

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 838 548**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6888 (2008.01)

C12Q 1/6876 (2008.01)

G01N 33/92 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2013 PCT/EP2013/064926**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009566**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2013 E 13736921 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2020 EP 2872647**

54 Título: **Procedimiento de identificación de marcadores moleculares de la piel de niño**

30 Prioridad:

13.07.2012 FR 1256766

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

02.07.2021

73 Titular/es:

LABORATOIRES EXPANSCIENCE (100.0%)

1, Place des Saisons

92048 Paris La Défense Cedex, FR

72 Inventor/es:

MSIKA, PHILIPPE y

BAUDOUIN, CAROLINE

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 838 548 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

Procedimiento de identificación de marcadores moleculares de la piel de niño

5 **Introducción**

La piel es un conjunto de células y de macromoléculas agrupadas en forma de un tejido resistente y flexible, que recubre la totalidad del cuerpo. La piel tiene como función principal establecer una barrera de protección contra los ataques del entorno permitiendo al mismo tiempo algunos intercambios entre el medio interior y el medio exterior. Es el centro de numerosos procesos metabólicos que se modulan por las condiciones fisiológicas del organismo y las condiciones del entorno. La piel está formada por dos capas juntas: la epidermis y la dermis, a las que se pueden asociar los tejidos subcutáneos.

La epidermis, cuyo papel principal es la protección del cuerpo, constituye la capa más superficial de la piel y asegura la impermeabilidad de la piel y su resistencia. Se pueden identificar en ella 4 capas celulares distintas, una capa basal (*stratum basalis*), una capa espinosa (*stratum spinosum*), una capa granulosa (*stratum granulosum*) y una capa córnea (*stratum corneum*). Aunque coexisten en la epidermis diferentes tipos celulares, los queratinocitos son ampliamente mayoritarios (90%). Su actividad característica es la síntesis de las queratinas, que representan el 95% de las proteínas totales de la epidermis. Las queratinas, proteínas fibrosas e insolubles en agua, entran en la constitución de la capa córnea de la epidermis que protege la piel contra las agresiones externas (calor, frío, deshidratación).

La epidermis está unida a la dermis por una zona denominada unión dermoepidérmica o membrana basal epidérmica. Esta estructura asegura la adherencia de la dermis a la epidermis y tiene el papel de soporte mecánico responsable, en parte, de la tonicidad de la piel. Está elaborada al mismo tiempo por los queratinocitos basales y por los fibroblastos dérmicos, y contiene un porcentaje importante de colágeno de tipo IV que forma parte de unas placas de anclaje que unen la membrana basal a unas placas de anclaje presentes en la dermis papilar.

La dermis, la capa interna de la piel, es un tejido conjuntivo fibroelástico compuesto por células (los fibroblastos) dispersadas en un medio complejo denominado matriz extracelular. Esta matriz está constituida por fibras de colágeno y de elastina, por glicoproteínas (fibronectina y laminina) y por proteoglicanos (proteína central + glicosaminoglicanos o GAG). La naturaleza y la cantidad de estos componentes rigen las propiedades mecánicas de la piel y son el origen de las modificaciones fisiopatológicas más visibles del relieve cutáneo observadas durante el envejecimiento.

La hipodermis es el compartimento más profundo y más grueso de la piel. Se invagina en la dermis y está unida a la dermis subyacente por fibras de colágeno y de elastina. Está constituida esencialmente por un tipo de células especializadas en la acumulación y almacenamiento de las grasas, los adipocitos. Los adipocitos que constituyen la hipodermis son unas células agrupadas en lóbulos separados por un tejido conjuntivo. Sirve como reserva energética, pero también como protección térmica y mecánica.

La adaptación a la vida extrauterina es un proceso que empieza en el nacimiento y continúa a lo largo de todo el primer año de vida. Los primeros meses de vida postnatal constituyen un periodo de reorganización funcional de la piel que permite una adaptación fisiológica al entorno extrauterino.

Por ejemplo, la acidificación de la piel aumenta después del nacimiento para alcanzar, en aproximadamente un mes, unos valores similares a los observados en los adultos. Por otro lado, la secreción de sebo es importante en el nacimiento y disminuye desde el final de la primera semana para permanecer a un nivel inferior al medido en el adulto, hasta la pubertad (Fluhr *et al.*, *Exp Dermatol.*, 19(6): 483-492, 2010).

Un estudio clínico reciente que asocia unas mediciones biometrológicas clásicas con la técnica de espectrometría Raman (Fluhr *et al.*, *Br J Dermatol*, 166(3): 483-90, 2012) ha mostrado que el grado de hidratación y el contenido de agua de la capa córnea son más bajos en el nacimiento (recién nacidos de 1 a 15 días), mientras que el nivel de factor hidratante NMF (Natural Moisturing Factor) es máximo. Este nivel disminuye después mientras que la hidratación se estabiliza. Los autores tienen la hipótesis de que la baja acidificación y la hidratación más baja de la piel podrían activar unos mecanismos reguladores de compensación (en particular con una producción significativa de NMF), que permiten la adaptación del recién nacido a su nuevo entorno. En el mismo estudio, se ha mostrado que el grado de NMF en el lactante de 6 meses se encuentra inferior al observado en el grupo de adultos. Este menor grado de NMF, demostrado por otro grupo (Nikolovski *et al.*, *J Invest Dermatol*, 128: 1728-36, 2008) sugiere que la piel de los lactantes presenta una cierta inmadurez sobre su capacidad para captar agua y regular los mecanismos que están relacionados con ella, lo cual tendría un impacto sobre la calidad y la competencia de la función de barrera.

Una maduración incompleta de la piel puede tener unas consecuencias clínicas importantes. Se sabe, por ejemplo, que el desarrollo de patologías microbianas se ve favorecido por unos valores de pH elevados (Korting *et al.*, *Acta Derm Venereol.*, 70(5): 429-431, 1990). Por lo tanto, es importante no utilizar detergentes que disminuirían aún

más la acidificación de la piel en los primeros meses de vida.

La comprensión de los procesos complejos realizados durante las primeras etapas de la vida postnatal permitiría, por lo tanto, poder identificar unos agentes activos o unas combinaciones de agentes activos que tienen una tolerancia y una eficacia particularmente adaptada para cada grupo de edad. Sin embargo, no se dispone de marcadores biológicos y moleculares de la evolución de la piel en los primeros meses, incluso los primeros años de la vida postnatal.

Existe por lo tanto una necesidad en este campo para la identificación de marcadores que sean específicos de la evolución de la piel, desde el nacimiento hasta la edad adulta.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Evolución de la expresión de los genes de la función de barrera CLDN1, IVL, KRT1 en las epidermis reconstruidas (A) y en los queratinocitos (B) en función de la edad. El nivel de expresión a 1 mes se ha fijado arbitrariamente al 100%.

Figura 2: Evolución de la expresión del gen de respuesta al estrés GP3X (A) y del gen de la inmunidad innata DEFB1 (B) en los queratinocitos en función de la edad. El nivel de expresión a 1 mes se ha fijado arbitrariamente al 100%.

Figura 3: Evolución de la expresión del gen de la inflamación MGST1 en los queratinocitos en función de la edad. El nivel de expresión a 1 mes se ha fijado arbitrariamente al 100%.

Figura 4: Evolución de la expresión de los genes de células madre: FN1, NID1, NOTCH1, KRT19, IGFBP1, ITGA6 y ITGB4 en los queratinocitos en función de la edad. El nivel de expresión a 1 mes se ha fijado arbitrariamente al 100%.

Figura 5: Evaluación por análisis histológico de la tolerancia de los productos para bebés a base de persea de aguacates sobre unas epidermis reconstruidas que proceden de donantes de 1 mes de edad. Los tejidos incluidos en parafina han sido coloreados con hematoxilina y eosina.

Descripción de la invención

La invención se describe en las reivindicaciones adjuntas. La presente descripción tiene como objetivo proporcionar unos marcadores biológicos que permitan caracterizar una piel de niño, desde su nacimiento hasta su pubertad.

El procedimiento de la descripción permite así identificar unos marcadores moleculares expresados de manera diferencial en la piel de niño, es decir, unos marcadores cuya expresión sea diferente en la piel de niño y en la piel de adulto.

Dicho procedimiento permite, por lo tanto, caracterizar la piel a nivel molecular desde el nacimiento y seguir su evolución a lo largo del tiempo.

Por "niño" se entiende en la presente memoria un individuo cuya edad es inferior a 16 años. Están comprendidos así en la categoría de niños los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, los lactantes, que tienen entre 1 mes y 2 años, y los niños propiamente dichos, que tienen una edad de por lo menos 2 años. Un "recién nacido", como se entiende en la presente memoria, puede haber nacido tanto a término como ser prematuro.

Para evitar cualquier ambigüedad, el término "niño" utilizado en la presente memoria sin más precisión debe entenderse en su acepción más general, es decir, refiriéndose a una persona menor de 16 años. Un "adulto" es en la presente memoria una persona que no es un niño, dicho de otra manera, una persona de más de 16 años de edad.

Preferentemente, el método se puede utilizar sea cual sea el origen étnico o geográfico de la piel, o incluso el fototipo de la misma. Puede ser así de origen caucásico, africano, asiático, sudamericano, melanesio u otro; puede presentar también un fototipo I, II, III, IV, V o VI, sin que ello afecte a la invención. Ésta tiene, en efecto, por objeto la identificación de marcadores biológicos que caractericen cualquier tipo de piel y depende solo de la edad del donante.

Por otro lado, el experto en la materia se dará cuenta fácilmente de que las enseñanzas de la presente descripción también se pueden aplicar a las mucosas. Estas son delgadas capas de tejido epitelial y de tejido conjuntivo subyacente, que están, al igual que la piel, en la interfaz entre los medios internos y externos. De hecho, algunas de estas mucosas son contiguas con la piel.

Se describe en la presente memoria un procedimiento de identificación de por lo menos un marcador biológico que caracterice la piel de niño menor de 16 años, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- 5 a) obtener una muestra de células cutáneas (A), procediendo dicha muestra de un donante que tiene una edad inferior a 16 años,
- b) medir el nivel de expresión de un marcador biológico candidato en la muestra de la etapa a), y
- 10 c) determinar si el marcador candidato es un marcador biológico que caracteriza una piel de niño menor de 16 años.

La invención se refiere en particular a un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 1.

15 Un "marcador biológico" se define en la presente memoria por lo menos por una diferencia entre el metabolismo de las células de niños menores de 16 años y el metabolismo de las células de adultos. Ventajosamente, el marcador biológico se define por lo menos por una diferencia entre el metabolismo de las células de recién nacido, de lactante y/o de niño de 2 a 16 años de edad, y el metabolismo de las células de adulto.

20 Por "marcador biológico que caracteriza una piel de niño" se entiende en la presente memoria un marcador que se expresa más o menos específicamente en la piel de niño menor de 16 años. Dicho de otra manera, un marcador biológico que caracteriza una piel de niño es un marcador cuya expresión varía con la edad y que se expresa de manera diferente entre la piel de niño y la piel de adulto.

25 Como se ha indicado anteriormente, la piel evoluciona funcional y estructuralmente en el periodo después del nacimiento. En particular, unas variaciones de diferentes parámetros tales como la pérdida de agua transepidérmica (TEWL), la hidratación del estrato córneo o el pH de la superficie de la piel se observan no sólo de manera general entre los 0 y 16 años, sino también de manera más particular dentro de este intervalo de edad. Así, estos parámetros varían entre los recién nacidos, los lactantes y los niños de entre 2 y 16 años de edad (Fluhr *et al.*, *Exp Dermatol.*, 19(6): 483-492, 2010). En particular, se pueden observar unas variaciones específicas de estos parámetros dentro de cada una de estas franjas de edad.

30 La expresión "marcador biológico que caracteriza una piel de niño" tal como se utiliza en la presente memoria abarca por lo tanto también cualquier marcador biológico que se exprese en el recién nacido y/o en el lactante y/o en el niño de entre 2 y 16 años de edad más o menos que en el adulto. Un marcador que caracteriza la piel de niño puede, por lo tanto, expresarse de manera más importante o menos importante que en el adulto en una o varias de estas tres categorías, incluso en el conjunto de la categoría de los niños menores de 16 años.

35 Según un modo de realización más preferido, el donante de la muestra (A) es más particularmente un donante que tiene una edad comprendida entre 0 y 1 mes, entre 1 mes y 2 años o entre 2 años y 16 años. Dicho de otra manera, según este modo de realización, el donante de la muestra (A) se selecciona de entre el grupo constituido por los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, por los lactantes, cuya edad está comprendida entre 1 mes y 2 años, y por los niños cuya edad está comprendida entre 2 años y 16 años.

40 En el procedimiento de la descripción, es posible determinar si un marcador biológico candidato es un marcador específico de una piel de niño comparando el nivel de expresión del marcador candidato en la muestra de células cutáneas (A) y en la muestra de células cutáneas de control (B).

50 Se describe en la presente memoria un procedimiento de identificación de por lo menos un marcador biológico que caracteriza una piel de niño, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- a) obtener por lo menos una muestra de células cutáneas (A), procediendo dicha muestra de un donante que tiene una edad inferior a 16 años,
- 55 b) obtener por lo menos una muestra de control (B) de células cutáneas,
- c) medir el nivel de expresión de un marcador biológico candidato en la muestra de la etapa a),
- d) medir el nivel de expresión de dicho marcador biológico candidato en la muestra de la etapa b),
- 60 e) calcular la relación entre el nivel de expresión de la etapa a) y el nivel de expresión de la etapa b), y
- f) determinar si el marcador candidato es un marcador biológico que caracteriza una piel de recién nacido o de lactante.

65 Preferentemente, el procedimiento descrito en la presente memoria es un procedimiento de identificación de por

lo menos un marcador biológico que caracteriza una piel de niño, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- 5 a) obtener por lo menos una muestra de células cutáneas (A), procediendo dicha muestra de un donante seleccionado de entre el grupo constituido por los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, por los lactantes, cuya edad está comprendida entre 1 mes y 2 años, y por los niños cuya edad está comprendida entre 2 años y 16 años;
- 10 b) obtener por lo menos una muestra de control (B) de células cutáneas;
- c) medir el nivel de expresión de un marcador biológico candidato en la muestra de la etapa a);
- d) medir el nivel de expresión de dicho marcador biológico candidato en la muestra de la etapa b);
- 15 e) calcular la relación entre el nivel de expresión de la etapa a) y el nivel de expresión de la etapa b); y
- f) determinar si el marcador candidato es un marcador biológico que caracteriza una piel de niño.

20 La muestra de control (B) según la invención y la descripción es una muestra de células cutáneas que procede de un donante cuya edad se conoce. Por ejemplo, la muestra de control (B) puede proceder de un niño o de un adulto. Más precisamente, la muestra de control (B) puede proceder de un donante que tiene menos de 16 años o que tiene más de 16 años. Ventajosamente, la muestra de control (B) del procedimiento descrito en la presente memoria procede de un donante cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, entre 1 mes y 2 años o entre 2 años y 16 años. Es posible así precisar si el marcador biológico que caracteriza la piel de niño es un marcador que caracteriza una piel de recién nacido menor de 1 mes, una piel de lactante que tiene entre 1 mes y 2 años, o una piel de niño de edad comprendida entre 2 y 16 años.

