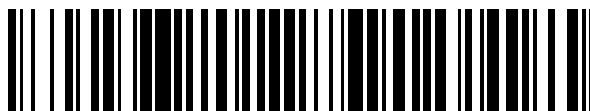


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 101**

51 Int. Cl.:

A61K 31/5685 (2006.01)

A61K 31/566 (2006.01)

A61K 31/453 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 15/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2005 E 05797148 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 1802312**

54 Título: **Precursor de esteroides sexuales en combinación con un modulador selectivo del receptor de estrógenos para la prevención y tratamiento de atrofia vaginal en mujeres postmenopáusicas**

30 Prioridad:

20.10.2004 US 620452 P

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

04.12.2015

73 Titular/es:

**ENDORECHERCHE INC. (100.0%)
2989 DE LA PROMENADE SAINTE-FOY
QUEBEC G1W 2J5, CA**

72 Inventor/es:

**EL-ALFY, MOHAMED;
LABRIE, FERNAND y
BERGER, LOUISE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 553 101 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

Precursor de esteroides sexuales en combinación con un modulador selectivo del receptor de estrógenos para la prevención y tratamiento de atrofia vaginal en mujeres postmenopáusicas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al precursor de esteroides sexuales dehidroepiandrosterona (DHEA) junto con el modulador selectivo del receptor de estrógenos (SERM) acolbifeno, para su uso en el tratamiento o en la reducción de la probabilidad de adquirir una enfermedad vaginal que afecta a la capa de la lámina propia de la vagina, en la que la enfermedad vaginal es una atrofia de la capa de la lámina propia en mujeres postmenopáusicas. La invención también se refiere a kits y a composiciones farmacéuticas para llevar a la práctica el uso anterior.
- 10 En el documento US 5.843.932, se notificaba el efecto sobre la atrofia vaginal de un tratamiento de uno, tres o seis meses con DHEA administrada a una dosis de 30 mg dos veces al día en una solución de un 50 % de etanol - 50 % de propilenglicol sobre un área de 2 cm² de la piel dorsal en una rata ooforectomizada. El análisis histopatológico mostró la proliferación y la mucificación del epitelio vaginal y la reversión de la atrofia de la mucosa vaginal en las ratas tratadas con DHEA.
- 15 El estudio llevado a cabo con la rata cuando se aplicaba DHEA en la piel dorsal durante 1, 3 y 6 meses solo analizaba el efecto sobre el epitelio vaginal (Sourla et al., 1998, J. Steroid Biochem Mol Biol., 66 (3): 137 - 149) y no sobre las otras dos capas, a saber, la lámina propia y la muscular. Después se observó que la DHEA era aproximadamente 10 veces más eficaz sobre el epitelio vaginal cuando se aplicaba tópicamente que cuando se administraba sobre la piel en un sitio distante de la vagina, requiriendo por lo tanto una absorción sistémica para ejercer su acción.
- 20 En un estudio previo sobre el efecto de la DHEA administrada en la piel de mujeres postmenopáusicas durante 12 meses en una crema de DHEA al 10 %, únicamente se evaluó la actividad estrogénica de la DHEA (Labrie et al., 1997, J. Clin. Endocrinol. Metab., 82: 3498 - 3505). Se indicaba (página 3.500) "se analizó la citología vaginal como un parámetro específico de la acción estrogénica de la DHEA". Esto es debido al método de evaluación, a saber, un frotis vaginal, que se limita a las células superficiales y fácilmente extraíbles del epitelio.
- 25

Antecedentes de la técnica relacionada

- La sequedad vaginal afecta aproximadamente al 50 % de las mujeres postmenopáusicas a una edad de entre 50 y 60 años, y al 72 % después de los 70 años (Rossin-Amar, 2000, Gynecol Obstet Fertilo, 28 (3): 245 - 249). De estas mujeres, aproximadamente el 80 % experimenta trastornos urogenitales, especialmente vaginitis y dispareunia
- 30 (Pandit y Ouslander, 1997, Am J Med Sci, 314 (4): 228 - 31). Dado que se cree que estos problemas están al menos parcialmente relacionados con la pérdida de los esteroides sexuales, debería considerarse una apropiada terapia de sustitución hormonal local en la menopausia. Recientemente se ha reconocido que las mujeres postmenopáusicas no solo carecen de todos los estrógenos ováricos, sino que también van careciendo progresivamente de los andrógenos procedentes de la transformación intracrina periférica de la dehidroepiandrosterona (DHEA) tanto en
- 35 andrógenos como en estrógenos (Labrie et al., 1991, Mol Cell Endocrinol, 78: C113 - C118; Labrie et al., 1995, Ann NY Acad Sci, 774: 16 - 28; Labrie et al., 2003, End Rev, 24 (2): 152 - 282). De hecho, la DHEA y la DHEA-S en suero disminuyen progresivamente desde la edad de entre los 30 y los 40 años (Labrie et al., 2003, End Rev, 24 (2): 152 - 182; Orentreich et al., 1984, J Clin Endocrinol Metab, 59: 551 - 555; Labrie et al., 1997, J Clin Endocrinol Metab, 82: 2396 - 2402). Una serie de estudios indica que unos bajos niveles de DHEA y de DHEA-5 está asociada con una serie de patologías y enfermedades relacionadas con la edad (Labrie et al., 1997, J. Clin. Endocrinol
- 40 Metab., 82: 3498 - 3505; Helzlsouer et al., 1992, Cancer Res, 52 (1): 1 - 4; Szathmari et al., 1994, Osteoporos Int, 4 (2): 84 - 88; Thoman y Weigle, 1989, Adv Immunol, 46: 221 - 261; Barrett-Connor et al., 1999, J Reprod Med, 44 (12): 1012 - 1020; Barrett-Connor et al., 1999, J Am Geriatr Soc, 47 (6): 685 - 691).
- Una metodología eficaz para aliviar la sequedad vaginal y otros síntomas menopáusicos es el uso de una terapia de sustitución hormonal (HRT) (Greendale y Judd, 1993, J Am Geriatr Soc, 41 (4): 426 - 436; Studd et al., 1980, Pasetto, Paleotti y Ambrus Eds, MT Press Lancaster, p: 127 - 139). Sin embargo, unos estudios clínicos recientes han indicado que la combinación de estrógenos y de progestinas aumenta la incidencia de cáncer de mama, con un potencial impacto negativo sobre acontecimientos cardiovasculares (Colditz et al., 1995, N Engl J Med, 332: 1589 - 1593; Ross et al., 2000, J Natl Cancer Inst, 92 (4): 328 - 332; Rossouw et al., 2002, JAMA, 288 (3): 321 - 333).
- 50 Mientras tanto, existe un creciente interés en el potencial de una terapia de sustitución combinada de estrógeno - andrógeno (Rosenberg et al., 1997, J Reprod Med, 42 (7): 394 - 404; Burd et al., 2001, Curr Women Health Rep, 1 (3): 202 - 205), aunque el uso del componente estrogénico está limitado por las potenciales complicaciones mencionadas anteriormente. Basándonos en los recientes avances en nuestra comprensión de la fisiología de los esteroides sexuales humanos, especialmente en las mujeres postmenopáusicas (Labrie et al., 1991, Mol Cell
- 55 Endocrinol, 78: C113 - C128; Labrie et al., 2003, End Rev, 24 (2): 152 - 182), el uso de DHEA se transforma en una posibilidad para proporcionar a las mujeres postmenopáusicas los niveles apropiados de andrógenos y de estrógenos sintetizados en tejidos específicos mediante mecanismos intracrininos, sin ningún efecto sistémico (Labrie et al., 1997, J. Clin. Endocrinol, Metab., 82: 3498 - 3505: 16 - 28; Labrie et al., 2003, End Rev, 24 (2): 152 - 182;

Labrie, 2001, Ref Gyn Obstet, 8: 317 - 322; Lasco et al., 2002, 145: 457 - 461). La restauración de los elementos sensibles a los andrógenos de la función vaginal también debería ayudar en la acción de los inhibidores de la fosfodiesterasa de GMPc de tipo 5 o de la prostaglandina E1.

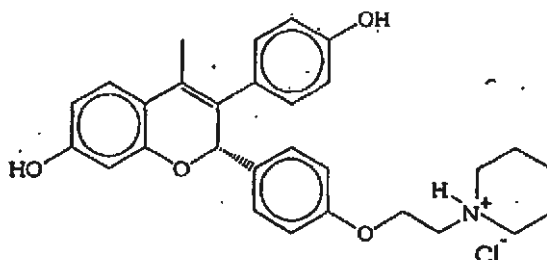
- El modulador selectivo del receptor de estrógenos (SERM) acolbifeno (EM-652) es un derivado de benzopirano desarrollado originalmente para la prevención y el tratamiento del cáncer de mama (Gautier et al., 1997, J Med Chem, 40: 2117 - 2122). El acolbifeno es el compuesto que tiene la mayor afinidad por el ER de entre todos los compuestos conocidos (Gautier et al., 1997, J Med Chem, 40: 2117 - 2122; Labrie et al., 1999, J Steroid Biochem Mol Biol, 69 (1 - 6): 51 - 84; Tremblay et al., 1997, Mol. Endocrinol., 11: 353 - 365) y ejerce su actividad tanto sobre el ER α como sobre el ER β (Tremblay et al., 1998, Endocrinology, 139: 111 - 118). Este compuesto muestra una actividad antiestrogénica pura y muy potente en la glándula mamaria y en el endometrio, mientras que disminuye el colesterol y los triglicéridos en suero y previene la pérdida ósea, al menos en la rata (Labrie et al., 1999, J Steroid Biochem Mol Biol, 69 (1 - 6): 51 - 84). Además, se ha demostrado que la administración de DHEA no solo no interfiere, sino que ejerce un efecto inhibidor aditivo con el antiestrógeno puro acolbifeno sobre el crecimiento de tumores de mama humanos en ratones lampiños (Dauvois et al., 1991, Cancer Res, 51: 3131 - 3135; Luo et al., 1997, Endocrinology, 138: 4435 - 4444). Se ha propuesto el tratamiento combinado con DHEA y acolbifeno como una metodología quimiopreventiva y terapéutica beneficiosa en el cáncer de mama (Labrie, 2001, Ref Gynecol Obstet, 8: 317 - 322). De hecho, el efecto inhibidor de la DHEA sobre el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de mama humano en ratones lampiños apoya su uso como una terapia de sustitución hormonal (Dauvois et al., 1991, Cancer Res, 51: 3131 - 3135; Couillard et al., 1998, J Natl Cancer Inst, 90: 772 - 778).
- El documento WO 99/63974 desvelaba usos médicos de un modulador selectivo del receptor de estrógenos junto con precursores de los esteroides sexuales

Sumario de la invención

- La presente invención proporciona: (1) DHEA en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de acolbifeno como parte de una terapia de combinación, (2) una composición farmacéutica para aplicación vaginal que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de DHEA, una cantidad terapéuticamente eficaz de acolbifeno, y un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, (3) una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de DHEA, una cantidad terapéuticamente eficaz de acolbifeno, y un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, y (4) un kit que comprende un primer recipiente que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de DHEA, y que comprende un segundo recipiente que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de acolbifeno, para su uso en el tratamiento o en la reducción de la probabilidad de adquirir una enfermedad vaginal que afecta a la capa de la lámina propia, en la que la enfermedad vaginal es atrofia de la capa de la lámina propia en mujeres postmenopáusicas.

