Como para el método de caracterización según el primer aspecto de la invención, los niveles de expresión se normalizan favorablemente utilizando niveles de expresión de genes que codifican 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).

35 Mediante el método de evaluación que se describe, se considera que un tratamiento dado es eficaz para el tratamiento de una mancha hiperpigmentaria si el nivel de expresión es:

- 40 - inferior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento, si el gen se selecciona de MXRA5, LYZ, PLAU, TIMP1, EFEMP1, ASPN, PAPLN y CHSY1, y
- superior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento, si el gen se selecciona entre CTSL2, ECM1, HS3ST6 y FLRT2.

45 A la inversa, mediante el método de evaluación que se describe, se considera que un tratamiento dado es eficaz para el tratamiento de manchas hipopigmentarias cuando el nivel de expresión es:

- 50 - superior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento, si el gen se selecciona entre MXRA5, LYZ, PLAU, TIMP1, EFEMP1, ASPN, PAPLN y CHSY1, e
- inferior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento, si el gen se selecciona entre CTSL2, ECM1, HS3ST6 y FLRT2.

Un tratamiento se considerará sin efecto si los niveles de expresión del gen seleccionado, antes y después del tratamiento, son sustancialmente idénticos, o bien si las diferencias observadas no son significativas.

55 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 si, para la mayoría de los genes analizados, y preferentemente para el conjunto de genes analizados, tomados individualmente, el tratamiento se considera como eficaz. Para los otros genes seleccionados, preferentemente, el tratamiento no debe tener efecto, pero no debe tener el efecto inverso.

60 De acuerdo con otra realización, el método de evaluación de la eficacia de un tratamiento de 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 observados entre la piel con lesión de la mancha o irregularidad pigmentaria y la piel sana.

Según esta realización de la evaluación de la eficacia de un tratamiento, el tratamiento se considera como eficaz si la diferencia entre los niveles de expresión del gen o genes seleccionados en la piel con lesión resultante de la mancha con respecto a los de la piel sana, preferentemente adyacente, es menor después del tratamiento con respecto a la que había antes del tratamiento.

5 Cuando se comparan los niveles de expresión de más de un gen, se concluye preferentemente que el tratamiento es eficaz cuando, para la mayoría de los genes seleccionados, y preferentemente para el conjunto de los genes seleccionados, tomados individualmente, se puede concluir con un tratamiento eficaz. Preferentemente, la comparación de los niveles de expresión del gen o genes seleccionados, se realiza en muestras de piel extraídas de parte de la mancha pigmentaria.

15 El tratamiento en cuestión, evaluado por el método de la invención, no se limita a un tipo de tratamiento particular. Puede tratarse de un tratamiento con una molécula química, un compuesto activo, un extracto natural, especialmente un aceite esencial, un ácido nucleico, especialmente un ARNi, un complejo proteico o cualquier otra molécula o combinación de moléculas. También puede tratarse de un tratamiento por medios físicos u ondas, especialmente electromagnéticas. Se trata preferentemente de un tratamiento tópico, pero también se contempla evaluar la eficacia de los tratamientos administrados por vía oral, por inyección o por cualquier otro medio de administración.

20 El tratamiento ensayado puede dirigirse a atenuar o a hacer desaparecer una mancha cutánea, a modular la pigmentación de la piel, a igualar el tono, a homogeneizar el color de la piel o a atenuar las discromías.

25 Los tratamientos particularmente preferidos en el contexto de esta invención son tratamientos cosméticos, más particularmente tratamientos cosméticos tópicos. En este caso, la mancha pigmentaria en cuestión es una mancha o irregularidad pigmentaria no patológica, y más particularmente, se trata de un léntigo actínico, solar o senil.

Mediante los métodos de la invención, también es posible evaluar la eficacia de la combinación de varios tratamientos. De hecho, es posible evaluar combinaciones que permitan restaurar mejor los niveles de expresión de uno, de varios o de todos los genes de la lista A o B, tales como los que se expresan en la piel intacta.

30 Mediante los métodos de evaluación descritos anteriormente, es posible evaluar la eficacia de un nuevo tratamiento contemplado, o bien cuantificar o calificar también la eficacia de los tratamientos existentes contra las manchas pigmentarias, ya sean hiper o hipopigmentarias. De esta manera, también es posible contemplar combinaciones de tratamientos que pueden ser susceptibles de ser particularmente eficaces, sinérgicos o complementarios. Como se explica en los métodos de caracterización según el primer aspecto de la invención, preferentemente se comparan los niveles de expresión de más de un gen, preferentemente de al menos dos, tres o cuatro genes descritos, o bien de 5 genes de la lista A.

40 Los genes o combinaciones de genes más particularmente preferidos ya se han explicado con respecto al primer aspecto de la invención; en este aspecto se prefieren los mismos genes o combinaciones. Especialmente, todas las combinaciones de dos en dos o de tres en tres de la invención, son particularmente preferidas, y especialmente las combinaciones de 2 en 2 o de 3 en 3 de los genes de la lista A.

45 Además, debido a los resultados complementarios obtenidos por los inventores en lo que respecta a otros genes dérmicos cuyo nivel de expresión se modula dentro de la mancha pigmentaria, los métodos de evaluación, tales como los descritos, se realizan preferentemente con:

- al menos un primer gen seleccionado entre los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1, o bien entre EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2, o bien entre MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI, TIMP1, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2 y
- 50 - al menos un segundo 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. Como alternativa, el segundo gen puede seleccionarse entre los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, o bien incluso entre los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1.

Los genes preferidos dentro de los genes dérmicos TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, son los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 y TGFBR3.

60 Los genes preferidos dentro de los genes dérmicos FRAS1 LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1 son los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 e ITGA2.

65 Si uno o más genes adicionales se seleccionan 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, entonces el método de evaluación lleva a considerar un tratamiento eficaz para el tratamiento de las manchas hiperpigmentarias 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 TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, 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.

A la inversa, el método de evaluación lleva a considerar un tratamiento eficaz para el tratamiento de las manchas hipopigmentarias si el nivel de expresión es:

- superior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento, si el gen se selecciona entre TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, 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.

La muestra de piel proviene preferentemente de un ser humano de tipo caucásico, preferentemente de al menos cuarenta años, preferentemente de al menos cincuenta años, o incluso de al menos sesenta años.