30 Está claro que la relación de la etapa e) del procedimiento depende de la naturaleza de la muestra de control (B). Se entenderá fácilmente que si el donante de la muestra de control (B) procede del mismo grupo de edad que el donante de la muestra (A), dicha relación de la etapa e) será igual a 1 aproximadamente; sin embargo, si los donantes de las muestras A y B proceden de dos grupos de edad distintos, entonces la relación de la etapa e) será diferente de 1. Por lo tanto, si la muestra (B) procede de un adulto, una relación entre los niveles de expresión del marcador candidato en la muestra (A) y en la muestra (B) superior a 1 indica que dicho marcador se expresa más específicamente en la piel de niño. Asimismo, aún en el caso en el que la muestra (B) proceda de un adulto, una relación entre los niveles de expresión del marcador candidato en la muestra (A) y la muestra (B) inferior a 1 indica que dicho marcador se expresa menos específicamente en la piel de niño.

40 Preferentemente, el nivel de expresión del marcador candidato se mide en por lo menos dos muestras de células cutáneas (A) y (A'), procediendo cada una de dichas muestras de un donante que tiene una edad inferior a 16 años. Más preferentemente, cada una de dichas muestras procede de un donante seleccionado de entre el grupo constituido por los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, por los lactantes, cuya edad está comprendida entre 1 mes y 2 años, y por los niños cuya edad está comprendida entre 2 años y 16 años. Ventajosamente, (A) y (A') pertenecen a dos grupos de edad diferentes. De manera más preferida, la muestra de control (B) procede de un donante adulto.

45 Es posible así sacar unas conclusiones más precisas y más fiables en lo que se refiere al marcador candidato.

50 Por "muestra cutánea" se entiende en la presente memoria cualquier muestra que contenga células de la piel. Las muestras cutáneas comprenden, por lo tanto, tanto los explantes de piel frescos obtenidos directamente del paciente, como los cultivos de células cutáneas en suspensión, los cultivos de células cutáneas en monocapa, los cultivos de células cutáneas en bicapa, y los modelos tisulares, incluyendo cultivos de pieles reconstruidas y los cultivos de mucosas reconstruidas. Como es difícil frecuentemente trabajar con explantes frescos, es particularmente ventajoso utilizar unos cultivos de células cutáneas. Ventajosamente, las células cutáneas comprenden células normales, sanas o patológicas, o células procedentes de líneas. Por ejemplo, las células cutáneas cultivadas pueden ser unas células obtenidas a partir de explantes de tejido cutáneo. Por "explante" o "explante de piel" se entiende en la presente memoria una extracción de células o de tejido cutáneo, que se puede realizar con un objetivo quirúrgico o para efectuar unos análisis.

60 En particular, un explante se puede obtener cuando tiene lugar una escisión quirúrgica. Por "escisión" se entiende en la presente memoria una intervención quirúrgica que consiste en cortar (extirpar) una parte más o menos ancha o profunda de la piel para tratar una anomalía o una excrecencia. Se procede a una escisión o bien para retirar un tumor cancerígeno o sospechoso de serlo, o bien para tratar una anomalía benigna de la piel que es molesta, ya sea por razones funcionales o estéticas. Una escisión incluye, por ejemplo, las muestras de piel obtenidas después de la cirugía plástica (plastia mamaria, abdominal, lifting, extirpación prepuccial, otoplastia, es decir remodelación de la oreja, sindactilia o dedo supernumeroso, etc.).

Un explante también se puede obtener mediante biopsia. Por "biopsia" se entiende en la presente memoria una extracción de células o tejido cutáneo realizada para su análisis. Se conocen y practican en este campo varios tipos de procedimientos de biopsias. Los tipos más comunes comprenden (1) la biopsia de incisión, en la que sólo se extrae una muestra del tejido; (2) la biopsia de escisión (o biopsia quirúrgica) que consiste en la escisión total de una masa tumoral, realizando así un procedimiento terapéutico y diagnóstico, y (3) la biopsia con aguja, en la que se extrae una muestra de tejido con una aguja, que puede ser ancha o delgada. Existen otros tipos de biopsia, como por ejemplo el frotis o el legrado, y se incluyen también en la presente memoria.

Alternativamente, dichas células cutáneas se pueden obtener por diferenciación de células madre (Guenou *et al.*, Lancet, 374(9703): 1745-1753, 2009; Nissan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 108(36): 14861-14866, 2011; Kraehenbuehl *et al.*, Nature Methods, 8: 731-736, 2011).

Las células cutáneas, tanto si proceden de una biopsia como si se obtienen por diferenciación de células madre, comprenden por lo menos un tipo de células presentes habitualmente en la hipodermis, la dermis y/o la epidermis. Estas células comprenden así, entre otros, unos queratinocitos, unos melanocitos, unos fibroblastos, unos adipocitos, unas células endoteliales, unos mastocitos, unas células de Langerhans y/o unas células de Merkel. De manera preferida, las células cutáneas según la invención y la descripción comprenden por lo menos unos queratinocitos y/o unos fibroblastos. De manera más preferida, las células cutáneas comprenden unos queratinocitos y/o unos fibroblastos.

El experto en la materia conoce numerosos métodos de cultivo de células cutáneas. Se puede utilizar cualquiera de estos métodos para cultivar las células cutáneas. Ventajosamente, las células cutáneas se cultivan y/o se conservan en unas condiciones que mantienen, por lo menos parcialmente, un metabolismo celular y/o unas funciones celulares. El cultivo de células cutáneas comprende, por lo tanto, tanto los cultivos de células cutáneas en suspensión, los cultivos de células cutáneas en monocapa o los cultivos de células cutáneas en bicapa, como modelos tisulares, incluyendo los cultivos de pieles reconstruidas y los cultivos de mucosas reconstruidas. De manera preferida, un cultivo de células cutáneas comprende por lo menos un cultivo de piel reconstruida.

Por ejemplo, los cultivos de células cutáneas en suspensión se realizan de forma rutinaria en un gran número de laboratorios desde hace varias décadas. Asimismo, los cultivos de células cutáneas en monocapa o en bicapa se conocen y se utilizan desde hace mucho tiempo.

Por otro lado, numerosos modelos tisulares, incluyendo en particular modelos de pieles reconstruidas y modelos de mucosas reconstruidas (Rosdy *et al.*, In Vitro Toxicol., 10(1): 39-47, 1997; Ponc *et al.*, J Invest Dermatol., 109(3): 348-355, 1997; Ponc *et al.*, Int J Pharm., 203(1-2): 211-225, 2000; Schmalz *et al.*, Eur J Oral Sci., 108(5): 442-448, 2000; Black *et al.*, Tissue Eng, 11(5-6): 723-733, 2005; Dongari-Batgzoglou y Kashleva, Nat Protoc, 1(4): 2012-2018, 2006; Bechtoille *et al.*, Tissue Eng, 13(11): 2667-2679, 2007; Vrana *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci, 49(12): 5325-5331, 2008; Kinicoglu *et al.*, Biomaterials, 30(32): 6418-6425, 2009; Auxenfans *et al.*, Eur J Dermatol, 19(2): 107-113, 2009; Kinicoglu *et al.*, Biomaterials, 32(25): 5756-5764, 2011; Costin *et al.*, Altern Lab Anim, 39(4): 317-337, 2011; Auxenfans *et al.*, J Tissue Eng Regen Med, 6(7): 512-518, 2012; Lequeux *et al.*, Skin Pharmacol Physiol, 25(1): 47-55, 2012; EP 29 678; EP 285 471; EP 789 074; EP 1 451 302 B1; EP 1 878 790 B1; EP 1 974 718; US 2007/0148,771; US 2010/0,099,576; WO 02/070729; WO 2006/063864; WO 2006/0,63865; WO 2007/064305) están a disposición del experto en la materia.

Ventajosamente, el modelo tisular comprende los modelos de piel reconstruida y los modelos de mucosa reconstruida. Preferentemente, el modelo de piel reconstruida se selecciona de entre el grupo que comprende los modelos de dermis, que contienen principalmente células estromales, y más particularmente aún fibroblastos, los modelos de epidermis constituidos principalmente por queratinocitos, los modelos de hipodermis, los modelos de piel que comprenden dermis y epidermis, y los modelos de piel que comprenden dermis, epidermis e hipodermis. Los modelos que comprenden por lo menos una dermis forman unos tejidos de tipo conjuntivo, mientras que los modelos que comprenden por lo menos una epidermis forman unos epitelios estratificados que comprenden las capas características del tejido considerado. Por ejemplo, se puede identificar en los modelos de epidermis una capa basal (*stratum basalis*), una capa espinosa (*stratum spinosum*), una capa granulosa (*stratum granulosum*), y una capa córnea (*stratum corneum*). Por otro lado, de manera preferida, el modelo de mucosa reconstruida es un modelo de mucosa de la boca, de la encía, de la vagina, o de la córnea.

Ventajosamente, dicho modelo es un modelo tisular de tipo conjuntivo de matriz de dermis que comprende un soporte matricial seleccionado preferentemente de entre:

- un soporte inerte seleccionado de entre el grupo que consiste en una membrana sintética semipermeable, en particular una membrana de nitrocelulosa semipermeable, una membrana de nylon semipermeable, una membrana o una esponja de teflón, una membrana de policarbonato o de polietileno, polipropileno, polietilentereftalato (PET) semipermeable, una membrana inorgánica Anopore semipermeable, de acetato o de éster de celulosa (HATF), una membrana Biopore-CM semipermeable, una membrana de poliéster semipermeable, una membrana o una película de ácido poliglicólico.

En este grupo, se encuentran, por ejemplo, los modelos dérmicos Skin²™ modelo ZK1100 y Dermagraft® y Transcyte® (Advanced Tissue Sciences);

- 5 - un plástico tratado con cultivo celular (formación de una hoja dérmica: Michel *et al.*, In Vitro Cell. Dev Biol.- Animal, 35: 318-326, 1999);
- 10 - un gel o una membrana a base de ácido hialurónico (Hyalograft® 3D - Fidia Advanced Biopolymers) y/o de colágeno (tal como, por ejemplo, una dermis equivalente o unos retículos de colágeno) y/o de fibronectina y/o de fibrina; en este grupo se encuentra, por ejemplo, el modelo dérmico Vitrix® (Organogenesis);
- 15 - una matriz porosa, tratada superficialmente o no tratada superficialmente (por ejemplo, una dermis equivalente), realizada a partir de colágeno que puede contener uno o varios glicosaminoglicanos y/o eventualmente quitosano (EP0296078A1, WO 01/911821 y WO 01/92322).

15 En este grupo, se encuentra por ejemplo el modelo dérmico Mimederm® (Coletica).

Estos soportes matriciales comprenden unas células estromales, en particular unos fibroblastos.

20 Ventajosamente, dicho modelo de piel es un modelo de epidermis que comprende un soporte matricial seleccionado preferentemente de entre:

- 25 - un soporte inerte seleccionado de entre el grupo que consiste en una membrana sintética semipermeable, en particular una membrana de nitrocelulosa semipermeable, una membrana de nylon semipermeable, una membrana o una esponja de teflón, una membrana de policarbonato o de polietileno, polipropileno, polietilentereftalato (PET) semipermeable, una membrana inorgánica Anopore semipermeable, de acetato o de éster de celulosa (HATF), una membrana Biopore-CM semipermeable, una membrana de poliéster semipermeable.

30 En este grupo, se encuentran los modelos de epidermis reconstruida (Skinethic®) así como el modelo EpiDerm®, (Mattek Corporation);

- una película o una membrana a base de ácido hialurónico y/o de colágeno y/o de fibronectina y/o de fibrina.

35 En este grupo se pueden citar, particularmente, los modelos: Laserskin® (Fidia Advanced Biopolymers), Episkin® (L'Oréal).

Estos modelos pueden ser inoculados con unos fibroblastos en la parte dérmica.

40 Estos modelos, en los que se pueden integrar o no unos fibroblastos, sirven de soporte para la inoculación de queratinocitos y la reconstitución de la epidermis. Ventajosamente, se introducen, además de los queratinocitos, unas células pigmentarias, unas células inmunocompetentes, unas células nerviosas; preferentemente las células inmunocompetentes son unas células de Langerhans.

45 Ventajosamente, dicho modelo tisular es un modelo de tejido de piel o de mucosa reconstruida que comprende un soporte matricial dérmico o de corion, seleccionado preferentemente de entre:

- 50 - un soporte inerte seleccionado de entre el grupo que consiste en una membrana sintética semipermeable, en particular una membrana de nitrocelulosa semipermeable, una membrana de nylon semipermeable, una membrana o una esponja de teflón, una membrana de policarbonato o de polietileno, polipropileno, polietilentereftalato (PET) semipermeable, una membrana inorgánica Anopore semipermeable, de acetato o de éster de celulosa (HATF), una membrana Biopore-CM semipermeable, una membrana de poliéster semipermeable, conteniendo o no dicho soporte inerte unas células estromales, en particular unos fibroblastos,
- 55 - un gel a base de colágeno y/o de ácido hialurónico y/o de fibronectina, y/o de fibrina que comprende unas células estromales, en particular unos fibroblastos,
- 60 - una matriz porosa, tratada superficialmente o no tratada superficialmente, realizada a partir de colágeno que puede contener uno o varios glicosaminoglicanos y/o eventualmente quitosano, integrando estas matrices porosas unas células estromales, en particular unos fibroblastos,
- una dermis desepidermizada o con dermis muerta, humana o animal.

65 En este grupo, se pueden citar particularmente los modelos Mimeskin (Coletica), EpiDermFT™, EpiAirway™, EpiOcular™, EpiOral™, EpiGingival™, EpiVaginal™ (MatTek corporation), Human Corneal Epithelium (HCE), Human Oral Epithelium (HOE), Human Gingival Epithelium (HGE), Human Vaginal Epithelium (HVE) (Skinethic®),

Phenion® Full Thickness Skin Model (Phenion) Apligraf® (Organogenesis), ATS-2000 (CellSystems® Biotechnologie Vertrieb), así como Skin 2TM (ZK1200-1300-2000 Advanced Tissue Science).

5 Por otro lado, existen unos modelos dedicados a la terapia tisular que se pueden utilizar asimismo en el marco del presente procedimiento. Se pueden citar los modelos Epidex (Modex Thérapeutiques), Epibase® (Laboratoire Génévrier), Epicell™ (Genzyme), Autoderm™ y Transderm™ (Innogenetics).

10 El soporte matricial es inoculado a continuación con unos queratinocitos para reconstruir la epidermis y obtener finalmente una piel reconstruida.

15 Ventajosamente, el modelo de piel utilizado comprende un modelo en el que se ha incorporado por lo menos un tipo celular complementario, tales como unas células endoteliales (CE) y/o unas células inmunitarias, tales como linfocitos, macrófagos, mastocitos, células dendríticas y/o células adiposas y/o anexos cutáneos, tales como pelo, cabello, glándulas sebáceas.

