



No. 13-137403- -00007-0000

Fecha: 2015-04-29 14:54:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 31

Clarke, Model

COLOMBIA

P-3770

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. 13-137.403

Solicitud de patente a nombre de **ZAMBON GROUP S.P.A.**

Yo, SILVANA MARIA LOPEZ DIAZ identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada sustituta de acuerdo con la sustitución adjunta de la sociedad **ZAMBON GROUP S.P.A.**, domiciliada en Italia, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. 896 notificado por fijación en lista el 3 de febrero de 2015, relacionado con concepto técnico de fondo, me permito manifestar:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de 4 reivindicaciones y reemplaza completamente el capítulo presentado anteriormente.
2. **Claridad**
 - 2.1 Respecto al requerimiento del examinador solicitando una modificación al título de la presente solicitud, se solicita amablemente que dicho título sea reemplazado por: "COMPOSICIONES TÓPICAS VAGINALES QUE COMPRENDEN EXTRACTO ENRIQUECIDO DE CALOSTRO CON INMUNOGLOBINAS".
 - 2.2 La reivindicación 2 se modificó para dar claridad al agente antiséptico utilizado en la composición reclamada. Dicha modificación se encuentra debidamente sustentada en la Página 6, líneas 6 a 10 del capítulo descriptivo modificado.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones de claridad y nivel inventivo planteadas por el señor examinador en su concepto técnico.

En consecuencia, nos permitimos informar que las nuevas reivindicaciones 1 a 4 se ajustan a las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486.

En cuanto al número de reivindicaciones, atentamente nos permitimos decir que no se adjunta tasa por reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo consta de un menor número de cláusulas que el presentado originalmente y en esencia es el mismo objeto pero más limitado.

P-3770

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

3. Nivel Inventivo

El examinador establece en su concepto técnico que la antigua reivindicación 1 carece de nivel inventivo a la luz de los documentos WO 2009/113065 (D1) y *Chowdary and Srinivasa* (D3). También indica que las antiguas reivindicaciones 2 y 3 carecen de nivel inventivo a la luz del documento WO 2009/113065 (D1) y el conocimiento del técnico. Por último, la antigua reivindicación 4 carece de nivel inventivo a la luz de los documentos WO 2007/039124 (D2) y *Chowdary and Srinivasa* (D3).

En este sentido, me permito decir que el artículo 18 de la Decisión 486, el cual hace referencia al nivel inventivo de una invención, establece que *“Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica”*.

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. El análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

Teniendo en cuenta lo anterior, es deseo de la solicitante manifestar su desacuerdo y presentar argumentos en contra de estas declaraciones, con el fin de demostrar que la invención reclamada en la presente solicitud posee características técnicas que implicaron un paso inventivo durante su desarrollo.

Al analizar los documentos considerados como la supuesta técnica más próxima, es deseo de la solicitante señalar que D1 no revela explícitamente composiciones vaginales.

D1 se centra en realidad en formulaciones a base de calostro para ser administradas preferiblemente por vía oral o nasal (Página 42). Toda la evidencia experimental concreta reportada en D1 se refiere a la administración oral de fracciones derivadas de calostro a ratas o ratones en modelos experimentales de diabetes, leucemia, carcinoma hepatocelular, hepatitis, melanoma, la enfermedad de Alzheimer, el cáncer de colon, cáncer de próstata, esclerosis múltiple, asma, artritis, arterosclerosis, diarrea (D1, Ejemplos 1 a 15).

Dicha evidencia experimental claramente no tiene relación con el uso de las composiciones reclamadas, decir, el tratamiento de la sequedad vaginal.

D1 sólo menciona muy genéricamente la administración intravaginal junto con todas las otras vías de administración posibles. Por lo tanto, no es evidente que D1 proporcione una enseñanza válida y fiable que sugiere la invención reclamada cuando se combina con D3.

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

Ahora bien, D3 es una revisión de las técnicas conocidas para la preparación de microesferas mucoadhesivas para la administración bucal, nasal, vaginal o rectal. D3 no menciona el calostro y, con respecto a la administración vaginal, sólo menciona el anticonceptivo y las aplicaciones anti-infecciosos.

La técnica anterior como un todo no sugiere, además, la característica crítica de la presente invención, a saber, **la de una combinación de la fracción de calostro en forma libre con una fracción de calostro en forma microencapsulada.**

La solicitante desea afirmar que esta combinación, no es sugerida por D1 o D2 en combinación con D3, la cual, es responsable de las excelentes propiedades del producto reclamado, como se muestra en el ensayo clínico anexo.

Como se presenta en el estudio adjunto, se ha desarrollado un nuevo producto, gel vaginal ZP-025, que contiene calostro bovino purificado (dializado liofilizado), para el tratamiento de la sequedad vaginal secundaria a la atrofia vaginal. El nuevo producto ZP-025, que contiene el calostro purificado, ha demostrado tener efectos beneficiosos sobre la atrofia vaginal en ratas ovariectomizadas, mejorando la hemodinámica vaginal y el espesor del epitelio vaginal (Anexo, Páginas 1 y 2).