En el contexto de la presente invención y especialmente para el método de evaluación descrito, este se trata del tratamiento de manchas hiperpigmentarias, y más particularmente de léntigos actínicos, solares o seniles.

El método de evaluación de la eficacia de un tratamiento según la presente invención se lleva a cabo *in vitro*.

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

La presente divulgación también se refiere a un método *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento de manchas pigmentarias; comprendiendo dicho método comparar, antes y después del tratamiento, el nivel de expresión, en un modelo celular representativo de la piel, de al menos un gen dérmico seleccionado de la lista constituida por los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU, TIMP1, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2 o bien el nivel de expresión o de actividad del producto de expresión de dicho gen seleccionado. La invención se refiere más precisamente a dicho método, para la evaluación de la eficacia de un tratamiento de léntigos actínicos, seniles o solares, donde el gen se selecciona de la lista A de genes dérmicos relacionados con la remodelación de la matriz.

El modelo celular puede ser de cualquier tipo considerado como apropiado por el experto en la materia. Estos modelos pueden incluir especialmente modelos celulares de monocultivos o cocultivos, o modelos tridimensionales de piel reconstruida, o bien de piel cultivada *ex vivo*. También hay modelos celulares representativos de manchas pigmentarias, más particularmente de léntigos actínicos, que pueden utilizarse en el contexto de este método. No es necesario que dichos modelos celulares imiten a las manchas pigmentarias (o al léntigo) en su totalidad, sino que deben imitar a los acontecimientos biológicos, a las características morfológicas o pigmentarias observadas en las manchas pigmentarias, especialmente al léntigo. El experto en la materia conoce bien dichos modelos *in vitro*.

De acuerdo con una realización preferida del método *in vitro* descrito anteriormente, esta comprende la comparación de los niveles de expresión de al menos dos genes, preferentemente de al menos tres, cuatro, cinco o seis genes descritos, como se explica para los otros métodos de evaluación según la invención, seleccionándose dichos genes entre los 12 genes descritos, o bien entre los 5 genes de la invención de la lista A o bien entre los 7 genes de la lista B, o entre los 6 genes preferidos de esta última lista, es decir, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN y CHSY1.

De manera similar, como se explica para los otros métodos de evaluación, estos se realizan preferentemente con al menos dos genes, uno de los cuales se selecciona entre los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU y TIMP1, o bien entre los genes de la lista B, o bien entre MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU, TIMP1, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2 y el segundo se selecciona 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, preferentemente entre los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, o bien entre los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1.

Los genes preferidos dentro de la lista TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1, son TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 y TGFBR3. Los genes preferidos dentro de la lista FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, son los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 e ITGA2.

Todas las combinaciones de genes específicos descritas con respecto a otros aspectos de la invención también son preferidas en el contexto de este aspecto.

Además, mediante estos métodos de evaluación, es posible promover un tratamiento con los consumidores, destacando los resultados obtenidos con este tratamiento en los métodos de evaluación de la eficacia descritos en la presente invención. Por tanto, la presente divulgación también describe un método que permite recomendar un producto indicando su efecto en un protocolo de ensayo constituido por un método de evaluación de la eficacia tal como describe anteriormente. Por tanto, la divulgación también tiene por objeto un método para promover un producto cosmético o tratamiento cosmético que consiste en indicar una eficacia, acción o propiedad de dicho producto o tratamiento, demostrada por al menos un método llevado a cabo como se describe anteriormente.

Dicha promoción del producto podrá realizarse a través de cualquier canal de comunicación. Podrá realizarla especialmente el vendedor o la vendedora, directamente en el punto de venta, por radio y televisión, especialmente en el contexto de anuncios publicitarios. También podrá realizarse mediante prensa escrita, o a través de cualquier otro documento, especialmente con fines publicitarios (prospecto). También podrá realizarse por Internet, o por cualquier otra red informática adecuada. También podrá realizarse directamente en el producto, especialmente en su envasado o en cualquier nota explicativa que pueda estar asociada a dicho envase. La presente descripción también divulga un método de selección de moléculas para el tratamiento de manchas pigmentarias cutáneas que comprende la realización de uno de los métodos de evaluación descritos anteriormente para determinar la eficacia de un tratamiento basado en esta molécula.

Según otro aspecto, la presente divulgación también se refiere a un método cosmético de tratamiento o prevención de manchas o irregularidades pigmentarias cutáneas, no patológicas de la piel humana, más específicamente de un léntigo actínico, senil o solar, que comprende la modulación del nivel de expresión o de actividad de un gen dérmico, en donde dicho gen se selecciona de la lista constituida por los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU, TIMP1, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2. Según la invención, el gen se selecciona de la lista de genes dérmicos relacionados con la remodelación de la matriz constituida por MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU y TIMP1 y la modulación se obtiene utilizando moléculas antisentido, un microARN o un ARNip dirigido contra el gen dérmico seleccionado e inhibiendo la expresión de dicho gen.

Las manchas cutáneas pigmentarias no patológicas, como los léntigos actínicos, seniles o solares, son manchas benignas, cuya eliminación solo es deseable por razones estéticas y no por razones terapéuticas.

Los presentes inventores han demostrado el importante papel de los genes descritos en la dermis a nivel de manchas pigmentarias, y especialmente la relación entre la desregulación del nivel de expresión de estos genes y la aparición de manchas pigmentarias. Como resultado, la suspensión o disminución de la modulación de estos genes puede permitir disminuir o anular las desregulaciones observadas y así permitir restaurar una situación al nivel de la matriz extracelular compatible con la ausencia de una mancha pigmentaria, por lo tanto, con un tono uniforme y un color de piel homogéneo.

Por las mismas razones explicadas con respecto a otros aspectos de la invención, se prefiere seleccionar más de un gen dentro de los genes de la invención, por ejemplo al menos dos genes, al menos tres, cuatro, cinco o seis genes. Según una realización, el método cosmético tiene por objeto modular el nivel de expresión de todos los genes de la lista A. El método cosmético según la invención tiene por objeto restaurar los niveles de expresión cercanos a los que se observan en la piel sana, por ejemplo, adyacente a una mancha pigmentaria. Los genes particularmente preferidos son los genes MXRA5, LYZ, PLAU y TIMP1.

En el caso de un léntigo 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 seleccionado entre los genes MXRA5, LYZ, PLAU y TIMP1 o bien
- un aumento, posiblemente temporal, de la expresión del gen CTSL2.