20 El marcador biológico candidato según la invención y la descripción es preferentemente un marcador génico, un marcador proteico, un marcador lipídico o un marcador metabólico. Para cada uno de estos tipos de marcadores, numerosos métodos están a disposición del experto en la materia para medir la expresión de dicho marcador biológico e identificar así una diferencia de expresión entre las células de niños menores de 16 años y las células de adulto.

En un primer modo de realización, dicho marcador es un marcador génico o un marcador proteico.

25 En este caso, el método de la descripción puede comprender una o varias etapas intermedias entre la extracción de la muestra de células cutáneas y la medición de la expresión del marcador biológico, correspondiendo dichas etapas a la extracción a partir de dicha muestra de células cutáneas de una muestra de ARNm (o del ADNc correspondiente) o de una muestra de proteína. Éste se puede utilizar a continuación directamente para medir la expresión del marcador. La preparación o la extracción de ARNm (así como la retrotranscripción de éste en ADNc) o de proteínas a partir de una muestra celular son sólo unos procedimientos de rutina bien conocidos por el experto en la materia.

35 Una vez que se obtiene una muestra de ARNm (o de ADNc correspondiente) o de proteína, se puede medir la expresión del marcador, o bien a nivel de los ARNm (es decir en el conjunto de los ARNm o de los ADNc presentes en la muestra), o bien de las proteínas (es decir en el conjunto de las proteínas presentes en la muestra). El método utilizado para ello depende entonces del tipo de transformación (ARNm, ADNc o proteína) y del tipo de muestra disponible.

40 Cuando se mide la expresión del marcador a nivel del ARNm (o ADNc correspondiente), se puede utilizar cualquier tecnología utilizada habitualmente por el experto en la materia. Estas tecnologías de análisis del nivel de expresión de los genes, como por ejemplo el análisis de transcriptoma, incluyen unos métodos bien conocidos tales como PCR (reacción en cadena de polimerasa, si se parte de ADN), la RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) o la RT-PCR cuantitativa o también los chips de ácidos nucleicos (incluyendo los chips de ADN y los chips de oligonucleótidos) para un rendimiento más elevado.

45 Por "chips de ácidos nucleicos" se entiende en la presente memoria varias sondas de ácidos nucleicos diferentes que están unidas a un sustrato, que puede ser un microchip, un portaobjetos, o una bola del tamaño de una microesfera. El microchip puede estar constituido por polímeros, por plásticos, por resinas, por polisacáridos, por sílice o por un material a base de sílice, de carbono, de metales, de vidrio inorgánico, o de nitrocelulosa.

50 Las sondas pueden ser unos ácidos nucleicos tales como los ADNc ("chip de ADNc"), los ARNm ("chip de ARNm") o unos oligonucleótidos ("chip de oligonucleótidos"), pudiendo dichos oligonucleótidos tener típicamente una longitud comprendida entre aproximadamente 25 y 60 nucleótidos.

55 Para determinar el perfil de expresión de un gen particular, se marca un ácido nucleico que corresponde en su totalidad o en parte a dicho gen, y después se pone en contacto con el chip en condiciones de hibridación, lo cual conduce a la formación de complejos entre dicho ácido nucleico diana marcado y las sondas unidas a la superficie del chip que son complementarias de este ácido nucleico. Después se detecta la presencia de complejos hibridados marcados.

60 Estas tecnologías permiten monitorizar el nivel de expresión de un gen en particular o de varios genes, incluso de todos los genes del genoma (full genome (genoma completo) o full transcriptome (transcriptoma completo)) en una muestra biológica (células, tejidos, etc.). Estas tecnologías se utilizan de forma rutinaria por el experto en la materia, y por lo tanto no es necesario detallarlas en la presente memoria. En la sección experimental se describen unos ejemplos de realización del procedimiento basados en el análisis de expresión génica (chip de ADNc) y en la PCR cuantitativa.

65

Alternativamente, es posible utilizar cualquier tecnología actual o futura que permita determinar la expresión de los genes en base a la cantidad de ARNm en la muestra. Por ejemplo, el experto en la materia puede medir la expresión de un gen por hibridación con una sonda de ácido nucleico marcada, como por ejemplo por transferencia Northern (para el ARNm) o transferencia Southern (para el ADNc), pero también mediante unas técnicas tales como el método de análisis en serie de la expresión de los genes (SAGE) y sus derivados, tales como LongSAGE, SuperSAGE, DeepSAGE, etc. También es posible utilizar unos chips de tejido (también conocidos como TMA: "tissue microarrays"). Los ensayos empleados habitualmente con los chips de tejido comprenden la inmunohistoquímica y la hibridación fluorescente *in situ*. Para el análisis a nivel del ARNm, los chips de tejido se pueden acoplar con la hibridación fluorescente *in situ*. Por último, es posible utilizar la secuenciación masiva en paralelo para obtener la determinación de la cantidad de ARNm en la muestra (RNA-Seq o "Whole Transcriptome Shotgun Sequencing"). Con este fin, hay disponibles varios métodos de secuenciación masiva en paralelo. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en los documentos US 4,882,127, U.S. 4,849,077; U.S. 7,556,922; U.S. 6,723,513; WO 03/066896; WO 2007/111924; US 2008/0020392; WO 2006/084132; US 2009/0186349; US 2009/0181860; US 2009/0181385; US 2006/0275782; EP-B1-1141399; Shendure & Ji, Nat Biotechnol., 26(10): 1135-45, 2008; Pihlak *et al.*, Nat Biotechnol., 26(6): 676-684, 2008; Fuller *et al.*, Nature Biotechnol., 27(11): 1013-1023, 2009; Mardis, Genome Med., 1(4): 40, 2009; Metzker, Nature Rev. Genet., 11(1): 31-46, 2010.

Cuando la expresión del marcador se mide a nivel proteico, es posible emplear unos anticuerpos específicos, en particular en tecnologías bien conocidas tales como la inmunoprecipitación, la inmunohistología, la transferencia western blot, la transferencia "dot blot", ELISA o ELISPOT, los chips de proteínas, los chips de anticuerpos, o los chips de tejido acoplados con inmunohistoquímica. Entre las demás técnicas que se pueden utilizar, se incluyen las técnicas de FRET o de BRET, los métodos de microscopía o histoquímica, incluyendo en particular los métodos de microscopía confocal y de microscopía electrónica, los métodos basados en la utilización de una o varias longitudes de onda de excitación y de un método óptico adecuado, tal como un método electroquímico (técnica de voltamperometría y de amperometría), la microscopía de fuerza atómica, y los métodos de radiofrecuencia, tales como la espectroscopía de resonancia multipolar, confocal y no confocal, detección de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia, transmitancia, y birrefringencia o índice de refracción (por ejemplo, por resonancia de los plasmones de superficie, o "Surface plasmon resonance" en inglés, por elipsometría, por ejemplo de espejo resonante, etc.), citometría de flujo, formación de imágenes por resonancia radioisotópica o magnética, análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); por espectrofotometría HPLC-mass, por cromatografía líquida/espectrofotometría de masa/espectrometría de masa (LC-MS/MS). Todas estas técnicas son bien conocidas por el experto en la materia y no es necesario detallarlas en la presente memoria.

Preferentemente, el marcador génico o proteico candidato se selecciona de entre el grupo que comprende los marcadores del metabolismo celular, los marcadores de la respuesta al estrés, los marcadores de la inflamación, los marcadores de la inmunidad, los marcadores de apoptosis, los marcadores de crecimiento/proliferación y de ciclo celular, los marcadores de la señalización celular, los marcadores de migración y de diferenciación, los marcadores de la barrera epidérmica, los marcadores de adhesión y los marcadores de las células madre pluripotentes de la piel.

El experto en la materia que busca determinar a qué clase pertenece un marcador génico o proteico, podrá fácilmente consultar la bibliografía científica pertinente o remitirse a unas bases de datos públicas, tales como, por ejemplo, las agrupadas en la página internet de National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>).

Más preferentemente, dicho marcador del metabolismo energético celular es IGFL3 (IGF-like family member 3), dicho marcador de respuesta al estrés es GP3X (glutación peroxidasa 3), dicho marcador de la inflamación se selecciona de entre el grupo que consiste en MGST1 (microsomal glutathione S-transferase 1), IL-1 (interleucina 1) e IL-8 (interleucina 8), dicho marcador de la inmunidad se selecciona de entre el grupo que consiste en DEFB1 y DEFB4 (defensina beta1 y beta4), dicho marcador del ciclo celular es CDKN1 (cyclin-dependent kinase inhibitor), dicho marcador de diferenciación es BARX2 (BARx Homeobox 2) o SCEL (escielina), dicho marcador de la barrera epidérmica se selecciona de entre el grupo que consiste en CLDN1 (claudina 1), IVL (implicina), y KRT1 (queratina 1), dicho marcador de adhesión es CADM1 (cell adhesion molecule 1) y/o dicho marcador de las células madre pluripotentes de la piel se selecciona de entre el grupo que consiste en FN1 (fibronectina 1), NID1 (nidogeno 1), NOTCH1 (Notch homolog 1, translocation-associated), KRT19 (queratina 19), ITGB1BP1 (integrin beta1 binding protein), ITGA6 (integrina alfa6) y ITGB4 (integrina beta4).

El gen CLDN 1 (NM_021101) codifica para la proteína claudina 1, que es uno de los componentes más importantes de las uniones estrechas. La implicina, codificada por el gen IVL (NM_005547) participa en la formación de la envoltura córnea de los corneocitos. El gen KRT1 (NM_006121) codifica para la queratina 1 que constituye la red intracelular de los queratinocitos. BARX2 (NM_003658) codifica para un factor de transcripción que regula la adhesión durante la formación de la epidermis y la diferenciación de ésta. Por último, el producto del gen SCEL (NM_001160706; NM_003843; NM_144777), la escielina, participa en la regulación de las proteínas de la envoltura córnea.

GPX3 (NM_002084) codifica para la glutatión peroxidasa, que tiene una función de defensa contra el estrés oxidativo. DEFB1 (NM_005218) y DEFB4 (NM_004942) codifican para las beta defensinas, y son más particularmente unos genes de la inmunidad innata, cuyos productos pertenecen a una misma familia de péptidos antimicrobianos.

5

El gen MGST1 (NM_145792; NM_001267598; NM_145764; NM_001260511; NM_020300; NM_001260512; NM_145791) codifica para una proteína de la inflamación, la transferasa de glutatión microsomal, que está implicada en la producción de mediadores de la inflamación.

10

Los genes IL-1 (NM_000575; NM_000576; NM_001243211; NM_000577) e IL-8 (NM_000584) codifican para dos citoquinas, que son unos mediadores importantes de la inflamación.

15

FN1 (NM_212482; NM_002026; NM_212476; NM_212478; NM_212474; NM_054034) codifica para la fibronectina 1, implicada en el proceso de adhesión de las células madre. El gen NOTCH1 (NM_017617) está implicado en el mantenimiento de las células madre. La proteína nidogeno 1 o entactina, codificada por el gen NID1 (NM_002508), es un componente de la membrana basal implicado en las células madre, en la interacción con la matriz. La proteína queratina 19, codificada por el gen KRT19 (NM_002276) es un miembro de la familia de las queratinas que se expresa específicamente en las células madre. Por último, ITGB1BP1 (NM_022334; NM_004763), ITGA6 (NM_001079818; NM_000210), ITGB4 (NM_000213; NM_001005731; NM_001005619) codifican respectivamente para la integrina beta 1 binding protein, la integrina alfa 6 y la integrina beta 4, todas esenciales para la adhesión de las células madre a la matriz.

20

25

Unos cuerpos laminares situados en la capa superior del *stratum granulosum* (capa granulosa), los cuerpos de Odland, contienen unos esteroides, unos fosfolípidos y unas glucosilceramidas, así como unas hidrolasas específicas. Estas enzimas convierten los fosfolípidos y las glucosilceramidas en ácidos grasos libres y ceramidas que forman, con el colesterol y el sulfato de colesterol, una bicapa laminar intercelular. Ésta participa en la protección de la piel contra las agresiones externas, y en el mantenimiento de un buen nivel de agua intraepidérmico (Jungerstend *et al.*, Contact Dermatitis, 58(5): 255-262, 2008). Ahora bien, esta función de barrera de la piel evoluciona con la edad, en particular entre el nacimiento y la edad adulta (Fluhr *et al.*, Exp Dermatol., 19(6): 483-492, 2010). Además de los lípidos de la bicapa laminar intercelular, la piel fabrica y segrega una mezcla de cuerpos grasos denominada sebo que comprende unos mono-, di- y triglicéridos, unos ácidos grasos libres, unas ceras y ceras esterificadas, unos escualenos y unos esteroides. La secreción de sebo varía desde el nacimiento hasta la edad adulta. Así, esta secreción aumenta durante la primera semana tras el nacimiento, y después disminuye antes de aumentar de nuevo con la pre-pubertad (Fluhr *et al.*, Exp Dermatol., 19(6): 483-492, 2010).

30

35

Según otro modo de realización, el marcador biológico según la descripción es por lo tanto un marcador lipídico.

40

En particular, el marcador lipídico según la descripción puede ser un marcador lipídico de la capa córnea o un marcador lipídico del sebo.

45

Ventajosamente, el marcador lipídico según la descripción es un marcador lipídico de la capa córnea. De manera preferida, dicho lípido se selecciona de entre los fosfolípidos, las ceramidas, los esteroides y los ácidos grasos libres.

50

Por "fosfolípido" se entiende en la presente memoria cualquier lípido que comprende un grupo fosfato. Ventajosamente, los fosfolípidos se seleccionan de entre el grupo constituido por los fosfoglicéridos y las esfingomielinas. Un "fosfoglicérido" es en la presente memoria un éster de glicerol en el que dos funciones alcoholos son esterificadas por unos ácidos grasos y la tercera por un ácido fosfórico. Ventajosamente, los ácidos grasos son saturados o insaturados, y contienen de 14 a 20 átomos de carbono. De manera preferida, un fosfoglicérido se selecciona de entre el grupo constituido por la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina, y el fosfatidilinositol. Se entiende por "esfingomielina" una molécula constituida por una base de cadena larga (esfingosina o dihidroesfingosina), por un ácido graso que amidifica la función amina y por un fosfato que esterifica la función alcohol primaria y a su vez es esterificado por un alcohol aminado (colina).

55

Por "esterol" se entiende en la presente memoria un lípido que pertenece a un subgrupo de esteroides que tienen un grupo hidroxilo libre, así como cualquier derivado de dicho lípido. Los esteroides pueden ser de origen natural o sintético. Ventajosamente, los esteroides se seleccionan de entre el colesterol o el sulfato de colesterol.

60

Una "ceramida" es en la presente memoria un lípido procedente de la reacción de amidificación de la esfingosina y de un ácido graso. Una ceramida está constituida por lo tanto por una base esfingosina o fitoesfingosina unida por un enlace amida a unos ácidos α -hidroxilo, ω -hidroxilo o no hidroxilo que poseen unas longitudes de cadena hidrófoba variables. En el *Stratum corneum* humano, se han identificado 9 clases de ceramidas, denominadas CER 1 a 9, (véase, por ejemplo, Dayan, Cosm & Toil, 121(1): 37-44, 2006; Jungerstend *et al.*, Contact Dermatitis, 58(5): 255-262, 2008; Farwick *et al.*, Cosm & Toil, 124(2): 63-72; Masukawa *et al.*, J Lipid Res., 50(8): 1708-1719, 2009). La ceramida según la descripción se selecciona más preferentemente de entre el grupo constituido por dichas ceramidas CER1 a 9.