- Según se usa en el presente documento, un modulador selectivo del receptor de estrógenos (SERM) es un compuesto que, bien directamente o bien a través de su metabolito activo, funciona como un antagonista del receptor de estrógenos ("antiestrógeno") en el tejido mamario, proporcionando además un efecto estrogénico o de tipo estrogénico sobre el tejido óseo y sobre los niveles de colesterol en suero (es decir, reduciendo el colesterol en suero). Es probable que los compuestos no esteroideos que funcionan como antagonistas del receptor de estrógenos *in vitro* o en tejido mamario humano o de rata (especialmente si el compuesto actúa como un antiestrógeno sobre las células de cáncer de mama humano) funcionen como un SERM. Por el contrario, los antiestrógenos esteroideos tienden a no funcionar como un SERM debido a que tienden a no mostrar ningún efecto beneficioso sobre el colesterol en suero. Hemos ensayado los antiestrógenos no esteroideos y hemos averiguado que funcionan como un SERM, incluido el acolbifeno (EM-01538):

Acolbifeno



Breve descripción de los dibujos

- La **Figura 1** muestra la división a lo largo del eje longitudinal de la vagina de rata en siete segmentos transversales, desde el orificio externo (*ostium*) (segmento 1) hasta el nivel del cuello del útero (segmento 7) (*portio vaginalis uteri*).
- La **Figura 5** muestra el espesor (μm) de los tres diferentes compartimentos vaginales a nivel del quinto segmento de la vagina de rata: a) epitelio, a) lámina propia, c) muscular y d) espesor total, después de 36 semanas de tratamiento

de animales OVX con DHEA, Premarina y Acolbifeno, solos o en combinación. Como controles de referencia se añaden animales intactos en estro y en proestro. Los grupos que comparten la misma letra no son estadísticamente diferentes a una $p < 0,05$.

5 La Figura 6 muestra la compacidad de las fibras de colágeno de la lámina propia, que está ilustrada en el segmento 5 como baja (A), moderada (B) o alta (C).

10 La **Figura 7** muestra microfotografías de los tres compartimentos vaginales: (E) epitelio, (L) lámina propia y (M) muscular, a nivel del quinto segmento de la vagina de rata, con énfasis en el espesor muscular relativo de los diferentes grupos. La separación de las 3 capas de las paredes vaginales con barras está indicada para estimar mejor la distribución del espesor entre los diferentes grupos. A) Intacto, B) OVX y OVX tratado con C) Acolbifeno, D) Premarina, E) Premarina + Acolbifeno, F) DHEA; G) DHEA + Acolbifeno, H) DHEA + Premarina, I) DHEA + Premarina + Acolbifeno.

La Figura 8 muestra el peso vaginal medido 36 semanas después de la OVX y del tratamiento de los animales OVX con Acolbifeno, Premarina y DHEA, solos o en combinación. Como controles se añaden animales intactos.

15 La Figura 9 muestra la localización inmunohistoquímica del AR, del ER α y del PR en (E) el epitelio, (L) la lámina propia y (M) la muscular, a nivel del quinto segmento vaginal de los diferentes grupos. Las barras indican la separación entre los tres compartimentos vaginales.

Descripción detallada de la invención

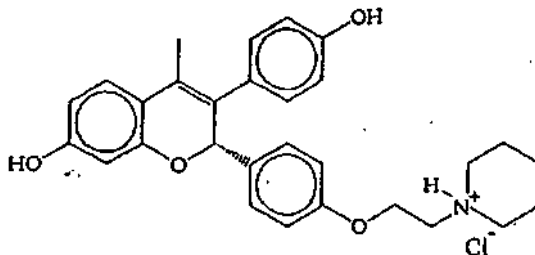
20 Después del cese de la secreción de estrógenos por parte de los ovarios en la menopausia, prácticamente todos los andrógenos y estrógenos son sintetizados en tejidos objetivo periféricos mediante un mecanismo intracrino a partir de la dehidroepiandrosterona (DHEA) de origen adrenal. De hecho, en ausencia de los estrógenos ováricos, es probable que la disminución gradual en la DHEA en suero juegue un papel importante en la sequedad vaginal, la inflamación, la dispareunia y la disfunción sexual frecuentemente asociadas con la menopausia. Con objeto de evaluar los efectos específicos estrogénicos y/o androgénicos de una potencial novedosa terapia de sustitución hormonal que podría, entre otros efectos beneficiosos, aliviar la sequedad vaginal, hemos analizado la morfología de la vagina de rata ocho meses después de una ooforectomía (OVX) y del tratamiento de los animales OVX con DHEA, con estrógenos conjugados (Premarina) y con el modulador selectivo del receptor de estrógenos acolbifeno, administrado solo o en combinación. En animales intactos en estro y en las ratas OVX tratadas con Premarina, el patrón estrogénico típico vaginal es un epitelio escamoso estratificado queratinizado. La OVX dio lugar a una atrofia general asociada con cambios inflamatorios, mientras que el acolbifeno redujo la incidencia de la inflamación y aumentó el número y el tamaño de las células mucosas del epitelio vaginal. A las dosis usadas, la Premarina reversionó completamente la atrofia epitelial inducida por la OVX, mientras que la DHEA reversionó parcialmente la atrofia. De hecho, el epitelio vaginal de los animales OVX tratados con DHEA se hizo hiperplásico con 3 - 5 capas de mucus cilíndrico y células caliciformes típicas de un efecto androgénico. La adición de Premarina a la DHEA dio lugar a un epitelio más grueso que en los animales intactos. Además, la compacidad de las fibras de colágeno de la lámina propia estaba aumentada por la DHEA. Por otro lado, el tratamiento solo con acolbifeno mostró una tendencia a un aumento en el espesor de la lámina propia, que alcanzó los valores del intacto cuando se combinó con DHEA.

35 Después de la OVX, la capa muscular vaginal había disminuido en un 46 %, un efecto que fue revertido en un 41 % y en un 100 % por la DHEA y por la Premarina, respectivamente. Por otro lado, la disminución del 50 % en el espesor total de la pared vaginal después de la OVX fue revertida en un 42 % y en un 93 % por la DHEA y por la Premarina, respectivamente, mientras que la combinación de DHEA y acolbifeno reversionó el espesor total de la pared vaginal a un valor en era significativamente diferente de los animales de control intactos.

La inmunohistoquímica reveló un fuerte marcaje del receptor de andrógenos (AR) en todos los grupos tratados con DHEA. Por otro lado, no se detectó el marcaje del receptor de estrógenos alfa (ER α) ni del receptor de progesterona (PR) en ninguno de los grupos tratados con acolbifeno.

45 En conclusión, el tratamiento con DHEA o con la combinación de DHEA y acolbifeno previene parcial o completamente los cambios atróficos inducidos por la OVX observados en varias capas de la pared vaginal a través de un efecto predominante androgénico, según se reveló por la mucificación epitelial y la regulación por aumento del AR. Los datos actuales también muestran unos efectos particularmente interesantes de la DHEA sobre las tres capas de la pared vaginal, a saber, un epitelio muy mucificado, un aumento en la compacidad de las fibras de colágeno de la lámina propia, así como un aumento en el espesor muscular. Por lo tanto, la DHEA ejerce ambos efectos androgénicos y estrogénicos sobre la mucosa vaginal, proporcionando así una terapia de sustitución más fisiológica. Aunque cada uno de los compuestos analizados tiene unos potenciales efectos beneficiosos sobre la función vaginal, la DHEA sola o en combinación podría muy bien aliviar óptimamente la sequedad vaginal y restaurar la fisiología vaginal global y ayudar a corregir la disfunción sexual asociada con la menopausia. La DHEA y los otros componentes podrían ser administrados localmente o sistémicamente.

El acobifeno (EM-1538, también denominado EM-652 · HCl) notificado en el documento US 6.710.059 B1



es la sal de clorhidrato del potente antiestrógeno EM-652.

El acobifeno administrado de acuerdo con la invención se administra preferentemente en un intervalo de dosificación de entre 0,01 y 10 mg/kg de peso corporal por día (preferentemente de entre 0,05 y 1,0 mg/kg), siendo preferidos 10 mg por día, especialmente 20 mg por día, en dos dosis igualmente divididas para una persona con un peso corporal medio cuando se administra por vía oral, o en un intervalo de dosificación de entre 0.003 y 3,0 mg/kg de peso corporal por día (preferentemente de entre 0,015 y 0,3 mg/ml), siendo preferidos 1,5 mg por día, especialmente 3,0 mg por día, en dos dosis igualmente divididas para una persona con un peso corporal medio cuando se administra por vía parental (es decir, una administración intramuscular, subcutánea o percutánea). Preferentemente, el acobifeno es administrado junto con un diluyente o un portador farmacéuticamente aceptable, como se describe a continuación.

El inhibidor preferido de la fosfodiesterasa de GMPc de tipo 5 son el Sildenafil comercializado con el nombre comercial "Viagra" por Pfizer USA, el comercializado con el nombre comercial "Cialis" por Eli Lilly USA, el vardenafil comercializado con el nombre comercial "Levitra" por Bayer (Alemania). También son un inhibidor preferido de la fosfodiesterasa de GMPc de tipo 5 que están actualmente en desarrollo: DA-8159 por Dong-A Pharm Tech (Corea del Sur), BMR-62203 por Merck (Alemania), TA-1790 por Tanabe Seiyaku (Japón), SCH-446132 por Schering-Plough (Estados Unidos) y UK-371800 por Pfizer (Estados Unidos).

Una prostaglandina preferida es el alprostadil comercializado con el nombre comercial "Alprox-TD por NexMed (Estados Unidos).

Con respecto a todas las dosis recomendadas en el presente documento, el médico tratante debería monitorizar la respuesta individual del paciente y ajustar consecuentemente la dosis.

Ejemplo de eficacia de la invención

Ejemplo 1

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Animales y tratamientos

Al inicio del experimento se usaron ratas Sprague-Dawley de entre diez y veinte semanas de edad (Cr1:CD® (SD)Br VAF/Plus™) (Charles River Laboratory, St-Constant, Canadá) con un peso de aproximadamente 220 - 270 g. Los animales se aclimataron a las condiciones ambientales (temperatura: 22 ± 3 °C; humedad: 50 ± 20 %; ciclos de 12 h de luz - 12 h de oscuridad, luces encendidas a las 07:15 h) durante al menos una semana antes de iniciar el experimento. Los animales se alojaron individualmente y se les dejó acceso libre a agua y a comida para roedores (Lab Diet 5002, Ralston Purina, St-Louis, MO). El experimento se llevó a cabo de acuerdo con la guía del CCAC para el cuidado y el uso de animales experimentales en una instalación animal aprobada por el Consejo Canadiense de Cuidado Animal (CCAC) y por la Asociación para la Evaluación y la Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC).