Preferentemente, la inhibición no es una inhibición total sino parcial que tiende a reducir el nivel de expresión del gen seleccionado sin inhibir no obstante por completo su expresión.

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

Preferentemente, en simultáneo con la modulación del nivel de expresión buscado para uno de los genes de la invención, un método cosmético según la invención también comprende preferentemente la modulación de al menos otro 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. Los genes preferidos dentro de esta segunda lista de genes dérmicos son los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 y TGFBR3; y los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 e ITGA2.

5 Las modulaciones aplicadas, si se trata del tratamiento de una mancha hiperpigmentaria, son la disminución del nivel de expresión para los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, y el aumento del nivel de expresión para los genes SOSTDC1 y PLOD2. En el caso de tratamiento de manchas hipopigmentarias, las modulaciones aplicadas se invierten.

10 Por lo tanto, un método cosmético comprende la aplicación de un producto, especialmente una molécula química, un extracto natural, un compuesto activo, ácidos nucleicos, péptidos, o de un tratamiento que module el nivel de expresión o la actividad del producto de expresión de al menos uno de los genes dérmicos de la invención.

15 Según la invención, las modulaciones se obtienen utilizando moléculas antisentido, un microARN o un ARNip dirigido contra al menos uno de los genes de la invención e inhibiendo su expresión.

Si es un producto, este se aplica preferentemente por vía tópica.

20 Preferentemente, la modulación se efectúa gracias a la utilización de un modulador de uno de los genes de la invención. Dichos moduladores se describen en el ejemplo 3 y en la tabla 3. Por ejemplo, un método cosmético, tal como se describe, comprenderá ventajosamente la aplicación de un compuesto seleccionado entre un extracto vegetal de *Lupinus albus* LU10, el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria, valsartán, polvo de hueso desmineralizado o "DBP, del inglés *demineralized bone powder*", fenilacetato de sodio (NaPA), P-aminobenzamidina, benzo[b]tiofeno-2-carboxamidina B428 sustituida en 4, tienopiridina SR 25989 y notoginsenosida R1, o bien entre
25 letrozol y anastrozol, o bien una combinación de al menos dos de estos moduladores.

Además, un método cosmético como el descrito, se realiza ventajosamente después de la caracterización de la mancha pigmentaria que se desea tratar mediante un método según el primer aspecto. De hecho, esta primera etapa permite caracterizar la mancha y, por lo tanto, detectar los genes cuyo nivel de expresión está fuertemente modulado
30 entre la zona de la mancha y una zona intacta, preferentemente adyacente. Es posible entonces adaptar un tratamiento que permita actuar sobre el gen o genes de la invención que se modulan de manera diferencial dentro de esta mancha, aplicando específicamente moduladores para dichos genes.

35 Cualquiera que sea el tratamiento en cuestión, el método cosmético también puede comprender la aplicación de uno o más compuestos activos adicionales destinados a reforzar los efectos deseados, por ejemplo, cualquier sustancia descrita despigmentante, agentes queratolíticos y/o descamantes, antioxidantes, filtros solares químicos o físicos UV, agentes antiinflamatorios y/o calmantes, ácidos desoxirribonucleicos y sus derivados.

40 El método cosmético también es aplicable en el caso de la prevención de la aparición de manchas pigmentarias u otras irregularidades del tono o del color de la piel, y especialmente de manchas hiperpigmentadas tales como el léntigo actínico.

45 De hecho, los diversos datos obtenidos por los inventores y detallados en la parte experimental, revelan que las agresiones en la matriz extracelular y en su organización, especialmente al nivel de remodelación de la matriz y al nivel de sus componentes proteoglucanos y glucoproteínas extracelulares, a través de los genes identificados por los inventores, pueden producirse aguas arriba, antes de la aparición de las manchas. Podemos pensar que la secuencia de acontecimientos biológicos en las manchas hiperpigmentarias puede 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 conduce a 3) un aumento de la longitud de la
50 unión dermoepidérmica y la formación de redes complejas que conducen a 4) un aumento de la carga melánica

La presente descripción también divulga el uso de un modulador del nivel de expresión o de la actividad del producto de expresión de al menos un gen dérmico seleccionado de la lista constituida por los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI, TIMP1, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2 para una aplicación cosmética en el
55 tratamiento de manchas cutáneas pigmentarias, no patológicas, más específicamente para el tratamiento de léntigos actínicos, seniles o solares. Según la invención, el gen se selecciona de la lista A de genes dérmicos relacionados con la remodelación de la matriz y el modulador es una molécula antisentido, un microARN o un ARNip dirigido contra el gen dérmico seleccionado y que inhibe la expresión de dicho gen.

60 Para el tratamiento de las manchas hiperpigmentarias, el modulador que se utiliza es un inhibidor de al menos un gen seleccionado entre MXRA5, LYZ, PLAUI, TIMP1, EFEMP1, ASPN, PAPLN y CHSY1 o un activador de al menos un gen seleccionado entre CTSL2, ECM1, HS3ST6 y FLRT2. Preferentemente, 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 de dicho gen, sin anular completamente la expresión o actividad de este gen. Según la invención, el modulador es un inhibidor
65 de al menos un gen seleccionado entre MXRA5, LYZ, PLAUI y TIMP1.

En el ejemplo 3 de la parte experimental se divulgan ejemplos de inhibidores o activadores ya conocidos y caracterizados. Dicho modulador puede ser especialmente un extracto vegetal de *Lupinus albus* LU10 para su uso en el tratamiento cosmético de manchas hiperpigmentarias.

5 Son moduladores bien conocidos también las moléculas antisentido, los ARNip y los microARN. Los moduladores contemplados son especialmente moléculas antisentido, microARN y ARNip dirigidos contra al menos uno de los genes de la invención y que inhiben su expresión.

10 Los moduladores preferidos incluyen un extracto vegetal de *Lupinus albus* LU10, el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria, valsartán, polvo de hueso desmineralizado o "DBP, *demineralized bone powder*", fenilacetato de sodio (NaPA), P-aminobenzamida, benzo[b]tiofeno-2-carboxamida B428 sustituida en 4, tienopiridina SR 25989 y notoginsenosida R1, letrozol y anastrozol. También puede contemplarse utilizar una combinación de al menos dos de estos moduladores.