65

El marcador lipídico según la descripción también puede ser un marcador lipídico del sebo. De manera preferida, tal marcador lipídico se selecciona de entre el grupo constituido por los mono-, di- y triglicéridos, los ácidos grasos libres, las ceras y las ceras esterificadas, los escualenos y los esteroides.

Los "glicéridos", o acilgliceroles o glicerolípidos, son unos ésteres de ácidos grasos y de glicerol. Según que estén esterificados por una, dos o tres cadenas de ácidos grasos, se denominan mono-, di- o triglicéridos.

Se entiende en la presente memoria por "ceras" unos cuerpos grasos constituidos por diferentes céridos, alcoholes y ácidos grasos libres, y frecuentemente por hidrocarburos saturados de cadena larga. Por "cérido" se entienden en la presente memoria unos monoésteres de ácidos grasos y de alcoholes alifáticos de cadena larga; los alcoholes de los céridos son en general unos alcoholes primarios, con número par de carbonos, saturados y no ramificados, mientras que la longitud de las cadenas carbonadas varía de 14 a 30 carbonos para el ácido graso, y de 16 a 36 carbonos para el alcohol graso.

Un escualeno es en la presente memoria un triterpeno, isoprenoide de treinta átomos de carbono y de cincuenta átomos de hidrógeno: (E) 2,6,10,15,19,23-Hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexeno.

Por último, la superficie de la piel está recubierta de una película protectora que permite que la piel mantenga su hidratación y se proteja contra las agresiones exteriores. Esta película cutánea de superficie comprende, entre otros, una película hidrolipídica, que está constituida esencialmente por sudor, por agua, por sebo y otros lípidos. Estos comprenden unas ceramidas, unos triglicéridos y unos ácidos grasos, en proporciones más o menos iguales. Los lípidos de la película hidrolipídica presentan una estructura tridimensional específica.

Numerosos métodos están a disposición del experto en la materia para medir el contenido en lípido en una muestra de células cutáneas. Estos métodos comprenden, entre otros, la cromatografía líquida en fase gaseosa (HPLC, véase por ejemplo Sullivan *et al.*, Arch Ophthalmol., 120(12): 1689-99, 2002), por ejemplo, acoplada a un detector evaporativo de difracción de luz (HPLC-ESD, véase Nordbäck *et al.*, J. High Resolut. Chromatogr., 22: 483-486, 1999; Torres *et al.*, J. Chromatogr. A., 1078: 28-34, 2005); la cromatografía en capa fina (TLC, por ejemplo Downing *et al.*, J Invest Dermatol., 77(4): 358-360, 1981; Nordstrom *et al.*, J Invest Dermatol., 87(2): 260-263, 1986); la resonancia magnética nuclear (NMR, véase por ejemplo Robosky *et al.*, J Lipid Res., 49(3): 686-692, 2008); la microespectroscopía confocal *in vivo* de Raman; la espectrometría de masas, la cromatografía en fase gaseosa acoplada con la espectrometría de masas (GC-MS, véase O'Neill *et al.*, J Chromatogr Sci., 14(1): 28-36, 1976); la cromatografía en fase líquida ultra-rendimiento (UPLC, véase Rainville *et al.*, J Proteome Res., 6(2):552-558, 2007; Castro-Perez *et al.*, J Proteome Res., 10(9): 4281-4290, 2011). Se puede analizar asimismo la organización de estos lípidos en la piel y más particularmente en el estrato córneo (o capa córnea), organización lamelar o lateral, mediante unas técnicas, por ejemplo de difracción con rayos X (Bouwstra *et al.*, J Invest Dermatol., 97(6): 1005-1012, 1991; van Smeden *et al.*, J Lipid Res., 52(6):1211-1221, 1991) o por espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (Gorcea *et al.*, Int J Pharm. 10 de noviembre de 2011.) o por un análisis morfométrico de microscopía electrónica (Daehnhardt-Pfeiffer *et al.*, Skin Pharmacol Physiol., 25(3): 155-161, 2012) o por un análisis de microscopía electrónica de una sección vítrea de piel combinado con un análisis molecular (Iwai *et al.*, J Invest Dermatol., 26 de abril de 2012).

Según otro modo de realización de la descripción, el marcador biológico candidato es un marcador metabólico.

Por "marcador metabólico" se entiende en la presente memoria los marcadores implicados en la regulación general de los procedimientos metabólicos de la piel, incluyendo el metabolismo energético. El "metabolismo" corresponde en la presente memoria al conjunto de las transformaciones moleculares y energéticas que se desarrollan de manera no interrumpida en las células de la piel. Dicho de otra manera, por "metabolismo" se entiende designar en la presente memoria todas las reacciones mediante las cuales, por ejemplo, las células de la piel producen y utilizan la energía, manteniendo su identidad, se reproducen, eliminan los compuestos tóxicos, etc.

Los marcadores metabólicos comprenden, en particular, los metabolitos de la piel que están presentes de manera diferencial en la piel de niño menor de 16 años, y más particularmente de los recién nacidos, de los lactantes y/o de los niños de 2 a 16 años, cuando se compara con la piel de adulto. El término "diferencial" significa en la presente memoria un contenido diferente en la muestra medida que en la muestra de control. Por ejemplo, un metabolito presente de manera diferencial en la piel de niño (o de recién nacido, de lactante y/o de niños de 2 a 16 años de edad) puede estar presente en cantidades más importantes en dicha piel de niño que en la piel de adulto. Alternativamente, este metabolito puede estar presente en cantidades menos importantes en la piel de niño (o de recién nacido, de lactante y/o de niños de 2 a 16 años de edad) que en la piel de adulto.

Los marcadores metabólicos de la piel son bien conocidos por el experto en la materia. Se describen, por ejemplo, en Fluhr *et al.* (Exp Dermatol., 19(6): 483-492, 2010) o en Jungerstend *et al.* (Contact Dermatitis, 58(5): 255-262, 2008). Los marcadores biológicos según la descripción comprenden los marcadores de la construcción de la epidermis y de la función de barrera de la piel, como, por ejemplo, la eleidina o los factores naturales de hidratación, también denominados NMF (Natural Moisturizing Factors). Estos son una mezcla de sustancias higroscópicas que

tienen la propiedad de retener el agua (Fluhr *et al.*, Exp Dermatol., 19(6): 483-492, 2010). Algunos de estos NMF proceden de la proteólisis de la filagrina según una cascada de reacciones que implican enzimas como, en particular, la caspasa 14 y la peptidilarginina deiminasa (PAD1). Otras moléculas higroscópicas epidérmicas y dérmicas como el ácido hialurónico contribuyen a mantener un buen nivel de agua y dar flexibilidad y volumen a la piel. Este glicosaminoglicano se sintetiza mediante unas hialuronano sintasas de tipo 1, 2 o 3, mientras que es degradado por unas hialuronidasas. La función de barrera de la piel está asegurada esencialmente por la capa córnea e implica, al mismo tiempo, los lípidos intercelulares y los corneocitos, que tienen ambos un papel estructural y funcional. Unas enzimas acompañan a la síntesis y a la maduración de estos lípidos clave como, por ejemplo, la betaglucoocerebrosidasa y la esfingomielinasa ácida; otras enzimas aseguran también la organización de las proteínas que constituyen los corneocitos como, en particular, la transglutaminasa. Una vez que todas las capas epidérmicas están constituidas y que la diferenciación ha terminado, es el proceso de descamación el que permite la eliminación de los corneocitos que implican unas enzimas tales como las calicreínas 5 y 7. Debajo de la epidermis, la dermis puede sufrir una reestructuración o remodelación de la matriz celular que implica unas metaloproteinasas y elastasas.

Por otro lado, se sabe que la concentración de hormonas de la piel varía con la edad. Según otro aspecto de la invención y de la descripción, los marcadores metabólicos de la piel son, por lo tanto, unas hormonas, y en particular las hormonas sexuales/esteroides como los estrógenos y los andrógenos (por ejemplo estradiol, progesterona y testosterona), las hormonas de la glándula suprarrenal, que son también unos esteroides (por ejemplo DHEA, cortisol), las hormonas de la tiroides (por ejemplo tiroxina y triyodotirosina), los glucocorticoides (por ejemplo, cortisol o hidrocortisona), las neurohormonas (por ejemplo las hormonas pro-opiomelanocortina y adrenocorticotrófica), etc.

Los marcadores metabólicos de la descripción pueden incluir también unas actividades enzimáticas tales como las enzimas antioxidantes, en particular la catalasa, la glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, etc.

Los marcadores metabólicos de la piel comprenden también las actividades enzimáticas relacionadas con la eliminación de los compuestos tóxicos exógenos (o xenobióticos) de las células. Se conoce desde hace mucho tiempo que este proceso de eliminación, o biotransformación, comprende generalmente dos etapas: una etapa de funcionalización o fase I, y una etapa de conjugación o fase II. La biotransformación recurre así a dos tipos de actividades, las enzimas de fase I y las enzimas de fase II. Estos dos tipos de actividades enzimáticas están presentes en las células de la piel e incluidas en los marcadores metabólicos de la piel (véase por ejemplo Ahmad y Mukhtar, J Invest Dermatol., 123: 417-425, 2004; Cheung *et al.*, J Dermatol Sci, 31: 9-19, 2003; Gelardi *et al.*, Toxicol in Vitro, 15: 701-711, 2001; Hotchkiss, S.A.M., 1998. Dermal metabolism. In: Roberts, M.S., Walters, K.A. (Eds.) Dermal Absorption and Toxicity Assessment. Marcel Dekker Inc, New York, p. 43-101; Janmohamed *et al.*, Biochem Pharmacol, 62: 777-786, 2001; Katiyar *et al.*, J Invest Dermatol, 114: 328-333, 2000; Moss *et al.*, Food Chem Toxicol, 38: 361-370, 2000; Oesch *et al.*, Drug Metab Rev, 39: 659-698, 2007; Oesch *et al.*, Biochem Pharmacol, 27: 17-20, 1978; Pillai *et al.*, Pharm Res, 21: 1146-1152, 2004; Raza *et al.*, J Invest Dermatol, 96: 463-467, 1991; Nordquist y Oreland, J Neural Transm, 114: 713-716, 2007).

Ventajosamente, el marcador metabólico de la piel según la descripción es una enzima de fase I. Por "enzima de fase I" se entiende una enzima que permite asegurar una oxidación. Preferentemente, la enzima de fase I es una enzima de la familia de los citocromos P450, una flavina monooxigenasa, una monoamina oxidasa, un alcohol deshidrogenasa, un aldehído deshidrogenasa, una esterasa o un epóxido hidrolasa. Por "citocromo P450" se entiende en la presente memoria una enzima constituida por una parte proteica, la apoproteína, y por un grupo prostético constituido por una protoporfirina unida a un átomo de hierro por cuatro enlaces covalentes, interviniendo dicha enzima en el metabolismo oxidativo de moléculas muy diversas. Una "flavina monooxigenasa" es en la presente memoria una enzima que fija la flavina adenina dinucleótido (FAD) y cataliza con la ayuda del NADPH, la oxigenación de átomos nucleófilos como el fósforo, el nitrógeno o el azufre que están presentes en numerosos compuestos exógenos. Se entiende en la presente memoria por "monoamina oxidasa" una enzima que cataliza la desaminación oxidativa de las aminas primarias para formar unos aldehídos. Los "alcoholes o aldehídos deshidrogenasas" son unas enzimas que catalizan la oxidación de las funciones alcohol a aldehídos o cetonas, y después a ácidos carboxílicos. Se entiende en la presente memoria por "estearasa" unas enzimas que intervienen en la hidrólisis de las funciones éster y liberan así las funciones alcohol y ácido carboxílico correspondientes. Una "epóxido hidrolasa" es en la presente memoria una enzima que lleva a cabo la desintoxicación de los epóxidos mediante la hidratación y la formación de dioles. Más preferentemente, la enzima de fase I es un citocromo P450 seleccionado de entre CYP1A, CYP2C y CYP3A.

Alternativamente, el marcador metabólico de la piel según la descripción es una enzima de fase II. Por "enzima de fase II" se entiende una enzima que permite asegurar una conjugación. Preferentemente, una "enzima de fase II" es una transferasa, es decir una enzima que cataliza la reacción entre un sustrato nucleófilo (alcohol, ácido carboxílico, amina o tiol) y un sustrato hidrosoluble electrófilo. Más preferentemente, la enzima de fase II es una UDP-glucuroniltransferasa, una sulfotransferasa, una glutatión-S-transferasa o una N-acetiltransferasa. Se entiende en la presente memoria por "UDP-glucuroniltransferasa" una enzima que permite la fijación del ácido glucurónico sobre un átomo de oxígeno, de nitrógeno o de azufre de una molécula para formar unos compuestos glucurónidos. Una "sulfotransferasa" cataliza la adición sobre una molécula funcionalizada de un grupo sulfato en

forma activada, estando dicho grupo sulfato dado por el 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS). Las "glutati6n-S-Transferasas" (GST) son una superfamilia de enzimas que catalizan la conjugaci6n entre el glutati6n reducido y unos xenobi6ticos electr6filos (compuestos arom6ticos, ep6xidos, etc.). Se entiende en la presente memoria por "N-acetiltransferasa" (NAT) una enzima responsable de la biotransformaci6n por acetilaci6n de diversos compuestos (aminas arom6ticas, sulfonamidas, hidrazinas, etc.).

Los marcadores metab6licos de la descripci6n comprenden asimismo los marcadores relacionados con la pigmentaci6n de la piel.

La pigmentaci6n de la piel resulta de la presencia de granos de melanina en los queratinocitos. Seg6n un primer aspecto, el marcador relacionado con la pigmentaci6n de la piel seg6n la invenci6n y la descripci6n es, por lo tanto, la melanina. La melanina es el pigmento m6s importante de la piel: el grado de melanina en la piel determina su color (clara, mate, etc.) y proporciona una mayor o menor protecci6n frente a los rayos ultravioletas. Por "melanina" se entiende en la presente memoria tanto la feomelanina como la eumelanina. La "feomelanina" o "femelanina" es un pigmento amarillo o rojo amarronado, principalmente compuesto por derivados benzotiazina ricos en azufre. Por "eumelanina" se entiende en la presente memoria un copol6mero muy heterog6neo que consiste en unas unidades de DHI (5,6-dihidroxiindol) y de DHICA (6cido 5,6-dihidroxiindol-2-carbox6lico) y que forma un pigmento marr6n-negro, pobre en azufre. La eumelanina y la feomelanina son bien conocidas por el experto en la materia (v6ase por ejemplo Bertolo *et al.*, *m/s*, 17(2): 177-185, 2001; Ito y Wakamatsu, *Pigment Cell Res*, 16(5): 523-531, 2003; Ebanks *et al.*, *Int J Mol Sci*, 10: 4066-4087, 2009).