Se distribuyó aleatoriamente un total de 126 ratas hembra en 9 grupos de 14 animales cada uno como sigue: 1) control intacto; 2) control ooforectomizado (OVX); 3) OVX + Acobifeno (2,5 mg/kg); 4) OVX + Premarina (0,5 mg/kg); 5) OVX + Premarina + Acobifeno; 6) OVX + DHEA (80 mg/kg); 7) OVX + DHEA + Acobifeno; 8) OVX + DHEA + Premarina; 9) OVX + DHEA + Acobifeno + Premarina. El primer día del estudio, los animales de todos los grupos (excepto el grupo uno) fueron ooforectomizados bilateralmente (OVX) bajo una anestesia inducida por isoflurano. La Premarina y el Acobifeno fueron administrados mediante una sonda oral (0,5 ml/rata) en forma de suspensiones en metil celulosa al 0,4 %, mientras que la DHEA, en un 50 % de etanol - 50 % de propilenglicol (0,5 ml/rata), fue aplicada tópicamente sobre una área afeitada de 2 x 2 cm de la piel dorsal. La selección de la dosis para la Premarina se corresponde con la dosis mínima suficiente para revertir la atrofia uterina inducida por la OVX, mientras que el acobifeno fue administrado a una dosis suficiente para provocar una atrofia uterina similar a la de una OVX después de su administración a los animales OVX tratados con Premarina. La dosis de DHEA usada proporcionó unos niveles de DHEA en sangre de 70 - 100 nmol/l. Los tratamientos se iniciaron el día 2 del estudio y los compuestos fueron administrados una vez al día durante 36 semanas. Los animales de los grupos de control

intacto y los OVX recibieron el vehículo solo.

Veinticuatro horas después de la última dosis, los animales en ayuno de una noche fueron sacrificados bajo anestesia de isoflurano por exsanguinación a través de la aorta abdominal (9 animales por grupo) o mediante una perfusión intracardiaca con formalina neutra tamponada al 10 % (5 animales por grupo). Se recogieron las vaginas de los animales no perfundidos y se pesaron, mientras que las vaginas recogidas de los animales perfundidos se marcaron con tinta negra en su cara ventral, y después se limpiaron como se describe a continuación.

Procedimientos histológicos

Las vaginas completas de cada animal perfundido se post-fijaron en formalina neutra tamponada al 10 %. Cada vagina se dividió después en siete segmentos transversales iguales según se ilustra en la Figura 1, se procesó de la forma habitual y se incluyeron juntas en el mismo bloque de parafina. En el bloque de parafina, los siete segmentos vaginales cilíndricos se ubicaron en una secuencia correspondiente a sus posiciones anatómicas originales y se orientaron perpendiculares a la superficie del bloque, permitiendo así que los segmentos fueran cortados en secciones transversales. Para cada animal se cortó una sección de parafina de 4 µm de espesor y se tiñó con hematoxilina-eosina para un análisis morfológico.

Histomorfometría

Las mediciones de las diferentes capas vaginales se llevaron a cabo sobre el quinto segmento (Fig. 1), que está aproximadamente a mitad de camino entre la región intermedia y el *portio vaginalis uteri* (segmento 7). Se averiguó que este quinto segmento mostraba una superficie epitelial representativa y un espesor suficiente de músculo liso. Se capturaron imágenes con una cámara a color DC-330 3CCD (Dage-MTI, Michigan City, IN, EE.UU.) y se cuantificaron mediante el uso del programa informático Image-Pro Plus 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE.UU.). Por tanto, mediante el uso de un objetivo X5 (Leica Microsystems, Willowdale, Ont., Canadá), se obtuvieron entre 3 y 4 mediciones del espesor por capa de las áreas representativas del epitelio y de la muscular, y para las tres capas vaginales juntas. Por lo tanto se midieron el espesor vaginal total, el espesor del epitelio y el espesor de la muscular. El espesor de la lámina propia se obtuvo restando el espesor del epitelio y de la muscular del espesor vaginal total.

Inmunohistoquímica

La inmunotinción se llevó a cabo mediante el uso de kits Zymed SP (San Francisco, CA). Las secciones de parafina (de 4 µm) se desparafinizaron con tolueno y se rehidrataron con etanol. La actividad de peroxidasa endógena se eliminó mediante una preincubación con H₂O₂ al 3 % en metanol durante 30 min. Se aplicó una técnica de recuperación con microondas mediante el uso de un tampón de citrato (Tacha y Chen, 1994). Después de enfriar los portaobjetos, la unión no específica se bloqueó mediante el uso de suero de cabra al 10 % durante 20 min. Después se incubaron las secciones durante 1,1 h a la temperatura ambiente con anticuerpos contra el ERα (AB-1, Calbiochem, California), el AR (N-20, Santa Cruz Biotechnology, California) o el PR (Ab-4, NeoMarkers, California), a 1:200, a 1:250 y a 1:250 respectivamente. Después de lavar con tampón de PBS, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado durante 10 min y a continuación con estreptavidina-peroxidasa durante otros 10 min. Se usó diaminobencidina como cromógeno para la visualización del complejo de biotina / estreptavidina - peroxidasa, con una monitorización bajo el microscopio. La contratinción se realizó mediante el uso de hematoxilina #2 de Gill durante 30 s. Para los controles se llevó a cabo una inmunoabsorción con un exceso del péptido usado para crear el anticuerpo, o una sustitución con IgG de conejo no inmune. Se llevó a cabo una evaluación semicuantitativa del número y de la intensidad de los núcleos inmunoteñidos según se indica en la Tabla 2.

Tabla 1. Evaluación histológica del epitelio, de la lámina propia y de la muscular en los siete segmentos vaginales de rata.

Grupo	Paredes vaginales	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3	Segmento 4	Segmento 5	Segmento 6	Segmento 7
INTACTO	estro	E L M	KS T ¹ - L ² s	KS t - L s	KS t - M M	KS M - M T	KS M - M T	KS M - M T
	proestro	E L M	KS T - M s	MSM t - M s	MSM t - M M	MSM - KS t - M M	MSM - KS M - M T	MSM - KS M - M T
OVX	Control	E L M	A t - H s	A t - H s	A t - H t	A t - H t	A M - M t	A M - H M
	Acolbifeno	E L M	KS M - M s	SCM - A t - M s	SCM - A t - H s	SCM - A t - H t	SCM - A t - H t	SCM - A M - H t
	Premarina	E L M	KS M - L s	KS - MSM t - M s	KS - MSM M - M M	KS - MSM M - M T	KS M - H T	KS T - H T
	Premarina + Acolbifeno	E L M	KS M - M s	A - SCM t - M s	SCM - A t - H t	SCM - A t - H t	SCM - A M - M t	SCM - A M - M M
	DHEA	E L M	KS - LHM M - H s	LHM t - H s	LHM t - H t	LHM t - H M	LHM - SCM M - H M	LHM - SCM M - H M
	DHEA + Acolbifeno	E L M	KS - LHM - SCM M - M s	SCM - LHM t - M s	SCM - LHM t - H s	SCM - LHM t - H t	SCM - LHM M - H M	LHM - SCM M - H M
	DHEA + Premarina	E L M	KS M - M s	MSM - KS t - L s	MSM - KS t - M M	MSM - KS t - M T	KS M - M T	KS M - H T
	DHEA + Premarina + Acolbifeno	E L M	KS M - M s	SCM - LHM - KS M - H s	SCM - LHM t - H s	SCM - LHM t - H t	SCM - LHM M - H M	LHM - SCM M - M M
	E = morfología del epitelio: KS (escamoso estratificado queratinizado), LHM (grandes células mucosas hipertrofiadas), SCM (pequeñas células mucosas alineadas cilíndricas o cuboides), MSM (escamoso estratificado mixto superpuesto con células mucosas), A (atrofia: pequeñas células cuboides). <i>Dos abreviaturas diferentes para un segmento dado indican dos patrones diferentes, y el primero es el dominante.</i> ¹ L = espesor de la lámina propia: T (grueso), MT (moderadamente grueso), t (delgado); ² compacidad de las fibras de colágeno: H (alta), M (moderada), L (baja); M = espesor de la muscular: T (grueso), MT (moderadamente grueso), t (delgado), s (escaso).							

Tabla 2. Evaluación semicuantitativa del número y de la intensidad de los núcleos inmunoteñidos para el AR, el ER α y el PR en el epitelio, en la lámina propia y en la muscular en el quinto segmento de la vagina de rata.

Receptor de esteroides sexuales		AR			ERα			PR		
Capa vaginal →		E	L	M	E	L	M	E	L	M
Grupo										
Intacto	Estro Referencia de bajo ERα y alto PR	2 ++	2 +++	1 +	1 +	1 +	3 +	2 +++	3 +++	3 +++
	Diestro Referencia de alto ERα y bajo PR	3 +++	3 +++	3 +++	3 +++	1 ++	1 +	0	2 ++	2 ++
OVX	control	1 ++	1 +++	1 +++	2 ++	1 +++	1 +++	0	0	0
	Acolbifeno	2 ++	1 +++	1 +++	0	0	0	0	0	0
	Premarina	2 ++	2 +++	1 +	2 ++	3 ++	3 ++	2 ++	2 +++	3 +++
	Premarina + Acolbifeno	2 ++	1 +	1 +	0	0	0	0	0	0
	DHEA	3 +++	3 +++	3 +++	2 ++	2 +++	3 +++	0	0	1 ++
	DHEA + Acolbifeno	3 +++	3 +++	3 +++	0	0	0	0	0	0
	DHEA + Premarina	2 +++	3 +++	3 +++	2 +	2 +++	3 +++	2 ++	2 +++	3 +++
	DHEA + Premarina + Acolbifeno	3 +++	3 +++	3 +++	0	0	0	0	0	0

-- Receptor de andrógenos (AR), receptor de estrógenos alfa (ERα), receptor de progesterona (PR), epitelio (E), lámina propia (L), muscular (M).

- Las cifras representan la evaluación semicuantitativa de los núcleos marcados: 0 = ninguno, 1 = bajo, 2 = moderado, 3 = alto

-- La intensidad del marcaje se indica como baja: +, moderada: ++ y alta: +++

Análisis estadístico

- 5 Los datos se presentan como las medias $\pm$ EEM de 8 - 9 animales por grupo para el peso vaginal, o de 5 animales por grupo para las determinaciones del espesor de la capa vaginal. La significación estadística se determinó de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan-Kramer (Kramer, 1956, Biometrics, 12: 307310).

RESULTADOS

Morfología y espesor de las diferentes capas de la vagina de rata

- 10 Para analizar con precisión y detalle las tres capas de la pared vaginal de rata, a saber, el epitelio, la lámina propia y la muscular, se analizaron en primer lugar los siete segmentos obtenidos a lo largo del eje longitudinal (Fig. 1). Aunque se observaron unas diferencias morfológicas importantes entre los grupos, en general, las diferencias eran uniformes en todos los animales del mismo grupo, y los segmentos 2, 3, 4, 5, 6 y 7 han mostrado una morfología epitelial similar. Las pocas excepciones observadas se mencionarán posteriormente.

15 Lámina propia

- El grado de compacidad de las fibras de colágeno de la vagina se clasificó como bajo, moderado y alto (Fig. 6), según se observó en el área proximal al epitelio. La compacidad «baja» y «moderada» estaba asociada con la presencia de fibras gruesas de colágeno muy poco o poco agregadas entre sí, respectivamente, mientras que una «compacidad alta» era el término usado para describir fibras finas de colágeno estrechamente empaquetadas, que muestran un aspecto liso y texturado. En todos los animales había relativamente pocos fibrocitos en proporción con respecto a la cantidad de colágeno, y su aspecto era predominantemente aplastado y encogido.