15 Las cantidades eficaces de los moduladores deben adaptarse según el resultado deseado y el tipo y número de moduladores utilizados; pudiendo comprender el 0,001 % y el 30 % en peso. Para el anastrozol, la concentración se limita preferentemente al 1 %.

20 Los moduladores descritos pueden utilizarse en los métodos cosméticos en combinación con los moduladores de los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 y SOSTDC1 o bien los moduladores de los genes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1.

25 Ya se han descrito combinaciones preferidas de genes.

Los moduladores se pueden utilizar en combinación con otros productos, compuestos activos o excipientes. Preferentemente, se envasan en una forma adecuada para la aplicación tópica, por ejemplo, en forma de pomada, crema o ungüento, o en cualquier otra forma adaptada al cuidado, tal como una loción, suero, jabón, etc.

30 Las diversas realizaciones detalladas en la sección relativa a los métodos cosméticos, son aplicables a los usos para aplicaciones cosméticas descritas anteriormente.

Los moduladores descritos anteriormente pueden utilizarse especialmente en aplicaciones cosméticas para igualar el tono, homogeneizar el color de la piel o combatir las discromías.

35 Además, la presente descripción divulga moduladores del nivel de expresión o de la actividad del producto de expresión de al menos un gen dérmico seleccionado entre los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI, TIMP1, EFEMP1, ECM1 y ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 y FLRT2, para una aplicación en el tratamiento de manchas pigmentarias cutáneas, por ejemplo, en el contexto de tratamientos terapéuticos. Según la invención, dichas manchas son manchas hiperpigmentarias, más específicamente léntigos actínicos, seniles o solares. Según la invención, el gen se selecciona entre la lista de genes dérmicos relacionados con la remodelación de la matriz constituida por MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI y TIMP1.

45 Anteriormente ya se han descrito los moduladores preferidos.

Pueden estar asociados con otros productos, compuestos activos o excipientes. Preferentemente, se envasan en una forma adecuada para la aplicación tópica, por ejemplo, en forma de pomada, crema o ungüento, o en cualquier otra forma adaptada al cuidado, tal como una loción, suero, jabón, etc...

50 En los diversos métodos y aplicaciones descritos anteriormente, las manchas pigmentarias en cuestión son preferentemente manchas hiperpigmentarias y lo más preferentemente léntigos actínicos, solares o seniles. Los métodos y aplicaciones descritos se basan en la identificación por parte de los inventores de una firma de dichas manchas pigmentarias.

55 Esta firma se caracteriza porque puede estar constituida por el conjunto de la lista de genes mencionados o por una parte de los mismos.

60 La presente descripción también divulga el uso de esta firma como un nuevo procedimiento de selección y predicción del lentigo actínico a través de las deficiencias de sus funciones biológicas. Este nuevo método se basa en estudiar el nivel de expresión de todos los genes, o de parte de los genes descritos en la presente invención, en una lesión hiperpigmentada frente a una piel adyacente intacta.

65 Esta divulgación también se inscribe en el contexto del tratamiento del lentigo actínico, utilizando estos genes como una firma molecular de las diferencias de expresión génica existentes entre una lesión y la piel sana adyacente. Esta firma también constituye una ventaja obvia para determinar la elección del tratamiento apropiado y para medir el efecto de un producto (compuesto activo, molécula, extracto natural), aunque también de un procedimiento (luz, inyección,

vía oral) que sea beneficioso en la piel. De hecho, la presente invención permite evaluar la eficacia de un producto o procedimiento para tratar el lentigo actínico modulando, a nivel de la lesión, la expresión de todos los genes o de parte de los genes descritos, de manera que su perfil de expresión se aproxime al de la piel sana.

5 La descripción también divulga un método para seleccionar factores de inhibición o de prevención de léntigos actínicos. Consiste en evaluar los compuestos sobre su poder de inhibición o aumento de la expresión de los genes mencionados y/o de la expresión o la actividad de los productos proteicos de dichos genes y seleccionarlos como factores que permitan prevenir o tratar el lentigo actínico. La verificación de la eficacia de los compuestos puede realizarse en modelos de células mono o co-cultivadas, o en modelos tridimensionales de piel reconstruida, o en piel ex vivo o *in vivo*.

15 La descripción también tiene por objeto el uso de compuestos que modulan la expresión de los genes identificados entre los biomarcadores de lentigo actínico, para prevenir o corregir la lesión para recuperar un estado normal de la piel, es decir, para recuperar una expresión que se aproxime a la expresión de piel sana intacta. En particular, nunca se han propuesto compuestos que actúan sobre las proteínas identificadas para prevenir o tratar las discromías pigmentarias (hiperpigmentación o hipopigmentación). Dichos compuestos existen y se indican en la tabla 3 del ejemplo 3.

20 Los agentes seleccionados son especialmente moduladores negativos de las proteínas sobreexpresadas relacionadas con el proceso de remodelación de la matriz o con sus componentes proteoglucanos y glucoproteínas extracelulares; o moduladores positivos de las proteínas subexpresadas.

25 Entre los moduladores negativos de las proteínas relacionadas con la remodelación de la matriz o sus componentes proteoglucanos y glucoproteínas extracelulares, pueden mencionarse especialmente inhibidores de la síntesis y/o de la secreción y/o activadores de la degradación de las proteínas que se descubrió que se sobreexpresaban en el léntigo.

A la inversa, entre los moduladores positivos, pueden mencionarse estimuladores de la síntesis, inductores de la secreción o inhibidores de la degradación de las proteínas subexpresadas en el léntigo.

30 Parte experimental:

Ejemplo 1: Estudio Transcripcional

35 Se realizó un estudio comparativo del perfil de expresión génica de la piel resultante de una lesión de lentigo actínico (PL) y piel adyacente intacta (PN).

40 El objetivo de este estudio es identificar marcadores relevantes, reproducibles y significativos que reflejen las alteraciones asociadas a la formación de léntigo actínico, para utilizarlos como dianas para tratamientos eficaces o como biomarcadores para analizar la eficacia de un tratamiento dado.