Zambon SpA (Bresso, Milán, Italia) ha desarrollado un producto en gel (Gel vaginal ZP-025 Monurelle Biogel), que contiene el calostro bovino purificado. Para ser administrado por vía tópica, para el tratamiento de la sequedad vaginal también en presencia de atrofia vaginal. Gracias a sus componentes, el calostro es capaz de ayudar a la defensa local (inmunoglobulina A); modula la respuesta inmunitaria (inmunoglobulina E, M, G); promueve la acción antibacteriana y antiviral (lactoferrina y transferrina); modula los factores de inflamación (citoquinas, interleucina); promueve el crecimiento normal de las células, las actividades celulares normales, la migración celular y la proliferación, y la reparación tisular (factor de crecimiento transformante alfa y beta, factor de crecimiento epidérmico); estimula la restauración de la mucosa; y acelera la cicatrización de las heridas (factores de crecimiento IGF-1 y -2 similares a la insulina). En particular, IGF-1 está implicado en la retroalimentación regulatoria de la hormona de crecimiento e interfiere con proteínas de unión del factor de crecimiento similares a la insulina. Hasta la fecha, sobre la base de la mejor ventaja del conocimiento científico disponible para nosotros, no hay hormonas sexuales que estén directamente presentes en el calostro bovino (Anexo, Páginas 3 y 4).

En el grupo placebo, las ratas recibieron gel ZP-025 sin calostro; en los grupos tratados las ratas recibieron gel ZP-025 que contiene 0,5% o 2,3% del calostro bovino. La eficacia del producto se evaluó por comparación estadística entre las dos dosis diferentes de calostro y placebo con el fin de establecer una posible superioridad del producto debido a la presencia de calostro. Después de 4 semanas de tratamiento dos veces al día por vía intravaginal con ZP-025 al 0,5%, no hubo diferencia estadística en la amplitud, la AUC, y la capacitancia vascular estuvo presente en comparación con el grupo placebo (Figura 4).

Por el contrario, el tratamiento con ZP-025 2,3% aumentó significativamente todos los

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

parámetros de la congestión de sangre vaginal siguiente a la estimulación PN, es decir, la amplitud máxima de la respuesta, AUC de la respuesta, y la capacitancia vascular en comparación con el grupo placebo (***) $P < 0,001$ para cada parámetro, análisis ANOVA de dos vías) (Figura 4) (Anexo, Páginas 6 y 10).

El estudio muestra que la aplicación de un nuevo gel vaginal que contiene el calostro purificado durante 4 semanas proporcionó efectos beneficiosos en un modelo animal de atrofia vaginal (Anexo, Página 14).

Estudios anteriores demuestran que la ovariectomía produce una disminución significativa en el útero de los animales y el peso húmedo del tejido vaginal y el espesor epitelial (Anexo, Página 15).

El estudio adjunto muestra que una aplicación dos veces al día de placebo, ZP-025 a 0,5% y a 2,3% de calostro a ratas OVX durante 4 semanas aumenta el espesor del epitelio vaginal en comparación con las ratas OVX no tratadas y se observa un aspecto morfológico de ciclo estral fisiológico del epitelio vaginal. A pesar del hecho de que el producto no es capaz de restaurar completamente el espesor epitelial a la misma condición que antes de la ovariectomía o con estrógenos, ni es capaz de mejorar significativamente el peso húmedo del tejido, presenta un efecto evidente en los animales tratados, con un epitelio de al menos cinco capas de células, en comparación con una o dos capas de células en los animales no tratados (Anexo, Página 16).

Este efecto de ZP-025 en todas las concentraciones de calostro podría ser debido no sólo a los factores de crecimiento bien conocidos comprendidos en el calostro per se, sino también a los otros componentes presentes en la fórmula re-epitelizante, tales como betaína, sericina y pantenol. Además, el compuesto antioxidante (vitamina E) incluido en el producto podría retardar las reacciones químicas biológicamente destructivas en la vida de los organismos a través de su capacidad para eliminar los oxidantes y los radicales libres (Anexo, Página 16).

El nuevo gel vaginal ZP-025 que contiene el calostro mejora la hemodinámica vaginal y espesor del epitelio vaginal en ratas con atrofia vaginal inducida por OVX. Los marcados cambios en la hemodinámica vaginal y la histología como consecuencia de la privación de estrógeno son mejorados por un tratamiento con ZP-025 que contiene la concentración de 2,3% de calostro purificado (Anexo, Página 17).

Con base en el análisis anterior, ni D1 ni D2 ni D3, ya sea solos o en combinación, enseñan o sugieren todas las características de la presente invención. En vista de lo anterior, **las nuevas reivindicaciones presentadas no son obvias y por lo tanto son inventivas sobre el estado del arte.** Por lo tanto, se le solicita respetuosamente al señor examinador retire la objeción de nivel inventivo.

En este orden de ideas, es claro que el análisis de nivel inventivo realizado por el señor

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

examinador es el resultado de una evaluación del tipo “*hindsight*” o retrospectivo. De hecho, este tipo de análisis no es permitido para desvirtuar el concepto de altura inventiva.

Por consiguiente, teniendo en cuenta los argumentos presentados, se concluye que las enseñanzas de las anterioridades citadas por su Despacho no llevan a un técnico versado en la materia a obtener la presente invención ya que no revelan o enseñan las características técnicas esenciales relacionadas con la misma, tal como acá es reivindicada. Lo anterior si se tiene en cuenta que para el estudio de nivel inventivo el Examinador no puede adoptar la posición de un inventor y que además no puede partir de la solución dada sino simplemente de lo que expresamente revelen el o los documentos más cercanos del estado del arte.