- Un cuidadoso análisis de cada animal (Tabla 1) revela que, en general, la compacidad de las fibras de colágeno en el segmento 1 es moderada (excepto baja en ratas en estro y en los animales OVX tratados con Premarina, o alta en las ratas OVX y en las OVX tratadas con DHEA), mientras que la compacidad aumenta en los segmentos 2 y 3 hasta alcanzar una meseta que generalmente permanece constante hasta el segmento 7. Por lo tanto, a lo largo del eje longitudinal de la vagina de las ratas intactas en estro, la compacidad de las fibras de colágeno era baja en los segmentos 1 a 3 y moderada en los segmentos 4 a 7. La atrofia estaba asociada a menudo con un aumento de la compacidad de las fibras de colágeno en los grupos OVX y OVX + Acolbifeno (Tabla 1). En los animales OVX tratados con Premarina, la compacidad en el segmento 1 era baja, y moderada en los segmentos 2 y 3, mientras que en los demás segmentos, la compacidad de las fibras de colágeno aumentaba gradualmente hasta ser alta en los segmentos 6 y 7.

Un análisis visual con el microscopio óptico del espesor de la lámina propia a lo largo de la vagina reveló de forma general que era moderadamente grueso en el segmento 1 y más delgado en los segmentos 2 a 4. En los segmentos 5 a 7, el espesor aumentaba progresivamente hasta un nivel similar al del segmento 1. Los correspondientes valores

medios del espesor de la lámina propia medidos en el segmento 5 (Fig. 5 B) indican que la OVX dio lugar a una significativa disminución en el espesor de la lámina propia ($76 \pm 2 \mu\text{m}$ frente a $135 \pm 28 \mu\text{m}$ en el grupo intacto) con una disminución no significativa inducida por el Acolbifeno ($60 \pm 8 \mu\text{m}$). El aumento observado después de la administración de Premarina o de Premarina + Acolbifeno en los animales OVX permaneció por debajo del grupo intacto ($100 \pm 9 \mu\text{m}$ y $90 \pm 3 \mu\text{m}$, respectivamente, frente a $135 \pm 28 \mu\text{m}$). La administración de DHEA también dio lugar a un aumento estadísticamente no significativo en el espesor de la lámina propia ($96 \pm 20 \mu\text{m}$), y la adición de Acolbifeno dio lugar a un aumento adicional en el espesor ($136 \pm 17 \mu\text{m}$), alcanzando el de los animales intactos. El tratamiento de los animales OVX con Premarina + DHEA aumentó significativamente el espesor, ($144 \pm 14 \mu\text{m}$) cuando se comparaba con solo DHEA. Finalmente, los animales tratados con Premarina + DHEA + Acolbifeno mostraron un espesor ($99 \pm 9 \mu\text{m}$) similar al del grupo tratado solo con DHEA, y menor que el del grupo con Premarina + DHEA, aunque la diferencia no era estadísticamente significativa.

Cuando se midió el espesor total de la pared vaginal (Fig. 5 D), no se incluyó la delgada capa externa de tejido conectivo que forma la adventicia. La OVX dio lugar a una notable (51 %) atrofia de la pared vaginal ($128 \pm 3 \mu\text{m}$, frente a $262 \pm 39 \mu\text{m}$ en los intactos) y la adición de Acolbifeno a las OVX no tuvo ningún efecto ($108 \pm 8 \mu\text{m}$) (Fig. 7 A, B y C). El tratamiento con Premarina mantuvo el espesor total en un valor ($253 \pm 10 \mu\text{m}$) similar al de los animales intactos, mientras que la adición de Acolbifeno a la Premarina revertió el efecto de la Premarina ($150 \pm 4 \mu\text{m}$) (Fig. 7 D y E, respectivamente). El espesor vaginal total conseguido mediante el tratamiento con DHEA ($184 \pm 21 \mu\text{m}$) era aproximadamente un 25 % menor que el del grupo tratado solo con Premarina (Fig. 7 F). Por otro lado, la adición de Acolbifeno a la DHEA dio lugar a un aumento en el espesor no significativo ($213 \pm 20 \mu\text{m}$), que se volvió no significativamente diferente del grupo intacto (Fig. 7 G). Finalmente, la administración conjunta de Premarina y de DHEA a los animales OVX aumentó notablemente el espesor ($290 \pm 13 \mu\text{m}$) hasta un valor similar al de los animales intactos (Fig. 7 H). La adición de Acolbifeno a la DHEA y a la Premarina revertió el efecto hasta un valor ($176 \pm 11 \mu\text{m}$) que no era significativamente diferente al de la DHEA sola (Fig. 7 I).

Peso vaginal

Después de ocho meses de tratamiento, los cambios observados en el peso vaginal entre los diferentes grupos (Fig. 8) siguen de forma general las observaciones morfológicas descritas anteriormente. De hecho, el peso vaginal después de la OVX disminuyó en aproximadamente un 50 % ($101 \pm 5 \text{ mg}$) en comparación con el grupo intacto ($205 \pm 11 \text{ mg}$), mientras que el tratamiento de los animales OVX solo con Acolbifeno no tuvo ningún efecto sobre el peso vaginal. Por otro lado, la administración de Premarina dio lugar a un aumento en el peso vaginal que no alcanzó el valor de los animales intactos ($170 \pm 9 \text{ mg}$), mientras que la adición de Acolbifeno a la Premarina revertió la ganancia de peso inducida por el estrógeno hasta un valor similar al de los animales OVX ($96 \pm 4 \text{ mg}$). Por el contrario, cuando se administró DHEA a los animales OVX, el peso vaginal aumentó hasta un valor ($171 \pm 12 \text{ mg}$) similar al del grupo tratado con Premarina, y la combinación de Acolbifeno y DHEA dio como resultado una disminución en el peso ($135 \pm 9 \text{ mg}$), que permaneció por encima del grupo OVX. Finalmente, la administración conjunta de Premarina y DHEA a los animales OVX dio como resultado una ganancia en el peso vaginal ($179 \pm 10 \text{ mg}$) que alcanzó un valor similar a los grupos de OVX + DHEA y de OVX + Premarina. La adición de Acolbifeno a esta combinación no tuvo un efecto significativo ($194 \pm 12 \text{ mg}$).

El tratamiento con DHEA de los animales OVX dio lugar a un fuerte marcaje del AR en muchos núcleos de las tres capas vaginales, encontrándose el mismo patrón cuando se usaban las combinaciones de DHEA + Acolbifeno y de DHEA + Premarina, con la excepción de un número menor de núcleos marcados en las capas superficiales del epitelio en el último grupo. La combinación de DHEA, Premarina y Acolbifeno también dio como resultado una fuerte tinción de la mayoría de los núcleos en las tres capas de pared vaginal.

ANÁLISIS

La sequedad vaginal o la vaginitis atrófica, denominada también atrofia urogenital, junto con la disfunción sexual, es un problema habitual en las mujeres postmenopáusicas (Notelovitz, 2000, Menopause, 7 (3): 140 - 142). Los síntomas más habituales son sequedad, quemazón, prurito, irritación y dispareunia, que conducen a una disminución en la libido y en la calidad de vida (Berman et al., 1999, Curr Opin Urol, 9 (6): 563 - 568). Dado que se sabe que está implicada la pérdida de estrógenos, la terapia de sustitución estrogénica (ERT) y la HRT son los tratamientos de elección. Sin embargo, dado que las nuevas informaciones sobre la fisiología de los esteroides sexuales en las mujeres sugieren fuertemente un importante papel de los andrógenos (Labrie et al., 2003, End Rev, 24 (2): 152 - 182), el presente estudio compara los efectos hormonales globales de una alternativa a la HRT o a la ERT, a saber, la DHEA sola o en asociación con el antiestrógeno puro Acolbifeno y también con Premarina en la morfología vaginal de rata y en la expresión del receptor de esteroides sexuales. La DHEA se administró percutáneamente para evitar el primer paso a través del hígado (Labrie et al., 1996, Endocrinol, 150: S107 - S118).

Finalmente, nuestros resultados han demostrado un significativo aumento del peso vaginal con el tratamiento con Premarina, cuando se compara con los animales OVX, siendo el valor similar al observado en el grupo tratado con DHBA. Es apropiado recordar que, aunque los aumentos del peso vaginal y uterino en roedores se usan habitualmente como medida de la estrogenicidad, estos órganos también pueden responder a la progesterona y a la testosterona, entre otros compuestos (Emmens y Martin, 1964, Dorfman Ed, Ed Academic Press NY: 1).

En la potencial triple combinación, se aspira a que el estrógeno equino Premarina actúe en el cerebro para aliviar los síntomas vasomotores. De hecho, los beneficios de la administración conjunta del antiestrógeno puro selectivo Acolbifeno con un estrógeno con objeto de neutralizar los efectos periféricos no deseados del estrógeno, han sido bien descritos por Labrie et al. (Labrie et al., 2003, *Endocrinol*, 144 (11): 4700 - 4706). En el presente estudio, cuando se administró Acolbifeno a animales OVX, la característica morfológica más típica inducida por el SERM fue la aparición de una capa superficial de pequeñas células de mucos bien alineadas superyacente a la capa de células basales, un patrón que estaba ligeramente más pronunciado en el grupo con Premarina + Acolbifeno, y que permaneció preponderante en todos los grupos tratados con Acolbifeno, incluyendo cuando se añadió el SERM a la DHEA. La mucificación del epitelio vaginal durante el tratamiento con un antiestrógeno ha sido notificada en ratas inmaduras (Anderson y Kang, 1975, *Am J anat*, 144 (2): 197 - 207) y adultas (Yoshida et al., 1998, *Cancer Lett*, 134 (1): 43 - 51). Aunque este patrón morfológico se ha comparado con la mucificación inducida por la progesterona (Anderson y Kang, 1975, *Am J anat*, 144 (2): 197 - 207), el mecanismo molecular por el cual un antiestrógeno induce una mucificación epitelial sigue siendo desconocido.

Se han notificado muchos efectos beneficiosos de la DHEA en mujeres postmenopáusicas (Labrie et al., 1997, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82: 3498 - 3505; Labrie et al., 1991, *Mol Cell Endocrinol*, 78: C113 - C118). Dado que no se ha caracterizado ningún receptor específico para la DHEA, los cambios morfológicos observados en la vagina de rata tras el tratamiento con DHEA reflejan su conversión intracrina en esteroides sexuales activos con una acción androgénica y/o estrogénica a través de mecanismos intracrininos (Labrie et al., 1991, *Mol Cell Endocrinol*, 78: C113 - C118). Esos cambios comprenden una mucificación epitelial intensa, una elevada compacidad de las delicadas y finamente tejidas fibras de colágeno de la lámina propia colágeno y un moderado aumento del espesor de la muscular cuando se comparan con los animales OVX. Los dos primeros cambios morfológicos son típicos de los efectos androgénicos, mientras que el tercero muestra una actividad de tipo estrogénica, lo que está adicionalmente apoyado por un aumento concomitante en la expresión del receptor de progesterona en la capa muscular.

Dado que la DHEA es transformada en uno o en ambos de andrógenos y estrógenos en los tejidos periféricos, el grueso epitelio multilaminar mucificado observado en el presente estudio después del tratamiento de los animales OVX con DHEA sugiere un efecto androgénico predominante de mucificación de la vagina de rata, un efecto que podría enmascarar cualquier potencial efecto estrogénico menor coexistente a nivel del epitelio. Un estudio previo ha demostrado el mismo efecto de mucificación en la vagina de rata (Sourla et al., 1998, *J Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 66 (3): 137 - 149); ese estudio previo, la aplicación intravaginal de DHEA consiguió un efecto significativo a una dosis diez veces menor de la que ha resultado ser activa después de la aplicación de la DHEA en la piel dorsal.