En resumen, se inscribieron 15 voluntarias sanas para participar en un estudio "hologenómico" de transcriptómica (microplacas Affymetrix). A cada voluntaria se la diagnosticó una lesión de tipo léntigo actínico en el dorso de la mano y dicho diagnóstico se verificó mediante epiluminiscencia. Este examen permite

45 1) verificar el diagnóstico clínico de la lesión (léntigo actínico exclusivamente) según los criterios del patrón de la unión dermoepidérmica (estructura pigmentada en red, "estructura similar a huellas dactilares") para diferenciar efélides (sin estructura pigmentada en red, pigmentación homogénea y zonas "de bordes apolillados") y queratosis seborreicas planas (múltiples quistes o pseudoquistes de tipo miliar, zonas de "bordes apolillados", aberturas seudofoliculares y patrón similar a huellas dactilares) [Menzies *et al*; Stolz *et al*; Carli *et al*].

50 2) delimitar zonas homogéneas en cuanto a estructura/patrón dentro de estas lesiones donde se realizarán biopsias cutáneas,

3) establecer una puntuación fenotípica basada en un análisis de imagen cuantitativo con el programa informático específico que se desarrolló en Matlab® (programa informático SQA, CMLA, ENS Cachan, UMR CNRS 8536).

55 Se realizó una biopsia de 3 mm centrada en la lesión, así como una biopsia del mismo tamaño en una zona de piel adyacente intacta. Los ARN totales de estas muestras se extrajeron y amplificaron. Se generaron sondas para la hibridación en microplacas Affymetrix. Se generaron perfiles de expresión génica en cada una de las 30 biopsias (2 biopsias por voluntaria), y se realizó un análisis comparativo entre la PN y la PL por voluntaria y en todas las voluntarias. Los genes estadísticamente expresados de manera diferencial (media geométrica de los pacientes) se recopilaron en listas y se reagruparon por familias funcionales.

60 De manera sorprendente e inesperada, los inventores encontraron una expresión diferencial para varios cientos de genes entre la PN y la PL. Se constituyó una lista de 437 genes que representaba una gran firma molecular de la lesión de léntigo actínico. Entre los 437 genes identificados, se encontró que 169 genes se regulaban de manera positiva ("upregulés") en la lesión de 'léntigo actínico' en comparación con la piel sana, mientras que 269 genes se regulaban de manera negativa ("down régulés").

Todos estos genes se subdividieron en varias familias funcionales.

5 Entre las familias funcionales o los procesos biológicos identificados, los inventores encontraron de manera sorprendente una familia de genes que reflejaba a nivel molecular una disfunción de la matriz extracelular y de la unión dermoepidérmica en el léntigo actínico. Estos genes, reagrupados en esta familia funcional denominada "Matriz Extracelular" nunca se habían descrito anteriormente como asociados al léntigo actínico y se enumeran a continuación y en las tablas 1 y 2:

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

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

20 Estos genes codifican componentes de la dermis o de proteínas implicadas en la síntesis de componentes de la matriz extracelular, relacionados con la renovación o remodelación de esta matriz de tejido conjuntivo, así como genes que codifican proteínas de la matriz asociadas a la unión dermoepidérmica y la zona de la membrana basal. Esta familia también contiene genes relacionados con la vía del TGFbeta, implicada en la síntesis de componentes de la matriz extracelular. Los genes de esta familia se sobreexpresan mayoritariamente en el léntigo actínico. Esta familia de genes es completamente original en un trastorno pigmentario y alude a un papel preponderante del estroma en el léntigo actínico.

25 Tabla 1: lista de genes de la familia "matriz extracelular" que se descubrió que se sobreexpresaban en el léntigo actínico

Subfamilia Vía/función	Denominación	Número de registro	Nombre completo	Índice de modulación
TGFb/SMAD	THBS2	NM_003247	trombospondina 2	3,41
	TGFBI	NM_000358	factor de crecimiento transformante beta inducido, 68 kDa	2,22
	BMP2	NM_001200	proteína morfogenética ósea 2	2,03
	SMAD3	NM_005902	miembro 3 de la familia SMAD	1,76
	TGFBR3	NM_003243	receptor III del factor de crecimiento transformante beta	1,68
	TGFBR2	D50683 NM_001024847 NM_003242	receptor II del factor de crecimiento transformante beta (70/80 kDa)	1,61
	SEMA5A	NM_003966	Dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (semaforina) (semaforina 5A, semaforina F)	1,56
	SMAD7	NM_005904	miembro 7 de la familia SMAD	1,52
Colágenos	LEPREL1	NM_018192	de tipo leprecan 1	2,64
	COL6A3	NM_004369	colágeno, de tipo VI, alfa 3	1,90
	CRTAP	NM_006371	proteína asociada a cartílago (LEPREL3)	1,60
lamininas	LAMC1	NM_002293	laminina, gamma 1 (antiguamente LAMB2)	1,96
	LAMB3	L25541 NM_000228 NM_001017402 NM_001127641	laminina, beta 3	1,94
	LAMA3	NM_000227	laminina, alfa 3	1,64
Integrinas	ITGA2	NM_002203	integrina, alfa 2 (CD49B, subunidad alfa 2 del receptor de VLA-2)	1,62
Integrinas	ITGAV	NM_001145000 NM_001144999 NM_002210	integrina, alfa V (receptor de vitronectina,)	1,62
	ITGB1	NM_133376	integrina, beta 1	1,55
Remodelación de la matriz	MXRA5	NM_015419	proteína de tipo 5 asociada a la remodelación de la matriz	2,40

(continuación)

Subfamilia Vía/función	Denominación	Número de registro	Nombre completo	Índice de modulación
	LYZ	NM_000239	lisozima (amiloidosis renal)	2,33
	TIMP1	NM_003254	Inhibidor de metalopeptidasa 1 TIMP	2,26
	PLAU	NM_002658	activador de plasminógeno, urocinasa	1,81
Proteoglucanos y glucoproteína extracelular	EFEMP1	NM_001039348 NM_001039349 NM_004105	proteína 1 de la matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF (FIBULINA 3)	3,86
	ASPN	NM_017680	Asporina	2,77
	PAPLN	NM_173462	papilina, glucoproteína sulfatada similar a proteoglucono	2,51
	CHSY1	NM_014918	carbohidrato (condroitina) sintasa 1	1,50
Membrana basal	FRAS1	NM_025074	Síndrome de Fraser 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 genes de la familia "matriz extracelular" que se descubrió que se subexpresaban en el léntigo actínico

Subfamilia Vía/función	Denominación	Número de registro	Nombre completo	Índice de modulación
Proteoglucanos	HS3ST6	NM_ 001009606	sulfato de heparán (glucosamina) 3-O- sulfotransferasa 6	0,44
Colágenos	PLOD2	NM_000935 NM_182943	procolágeno-lisina-2-oxoglutarato 5- dioxigenasa 2	0,45
Proteoglucanos	FLRT2	NM_013231	proteína 2 transmembrana de fibronectina rica en leucina	0,47
Remodelación de la matriz	CTSL2	NM_001333	cathepsina L2 (<i>peptidasa de degradación de la MEC</i>)	0,54
Proteoglucanos	ECM1	U65932 NM_ 004425 NM_ 022664	proteína 1 de la matriz extracelular	0,54
TGFb/SMAD	SOSTDC1	NM_015464	esclerostina que contiene el dominio 1 (ectodin, <i>antagonista de BMP</i>)	0,62

5 Ejemplo 2: materiales y métodos

Se seleccionó a 15 mujeres voluntarias, fototipos II a IV, de 50 a 70 años.