En este tipo de análisis, el examinador no enfoca su análisis en el momento en el que el solicitante plantea un problema con el fin de solucionar fallas técnicas existentes en los productos convencionales de un campo técnico específico, sino que se enfoca en la solución dada al problema planteado y en la búsqueda de documentos con conceptos análogos. A este respecto dirijo la atención del examinador al “Manual para Examen de Solicitudes de Patentes de Invención en las Oficinas de Propiedad Industrial de los Países de la Comunidad Andina”, publicado en la página Web de la Comunidad Andina, donde se establece en la página 74 en cuanto al nivel inventivo “...que la búsqueda de anterioridades se efectúa a posteriori, tomando como punto de partida la misma invención,...el examinador debe realizar el esfuerzo intelectual de colocarse en la situación que ha tenido que afrontar el técnico con conocimientos medios en la materia en un momento en que la invención no era conocida, es decir antes de la invención”. (El subrayado es nuestro).

En el presente caso, para el examinador puede resultar “obvio” que el objeto de la presente solicitud se derive de la materia objeto de los documentos citados, sin dar mayor importancia al trabajo desplegado y a la capacidad inventiva del solicitante para lograr llegar a la solución del problema planteado. Es decir, que el examinador no hace su análisis partiendo del problema mismo que existía en la técnica en el momento en que el solicitante dirige todos sus esfuerzos para encontrar una solución, sino que enfoca su estudio en el momento en que el problema ya fue resuelto.

En cuanto a las características técnicas antes mencionadas relacionadas con la presente invención, nos permitimos hacer hincapié en lo argumentado en la interpretación prejudicial 81-IP-2006 del Tribunal que ha establecido lo siguiente: “Ante ello, es preciso definir lo que se entiende por “obvio” y por “evidente”. Lo obvio es aquello que salta a la vista de manera clara y directa; lo que se encuentra o pone delante de los ojos o que no tiene dificultad. Mientras que lo evidente es algo tan cierto y claro que nadie puede dudar racionalmente de ello; se presenta de manera tan perceptible y manifiesta que muestra certeza y claridad¹. Como se podrá ver, la diferencia radica en lo “tan”, de forma que algo que resulte obvio no es necesariamente evidente; empero lo que es evidente, es también obvio.” (El subrayado es nuestro).

¹ Diccionario de la Lengua Española. Vigésima Primera Edición. Madrid – España. 1992. Definiciones de evidente, evidencia y obvio. Pp. 655 y 1036.

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

Es claro que la presente invención **no salta a la vista** de una persona medianamente versada en la técnica cuando se cuenta con la información de D1, D2 y D3.

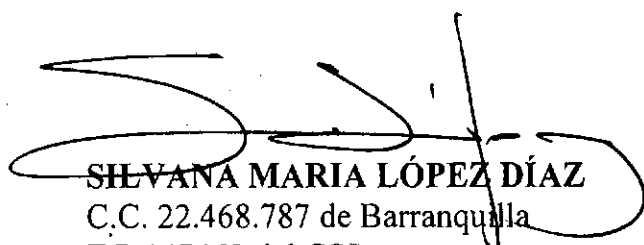
En este sentido, y siguiendo el Manual Andino de Patentes, la presente invención tal y como se encuentra definida en las nuevas reivindicaciones 1 a 4, tiene diferencias con el estado del arte e implicó un nivel inventivo durante su desarrollo, por lo cual debe ser considerada como novedosa e inventiva según las disposiciones de los artículos 16 y 18 de la Decisión 486.

4. Conclusiones

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese despacho, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio.

En consecuencia, solicitamos a ese despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional

Señor Superintendente,



SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

C.C. 22.468.787 de Barranquilla

T.P 147463 del CSJ

notificaciones@clarkemodet.com.co

ANEXO

- Nuevo capítulo de reivindicaciones
- Ensayo clínico: EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE UN GEL INTRAVAGINAL NUEVO QUE CONTIENE, CALOSTRO PURIFICADO DE BOVINO, EN EL FLUJO DE SANGRE DE LA VAGINA Y ATROFIA VAGINAL EN RATAS OVARIECTOMIZADAS.

REIVINDICACIONES

1.- Composiciones tópicas vaginales en forma de gel que comprenden una fracción de calostro enriquecido con inmunoglobulinas, que se seleccionan del grupo que consiste de: inmunoglobulinas de clase IgG2 y IgA y el complemento c3/c4, factores de crecimiento seleccionados del grupo que consiste de: TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante), EGF (factor de crecimiento epitelial), IGF 1 (factor de crecimiento similar a insulina), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), FGF-b (factor de crecimiento de fibroblastos básico), la GH (hormona del crecimiento), el GHRF (factor de crecimiento de la hormona del crecimiento), el NGF (factor de crecimiento nervioso) y proteínas ricas en prolina, factores quimiotácticos seleccionados del grupo que consiste de: eotaxina, IP-10-ligando de quimocina10, MCP-1 (factor quimiotáctico del monocito 1), IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-17, IL-10, el interferón-gamma y TNF- α (factor de necrosis tumoral), y factores antimicrobianos/antivirales seleccionados del grupo que consiste de: transferrina, lactoferrina, lisozima y lactoperoxidasa, parcialmente en forma libre, cuya concentración puede variar entre 1 a 10% y parcialmente encapsulada en microesferas mucoadhesivas, en una concentración que puede variar entre 0.1 a 5%.

2.- Un método para obtener la fracción de calostro de la composición de la reivindicación 1, a partir del calostro bovino ordeñado entre la quinta y sexta hora después de parir, que comprende las etapas de:

- adicionar agentes antisépticos al calostro, seleccionados de: sorbato de potasio y benzoato de sodio, cada uno en una concentración de 12.5%, o alternativamente, fenoxietanol en la concentración de 2.5% o urea de diazolidinilo en la concentración de 1%, para asegurar la esterilidad y apirogenicidad;
- diluir con solución salina;
- microfiltrar tangencialmente, una o más veces, a través de las membranas cerámicas con corte que varía entre 2 y 6 μm ;
- pasar la solución a través de las membranas o tamices moleculares con corte de 300,000 Daltons;
- realizar diálisis mediante ultrafiltración de alta presión hasta la remoción completa de los agentes antisépticos; y
- liofilizar.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque además, el calostro se obtiene de vacas Guernsey o Holstein.