Los presentes datos indican la coexistencia de acciones androgénicas mayores y estrogénicas menores de la DHEA en la vagina de rata. Además, los presentes resultados están bien apoyados por la observación del epitelio vaginal de animales OVX que recibieron la misma aplicación tópica de DHEA que la usada en nuestro estudio, más una dosis subcutánea del antiandrógeno Flutamida (FLU) (resultados no publicados). De hecho, el efecto androgénico de la mucificación producida por el componente androgénico de la DHEA era completamente revertido por la FLU y dio como resultado un epitelio escamoso estratificado, típico de un efecto estrogénico (datos no mostrados). Si la DHEA tuviera un exclusivo efecto androgénico (mucificación) en la vagina de rata, este efecto sería revertido por la FLU y entonces se debería observar un epitelio atrófico similar al de los animales OVX. Los estudios previos con ratas machos y hembras gonadectomizadas han establecido claramente que el tratamiento con DHEA da lugar a unos efectos estimulantes androgénicos y/o estrogénicos sobre la próstata, la vesícula seminal y el útero, dependiendo del tejido objetivo en investigación (Labrie et al., 1988, *Endocrinol*, 123: 1412 - 1417).

La combinación de DHEA + Acolbifeno, por un lado, muestra una reducción en la magnitud de la mucificación epitelial, mostrando así la alternancia de una capa de células mucosas bien alineadas - un efecto del Acolbifeno - e invaginaciones de células mucosas hipertrofiadas multilaminares, que se corresponde con un efecto androgénico de la DHEA. Por consiguiente, el Acolbifeno inhibe el efecto estrogénico parcial de la DHEA, mientras que el principal homólogo androgénico de la DHEA se mantiene y se añade un pequeño efecto de tipo estrogénico del Acolbifeno, observándose este último a nivel del *ostium*. La disminución en el peso vaginal observada después de la adición de Acolbifeno a la DHEA es menor que la obtenida después de la adición de Acolbifeno a la Premarina, ilustrando por tanto el menor componente estrogénico de la DHEA que es revertido por el antiestrógeno, mientras que el principal componente androgénico no se ve afectado. Además, los aumentos en el espesor de la lámina propia y en la compacidad de las fibras de colágeno, cuando se comparan con los de los animales OVX e intactos respectivamente, en el grupo con DHEA + Acolbifeno, sugieren, de nuevo, un potencial papel de los andrógenos en el aumento de la compacidad del espesor del colágeno, dado que el componente estrogénico de la DHEA está bloqueado por el Acolbifeno.

Otros estudios han demostrado que la acción de la DHEA en la glándula mamaria de rata (Sourla et al., 1998, *Endocrinol*, 139: 753 - 764), en las glándulas sebáceas cutáneas (Sourla et al., 2000, *J Endocrinol*, 166 (2): 455 - 462) y en la densidad mineral ósea (Martel et al., 1998, *J Endocrinol*, 157: 433 - 442) es prácticamente exclusivamente androgénico. No obstante, la presencia de una acción estrogénica de la DHEA en la vagina de rata ha sido previamente demostrada a través de la inducción de una apertura vaginal y una ovulación precoz en ratas inmaduras tratadas con este compuesto, mientras que la DHT, un andrógeno no aromatizable en estrógenos, no produce dichos efectos (Knudsen y Mahesh, 1975, *Endocrinol*, 97 (2): 458 - 468). Es probable que la capacidad del tejido vaginal de rata de aromatizar andrógenos, especialmente Testo, justifique la mayor parte del efecto

estrogénico de la DHEA en este órgano (Lephart et al., 1989, Biol Reprod, 40 (2): 259 - 267). El androst-5-eno-3 β , 17 β -diol (5-diol), un metabolito de la DHEA del que se sabe que se une al receptor de estrógenos (Shao et al., 1950, J Biol Chem, 250: 3095 - 3100; Poortman et al., 1975, J Clin Endocrinol Metab, 40 (3): 373 - 379; Van Doorn et al., 1981, Endocrinol, 108: 1587 - 1594; Adams et al., 1981, Cancer Res, 41: 4720 - 4726), también podría contribuir al efecto estrogénico (Poulin y Labrie, 1986, Cancer Res, 46: 4933 - 4937). La combinación propuesta del antiestrogénico Acolbifeno con DHEA evitaría así cualquier efecto estimulador no deseado del 5-diol. Por otro lado, el acolbifeno mostraría unos beneficios adicionales al prevenir la pérdida ósea (Martel et al., 2000, J Steroid Biochem Mol Biol, 74 (1 - 2): 45 - 56).

Hasta donde sabemos, ningún estudio previo ha demostrado los efectos estimuladores de la DHEA sobre la compacidad y la morfología de las fibras de colágeno de la lámina propia y, en menor grado, de la muscular. Dichas acciones de los andrógenos y de los estrógenos derivados de la DHEA podrían tener unos efectos beneficiosos sobre la función vaginal en mujeres postmenopáusicas, y deberían proporcionar los sustratos necesarios para la acción de los inhibidores de la fosfodiesterasa de tipo 5 tales como sildenafil o tadalafil, posiblemente a través de la facilitación de la relajación del músculo liso vaginal mediada por la sintasa de óxido nítrico endotelial (NOSe) inducida por los andrógenos o por los estrógenos (revisado en Munarriz et al., 2003, J Urol, 170 (2 Pt 2): S40 - S44, Discussion S44 - S45). De hecho, se ha averiguado que el Acolbifeno induce la NOSe en células endoteliales humanas y de rata (Simoncini et al., 2002, Endocrinol, 143 (6): 2052 - 2061).

Los resultados obtenidos en todos los grupos implicados en el tratamiento con DHEA revelan que la expresión del AR es regulada por aumento por los andrógenos derivados de la transformación intracrina de la DHEA en la vagina de rata, de una forma similar en los tres compartimentos tisulares.

Los beneficiosos cambios morfológicos por parte de los andrógenos, observados concomitantemente con la fuerte modulación del AR vaginal de rata, sugieren que la disminución en los niveles en suero de los andrógenos derivados de la DHEA en mujeres postmenopáusicas podría contribuir a la disminución de la salud vaginal y finalmente a la pérdida de la libido y del disfrute sexual observados en este grupo de edad. De hecho, se encontró una disminución de la Testo total en suero, de la Testo libre y de la DHBA-S en las mujeres que acudieron a consulta por una disminución en el deseo sexual (Guay y Jacobson, 2002, J Sex Marital Ther, 28 Supl. 1: 129 - 142).

En el presente estudio hemos demostrado que el tratamiento de ratas hembra OVX con DHEA o con la combinación de DHEA con Acolbifeno y de DHEA con Acolbifeno y Premarina, revertió los cambios atróficos inducidos por la OVX encontrados en la vagina por mediación de un efecto predominante androgénico, a través del AR, que fue reflejado por una intensa mucificación epitelial y un aumento en la compacidad de las fibras de colágeno de la lámina propia. El tratamiento solo con DHEA también aumentó moderadamente el espesor de la muscular. Dichos datos subrayan la importancia de los esteroides sexuales sintetizados localmente a partir de la DHEA y de la DHEA-S en tejidos periféricos objetivo. Además de estos efectos beneficiosos, el Acolbifeno redujo la incidencia de inflamación, posiblemente a través de una inducción de tipo estrogénico del epitelio escamoso queratinizado protector a nivel del *ostium* y un efecto antiestrogénico de mucificación a nivel interno.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas

A continuación se establecen, a modo de ejemplo y no de limitación, varias composiciones farmacéuticas que utilizan el SERM Acolbifeno activo, un precursor activo de los esteroides sexuales DHEA, el estrógeno preferido 17 β -estradiol o premarina, el inhibidor preferido de la fosfodiesterasa de GMPc de tipo 5 Sildenafil o Tadalafil. La concentración del principio activo puede variar en un amplio intervalo según se ha analizado en el presente documento. Las cantidades y los tipos de los demás ingredientes que pueden ser incluidos son bien conocidos la materia.

Ejemplo C

Comprimido

Ingrediente	% en peso (sobre el peso de la composición total)
Acolbifeno	5,0
DHEA	15,0
Gelatina	5,0
Lactosa	58,5
Almidón	16,5

Ejemplo D

Cápsula de gelatina

Ingrediente	% en peso (sobre el peso de la composición total)
Acolbifeno	5,0
DHEA	15,0
Lactosa hidratada	65,0
Almidón	4,8
Celulosa microcristalina	9,8
Estearato de magnesio	0,4

Ejemplo E

5 Comprimido

Ingrediente	% en peso (sobre el peso de la composición total)
Acolbifeno	5,0
DHEA	15,0
Premarina	0,5
Gelatina	5,0
Lactosa	63,0
Almidón	16,5

Ejemplo F

Cápsula de gelatina

Ingrediente	% en peso (sobre el peso de la composición total)
Acolbifeno	5,0
DHEA	15,0
Premarina	0,5
Lactosa hidratada	64,5
Almidón	4,8
Celulosa microcristalina	9,8
Estearato de magnesio	0,4

10 **Ejemplo H**

Cápsula de gelatina

Ingrediente	% en peso (sobre el peso de la composición total)
Sildenafil	15,0
Acolbifeno	5,0
DHEA	15,0
Lactosa hidratada	50,0
Almidón	4,8
Celulosa microcristalina	9,8
Estearato de magnesio	0,4

Ejemplo I

Comprimido

Ingrediente	% en peso (sobre el peso de la composición total)
Acolbifeno	5,0
DHEA	15,0
Sildenafil	15,0
Gelatina	5,0
Lactosa	43,5
Almidón	16,5

Ejemplo I

5 Cápsula de gelatina

Ingrediente	% en peso (sobre el peso de la composición total)
Acolbifeno	5,0
DHEA	15,0
Sildenafil	15,0
Lactosa hidratada	50,0
Almidón	4,8
Celulosa microcristalina	9,8
Estearato de magnesio	0,4

Ejemplo K

Crema vaginal

Ingrediente	% en peso (sobre el peso de la composición total)
DHEA	1,0
Acolbifeno	0,2
Cera emulsionante, NF	18,0
Aceite mineral ligero, NF	12,0
Alcohol bencílico	1,0
Etanol al 95 % USP	33,8
Agua purificada, USP	34,0

10 Ejemplos de kit

A continuación se establecen, a modo de ejemplo y no de limitación, varios kits que utilizan el SERM Acolbifeno activo, un precursor activo de los esteroides sexuales DHEA, los estrógenos preferidos 17 β -estradiol o estrógenos conjugados, el inhibidor preferido de la fosfodiesterasa de GMPc de tipo 5 Sildenafil o Tadalafilo. La concentración del principio activo puede variar en un amplio intervalo según se ha analizado en el presente documento. Las cantidades y los tipos de los demás ingredientes que pueden ser incluidos son bien conocidos la materia.