Seg6n un segundo aspecto, el marcador relacionado con la pigmentaci6n de la piel seg6n la descripci6n es una actividad enzim6tica que regula la s6ntesis de una melanina. Ventajosamente, dicho marcador es una actividad de tipo "tirosinasa". Una actividad tirosinasa es en la presente memoria una actividad enzim6tica que es capaz de catalizar la hidroxilaci6n de la tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA) y DOPA en dopaquinona. Un ejemplo de tirosinasa corresponde, por ejemplo, al producto del locus *albino* del rat6n, as6 como a sus hom6logos en las dem6s especies de mam6feros. La reacci6n catalizada por la tirosinasa es com6n a la bios6ntesis de las eumelaninas y a la de la feomelanina (Bertolo *et al.*, *m/s*, 17(2): 177-185, 2001; Ebanks *et al.*, *Int J Mol Sci*, 10: 4066-4087, 2009).

Alternativamente, el marcador relacionado con la pigmentaci6n de la piel es una actividad enzim6tica espec6fica de la s6ntesis de la feomelanina o de la eumelanina. Preferentemente, dicha actividad enzim6tica es espec6fica de la s6ntesis de la eumelanina. M6s preferentemente, dicha actividad enzim6tica es una actividad de tipo DHICAoxidasa (o TRP-1 o TYRP1 o gp75) o de tipo DOPAcromo tautomerasa (o TRP-2 o TYRP2). Se entiende en la presente memoria por DHICAoxidasa una actividad enzim6tica capaz de catalizar la oxidaci6n del 6cido 5,6-dihidroxiindol-2-carbox6lico (DHICA) en 6cido indol 5,6-quinona-2-carbox6lico. Dicha actividad es portada, por ejemplo, por una prote6na hom6loga del producto del locus murino marr6n (*Brown*). La DOPAcromo tautomerasa es una actividad enzim6tica capaz de catalizar la oxidaci6n de dopacromo en DHICA que es codificada, por ejemplo, por un gen hom6logo del gen murino pizarroso (*slaty*).

Se entiende en la presente memoria que los productos de las reacciones catalizadas por las diferentes actividades enzim6ticas entran tambi6n en la definici6n de los marcadores de la pigmentaci6n de la piel. As6, la DOPA, la dopaquinona, el leucodopacromo, el dopacromo, la DHI, la indol-5,6-quinona, la DHICA, el 6cido indol 5,6-quinona-2-carbox6lico son todos unos marcadores biol6gicos de la piel, as6 como la cisteinil-dopa y la 1,4-benzotiazinilalanina (v6ase por ejemplo la figura 1 de Bertolo *et al.*, *m/s*, 17(2): 177-185, 2001).

La hipodermis comprende unas c6lulas especializadas en la s6ntesis y el almacenamiento de los triglic6ridos, los adipocitos. La hipodermis puede comprender as6 unos adipocitos blancos, que constituyen la grasa blanca o el tejido adiposo blanco, y unos adipocitos marrones, que forman la grasa marr6n o tejido adiposo marr6n. Esta 6ltima est6 presente, sobre todo, al comienzo de la vida.

Por lo tanto, tambi6n est6n incluidos en los marcadores seg6n la descripci6n los marcadores relacionados con los adipocitos. En particular, los marcadores seg6n la descripci6n comprenden la relaci6n entre el n6mero de adipocitos blancos y el n6mero de adipocitos marrones. Los adipocitos de la grasa blanca son unas c6lulas esf6ricas, de un di6metro de aproximadamente un centenar de micr6metros, cuyo citoplasma contiene una gran vacuola lip6dica 6nica (triglic6ridos), rodeada por una fina corona citopl6smica que contiene un aparato de Golgi, ret6culo endopl6smico granular, ret6culo endopl6smico liso y mitocondrias. A diferencia de los adipocitos blancos, los adipocitos marrones tienen un n6cleo central y un citoplasma relleno de numerosas peque6nas vacuolas lip6dicas (la c6lula se denomina multiocular) y de mitocondrias.

Los adipocitos blancos secretan numerosos p6ptidos, denominados colectivamente adipocitoquinas (Avram *et al.*, *J Am Acad Dermatol*, 53(4): 671-683, 2005) que comprenden, entre otras, la leptina, la adipsina, la adiponectina, y la prote6na ASP (acylation stimulating protein). En un modo de realizaci6n preferido, los marcadores relacionados con los adipocitos de la invenci6n y de la descripci6n son unas adipocitoquinas; m6s preferentemente, dichos marcadores se seleccionan de entre la leptina, la adipsina, la adiponectina, la resistina, y la prote6na ASP. Por "leptina" se entiende en la presente memoria una prote6na de 16 kDa, codificada por el gen *Ob*, y que regula las reservas de grasas en el organismo y el apetito controlando la sensaci6n de saciedad. Ventajosamente, la leptina

tiene la secuencia peptídica representada por NP_000221.1. Se entiende por "adipsina" o "Factor D" o "factor de complemento D (CFD)" una proteína de 253 residuos que tiene una actividad de serina proteasa y codificada por el gen *CFD*. Ventajosamente, la adipsina tiene la secuencia proteica representada por NP_001919. Se entiende por "adiponectina" o "AdipoQ", "Acr30" (adipocyte complement-related protein of 30 kD) "APM1" (adipose most abundant gene transcript 1), o "GBP28" (gelatin-binding protein of 28 kD) una proteína de 244 aminoácidos implicados, entre otros, en la regulación del metabolismo de los lípidos y de la glucosa. Ventajosamente, esta proteína posee la secuencia de aminoácidos representada por NP_001171271.1. La "resistina" o "ADSF" (adipose tissue-specific secretory factor) o "XCP1" (C/EBP-epsilon-regulated myeloid-specific secreted cysteine-rich protein) es una proteína de 108 aminoácidos codificada por el gen *RSTN*. Ventajosamente, la proteína resistina posee la secuencia proteica NP_001180303.1. La proteína "ASP", tal como se entiende en la presente memoria, es un producto de escisión del factor de complemento C3 (NP_000055.2) que es específico de los adipocitos y que regula la entrada en estas células de la glucosa y el almacenamiento de los ácidos grasos no esterificados.

Los adipocitos blancos pueden liberar energía en forma de ácidos grasos libres a partir de los triglicéridos almacenados: es la lipólisis. Según otro modo de realización preferido, los marcadores relacionados con los adipocitos de la descripción comprenden las actividades enzimáticas relacionadas con la lipólisis, es decir con la hidrólisis de los triglicéridos. Preferentemente, dicha actividad enzimática es una actividad de tipo lipasa. Una "lipasa" es una enzima hidrosoluble capaz de efectuar la hidrólisis de funciones éster y especializada en la transformación de triglicéridos en glicerol y en ácidos grasos. La lipasa es más preferentemente la lipasa sensible a hormonas, la lipasa de monoglicérido y la lipasa de triglicéridos adiposos (Lafontan y Langin, *Prog Lipid Res*, 48(5): 275-297, 2009). La "lipasa sensible a hormonas", tal como se entiende en la presente memoria, es una enzima capaz de hidrolizar los triglicéridos en diglicéridos y los diglicéridos en monoglicéridos, y cuya actividad está regulada por el nivel intracelular de AMPc a través de una fosforilación por la proteína quinasa A (PKA). Un ejemplo de lipasa sensible a hormonas corresponde a la proteína HSL humana, cuya secuencia se da por NP_005348.2. Se entiende en la presente memoria por "lipasa de monoglicéridos" una enzima asociada a la membrana capaz de hidrolizar los monoglicéridos en glicerol y ácido graso. La lipasa de monoglicéridos humana corresponde a la proteína MAGL, MGL o MGLL (NP_001243514). Una "lipasa de triglicéridos adiposos" es en la presente memoria una enzima capaz de hidrolizar los triglicéridos, pero únicamente los triglicéridos (y por lo tanto, no los diglicéridos y/o los monoglicéridos), y no es fosforilada por PKA. Por ejemplo, se podrá hacer referencia a la proteína ATGL humana, que tiene como secuencia la que corresponde al número de identificación NP_065109.1.

Tal como se ha indicado anteriormente, los marcadores biológicos son bien conocidos por el experto en la materia. Los métodos para analizar dichos marcadores biológicos se han descrito y utilizado de forma rutinaria en laboratorio desde hace numerosos años y por lo tanto no es necesario detallarlos con mayor detalle en la presente memoria.

Ventajosamente, la expresión del marcador candidato es normalizada con respecto a la expresión de un marcador de control. Un "marcador de control" es en la presente memoria un marcador cuya expresión es idéntica, sea cual sea el tipo celular considerado y la edad del donante. Dicho de otra manera, el marcador de control se expresa al mismo nivel en el niño, y en particular en el recién nacido, el lactante y/o el niño de entre 2 y 6 años, y el adulto.

En particular, cuando el marcador candidato es un marcador génico o un marcador proteico, el marcador de control es un gen que se expresa en todos los tipos celulares, independientemente de la edad del sujeto, o su producto proteico. En particular, dicho marcador de control es un gen de mantenimiento o el producto proteico de dicho gen de mantenimiento. Un gen de mantenimiento es un gen que se expresa en todos los tipos celulares y que proporciona una función básica que es necesaria para la supervivencia de la célula. Una lista de genes de mantenimiento humanos se puede encontrar, por ejemplo, en Eisenberg *et al.* (*Trends in Genetics* 19: 362-365, 2003). Un gen de mantenimiento preferido es un gen seleccionado de entre el grupo constituido por B2M, TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IPO8 y HMBS

Está claro para el experto en la materia que el procedimiento de la descripción presenta la ventaja de permitir el aislamiento y la caracterización fáciles de agentes activos, de materias primas cosméticas y/o de formulaciones cosméticas. En particular, el procedimiento de la descripción permite verificar fácilmente la tolerancia, la dermopenetración y la eficacia de un agente activo, de una composición dermocosmética o de una formulación cosmética. Por ejemplo, se puede desear, en algunos casos, verificar que estos agentes, estas composiciones o estas formulaciones sean bien tolerados y no induzcan la expresión de marcadores indicativos de un estrés, como por ejemplo los marcadores relacionados con la inflamación.

Por lo tanto, se describe asimismo en la presente memoria un procedimiento de evaluación de la tolerancia de un agente activo, de una composición dermocosmética o de una formulación cosmética, que comprende las etapas siguientes:

- a) obtener por lo menos una muestra (A) de células cutáneas de niños;
- b) poner en contacto un agente activo, una composición dermocosmética o una formulación cosmética, con la muestra (A);

- c) medir el nivel de expresión de por lo menos un marcador biológico que caracteriza una piel de niño identificado según el procedimiento de la invención y de la descripción;
- 5 d) medir el nivel de expresión de dicho marcador biológico en una muestra de control;
- e) calcular la relación entre el nivel de expresión de la etapa c) y el nivel de expresión de la etapa d), y
- 10 f) determinar si dicho agente activo, composición dermocosmética o formulación cosmética, son bien tolerados por la piel de niño.

La invención se refiere en particular a un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 11.

15 En la invención, el donante de la muestra (A) es más particularmente un donante que tiene una edad comprendida entre 0 y 1 mes, entre 1 mes y 2 años o entre 2 años y 16 años. Dicho de otra manera, el donante de la muestra (A) se selecciona de entre el grupo constituido por los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, por los lactantes, cuya edad está comprendida entre 1 mes y 2 años, y por los niños cuya edad está comprendida entre 2 años y 16 años.

20 La muestra de control es, por ejemplo, una muestra que no ha estado en contacto con el agente activo, la composición dermocosmética o la formulación cosmética, lo cual permite efectuar una comparación significativa entre el nivel de expresión de la etapa c) y el de la etapa d). Por ejemplo, la muestra (A) que no ha sido tratada por el agente activo, la composición o la formulación se puede utilizar como control. En este caso, el nivel de expresión del marcador biológico se mide en la muestra (A) antes y después de haber estado en contacto con el agente activo, la composición dermocosmética o la formulación cosmética.

30 El agente activo es un agente activo que es bien tolerado por la piel de niño si dicho agente activo no modula la expresión del marcador biológico. De la misma manera, la composición dermocosmética o la formulación cosmética son bien toleradas si la expresión del marcador biológico no es modulada por su adición sobre la muestra (A). Dicha modulación puede corresponder, según los casos, y en particular según la naturaleza del marcador biológico, a un aumento o a una disminución de la expresión de dicho marcador. En particular, la expresión de los marcadores de la inflamación es conocida por que aumenta cuando la piel de niño es agredida. Sin embargo, la expresión de estos marcadores de la inflamación no se ve afectada por agentes activos, composiciones o unas formulaciones bien toleradas, como lo muestran los resultados experimentales. Preferentemente, el marcador biológico de la etapa c) es un marcador de la inflamación. Más preferentemente, el marcador biológico de la etapa c) es IL1 o IL8. En la invención, el marcador biológico es un marcador de la inflamación seleccionado de entre IL1 o IL8.

40 El procedimiento puede comprender además una comparación de la viabilidad celular en la muestra tratada con el agente activo, la composición o la formulación y en la muestra de control. En este caso, el agente activo, la composición dermocosmética o la formulación cosmética es bien tolerado por la piel de niño si la viabilidad celular de la muestra no se ve afectada por la presencia del agente activo, la composición dermocosmética o la formulación cosmética.

45 Según otro modo de realización preferido, el procedimiento de la descripción comprende, por lo tanto, una etapa de determinación de la viabilidad celular en la muestra (A) tratada con el agente activo, la composición dermocosmética o la formulación cosmética, de determinación de la viabilidad celular en la muestra de control y de comparación entre ambas.

50 Numerosos ensayos para determinar la viabilidad celular están disponibles para el experto en la materia y se utilizan habitualmente en cosmetología. Se citará, en particular, la prueba MTT, descrita por ejemplo en Mosman *et al.* (J Immunol Methods, 65(1-2): 55-63, 1983).

55 Puede ser también interesante buscar unos agentes que provoquen una expresión incrementada de marcadores característicos de un intervalo de edad diferente, como, por ejemplo, unos genes y/o unas proteínas de la barrera.

60 En otro aspecto, el procedimiento permite, por lo tanto, aislar unos agentes activos que tengan un efecto sobre la piel de niño, y más particularmente sobre la piel de recién nacido, de lactante y/o de niño de 2 a 16 años de edad. La identificación de marcadores biológicos permite identificar los agentes activos que modulan o no la expresión de estos marcadores.

65 Por lo tanto, se describe en la presente memoria un procedimiento de identificación de un agente activo para la preparación de una composición dermocosmética para niño, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- a) obtener por lo menos una muestra (A) de células cutáneas de niños;

- b) poner en contacto un agente activo candidato con la muestra (A);
- c) medir el nivel de expresión de por lo menos un marcador biológico que caracteriza una piel de niño identificado según el procedimiento de la invención y de la descripción;
- d) medir el nivel de expresión de dicho marcador biológico en una muestra de control;
- e) calcular la relación entre el nivel de expresión de la etapa c) y el nivel de expresión de la etapa d), y
- f) determinar si dicho agente candidato es un agente activo para la preparación de una composición dermocosmética de la piel de niño.