4.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque además contiene uno o más de los siguientes ingredientes:

- a) sericina;
- b) pantenol;
- c) betaína;
- d) extracto de Aloe vera;
- e) vitamina E; y
- f) extracto de *Lepidium meyenii*.

MEDICINA SEXUAL
ACCESO ABIERTO



EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE UN GEL INTRAVAGINAL NUEVO QUE
CONTIENE, CALOSTRO PURIFICADO DE BOVINO, EN EL FLUJO DE
SANGRE DE LA VAGINA Y ATROFIA VAGINAL EN RATAS
OVARIECTOMIZADAS

Silvia Vailati, MSc, * Elsa Melloni, MSc, * Ermanno Riscassi, MSc, [†] Delphine Behr
Roussel, PhD, ^{‡§} y Marco Sardina, MD, PhD *

*Zambon S.pA, Bresso (Milán), Italia; [†]Pharma Research Consulting s.r.l, Milán,
Italia; [‡]Pelvipharm, Montigny Le-Bretonneux, Francia; [§]EA 4501 Université de
Versailles Saint Quentin en Yvelines, Montigny-Le-Bretonneux, Francia

DOI: 10.1002/sm2.8

RESUMEN -----

Introducción. La sequedad vaginal debido a la atrofia vaginal es una queja común de las mujeres posmenopáusicas, lo que interfiere con la función sexual y la calidad de vida, la terapia de reemplazo hormonal es la única terapia eficaz pero con riesgos conocidos que dejan necesidades médicas no cubiertas. Se ha desarrollado un nuevo producto, gel vaginal ZP-025, que contiene calostro bovino purificado (dializado liofilizado), para el tratamiento de la sequedad vaginal secundaria a la atrofia vaginal.

Objetivo. El estudio tiene como objetivo investigar los efectos de la aplicación intravaginal de ZP-025 sobre la atrofia vaginal utilizando un modelo animal.

Métodos. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley hembras ovariectomizadas. Tres semanas después de la cirugía, las ratas se dividieron en cuatro grupos y se trataron durante 4 semanas (dos veces al día) con placebo o ZP-025 en

10

concentraciones bajas (0,5%) o alta (2,3%) de calostro; en el grupo control, las ratas no recibieron ningún tratamiento. Los cambios en el flujo de sangre vaginal debido a la estimulación del nervio pélvico se evaluaron mediante flujometría Doppler láser y el tejido vaginal se recogió para ensayo histológico.

Principales medidas de resultado. Las principales medidas de resultado fueron el flujo de sangre vaginal antes y después de la estimulación del nervio pélvico y la histología del epitelio vaginal.

Resultados. El tratamiento con ZP-025 de ratas ovariectomizadas indujo un aumento de los parámetros del flujo de sangre vaginal (capacitancia vascular, amplitud y área bajo la curva de respuesta) en respuesta a la estimulación del nervio pélvico en comparación con el grupo control, estadísticamente significativo al 2,3%. El epitelio vaginal mostró un aspecto fisiológico de ciclo estral en los animales tratados, con al menos cinco capas de células frente a una o dos capas de células en las ratas de control. Como era de esperar a partir de una formulación tópica, no se observaron efectos sistémicos sobre los pesos corporales y los pesos húmedos uterinos con la aplicación de ZP-025.

Conclusiones. En este estudio, el nuevo producto ZP-025, que contiene el calostro purificado, ha demostrado tener efectos beneficiosos sobre la atrofia vaginal en ratas ovariectomizadas, mejorando la hemodinámica vaginal y el espesor del epitelio vaginal. Vailati S, Melloni E, Riscassi E, Behr Roussel D, and Sardina M. Evaluation of the effects of a new intravaginal gel, containing purified bovine colostrum, on vaginal blood flow and vaginal atrophy in ovariectomized rat. Sex Med **,**,**.*.

Palabras clave. Atrofia vaginal; Calostro bovino; Rata Ovariectomizada; Flujo de sangre vaginal.

Introducción

La atrofia vaginal es causada por una disminución en la producción de estrógenos y es una queja común de las mujeres posmenopáusicas, interfiriendo con la función sexual y la calidad de vida. En aproximadamente 45% de las mujeres menopáusicas, la atrofia vaginal puede ser clínicamente manifiesta como un síndrome de sequedad vaginal, picazón, irritación, y dispareunia [1,2].

La atrofia vaginal llega a ser clínicamente evidente 4-5 años después de la menopausia y sus señales de identidad son el adelgazamiento de las capas epiteliales vaginales, aumento del pH vaginal, disminución en el flujo de sangre local, y la disminución de la secreción vaginal. Los estudios clínicos han demostrado que estos signos se correlacionan significativamente con la disminución en la circulación de las hormonas ováricas [3-6].

Mientras que la terapia hormonal sistémica y local basada en estrógeno es eficaz en el tratamiento de síntomas de la atrofia vaginal en mujeres postmenopáusicas [3,7-9], estos medicamentos están contraindicados en algunas poblaciones (mujeres con sangrado vaginal/uterino desconocido o aquellas con un cáncer de endometrio, de ovario sospechado o desconocido, y cáncer de mama) y otras mujeres optan por no tomarlos por temor a su seguridad [10,11]. Debido a estos problemas, el trabajo reciente se ha centrado en el desarrollo más específico, y en muchos casos no hormonal, alternativos a la terapia hormonal posmenopáusica tradicional para tratar la sequedad vaginal en presencia o en ausencia de atrofia vaginal [12].