Ejemplo A

El SERM, los estrógenos y el inhibidor de la fosfodiesterasa de GMPc de tipo 5 se administran por vía oral, mientras que el precursor de los esteroides sexuales se aplica localmente o se administra percutáneamente

Composición de SERM para su administración por vía oral (cápsulas)

Ingrediente	% en peso (sobre el peso de la composición total)
Acolbifeno	5,0
Lactosa hidratada	80,0
Almidón	4,8
Celulosa microcristalina	9,8
Estearato de magnesio	0,4

Composición de SERM + estrógenos para su administración por vía oral (cápsulas)

Ingrediente	% en peso (sobre el peso de la composición total)
Acolbifeno	5,0
Premarina	0,5
Lactosa hidratada	79,5
Almidón	4,8
Celulosa microcristalina	9,8
Estearato de magnesio	0,4

- 5 Composición de SERM + estrógenos + inhibidor de la fosfodiesterasa de GMPc de tipo 5 para su administración por vía oral (cápsulas)

Ingrediente	% en peso (sobre el peso de la composición total)
Acolbifeno	5,0
Premarina	0,5
Sildenafil	15,0
Lactosa hidratada	64,5
Almidón	4,8
Celulosa microcristalina	9,8
Estearato de magnesio	0,4

Composición del precursor de esteroides sexuales para su administración por vía tópica (gel)

Ingrediente	% en peso (sobre el peso de la composición total)
DHEA	2,0
Triglicérido caprílico - cáprico (Neobee M-5)	5,0
Hexilenglicol	15,0
Transcutol (dietilenglicol monometil éter)	5,0
Alcohol bencílico	2,0
Ciclometicona (Dow corning 345)	5,0
Etanol (absoluto)	64,0
Hidroxipropil celulosa (1500 cps) (KLUCEL)	2,0

10 Ejemplo B

El SERM y el precursor de esteroides sexuales se administran por vía oral

Composición del antiestrógeno no esteroideo para su administración por vía oral (cápsulas)

Ingrediente	% en peso (sobre el peso de la composición total)
Acolbifeno	5,0
Lactosa hidratada	80,0
Almidón	4,8
Celulosa microcristalina	9,8
Estearato de magnesio	0,4

Composición del precursor de esteroides sexuales para su administración por vía oral (cápsula de gelatina)

Ingrediente	% en peso (sobre el peso de la composición total)
DHEA	15,0
Lactosa hidratada	70,0
Almidón	4,8
Celulosa microcristalina	9,8
Estearato de magnesio	0,4

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dehidroepiandrosterona en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de acolbifeno como parte de una terapia de combinación, para su uso en el tratamiento o en la reducción de la probabilidad de adquirir una enfermedad vaginal que afecta a la capa de la lámina propia, en la que la enfermedad vaginal es la atrofia de la capa de la lámina propia en mujeres postmenopáusicas.
- 10 2. Una composición farmacéutica para aplicación vaginal que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de dehidroepiandrosterona, una cantidad terapéuticamente eficaz de acolbifeno, y un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento o en la reducción de la probabilidad de adquirir una enfermedad vaginal que afecta a la capa de la lámina propia, en la que la enfermedad vaginal es la atrofia de la capa de la lámina propia en mujeres postmenopáusicas.
- 15 3. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de dehidroepiandrosterona, una cantidad terapéuticamente eficaz de acolbifeno, y un excipiente, un diluyente o un portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento o en la reducción de la probabilidad de adquirir una enfermedad vaginal que afecta a la capa de la lámina propia, en la que la enfermedad vaginal es la atrofia de la capa de la lámina propia en mujeres postmenopáusicas.
- 20 4. Un kit que comprende un primer recipiente que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de dehidroepiandrosterona, y que comprende un segundo recipiente que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de acolbifeno, para su uso en el tratamiento o reducción de la probabilidad de adquirir una enfermedad vaginal que afecta a la capa de la lámina propia, en la que la enfermedad vaginal es la atrofia de la capa de la lámina propia en mujeres postmenopáusicas.