Preferentemente, el donante de la muestra (A) es más particularmente un donante que tiene una edad comprendida entre 0 y 1 mes, entre 1 mes y 2 años o entre 2 años y 16 años. Dicho de otra manera, en este caso, el donante de la muestra (A) se selecciona de entre el grupo constituido por los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, por los lactantes, cuya edad está comprendida entre 1 mes y 2 años, y por los niños cuya edad está comprendida entre 2 años y 16 años.

Por lo tanto, se describe asimismo un procedimiento de identificación de un agente activo para la preparación de una composición dermocosmética para niño, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- a) obtener por lo menos una muestra (A) de células cutáneas, procediendo dicha muestra de un donante, seleccionándose dicho donante de entre el grupo constituido por los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, por los lactantes, cuya edad está comprendida entre 1 mes y 2 años, y por los niños cuya edad está comprendida entre 2 años y 16 años;
- b) poner en contacto un agente activo candidato con la muestra (A);
- c) medir el nivel de expresión de por lo menos un marcador biológico que caracteriza una piel de niño según el procedimiento de la invención y de la descripción;
- d) medir el nivel de expresión de dicho marcador biológico en una muestra de control;
- e) calcular la relación entre el nivel de expresión de la etapa c) y el nivel de expresión de la etapa d); y
- f) determinar si dicho agente activo candidato es un agente activo para la preparación de una composición dermocosmética de la piel de niño.

La muestra de control es una muestra que no ha estado en contacto con el agente activo candidato, lo cual permite efectuar una comparación significativa entre el nivel de expresión de la etapa c) y el de la etapa d). Por ejemplo, la muestra (A) que no ha sido tratada por el agente activo candidato se puede utilizar como control. En este caso, el nivel de expresión del marcador biológico se mide en la muestra (A) antes y después de haber estado en contacto con el agente activo candidato.

El agente activo candidato es un agente activo para la preparación de una composición dermocosmética de piel de niño si dicho agente activo permite modular la expresión del marcador biológico. Esta modulación puede corresponder, según los casos, y en particular según la naturaleza del marcador biológico, a un aumento o a una disminución de la expresión de dicho marcador. En particular, puede ser interesante aislar unos agentes activos que estimulan la expresión de los marcadores de la barrera cutánea o que limitan los marcadores de la inflamación.

En otro aspecto, el procedimiento permite el aislamiento de materia prima que se puede utilizar en la realización de formulaciones para la piel de niño y, más particularmente, para la piel de recién nacido, de lactante y/o de niño de 2 a 16 años de edad.

Una formulación es en la presente memoria una preparación resultante de una mezcla de diferentes materias primas, con el fin de responder a una demanda expresada, en general, en términos de propiedades. Las formulaciones se pueden utilizar en el campo cosmético, farmacéutico, alimentario y/o nutracéutico. Se pueden utilizar en humanos o animales, por aplicación tópica u oral.

El procedimiento permite así identificar unas materias primas que mejoran la tolerancia y la dermopenetración. La identificación de marcadores biológicos permite identificar las materias primas que modulan o no la expresión de estos marcadores. Por lo tanto, se describe asimismo en la presente memoria un procedimiento de identificación de una materia prima que se puede utilizar para la preparación de una formulación cosmética, farmacéutica, alimentaria y/o nutracéutica para niño, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- a) obtener por lo menos una muestra (A) de células cutáneas, procediendo dicha muestra de un donante que

tiene una edad inferior a 16 años;

- b) poner en contacto una materia prima candidata con la muestra (A);
- 5 c) medir el nivel de expresión de por lo menos un marcador biológico que caracteriza una piel de niño identificado según el procedimiento de la invención y de la descripción;
- d) medir el nivel de expresión de dicho marcador biológico en una muestra de control;
- 10 e) calcular la relación entre el nivel de expresión de la etapa c) y el nivel de expresión de la etapa d), y
- f) determinar si dicha materia prima es una materia prima para la preparación de una formulación cosmética, farmacéutica, alimentaria y/o nutracéutica para niño.

15 Preferentemente, el donante de la muestra (A) es más particularmente un donante que tiene una edad comprendida entre 0 y 1 mes, entre 1 mes y 2 años o entre 2 años y 16 años. Dicho de otra manera, en este caso el donante de la muestra (A) se selecciona de entre el grupo constituido por los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, por los lactantes, cuya edad está comprendida entre 1 mes y 2 años, y por los niños cuya edad está comprendida entre 2 años y 16 años.

20 Por lo tanto, se describe asimismo en la presente memoria un procedimiento de identificación de una materia prima que se puede utilizar para la preparación de una formulación cosmética, farmacéutica, alimentaria y/o nutracéutica para niño, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- 25 a) obtener por lo menos una muestra (A) de células cutáneas, procediendo dicha muestra de un donante, seleccionándose dicho donante de entre el grupo constituido por los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, por los lactantes, cuya edad está comprendida entre 1 mes y 2 años, y por los niños cuya edad está comprendida entre 2 años y 16 años;
- 30 b) poner en contacto una materia prima candidata con la muestra (A);
- c) medir el nivel de expresión de por lo menos un marcador biológico que caracteriza una piel de niño identificado según el procedimiento de la invención y de la descripción;
- 35 d) medir el nivel de expresión de dicho marcador biológico en una muestra de control;
- e) calcular la relación entre el nivel de expresión de la etapa c) y el nivel de expresión de la etapa d), y
- 40 f) determinar si dicha materia prima candidata es una materia prima para la preparación de una formulación cosmética, farmacéutica, alimentaria y/o nutracéutica para niño.

45 La muestra de control es una muestra que no ha estado en contacto con la materia prima candidata, lo cual permite efectuar una comparación significativa entre el nivel de expresión de la etapa c) y el de la etapa d). Por ejemplo, la muestra (A) que no ha sido tratada con la materia prima candidata se puede utilizar como control. En este caso, el nivel de expresión del marcador biológico se mide en la muestra (A) antes y después de haber estado en contacto con el agente activo candidato.

50 Está claro que el procedimiento permite así, no sólo aislar y caracterizar unas materias primas que se pueden utilizar en formulaciones, sino además ensayar unas formulaciones ya constituidas e identificar las que presentan unas cualidades de tolerancia, eficacia, toxicología, y dermopenetración óptimas con respecto a la piel de niño. El experto en la materia entenderá fácilmente, en efecto, que sólo es suficiente medir la expresión de uno o varios marcadores biológicos para determinar si una formulación se puede utilizar sobre la piel de niño.

55 Por tanto, se describe asimismo en la presente memoria un procedimiento para identificar una formulación cosmética, farmacéutica, alimentaria y/o nutracéutica para niño, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- 60 a) obtener por lo menos una muestra (A) de células cutáneas, procediendo dicha muestra de un donante que tiene una edad inferior a 16 años;
- b) poner en contacto una formulación candidata con la muestra (A);
- c) medir el nivel de expresión de por lo menos un marcador biológico que caracteriza una piel de niño identificado según el procedimiento de la invención y de la descripción;
- 65 d) medir el nivel de expresión de dicho marcador biológico en una muestra de control;

e) calcular la relación entre el nivel de expresión de la etapa c) y el nivel de expresión de la etapa d), y

5 f) determinar si dicha formulación cosmética candidata es una formulación cosmética, farmacéutica, alimentaria y/o nutracéutica para niño.

Preferentemente, el donante de la muestra (A) es más particularmente un donante que tiene una edad comprendida entre 0 y 1 mes, entre 1 mes y 2 años o entre 2 años y 16 años. Dicho de otra manera, el donante de la muestra (A) se selecciona de entre el grupo constituido por los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, por los lactantes, cuya edad está comprendida entre 1 mes y 2 años, y por los niños cuya edad está comprendida entre 2 años y 16 años.

Por lo tanto, se describe en la presente memoria también un procedimiento de identificación de una formulación cosmética, farmacéutica, alimentaria y/o nutracéutica para niño, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

20 a) obtener por lo menos una muestra (A) de células cutáneas, procediendo dicha muestra de un donante, seleccionándose dicho donante del grupo constituido por los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, por los lactantes, cuya edad está comprendida entre 1 mes y 2 años, y por los niños cuya edad está comprendida entre 2 años y 16 años.;

b) poner en contacto una formulación candidata con la muestra (A);

25 c) medir el nivel de expresión de por lo menos un marcador biológico que caracteriza una piel de niño identificado según el procedimiento de la invención y de la descripción;

d) medir el nivel de expresión de dicho marcador biológico en una muestra de control;

30 e) calcular la relación entre el nivel de expresión de la etapa c) y el nivel de expresión de la etapa d), y

f) determinar si dicha formulación cosmética candidata es una formulación cosmética, farmacéutica, alimentaria y/o nutracéutica para niño.

35 La muestra de control es una muestra que no ha estado en contacto con la formulación candidata, lo cual permite efectuar una comparación significativa entre el nivel de expresión de la etapa c) y el de la etapa d). Por ejemplo, la muestra (A) que no ha sido tratada con la formulación candidata se puede utilizar como control. En este caso, el nivel de expresión del marcador biológico se mide en la muestra (A) antes y después de haber estado en contacto con el agente activo candidato.

40 Según otro aspecto, los marcadores biológicos que caracterizan una piel de niño permiten caracterizar los trastornos cutáneos que afectan a los niños. Más particularmente, es posible caracterizar, con la ayuda de dichos marcadores biológicos, las enfermedades de la piel que afectan a los recién nacidos, a los lactantes y/o a los niños cuya edad está comprendida entre 2 y 16 años.

45 Por "trastornos cutáneos" se entienden en la presente memoria todas las reacciones anormales que pueden aparecer sobre la piel de un individuo. Esas afecciones alcanzan tanto a la piel en sí (es decir la epidermis, la dermis y/o la hipodermis), como a los poros de la piel, las glándulas sudoríparas y sebáceas anexas, el cabello o las uñas.

50 Los trastornos cutáneos se traducen en la presente memoria por unas lesiones, lo que corresponde a una piel dañada o en mal estado. La piel dañada incluye, por ejemplo, la piel sensible reactiva, la piel seca, la piel dañada por el sol, por las radiaciones, por el frío, por el estrés o por la contaminación, por una alergia, por una urticaria, por un eczema y otras formas de dermatitis, tal como la dermatitis atópica, el impétigo, la dermatitis irritativa, en particular la dermatitis irritativa del pañal o eritema del pañal, la dermatitis de contacto, la dermatitis seborreica de la piel y del cuero cabelludo (costras de leche), la psoriasis, la enfermedad de Lainer-Moussous, o también heridas o quemaduras. Por trastorno cutáneo, se entiende, por lo tanto, unos trastornos tan diversos como los herpes, los angiomas (incluyendo tuberosos, subcutáneos o planos), los hemangiomas, el acné del lactante, el acné del adolescente, las ictiosis (por ejemplo, vulgaris, congénita, arlequín, etc.), etc. Un trastorno cutáneo puede también estar causado o exacerbado por una infección externa, por ejemplo, de origen parasitario, viral, bacteriano o fúngico. Se incluyen así en particular en los trastornos cutáneos las verrugas, el prurigo estrófulo, la sarna, la pediculosis del cuero cabelludo o también las micosis. Estas últimas son unas enfermedades parasitarias provocadas por la proliferación de hongos microscópicos parásitos del organismo. Entre las micosis más frecuentes, se pueden citar las candidiasis y las pitirosporiasis, que son provocadas por la proliferación de levadura de la piel.

65 En particular, se describe en la presente memoria un procedimiento de identificación de por lo menos un marcador

biológico de un trastorno cutáneo que afecta a los niños, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- 5 a) obtener por lo menos una muestra (A') de células cutáneas de niños, procediendo dichas células de un sujeto afectado por dicho trastorno cutáneo;
- b) obtener por lo menos una muestra de control (B) de células cutáneas de niños, procediendo dichas células de un sujeto sano;
- 10 c) medir el nivel de expresión de un marcador biológico candidato en la muestra de la etapa a), siendo dicho marcador biológico candidato un marcador biológico que caracteriza una piel de niño tal como se identifica según el procedimiento de la invención y de la descripción descrito anteriormente;
- d) medir el nivel de expresión de dicho marcador biológico candidato en la muestra de la etapa b),
- 15 e) calcular la relación entre el nivel de expresión de la etapa a) y el nivel de expresión de la etapa b), y
- f) determinar si el marcador biológico candidato es un marcador biológico de un trastorno cutáneo que afecta a los niños.

20 Preferentemente, la muestra (A') procede de un donante que es más particularmente un donante que tiene una edad comprendida entre 0 y 1 mes, entre 1 mes y 2 años o entre 2 años y 16 años. Dicho de otra manera, en este caso el donante de la muestra (A) se selecciona de entre el grupo constituido por los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, por los lactantes, cuya edad está comprendida entre 1 mes y 2 años, y por los niños cuya edad está comprendida entre 2 años y 16 años.

25 Preferentemente, dicho marcador biológico candidato es un marcador biológico de un trastorno cutáneo si su nivel de expresión es diferente en una piel sana y en una piel que presenta los caracteres clínicos de dicho trastorno cutáneo. De manera más preferida, dicho marcador caracteriza un trastorno cutáneo si dicho marcador se expresa de manera diferenciada en el sujeto afectado por el trastorno cutáneo y en el sujeto sano. Esto se traduce por una relación en la etapa e) que es diferente de 1.

30 Como el experto en la materia podrá apreciar fácilmente, la identificación de marcadores específicos de enfermedades de piel de niño (y en particular de recién nacido, de lactante y/o de niño de 2 a 16 años de edad) presenta la ventaja inmediata de permitir el aislamiento de agentes activos para tratar dichas enfermedades de piel.

Por lo tanto, se describe asimismo en la presente memoria un procedimiento de identificación de un agente activo para tratar los trastornos cutáneos de los niños, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- 40 a) obtener por lo menos una muestra (A') de células cutáneas de niños, procediendo dichas células de un sujeto afectado por dicho trastorno cutáneo;
- b) poner en contacto un agente activo candidato con la superficie de dicha muestra (A');
- 45 c) medir en la muestra (A') de la etapa b) el nivel de expresión de por lo menos un marcador biológico de dicho trastorno cutáneo que afecta a un niño identificado según el procedimiento descrito anteriormente;
- d) medir el nivel de expresión de dicho marcador biológico en por lo menos una muestra de control;
- 50 e) calcular la relación entre el nivel de expresión de la etapa c) y el nivel de expresión de la etapa d), y
- f) determinar si dicho agente activo candidato es un agente activo para tratar los trastornos cutáneos de niños.

55 Preferentemente, la muestra (A') procede de un donante que es más particularmente un donante que tiene una edad comprendida entre 0 y 1 mes, entre 1 mes y 2 años o entre 2 años y 16 años. Dicho de otra manera, en este caso el donante de la muestra (A') se selecciona de entre el grupo constituido por los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, por los lactantes, cuya edad está comprendida entre 1 mes y 2 años, y por los niños cuya edad está comprendida entre 2 años y 16 años.