10 Se escogieron léntigos actínicos del dorso de la mano, de un tamaño mínimo de 3 mm que se caracterizaron por epiluminiscencia. En el ejemplo 1 se presentan las diferentes ventajas de la caracterización por epiluminiscencia.

15 Se realizan dos biopsias de 3 mm de diámetro en una de las manos de cada paciente. En cada voluntaria, una de las biopsias corresponde a la lesión de léntigo actínico (PL) y la otra a una zona adyacente de piel intacta (PN) (también verificada con epiluminiscencia).

20 Después de extraerlas, las biopsias de 3 mm se colocaron en ARN later (referencia de Qiagen 76106) de 16 a 24 horas a 4 °C. Al día siguiente, las muestras se llevaron a -20 °C hasta las etapas de homogeneización y extracción. Al descongelarse, las muestras se cortaron con un escalpelo para facilitar la homogeneización, antes de transferirlas al tampón de lisis.

La homogeneización se realizó con un recipiente (Fisher Labosi ref A6391000) con pistones de polipropileno sin ARNasa (Fisher Labosi ref A1419753) permitiendo la homogeneización directa en tubos Eppendorf de 1,5 ml.

25 El ARN se extrajo con los micro kits RNeasy (Qiagen ref: 74004) siguiendo las instrucciones del proveedor. La cuantificación de los RNA se realizó mediante una dosificación de ribogreen (Molecular Probes ref R11490). La calidad se validó con un bioanalizador Agilent 2100 que proporciona la relación de las intensidades de los ARN ribosómicos

28S con respecto a 18S, así como un Número de Integridad de ARN (RIN, del inglés *RNA Integrity Number*) que tiene en cuenta la degradación de los ARN. Un ARN de buena calidad tiene una relación $>1,5$ y un RIN > 7 .

5 Para obtener los ADNc correspondientes se realizó una reacción de transcriptasa inversa (RT, del inglés *reverse transcriptase*). A partir de 50 ng de ARN, se sintetizaron dos sondas por muestra con una etapa de amplificación. Los ADNc se marcaron con fluorocromos y se hibridaron en microplacas de ADN de Affymérix® para revelar el nivel de expresión de todos los genes del genoma humano. (Las microplacas biológicas de ADN de tipo Affymérix U133A 2.0 contienen 54.000 sondas, y también permiten estudiar la expresión de 47.000 transcripciones, incluyendo 38.500 genes caracterizados). El paquete de micromatrices de Affymérix (Mas 5.0) permite obtener para cada transcripción, una señal de detección. Después de revelar las hibridaciones específicas y el procesamiento de datos sin procesar (extracción, resta del ruido de fondo, normalización), se comparó la expresión de los genes entre la piel sana y la piel intacta. Por cada muestra se hibridaron 2 microplacas Affymérix HG_U133 Plus 2.

15 La calidad de la hibridación se efectuó mediante el método de AffyPLM (Bolstad y col., 2005) y mediante el método de ACP (análisis de componentes principales).

Las pacientes no se quedan para un análisis adicional si las 2 microplacas Affymérix tienen una calidad de hibridación correcta. Para el presente estudio, se pudieron analizar 13 de las 15 pacientes iniciales.

20 La realización de un perfil transcriptómico de la piel sana y de la piel correspondiente al léntigo actínico permitió generar listas de genes expresados diferencialmente en las dos situaciones, e identificar biomarcadores de léntigo actínico. Las listas se generaron como una relación de expresión entre PL (piel lesionada) frente a PN (piel normal). Se conserva la relación que representa la media geométrica de las 13 pacientes.

25 Etapas de generación de listas de genes expresados diferencialmente entre piel lesionada y piel sana:

- Filtro de identificadores de Affymérix (conjuntos de sondas, *ProbeSets*): solo se conservan los conjuntos de sondas que están presentes en las dos copias de al menos una biopsia. Después de este filtro se conservan 23.968 conjuntos de sondas.
- 30 - Supresión del efecto de la paciente: Para suprimir el efecto de la paciente, observado en los resultados de los análisis diferenciales, la expresión de cada conjunto de sondas se dividió entre la media geométrica de 4 valores de conjuntos de sondas correspondientes a las 4 microplacas.
- Análisis diferencial: se generó reagrupando las listas obtenidas mediante 2 métodos, el análisis de cNMF (del inglés *consensus Non Negative Matrix Factorisation*, Factorización no negativa de matrices consenso (Lee y Seung (1999), Brunet y col. (2004), Fogel y col. (2007), Fogel y col. (2008)), que identificó 2.638 conjuntos de sondas (1.521 inducidas y 1.117 reprimidas) y el método de PLS (regresión parcial de mínimos cuadrados) que identificó 610 conjuntos de sondas moduladas. La unión de las 2 listas permitió obtener una lista de 3.248 conjuntos de sondas.
- 35 - Filtro de modulación: para los genes inducidos, selección de conjuntos de sondas que tienen una media geométrica de corrección de 13 veces (FC, folds corrigés) ≥ 1.5 : lista de 562 conjuntos de sondas inducidas. Para los genes reprimidos, selección de conjuntos de sondas que tienen una media geométrica de corrección de 13 veces FC $\leq 0,67$: lista de 807 conjuntos de sondas reprimidas. En total: $562 + 807 = 1.369$ conjuntos de sondas moduladas, es decir, 1.007 conjuntos de sondas después de la eliminación de duplicados (1.002 estrategia con cNMF + 5 estrategia con PLS)
- 40 - Filtro en las 13 pacientes: visualización de las modulaciones de los 1.007 conjuntos de sondas en forma de histogramas y selección de los conjuntos de sondas moduladas en el mismo sentido en las 13 pacientes. Lista final de 132 conjuntos de sondas que diferencian las biopsias con lesiones de las biopsias intactas y que se modulan en el mismo sentido en las 13 pacientes del estudio.
- 45 - Análisis de la lista de 1.007 conjuntos de sondas
 - 50 ○ Filtrar sobre el valor de P ($\leq 0,00001$)
Para conservar solo los genes más discriminantes, a la lista de 1.002 conjuntos de sondas se la aplicó un filtro sobre el valor de P, $P \leq 0,00001$. Después de este nuevo filtro, 827 conjuntos de sondas a los que se añaden los 5 conjuntos de sondas obtenidos de la estrategia de PLS \Rightarrow lista de 832 conjuntos de sondas