Zambon SpA (Bresso, Milán, Italia) ha desarrollado un producto en gel (Gel vaginal ZP-025 Monurelle Biogel), que contiene el calostro bovino purificado. Para ser administrado por vía tópica, para el tratamiento de la sequedad vaginal

también en presencia de atrofia vaginal. El calostro es una sustancia producida por la glándula mamaria femenina durante las primeras horas después del parto, y numerosos investigadores han informado de que el calostro imparte muchas ventajas para el desarrollo de los niños [13]. Gracias a sus componentes, el calostro es capaz de ayudar a la defensa local (inmunoglobulina A); modula la respuesta inmunitaria (inmunoglobulina E, M, G); promueve la acción antibacteriana y antiviral (lactoferrina y transferrina); modula los factores de inflamación (citoquinas, interleucina); promueve el crecimiento normal de las células, las actividades celulares normales, la migración celular y la proliferación, y la reparación tisular (factor de crecimiento transformante alfa y beta, factor de crecimiento epidérmico); estimula la restauración de la mucosa; y acelera la cicatrización de las heridas (factores de crecimiento IGF-1 y -2 similares a la insulina). En particular, IGF-1 está implicado en la retroalimentación regulatoria de la hormona de crecimiento [14] e interfiere con proteínas de unión del factor de crecimiento similares a la insulina [15]. Hasta la fecha, sobre la base de la mejor ventaja del conocimiento científico disponible para nosotros, no hay hormonas sexuales que estén directamente presentes en el calostro bovino.

Debido a que la mucosa vaginal, por sus características anatómicas y fisiológicas, está expuesta a daño del epitelio y al ecosistema vaginal y las alteraciones de los factores de defensa local, el calostro puede ayudar en la promoción de la restauración trófica de la mucosa y la preservación de la agresión bactericida y viral. Nuestra hipótesis es que la aplicación tópica de calostro podría tener un efecto beneficioso específicamente en la atrofia vaginal.

Además del calostro purificado, este gel vaginal contiene otras sustancias naturales con propiedades humectantes, hidratantes, re-epitelizantes y

antioxidantes en concentraciones <5%: betaína, sericina, pantenol, glicerina, tocoferol, extracto de raíz de *Lepidium meyenii*.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del gel vaginal ZP-025 sobre el flujo de sangre vaginal y la morfología del tejido usando ratas ovariectomizadas (OVX) como un modelo animal para la atrofia vaginal. Este modelo experimental bien caracterizado es muy útil para inducir la menopausia experimental, en un corto periodo de tiempo post-ovariectomía, las ratas hembras sin secreción hormonal ovárica imitan muchos cambios posmenopáusicos humanos, incluyendo la atrofia vaginal. Ha sido bien documentado también en este modelo animal que el reemplazo de estrógeno aumenta el flujo de sangre pélvico y restaura la integridad estructural y funcional del tejido vaginal [16-21], lo que confirma que la pérdida de estrógenos es el factor clave que conduce a la atrofia vaginal.

MATERIALES Y METODOS

Animales y Tratamientos

Ratas adultas hembras Sprague-Dawley no embarazadas (Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia, de 8-10 semanas de edad, 200-225 g) se alojaron 7 días antes del comienzo de los experimentos, con libre acceso al alimento estándar y agua y se mantuvieron en un ciclo invertido de 12 horas oscuridad/luz (10:00/22:00). Todos los procedimientos se realizaron de conformidad con la legislación sobre el uso de animales de laboratorio (NIH publicación N° 85-23, versión revisada en 1996) y el Reglamento de cuidado de los animales en vigor en Francia a partir de 1988 (autorización competente Ministerio Francés de Agricultura, Acuerdo No. A91-471-109, mayo de 2009).

12

Después de un periodo de aclimatación de 1-semana, todas las ratas fueron ovariectomizadas bilateralmente bajo anestesia con isoflurano 1-1,2% (CSP, Cournon, Francia).

Después de 3 semanas de periodo postquirúrgico para inducir la menopausia artificial, las ratas se dividieron en cuatro grupos ($n = 8/\text{grupo}$) y recibieron 50 μL de los siguientes tratamientos intravaginales, entregado a través de una micropipeta dos veces al día (intervalos 8-10 horas) durante 4 semanas: en el grupo de control, las ratas no recibieron ningún tratamiento, pero se introdujo una punta de la micropipeta en la vagina; en el grupo placebo, las ratas recibieron gel ZP-025 sin calostro; en los grupos tratados las ratas recibieron gel ZP-025 que contiene 0,5% o 2,3% del calostro bovino.

El peso corporal se registró dos veces por semana.

Evaluación In Vivo del flujo de sangre vagina.

Al final del periodo de tratamiento, se evaluaron los cambios en el flujo de sangre vaginal en respuesta a la estimulación del nervio pélvico en cada rata de los cuatro grupos experimentales. Se midió la congestión vaginal mediante el control de flujo de sangre en la pared vaginal utilizando la medición por percusión Doppler láser (LDPM) (Oxford Optronix Ltd, Abingdon, Oxfordshire, Reino Unido) en condiciones de línea base y después de la estimulación del nervio pélvico. La LDPM se expresa en unidades arbitrarias (AU).