60 De manera ventajosa, un agente activo para tratar dicho trastorno cutáneo es capaz de modular la expresión de dicho marcador biológico de dicho trastorno cutáneo. Un candidato será por lo tanto un agente activo si conduce a una expresión de dicho marcador biológico diferente en las células (A') no tratadas con dicho candidato y en las células tratadas. En este caso, el control de la etapa d) será ventajosamente una muestra (A') no tratada. De manera aún más ventajosa, dicho agente activo permite modular el nivel de expresión de dicho marcador biológico en la muestra tratada de manera que sea similar al observado en una muestra sana. En este caso, la etapa d) comprenderá la medición del nivel de expresión de dicho marcador biológico en por lo menos dos muestras de

control, correspondiendo una a una muestra (A') no tratada y la otra a una muestra (B) sana. Si el marcador candidato es un agente activo para tratar los trastornos cutáneos, entonces se debería observar que la relación entre los niveles de expresión de (A') tratada y (A') no tratada es diferente de 1, mientras que aquella entre los niveles de expresión de (A') y (B) está próxima a 1.

5 El procedimiento se describirá más precisamente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

10 Ejemplo 1

Con el fin de identificar unos marcadores biológicos que caracterizan la piel de niño, los presentes inventores han emprendido un estudio de análisis genómico en función de la edad de los niños.

15 Materiales y métodos

Se extrajeron unas muestras de piel (extracción prepucial o plastia mamaria, según el sexo del donante) en donantes de 1 mes, 3 meses, 3 años, 6 años y 11 años de edad, así como en adultos.

20 Se generaron unos modelos de piel reconstruida a partir de estas muestras. Se produjeron así unas epidermis reconstruidas con los diferentes donantes seleccionados mediante la técnica de Poumay *et al.* (Arch Dermatol Res, 296(5): 203-211, 2004). Después de 2 días de cultivo en inmersión, las epidermis reconstruidas se cultivaron en la interfaz aire/líquido durante 5 o 9 días. Durante el tiempo de cultivo, el medio se renovó cada 2 o 3 días.

25 Al final de la incubación, las epidermis se aclararon y se congeló la mitad y la otra mitad se fijó en una disolución de formaldehído. Se realizaron unos cortes transversales en los tejidos fijados con microtomo, con el fin de verificar la estructura de las epidermis.

30 Paralelamente a estas epidermis reconstruidas se realizaron unos cultivos monocapa de queratinocitos que proceden de las diferentes muestras. Los diferentes queratinocitos se inocularon en medio de cultivo de placa de 12 pocillos. Después de 48 horas de incubación (día del paso de aire líquido para las epidermis reconstruidas), se lisaron los tapices celulares en TriPure Isolation Reagent® (Roche Applied Science) y se congelaron a -80°C.

35 Al final de la incubación, las epidermis o los tapices celulares se lisaron en TriPure Isolation Reagent® y los ARN totales se extrajeron según el protocolo recomendado por el proveedor. La cantidad y la calidad de los ARN se evaluó con la ayuda del Bioanalyzer (Agilent Technologies). Cada muestra de ARN se dividió en alícuotas, utilizándose una parte de la muestra para una hibridación sobre microchips, y congelándose el resto antes de ser utilizado para un ensayo de RT-PCR cuantitativa.

40 Los ARN se amplificaron y marcaron con la ayuda del GeneChip 3'IVT Express Kit (Affymetrix) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Después, se hibridaron sobre el chip Affymetrix® U219 en la estación de hibridación GeneAtlas™ fluidics station Affymetrix® durante 16 horas a 45°C. Esta etapa se realizó con la ayuda del kit de hibridación " GeneAtlas™ hybridization, wash and stain kit for 3' IVT arrays" (Affymetrix®). El chip U219 se analizó con la ayuda del escáner GeneAtlas™ Imaging station.

45 Los datos obtenidos por hibridación sobre chip se trataron y normalizaron con la ayuda de los programas proporcionados por Affymetrix (GCOS Affymetrix®, Expression Console Affymetrix®).

50 Los resultados obtenidos por hibridación sobre chip se confirmaron por análisis por RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR). Para ello, los ARN preparados se retro-transcriben en primer lugar en ADNc en presencia de oligo(dT) con la ayuda de la enzima Superscript II (Gibco).

Resultados

55 El análisis histológico ha mostrado que todas las epidermis reconstruidas tenían la morfología esperada el D5 y el D12, sea cual sea el donante, permitiendo validar los resultados de análisis génico. En particular, se encontraba bien la capa basal, la capa espinosa, la capa granulosa y la capa córnea en cada epidermis. Además, como se esperaba, el grosor de éstas era más elevado el D12 que el D5.

60 El análisis genómico ha permitido identificar varios marcadores cuya expresión varía en función de la edad del donante. Estos resultados se confirmaron por RT-PCR cuantitativa. Los marcadores se agruparon después por función biológica, con la ayuda del programa Pathway Studio® de Ariadne Genomics.

65 Así se ha podido identificar un grupo de genes de la barrera cutánea, que comprende los genes CLDN1, IVL, KRT1. La expresión de estos genes de la función de barrera epidérmica aumenta con la edad en las epidermis reconstruidas (figura 1A); sin embargo, estos genes se expresan menos en los más jóvenes. Estos resultados se

confirmaron por el análisis en RT-PCR cuantitativa en los queratinocitos (figura 1B). Los resultados obtenidos con las epidermis reconstruidas y los queratinocitos son similares en términos de perfil de expresión, lo cual valida el enfoque llevado a cabo. Por otra parte, es interesante señalar que estos resultados, así como los de Fluhr *et al.* (Exp Dermatol., 19(6): 483-492, 2010), ilustran la maduración con la edad de la función de barrera de la piel.

Asimismo, la expresión de los genes de respuesta al estrés (GPX3) y de defensa innata (DEFB1) aumenta con la edad (figuras 2A y 2B respectivamente).

Sin embargo, la expresión del gen MGST1 disminuye con la edad (figura 3). Este gen se expresa fuertemente en los niños de 1 y 3 meses, pero su transcripción disminuye después en un factor por lo menos igual a 5.

Por último, la expresión de los genes de las células madre, FN1, NOTCH1, NID1, KRT19, ITGBP1, ITGA6 y ITGB4, es importante después del nacimiento y disminuye con la edad (figura 4).

Ejemplo 2

La tolerancia del producto a base de azúcares de C7 de aguacate (perseosa de aguacate, véanse por ejemplo los documentos WO 2005/115421, WO 2008/025847 o WO 2011/073281) se ha evaluado sobre unas epidermis reconstruidas que proceden de donantes de 1 mes de edad.

Material y métodos

Se han reconstruido unas epidermis tal como se indica en el ejemplo 1 con unos queratinocitos que proceden de donantes de 1 mes. Los productos, una leche limpiadora y una loción hidratante que contienen ambas perseosa de aguacate, se han aplicado sobre epidermis reconstruidas durante 16 horas. Se realizó un control aplicando un 0,4% de SDS sobre unas muestras de epidermis reconstruidas de control.

Se analizó la proteína IL-8 en los sobrenadantes de cultivo mediante un ensayo Elisa. La viabilidad celular se evaluó mediante la prueba MTT. Por último, se realizó un análisis histológico sobre unos tejidos embebidos en parafina por coloración hematoxilina y eosina.

Resultados

Los resultados detallados en la tabla 1 muestran que la viabilidad celular no se ve afectada por la aplicación de la leche de limpieza y de la loción hidratante que contiene perseosa de aguacate. En comparación, la viabilidad de las células de la epidermis tratada con SDS se reduce de manera muy pronunciada, ya que sólo el 2% de las células siguen vivas después del tratamiento.

Por otro lado, el grosor de las capas de células vivas se mantiene a un nivel similar al del control en las muestras tratadas con los productos que contienen perseosa de aguacate. En comparación, el análisis histológico muestra que las capas de células vivas en la epidermis tratada con SDS corresponden sólo al 50-60% del grosor observado en el control (figura 5).

Estos resultados de biología celular se confirman por el análisis de la activación de la citoquina IL-8 en respuesta a los diferentes tratamientos. Mientras que el SDS provoca un fuerte aumento de la expresión de esta proteína, no se observa ningún efecto cuando las epidermis reconstruidas se tratan con la leche de limpieza o la loción hidratante que contienen perseosa de aguacate.

El conjunto de estos resultados muestra, por lo tanto, que los dos productos que contienen perseosa de aguacate no son tóxicos y son bien tolerados.

Tabla 1

	Control	+ SDS 0,4%	+ Loción	+ Loción hidratante
Viabilidad	100%	2%	84%	93%
Molécula inflamatoria IL8	100%	602%	99%	89%
Grosor de las capas vivas	100%	58%	88%	87%

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de identificación de por lo menos un marcador biológico que caracteriza una piel de niño, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:
- a) medir el nivel de expresión de un marcador biológico candidato en por lo menos dos cultivos de piel reconstruida (A) y (A'), procediendo dichos cultivos de un donante seleccionado de entre el grupo constituido por los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, y por los lactantes, cuya edad está comprendida entre 1 mes y 2 años; perteneciendo dichos cultivos (A) y (A') a dos clases de edad diferentes,
 - b) medir el nivel de expresión de dicho marcador biológico candidato en por lo menos un cultivo de piel reconstruida de control (B),
 - c) calcular la relación entre el nivel de expresión de la etapa a) y el nivel de expresión de la etapa b), y
 - d) determinar que el marcador candidato es un marcador biológico que caracteriza una piel de niño, si
 - el cultivo de control (B) procede de un adulto, y
 - la relación de la etapa c) es diferente de 1.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho marcador biológico es un marcador génico, un marcador proteico, un marcador lipídico o un marcador metabólico.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que dicho marcador biológico candidato es un marcador génico seleccionado de entre el grupo que comprende los marcadores del metabolismo celular, los marcadores de la respuesta al estrés, los marcadores de la inflamación, los marcadores de la inmunidad, los marcadores de apoptosis, los marcadores de crecimiento/proliferación y del ciclo celular, los marcadores de la señalización celular, los marcadores de migración y de diferenciación, los marcadores de la barrera epidérmica, los marcadores de adhesión y los marcadores de las células madre pluripotentes de la piel.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, caracterizado por que el nivel de expresión de dicho marcador génico se determina mediante un método seleccionado de entre la transferencia northern blot, la transferencia southern blot, la PCR, la RT-PCR, la RT-PCR cuantitativa, el SAGE y sus derivados, los chips de ácidos nucleicos, en particular los chips de ADNc, los chips de oligonucleótidos y los chips de ARNm, los chips de tejido y el RNA-Seq.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que dicho marcador biológico candidato es un marcador proteico seleccionado de entre el grupo que comprende los marcadores del metabolismo celular, los marcadores de la respuesta al estrés, los marcadores de la inflamación y de la inmunidad, los marcadores de apoptosis, los marcadores de crecimiento/proliferación y del ciclo celular, los marcadores de la señalización celular, los marcadores de migración y de diferenciación, los marcadores de la barrera epidérmica, los marcadores de adhesión y los marcadores de las células madre pluripotentes de la piel.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 5, caracterizado por que el nivel de expresión de dicho marcador proteico se determina mediante un método seleccionado de entre la inmunohistología, la inmunoprecipitación, la transferencia western blot, la transferencia dot blot, ELISA o ELISPOT, los chips de proteínas, los chips de anticuerpos, o los chips de tejido acoplados a la inmunohistoquímica, las técnicas de FRET o de BRET, los métodos de microscopía o de histoquímica, incluyendo en particular los métodos de microscopía confocal y de microscopía electrónica, los métodos basados en la utilización de una o varias longitudes de onda de excitación y de un método óptico adaptado, como un método electroquímico (las técnicas de voltametría y de amperometría), el microscopio de fuerza atómica, y los métodos de radiofrecuencia, como la espectroscopía de resonancia multipolar, confocal y no confocal, detección de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia, transmitancia, y birrefringencia o índice de refracción (por ejemplo, por resonancia de los plasmones de superficie, o "Surface plasmon resonance" en inglés, por elipsometría, por método de espejo resonante, etc.), citometría de flujo, formación de imágenes por resonancia radioisotópica o magnética, análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); por espectrofotometría HPLC-Mass, por cromatografía líquida/espectrofotometría de masa/espectrometría de masa (LC-MS/MS).
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que dicho marcador candidato es un marcador lipídico de la capa córnea, seleccionado preferentemente de entre las ceramidas, el colesterol y los ácidos grasos libres, un marcador lipídico del sebo o un marcador de la película hidrolipídica.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que dicho marcador lipídico es una ceramida seleccionada de entre el grupo constituido por las ceramidas CER 1 a 9.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2, 7 y 8, caracterizado por que el nivel de expresión de

dicho marcador lipídico se determina mediante un método seleccionado de entre la cromatografía líquida en fase gaseosa (HPLC), en particular la cromatografía líquida en fase gaseosa acoplada a un detector evaporativo de difracción de la luz (HPLC-ESD); la cromatografía en capa fina (TLC); la resonancia magnética nuclear (RMN); la microespectroscopía confocal *in vivo* de Raman; la espectrometría de masas, la cromatografía en fase gaseosa acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS); y la cromatografía en fase líquida de rendimiento ultra alto (UPLC).

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que dicho marcador candidato es un marcador metabólico seleccionado de entre los marcadores de la construcción de la epidermis y de la función de barrera de la piel, en particular los factores naturales de hidratación, también denominado NMF (Natural Moisturizing Factor); las hormonas de la piel; las actividades enzimáticas antioxidantes; las actividades enzimáticas relacionadas con la eliminación de los compuestos tóxicos exógenos, en particular las enzimas de fase I y las enzimas de fase II; los marcadores relacionados con la pigmentación de la piel, en particular la melanina y las actividades enzimáticas que regulan la síntesis de la melanina; los marcadores relacionados con los adipocitos, en particular la relación entre los adipocitos blancos y los adipocitos marrones, las adipocitoquinas y las actividades enzimáticas relacionadas con la lipólisis.

11. Procedimiento de evaluación de la tolerancia de un agente activo, de una composición dermocosmética o de una formulación cosmética, que comprende las etapas siguientes:

- a) obtener por lo menos un cultivo de piel reconstruida (A) que procede de un donante seleccionado de entre el grupo constituido por los recién nacidos, cuya edad está comprendida entre 0 y 1 mes, por los lactantes, cuya edad está comprendida entre 1 mes y 2 años, y por los niños cuya edad está comprendida entre 2 años y 16 años;
- b) poner en contacto un agente activo, una composición dermocosmética o una formulación cosmética con el cultivo (A);
- c) medir el nivel de expresión de por lo menos un marcador biológico que caracteriza una piel de niño;
- d) medir el nivel de expresión de dicho marcador biológico en un cultivo de control;
- e) calcular la relación entre el nivel de expresión de la etapa c) y el nivel de expresión de la etapa d), y
- f) determinar que dicho agente activo, la composición dermocosmética o la formulación cosmética es bien tolerado por el cultivo de piel reconstruida si dicho agente activo, dicha composición dermocosmética o dicha formulación cosmética no induce la expresión de dicho marcador biológico;

en el que dicho marcador biológico es un marcador de la inflamación seleccionado de entre IL-1 e IL-8.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado por que la muestra de control de la etapa d) es el cultivo que no ha sido puesto en contacto con el agente activo, la composición dermocosmética o la formulación cosmética.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, caracterizado por que dicho procedimiento comprende una etapa suplementaria de determinación de la viabilidad celular en el cultivo (A) tratado con el agente activo, la composición dermocosmética o la formulación cosmética, de determinación de la viabilidad celular en el cultivo de control y de comparación entre ambas.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado por que las células de dicho cultivo proceden de un explante de tejido cutáneo o de células madre diferenciadas en células cutáneas.