55 Después de buscar anotaciones, eliminar genes no anotados y eliminar duplicados, se estableció una lista de 437 genes expresados diferencialmente entre PL y PN. En la LA, se sobreexpresaron 169 genes y se subexpresaron 269.

60 Con la ayuda de herramientas, Gene ontology, PubMed, Scopus, se buscaron las funciones de los genes y dichos genes se clasificaron por familias funcionales.

Ejemplo 3: Moduladores:

65 Existen compuestos que se sabe que modulan, en el sentido deseado, las proteínas desreguladas en el léntigo. Para la familia de genes/proteínas de la matriz extracelular, pueden mencionarse:

- fibratos, tal como, por ejemplo, el fenofibrato, que disminuye la expresión de SMAD3,
- alcaloides, tal como la oximetrina, que disminuye la expresión de SMAD3, o polifenoles, tal como, por ejemplo, el ácido salvianólico B, que disminuye la expresión de SMAD3 y de TGFBR2,
- extractos naturales, especialmente hierbas medicinales tal como el Wen-pi-tang-hab-wu-ling-san, que disminuye la expresión de SMAD3,
- compuestos de la familia de los imidazoles, que son antagonistas de TGF-βR1, tal como el SB-431542, que disminuye la expresión de SMAD3,
- algunos miARN, especialmente los miR183 y miR29b que disminuyen la expresión de ITGB1,
- inhibidores del activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPA), como la p-aminobenzamidina o la benzo[b]tiofeno-2-carboxamodina B428 sustituida en 4, que disminuye la actividad de PLAU,
- compuestos de la familia de los fenilacetatos, como NaPA, que disminuye la expresión de PLAU,
- compuestos de la familia química de las tiazolidinodionas, tal como, por ejemplo, la pioglitazona, que disminuye la expresión de BMP2 y de COL6A3,
- compuestos de la familia química de los tiazoles, tal como, por ejemplo, GW-0742, que disminuye la expresión de BMP2,
- compuestos de la familia de los tetrazoles, tal como valsartan, que disminuye la expresión de TIMP1.

Con respecto a la proteína enzimática PLOD2 de la familia extracelular subexpresada en el léntigo, podrán emplearse los siguientes compuestos para restablecer su índice:

- compuestos de la familia de las quinazolininas como vandetanib (ZD64745 5) que aumentan la expresión de PLOD2.

También pueden emplearse otros tipos de moduladores para permitir corregir la expresión/cantidad o actividad de las proteínas desreguladas. Pueden mencionarse:

- ácidos nucleicos (preferentemente ARN antisentido o ARNi), anticuerpos neutralizantes,
- medios eléctricos, luminosos, mecánicos o térmicos. Como ejemplo, para aumentar la cantidad o la actividad de PLOD2 podrá utilizarse ultrasonido pulsado de baja intensidad (LIPUS, del inglés *low intensity pulsed ultrasound*).

A la inversa, en el caso de manchas hipopigmentarias, los moduladores preferidos serán los que aumenten el índice de expresión o de actividad de las proteínas resultantes de los genes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, EFEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, MXRA5, LYZ, PLAU, TIMP1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 y ACTN1, y los que disminuyen el índice de expresión o de actividad de las proteínas resultantes de los genes SOSTDC1, ECM1, HS3ST6, FLRT2, CTSL2 y PLOD2.

En la tabla 3 también se detallan ejemplos de dichos moduladores.

Bibliografía:

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

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

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

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

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

Montagna W, Hu F, Carlisle K. "A reinvestigation of solar lentigines". Arch Dermatol. Octubre de 1980; 116(10): 1151-4. Stolz W, Braun-Falco O, Bilek P, Landthaler M, Burgdorf WHC, Cagnetta AB. "Differential diagnosis of pigmented skin lesions" En Color atlas of dermatology. Eds Stolz W, Braun-Falco O, Bilek P, Landthaler M, Burgdorf WHC, Cagnetta AB. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Germany. 2002: págs. 41-66.

Tabla 3. LISTA DE MODULADORES DE GENES IMPLICADOS EN EL LÉNTIGO ACTÍNICO

Subfamilia/función	Nombre	Modulador de gen/proteína	Sentido de la modulación
TGFB/SMAD	TGFBI, factor β de crecimiento transformante inducido, 68 kDa	Polvo de hueso desmineralizado (DBP, <i>demineralized bone powder</i>)	Aumenta la expresión

(continuación)