Antes de las mediciones, las ratas se anestesiaron con uretano 1,2 mg/kg y su temperatura se mantuvo a 37°C (temperatura rectal $37 \pm 0,3$ °C) utilizando una manta homeotérmica. Luego las ratas se traqueotomizaron para evitar que aspiraran saliva y, para cuando sea necesario, realizar ventilación artificial. La arteria carótida se cateterizó con tubo de polietileno lleno de solución salina

heparinizada (25 UI/mL) para registrar la presión arterial (PB) a través de un transductor de presión (Elcomatic 750, Glasgow, UK).

El nervio pélvico (PN) se expone a través de una incisión en la línea promedio suprapúbica y se separó del tejido conectivo usando un microscopio de disección. El PN se colocó en un electrodo de estimulación bipolar de platino conectado a un estimulador eléctrico (Sistemas de AM, Modelo 2100, Phymep, Francia) que entrega una serie de impulsos de onda cuadrada. Las microsondas Doppler láser no invasivas se colocaron contra el lado lateroventral interior del lumen de la vagina 15-17 mm distal de la vulva.

Se realizaron medidas computarizadas simultáneas de BP y LDPM en diferentes tiempos: en $t = 0$, se inició el registro continuo de BP y LDPM y la sonda láser se colocó en la pared vaginal para realizar las mediciones de línea base de la perfusión de la pared vaginal; En $t = 30$ minutos, la sonda láser se posicionó y la LDPM se estabilizó durante 10 minutos, hasta que la estimulación PN; En $t = 40$ minutos y a intervalos de 5 minutos después de esto, se estimuló la PN en pulsos de ondas cuadradas de 1 ms, 6V, durante 30 segundos por diferentes frecuencias de estimulación (2, 4, 6, 8 y 10 Hz: éstos diferentes estímulos eléctricos se corrieron con asignación y repitieron dos veces a fin de establecer una curva de respuesta en frecuencia para cada animal); En $t = 90$ minutos, el registro terminó.

Se estudiaron los siguientes parámetros: la línea base LDPM y BP, medidas durante los 30 minutos del período de línea base antes de cualquier estimulación PN (promedio de tres mediciones hechas en tres regiones diferentes de la pared vaginal durante un periodo cada una de 10 minutos).

Y, para cada estimulación PN:

- La amplitud promedio máxima de la respuesta, que es el porcentaje del aumento LDPM calculado como sigue: $\Delta \text{LDPM} \times 100 / \text{base LDPM}$, y se expresa en %.
- El área bajo la curva (AUC) de la respuesta calculada para toda la respuesta, normalizado por la base LDPM y se expresa en % x segundo
- La capacitancia vascular, que corresponde a la relación de la amplitud máxima promedio de la respuesta a la correspondiente BP promedio expresada en %/mm Hg

Los parámetros de respuestas LDPM se normalizaron a su propia medición de LDPM de línea base (LDPM base, lo que representa 100%) a fin de comparar de forma fiable cada rata, puesto que el flujo de sangre a través de cualquier tejido dado depende de la BP sistémica.

Recolección de tejidos y Procesamiento

En los experimentos de LDPM finales, todas las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de uretano y se recogieron la vagina y el útero (incluidos los cuernos uterinos y cuello uterino).

Los tejidos se colocaron inmediatamente en solución salina fisiológica fría para eliminar el exceso de sangre y se disecaron cuidadosamente libres de tejido circundante.

Se pesaron la vagina y el útero (peso húmedo) y luego se fijaron durante 48 horas en 10% de formalina tamponada neutra y se almacenaron en etanol al 70% a 4°C. Después de la deshidratación y la incrustación en cera de parafina, se cortaron

secciones de los tejidos a 5 μ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina para el análisis histológico no ciego.

Toda la vagina, se evaluó teniendo en cuenta tres porciones:

1. La parte proximal, cerca del cuello uterino
2. La parte distal, cerca de la vulva
3. La parte central, entre la parte proximal y una parte distal

Análisis De Los Datos

Todos los resultados se expresaron como promedio $\pm$ SEM. Se utilizó el Test de Grubbs para la detección y la exclusión de los valores atípicos. Se analizó la comparación entre los grupos de tratamiento mediante la prueba t-Teste Student o un análisis de una vía de la varianza (ANOVA) o una de dos vías ANOVA. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

Resultados

Peso Corporal

En todos los grupos, el peso corporal de las ratas aumentó regularmente desde el día de la ovariectomía hasta el comienzo del período de tratamiento (día 21) (Figura 1a). No hubo diferencia significativa entre los grupos experimentales en los pesos corporales medidos en el momento de la cirugía (día 0-ANOVA de una vía $P > 0,05$), ni en el momento de los tratamientos iniciales (día 21). Del mismo modo, los tratamientos dos veces al día con placebo, ZP-025 al 0,5%, y ZP-025 2,3% durante 4 semanas no modificaron el cambio de peso corporal entre el inicio (día 21) y el final del periodo de aplicación (día 49) (Figura 1B) en comparación con el control.

Determinación de la respuesta sexual Periférica: Congestión de la sangre vaginal por LDPM.

La aplicación intravaginal de placebo durante 4 semanas, 3 semanas después de la ovariectomía, no cambió significativamente el promedio de la línea base BP ni el de la línea base LDPM en comparación con el grupo control (Figura 2).

De la misma manera, ni ZP-025 0,5% ni ZP-025 2,3% modificaron ya sea BP (Figura 2 A) o LDPM línea base (Figura 2B) en comparación con placebo.