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, caracterizado por que el cultivo comprende por lo menos unos fibroblastos o unos queratinocitos.

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, caracterizado por que la piel reconstruida se selecciona de entre el grupo que comprende los modelos de dermis, los modelos de epidermis, los modelos de hipodermis, los modelos de piel que comprenden una dermis y una epidermis, y los modelos de piel que comprenden una dermis, una epidermis y una hipodermis.

Figura 1A

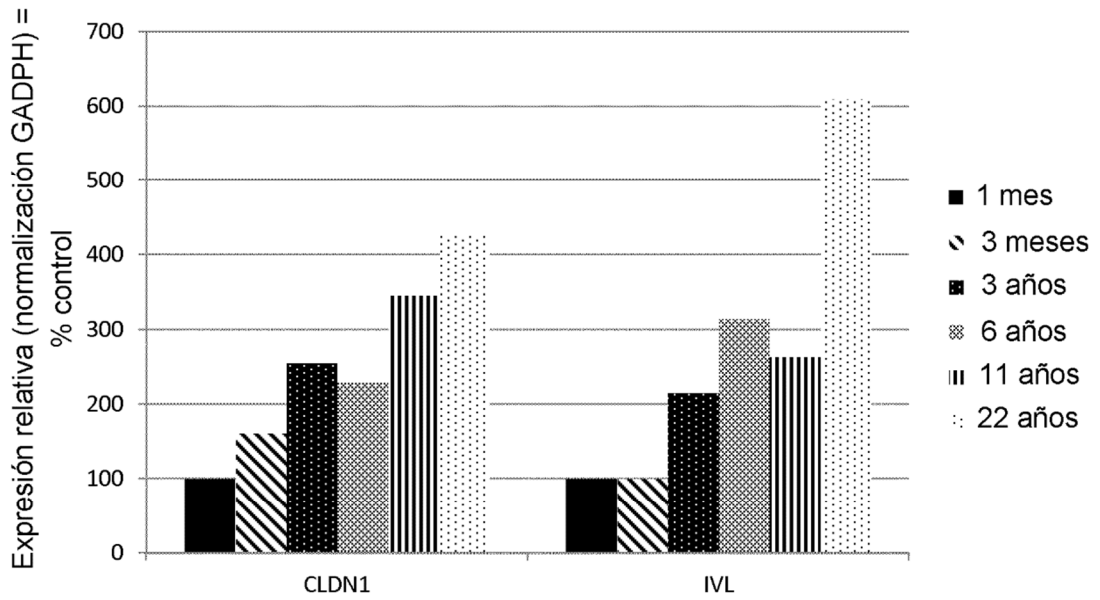


Figura 1B

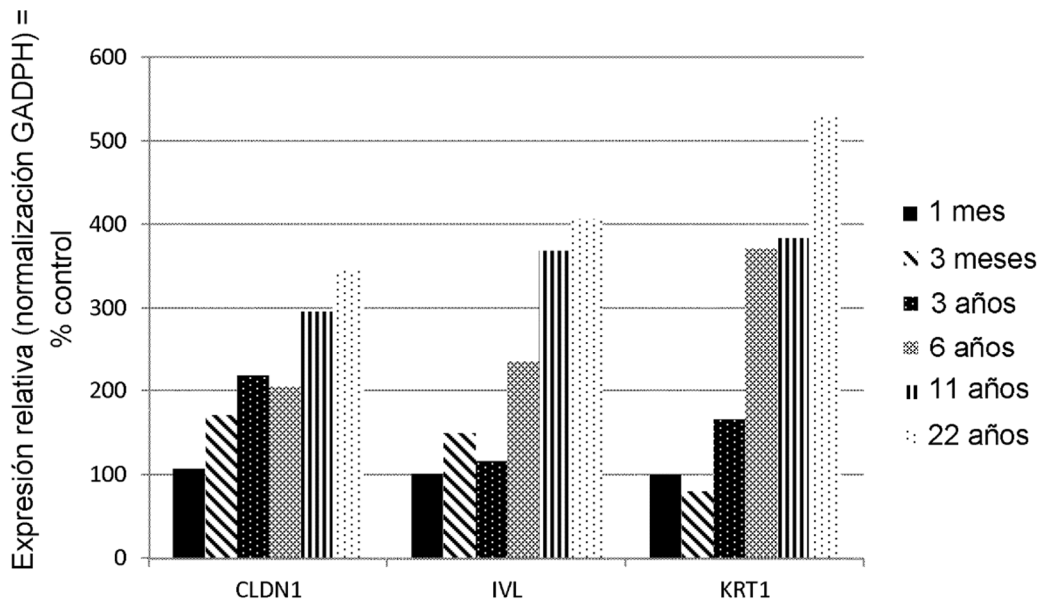


Figura 2A

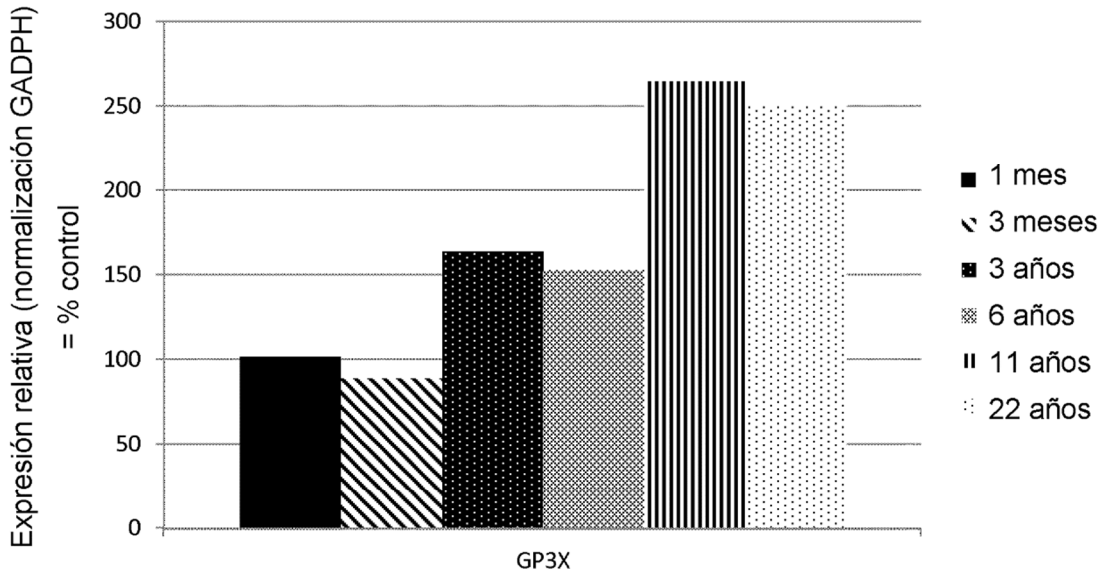


Figura 2B

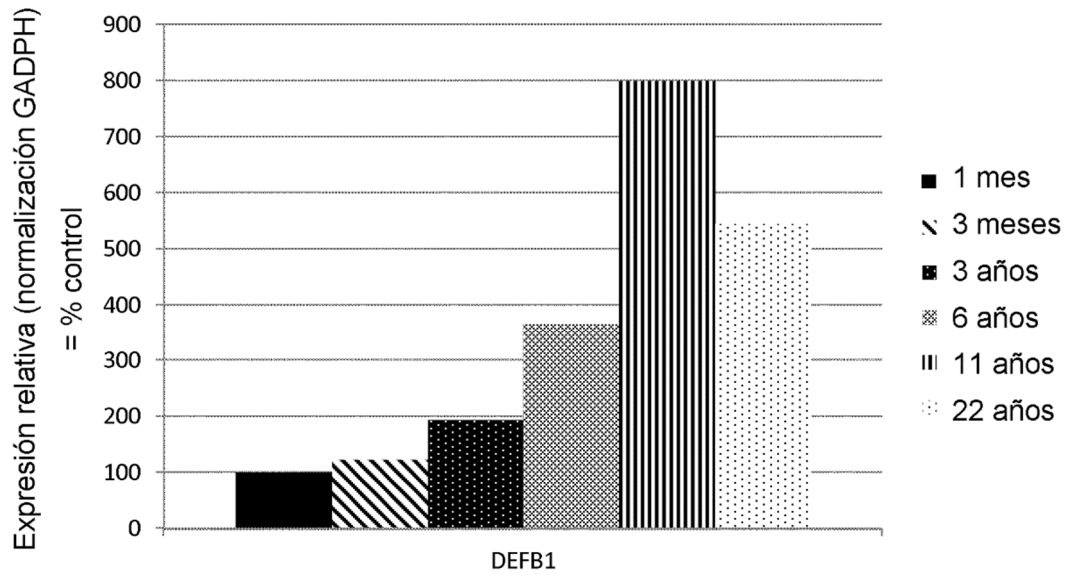


Figura 3

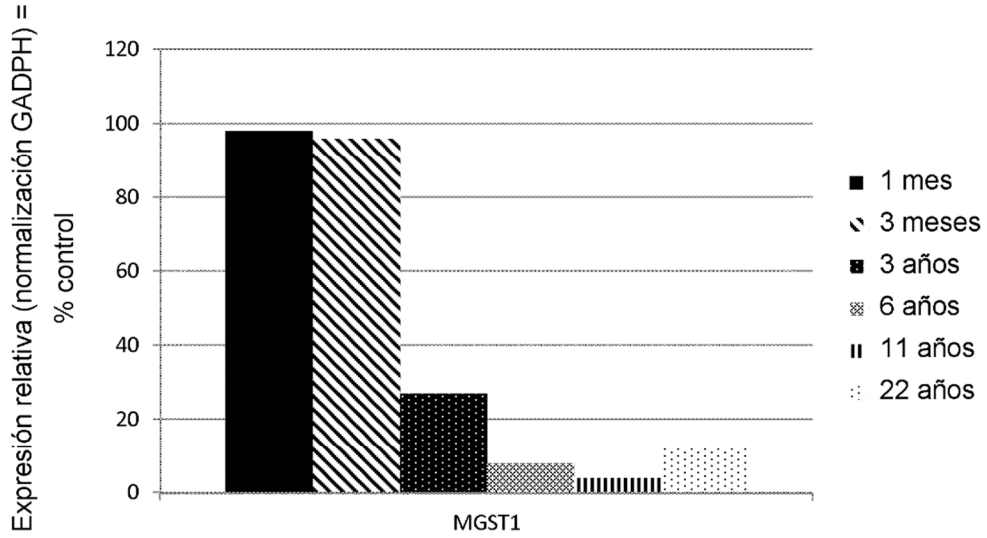


Figura 4

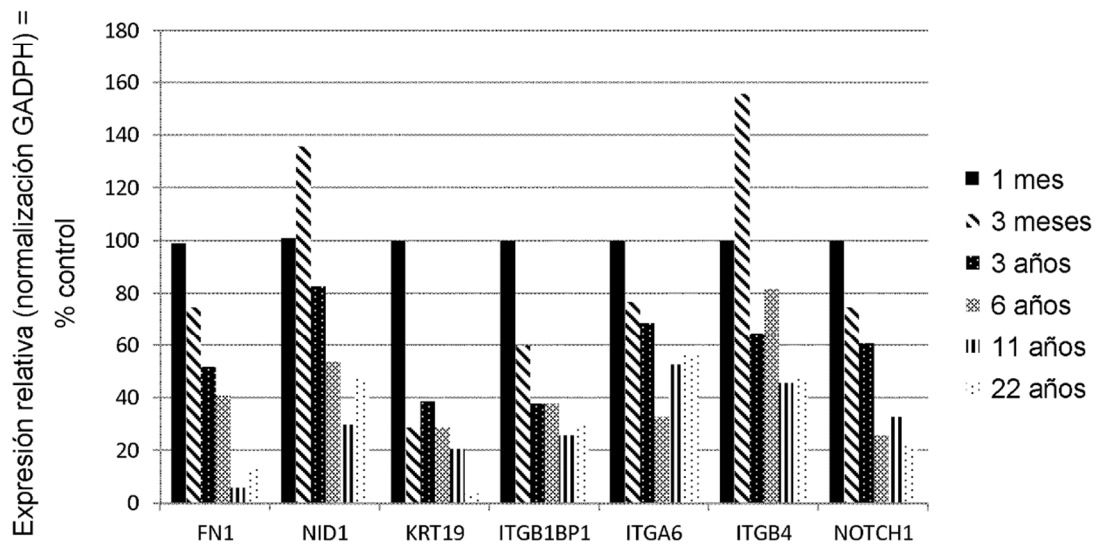
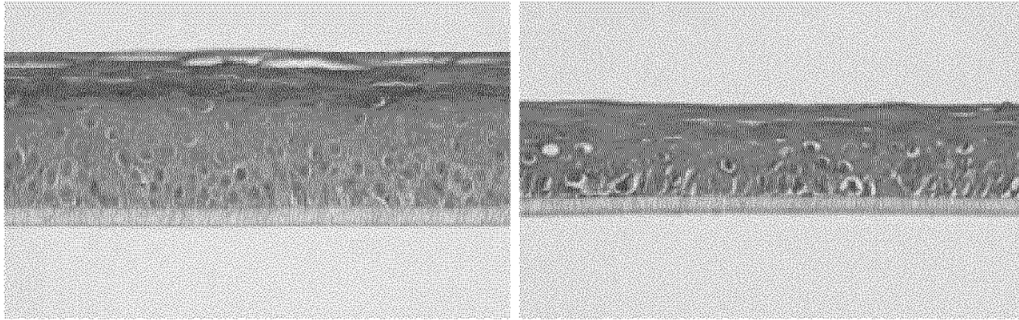
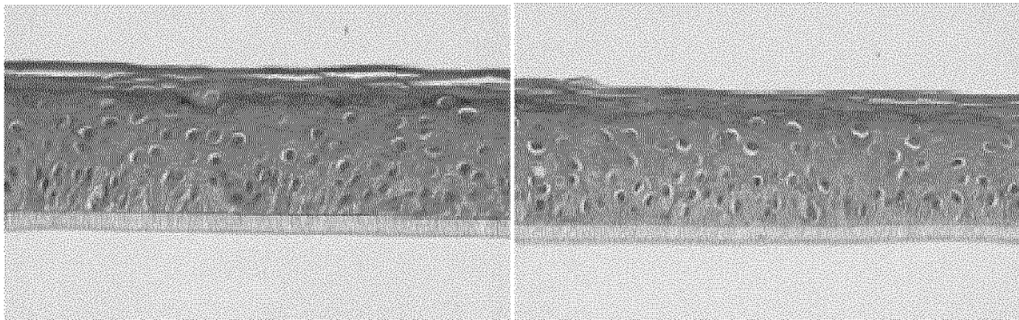


Figura 5



Control

+ SDS 0,4 %



+ Leche limpiadora

Loción hidratante