Figura 1

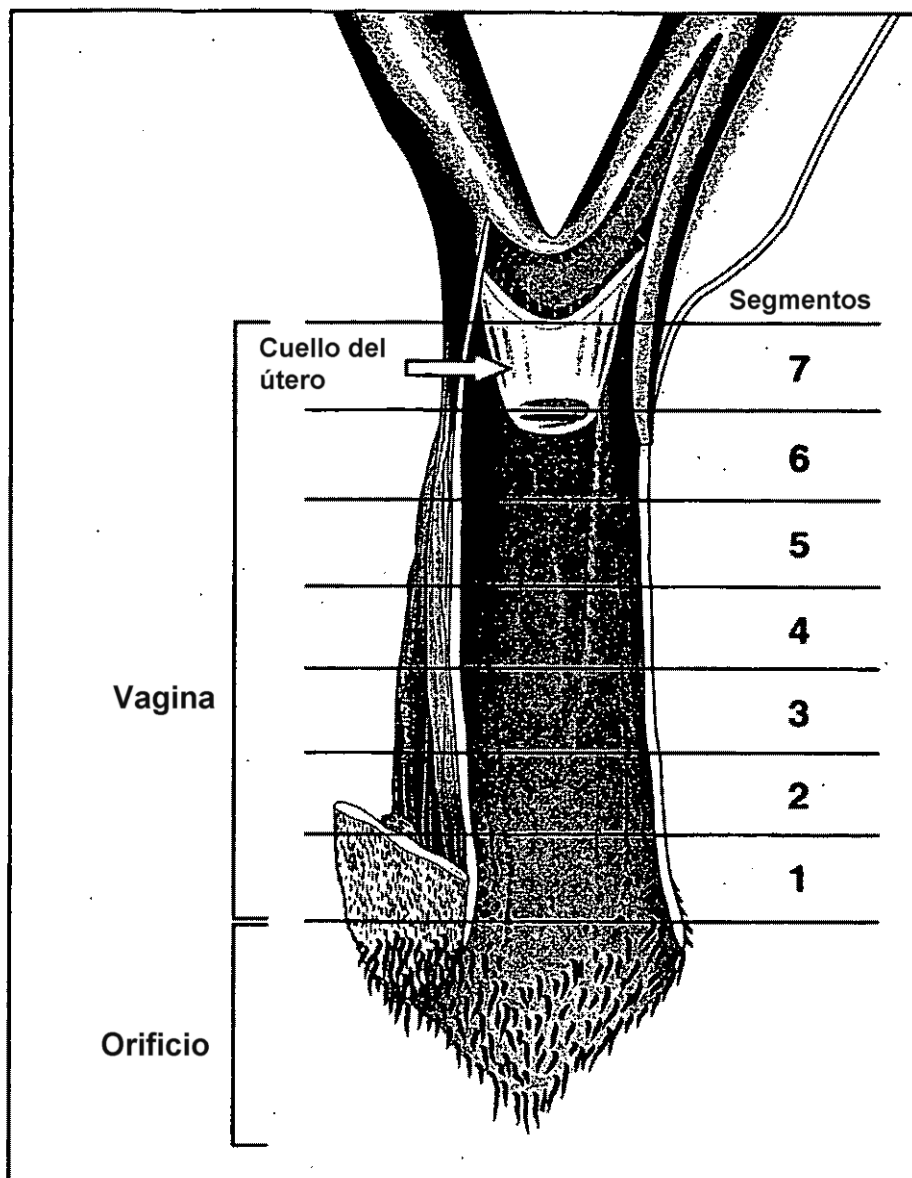


Figura 5A

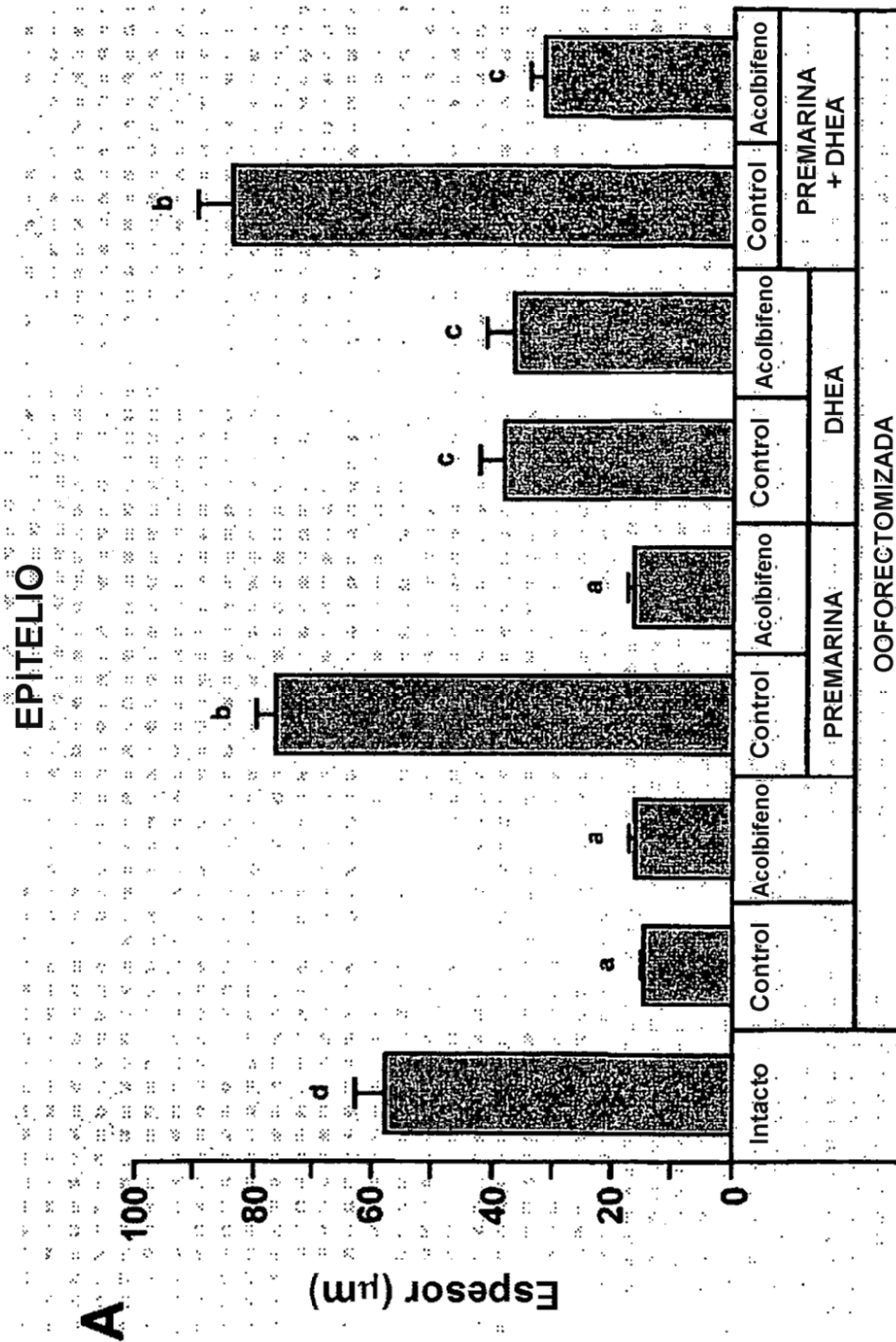


Figura 5C

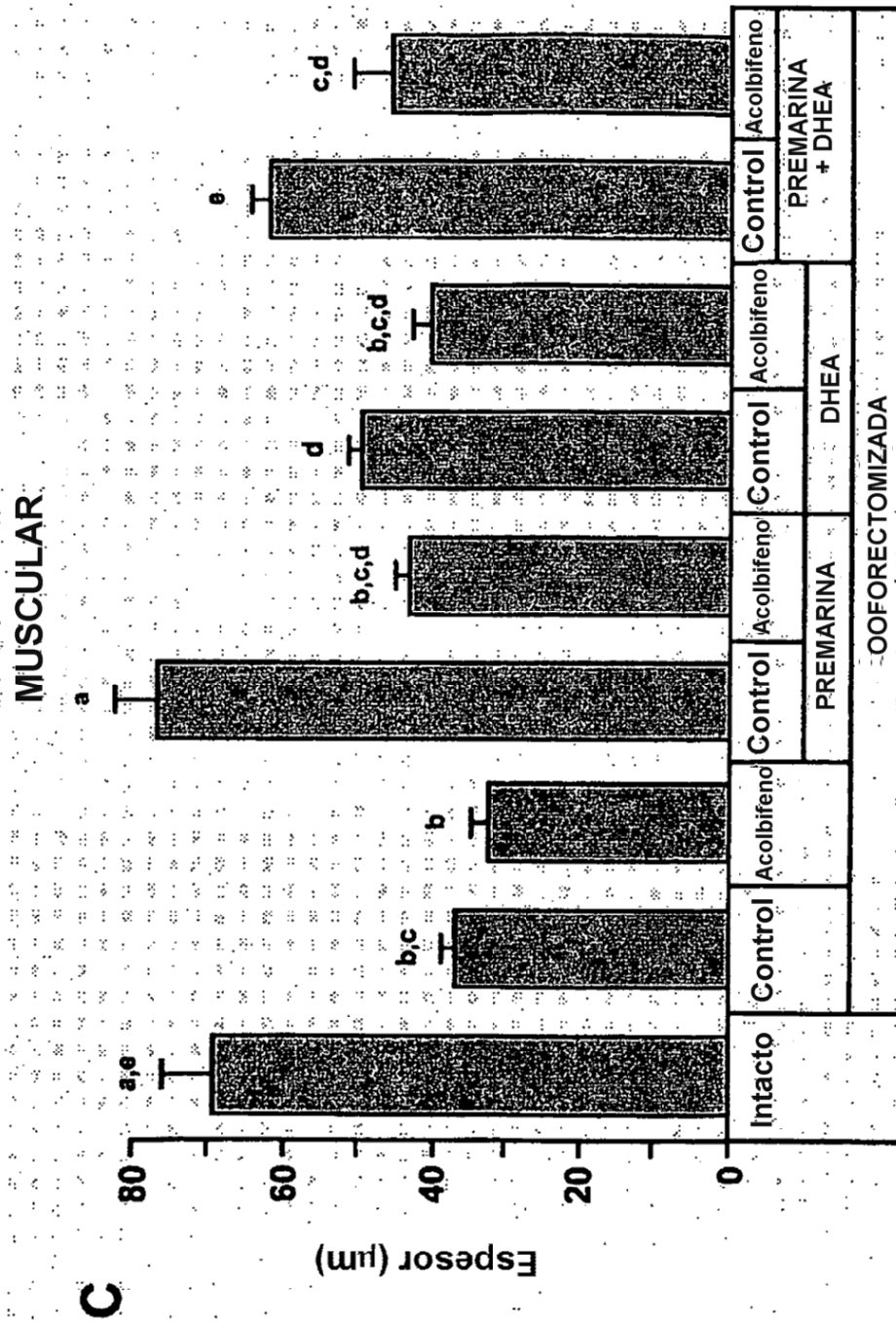


Figura 5D

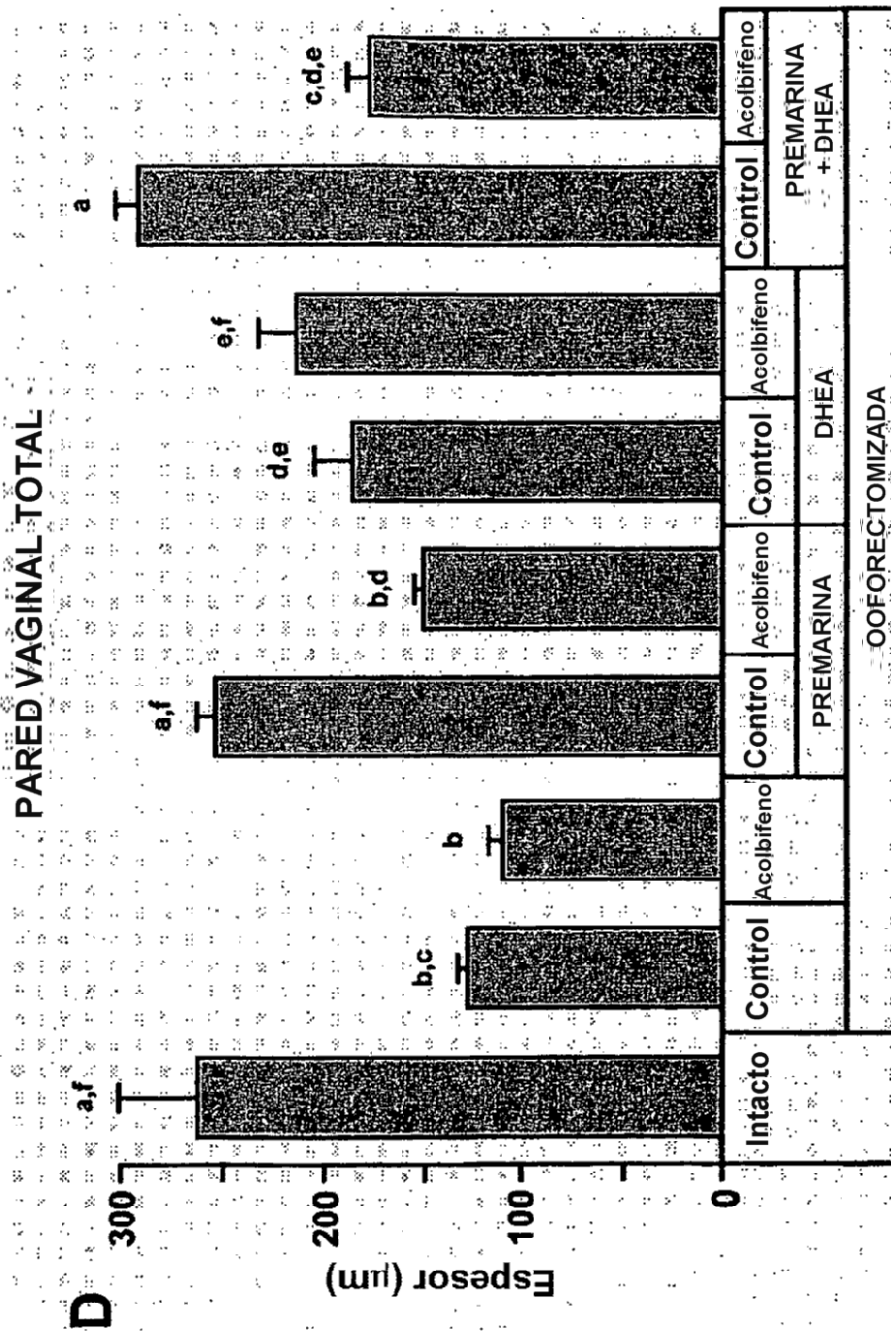


Figura 6



Figura 7