Después de la estimulación PN, los parámetros de congestión de sangre vaginal (i.e., amplitud máxima de la respuesta, AUC de la respuesta, y la capacitancia vascular) aumentó en cada grupo en paralelo con la frecuencia de estimulación eléctrica PN. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cada parámetro entre el placebo y el grupo control (Figura 3). La eficacia del producto se evaluó por comparación estadística entre las dos dosis diferentes de calostro y placebo con el fin de establecer una posible superioridad del producto debido a la presencia de calostro. Después de 4 semanas de tratamiento dos veces al día por vía intravaginal con ZP-025 al 0,5%, no hubo diferencia estadística en la amplitud, la AUC, y la capacitancia vascular estuvo presente en comparación con el grupo placebo (Figura 4). Por el contrario, el tratamiento con ZP-025 2,3% aumentó significativamente todos los parámetros de la congestión de sangre vaginal siguiente a la estimulación PN, es decir, la amplitud máxima de la respuesta, AUC de la respuesta, y la capacitancia vascular en comparación con el grupo placebo (***) $P < 0,001$ para cada parámetro, análisis ANOVA de dos vías) (Figura 4).

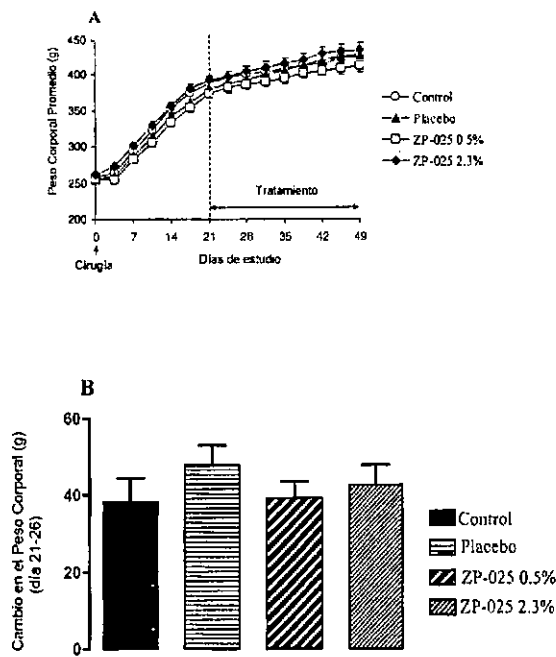


Figura 1 Evolución de (A) peso corporal a partir de la cirugía hasta el final del tratamiento y (B) cambio de peso corporal durante las 4 semanas de tratamiento intravaginal en grupos bien sea en placebo o ZP-025 0,5% o ZP-025 2,3% en comparación con el grupo de control en ratas ovariectomizadas (ANOVA de una vía, no significativo).

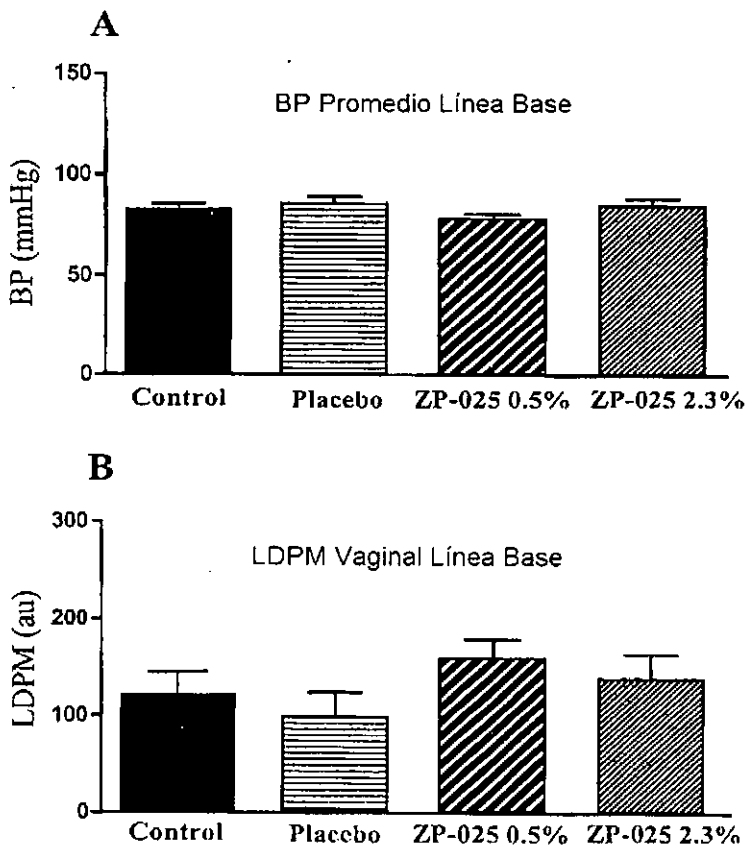


Figura 2 (A) Línea base promedio de la presión arterial (BP) y (B) medición de la línea base de percusión Doppler láser vaginal medida en ratas ovariectomizadas anestesiadas (ANOVA de una vía, no significativa). au = unidad arbitraria.

Peso de la Vagina y el útero

El tratamiento intravaginal con placebo, ZP-025 0,5%, o ZP-025 2,3% durante 4 semanas en ratas OVX no indujo ninguna modificación del aspecto macroscópico

de la vagina y el útero. De hecho, en todos los grupos de tratamiento (control, placebo, ZP-025 0,5%, y ZP-025 2,3%), la apariencia de la vagina y el útero fue normal y se observaron cuernos uterinos delgados.