Subfamilia/función	Nombre	Modulador de gen/proteína	Sentido de la modulación
TGFB/SMAD	BMP2, proteína morfogénica ósea 2	Pioglitazona	Disminuye la expresión
		GW0742	Disminuye la expresión
		Flavonoide de Cristata L	aumenta la expresión
TGFB/SMAD	SMAD3, miembro 3 de la familia SMAD	Fenofibrato	Disminuye la expresión
		Oximatrina	
		Ácido salviánico B (Sal B), componente de Danshen (una hierba tradicional china utilizada para las enfermedades renales crónicas), antioxidante y protección celular.	Disminuye la fosforilación
		SB-431542 (un inhibidor específico de cinasa T β R-I)	
TGFB/SMAD	TGFR2, receptor II del factor de crecimiento transformante β (70/80 kDa)	Extracto de Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san (WHW)	Disminuye la expresión
		Ácido salviánico B (SA-B)	
TGFB/SMAD	SMAD7, miembro 7 de la familia SMAD	Oximatrina	Aumenta la expresión
		3-desoxiglucosona (precursor del producto final de la glicación avanzada)	
		Tetrandrina	
		N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina (Ac-SDKP)	
Colágeno	COL6A3, colágeno, tipo VI, alfa 3	Pioglitazona	Disminuye la expresión
Integrina	ITGB1, integrina, beta	miR-183, miR-29b	Disminuye la expresión
Remodelación de la matriz	LYZ, lisozima (amiloidosis renal)	Polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) PACAP38	Aumenta la expresión
Remodelación de la matriz	TIMP1, inhibidor 1 de metalopeptidasa	Valsartán, (bloqueador de receptores de angiotensina II, ARB, del inglés <i>angiotensin receptor blocker</i> , de tipo 1), Extracto vegetal de <i>Lupinus albus</i> LU 10	Disminuye la expresión
		Polvo de hueso desmineralizado (DBP, <i>demineralized bone powder</i>)	Aumenta la expresión.
Remodelación de la matriz	PLAU, activador de plasminógeno, urocinasa	Fenilacetato de sodio (NaPA)	Disminuye la expresión
		P-aminobenzamida (inhibidor del activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPA)): las benzo[b]tiofeno-2-carboxamidas sustituidas en 4, B428, B392 (inhibidor del activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPA))	Disminuye la actividad
		Tienopiridina SR 25989 (inhibidor de la angiogénesis), derivado esterificado de ticlopidina, notoginsenosida R1 (de PANAX notoginseng)	Aumenta la expresión
Proteoglicano asimilado	ASPN, Asporina	letrozol anastrozol	Aumenta la expresión
Membrana basal	MATN2, matrilina 2	vitamina k2 menaquinona	Aumenta la expresión
Colágeno	PLOD2, procolágeno-lisina-2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2	beta-aminopropionitrilo (bAPN)	Disminuye la expresión
		ultrasonido pulsado de baja intensidad (LIPUS, del inglés <i>low intensity pulsed ultrasound</i>)	Aumenta la expresión /actividad
		Vandetanib (ZD6474 5)	
Remodelación de la matriz	CTSL2, catepsina L2	Derivados de fenilalanina	Disminuye la actividad

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de caracterización de una mancha pigmentaria cutánea aparente o sospechosa en un ser humano, que comprende comparar los niveles de expresión, en muestras de piel resultante de dicha mancha y de piel adyacente intacta, dentro de las células de la dermis, de al menos un gen dérmico implicado en la organización de la matriz extracelular, seleccionado entre la lista constituida por los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU y TIMP1, en el que dicha mancha pigmentaria cutánea es un léntigo actínico, senil o solar.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, que comprende comparar los niveles de expresión de al menos dos genes distintos, preferentemente de al menos tres genes distintos seleccionados entre dicha lista.
- 15 3. El método según la reivindicación 1, en el que dicha mancha se confirma como léntigo actínico, senil o solar, cuando el nivel de expresión es
- superior en la muestra de piel resultante de la mancha con respecto al nivel en la muestra de piel adyacente intacta, si el gen se selecciona entre MXRA5, LYZ, PLAU y TIMP1, e
 - inferior en la muestra de piel resultante de la mancha con respecto al nivel en la muestra de piel adyacente intacta, si el gen es CTSL2.
- 20 4. Método de evaluación *in vitro* de la eficacia de un tratamiento de manchas pigmentarias cutáneas, que comprende comparar, antes y después del tratamiento, los niveles de expresión dentro de las células de la dermis en una muestra de piel resultante de dicha mancha, de al menos un gen dérmico implicado en la organización de la matriz extracelular, seleccionado entre la lista constituida por los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU y TIMP1,
- 25 en el que dichas manchas pigmentarias cutáneas son un léntigo actínico, senil o solar.
- 30 5. El método según la reivindicación 4, en el que dicho tratamiento se considera eficaz para el tratamiento del léntigo actínico, senil o solar, 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 MXRA5, LYZ, PLAU y TIMP1, y
 - superior después del tratamiento con respecto al nivel de expresión antes del tratamiento, si el gen es CTSL2.
- 35 6. Método de evaluación *in vitro* de la eficacia de un tratamiento de manchas pigmentarias cutáneas, que comprende comparar, antes y después del tratamiento, el nivel de expresión dentro de las células de la dermis en un modelo celular representativo de la piel, de al menos un gen dérmico implicado en la organización de la matriz extracelular seleccionado entre la lista constituida por los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU y TIMP1, o bien el nivel de expresión o de actividad del producto de expresión de dicho gen seleccionado,
- 40 en el que dichas manchas pigmentarias cutáneas son un léntigo actínico, senil o solar.
- 45 7. Un método cosmético de tratamiento o de prevención de una mancha pigmentaria cutánea no patológica de la piel humana, que comprende modular el nivel de expresión o de actividad de un gen dérmico implicado en la organización de la matriz extracelular, en el que el gen se selecciona entre la lista constituida por los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU y TIMP1,
- 50 en el que dicha mancha pigmentaria cutánea es un léntigo actínico, senil o solar, y en el que dicha modulación es una inhibición si el gen se selecciona entre MXRA5, LYZ, PLAU y TIMP1, y un aumento del nivel de expresión o de la actividad si el gen es CTSL2, y en el que dicha modulación se obtiene utilizando una molécula antisentido, un microARN o un ARNip, dirigido contra el gen dérmico seleccionado e inhibiendo la expresión de dicho gen.
- 55 8. El método según la reivindicación 7, en el que dicho método comprende la modulación de al menos dos genes, preferentemente de al menos cuatro genes distintos, seleccionados entre la lista constituida por los genes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU y TIMP1.
- 60 9. Uso 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 MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU y TIMP1 para una aplicación cosmética en el tratamiento de manchas pigmentarias cutáneas no patológicas, modificando dicho modulador el nivel de expresión o la actividad del producto de expresión del gen o genes seleccionados, en el que dichas manchas pigmentarias cutáneas son un léntigo actínico, senil o solar, en el que dicha modificación del nivel de expresión o de la actividad del producto de expresión, es una inhibición si el gen se selecciona entre MXRA5, LYZ, PLAU y TIMP1, y un aumento del nivel de expresión o de la actividad si el gen es CTSL2, y en el que dicho modulador es una molécula antisentido, un microARN o un ARNip, dirigido contra el gen dérmico seleccionado y que inhibe la expresión de dicho gen.