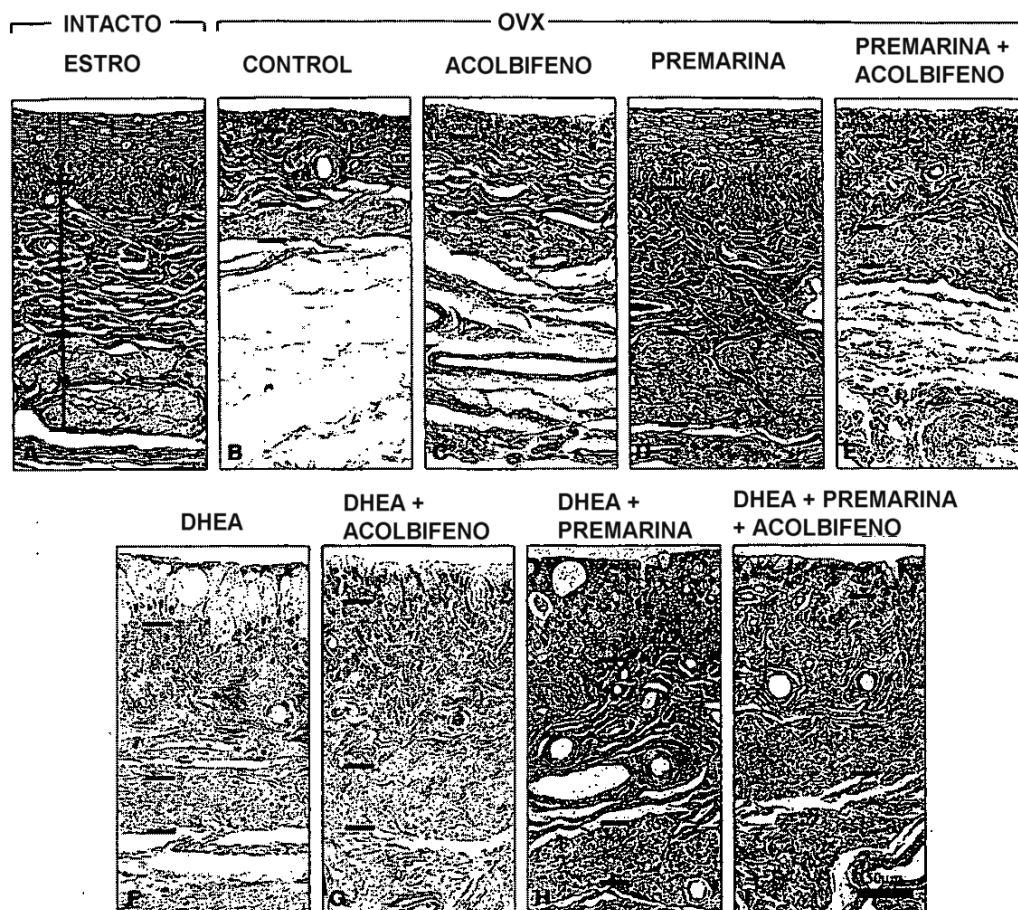


Figura 8

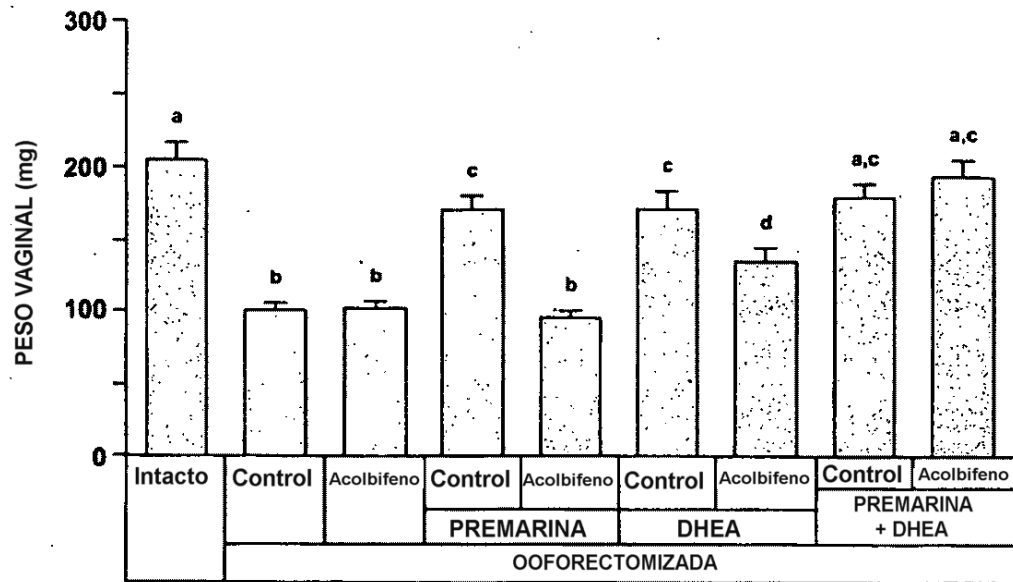


Figura 9A

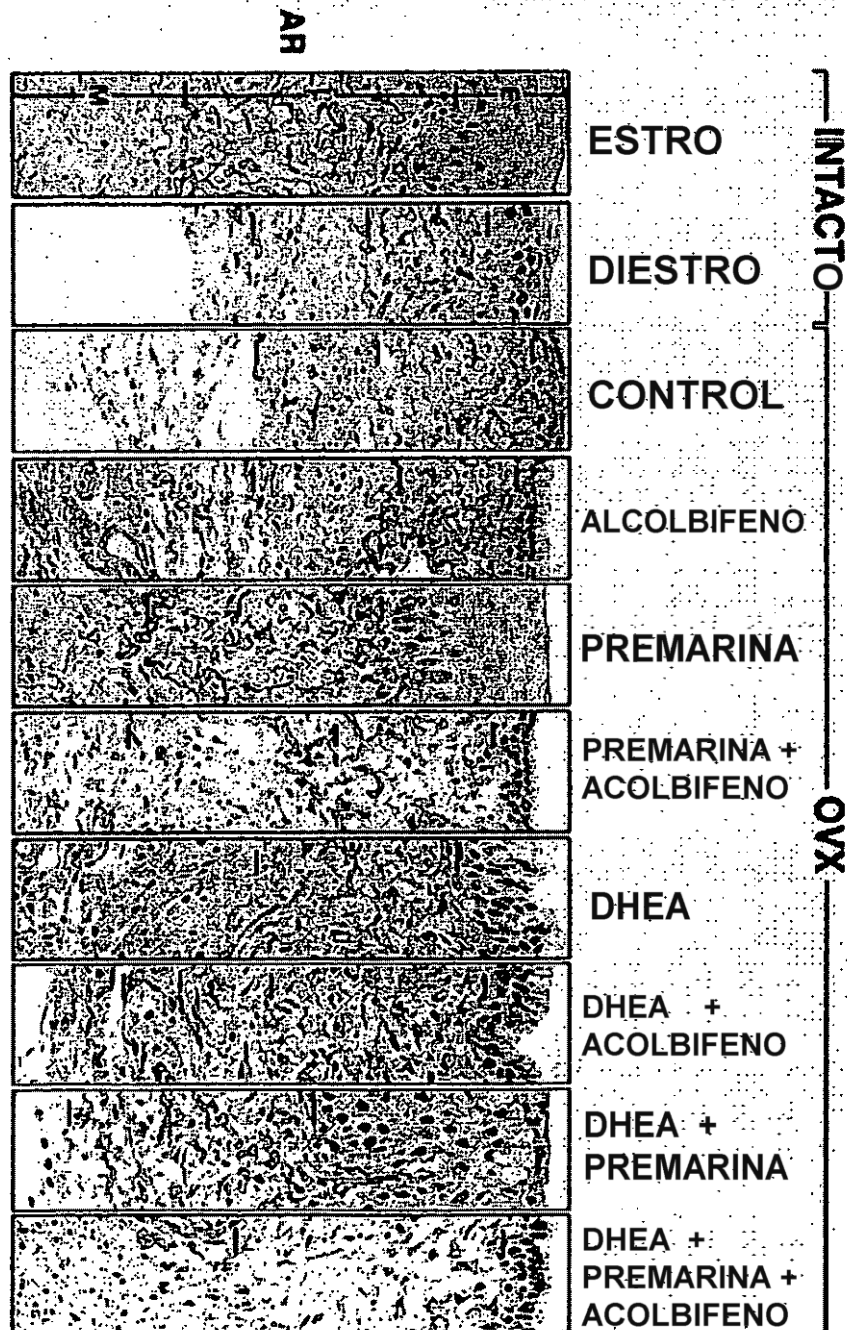


Figura 9B

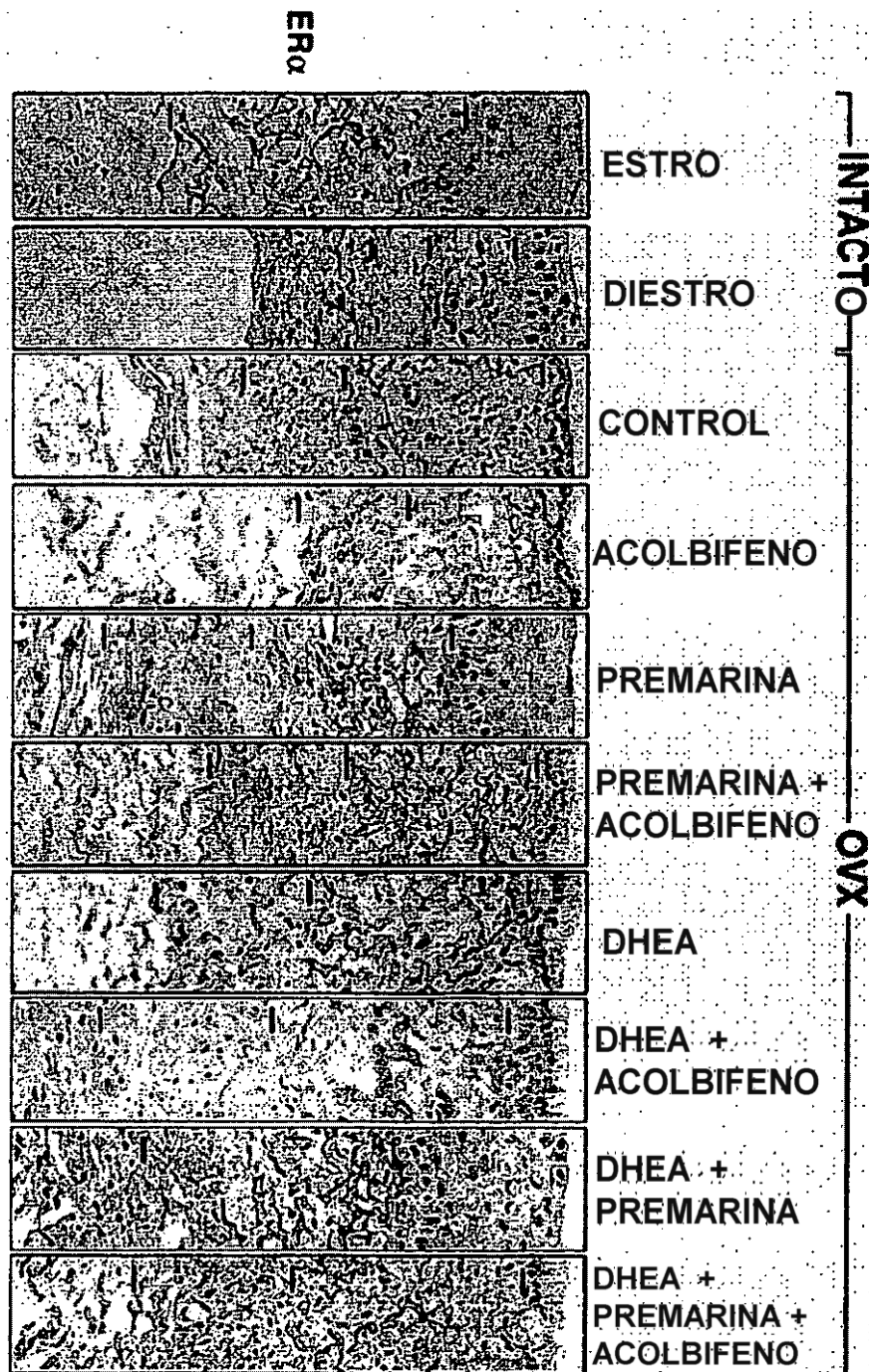


Figura 9C

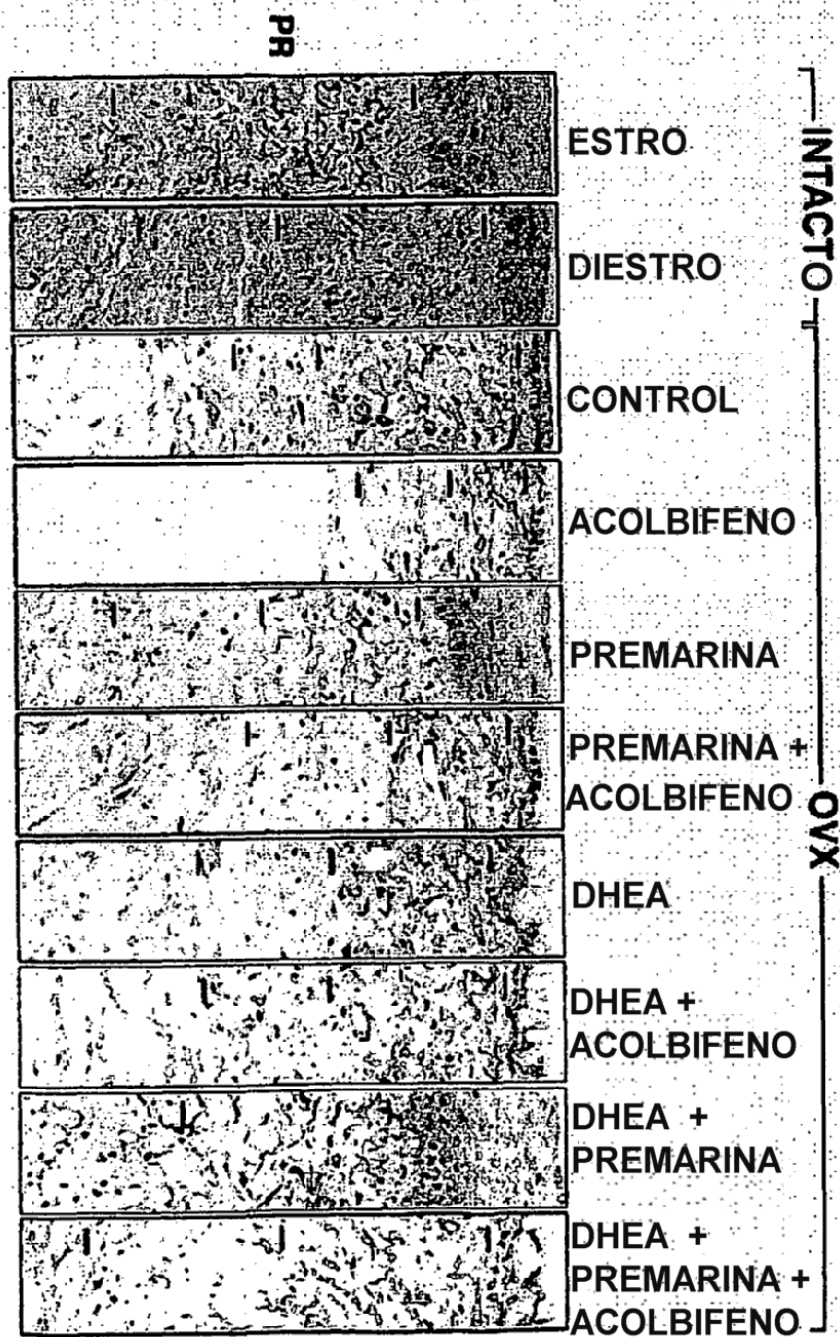


Figura 9C