Por otra parte, después de 4 semanas de tratamiento intravaginal dos veces al día con placebo, ZP-025 0,5% y ZP-025 2,3%, el peso húmedo del tejido de la vagina y el útero normalizado al peso corporal no se modificaron en comparación con el control (Tabla 1).

Evaluación histopatológica de la vagina y el útero siete semanas después de la ovariectomía, al final del periodo de tratamiento, se observó atrofia en el útero y cuello uterino en todos los animales de todos los grupos experimentales. La atrofia involucró endometrio y miometrio.

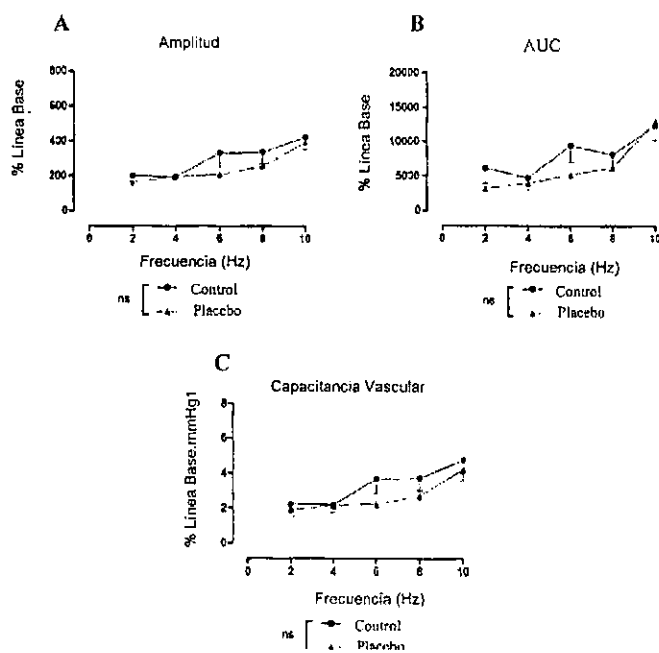


Figura 3 Efecto del tratamiento intravaginal dos veces al día con placebo o control en ratas ovariectomizadas anestesiadas sobre la congestión de la sangre vaginal: amplitud de la respuesta (A); AUC de la respuesta (B); y Capacitancia Vascular (C) provocada por estímulos eléctricos del nervio pélvico en frecuencias aumentadas (análisis ANOVA de dos vías). AUC = área bajo la curva; ns = no significativa.

21

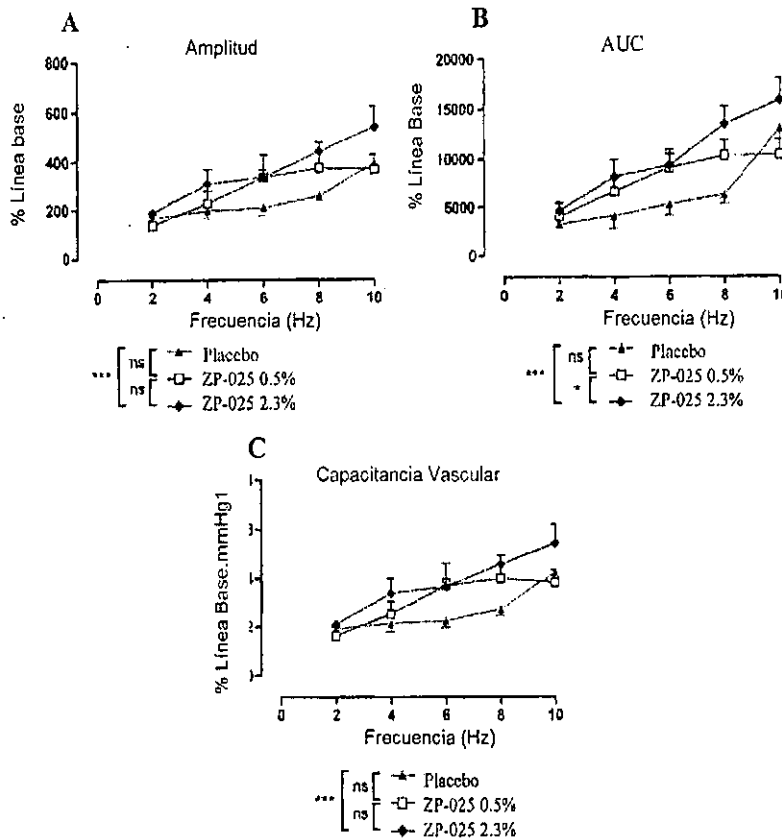


Figura 4 Efecto de un tratamiento intravaginal dos veces al día con placebo o ZP-025 0,5% o ZP-025 2,3% durante 4 semanas en ratas Ovariectomizadas anestesiadas en la congestión de sangre vaginal: amplitud de la respuesta (A); AUG de la respuesta (B); y la capacitancia vascular (C) provocada por estímulos eléctricos del nervio pélvico en frecuencias aumentadas (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, ANOVA de dos vías). AUC = área bajo la curva; ns = no significativa.

La atrofia también se observó en el epitelio vaginal en todos los animales de control (Figura 5A). En particular, se presentó un adelgazamiento significativo en la parte proximal y parte central del epitelio de la vagina, que se redujo a una o dos capas de células y llegando a un máximo de tres a cuatro capas de células en la parte distal de algunos animales de control.

Por el contrario, el epitelio vaginal mostró un aspecto morfológico de ciclo estral fisiológico en animales que recibieron placebo o ZP-025 0,5% o ZP-025 2,3% (Figura 5B). El epitelio consistió de una o dos capas de células con células superficiales aplanadas solamente en la parte proximal con aumento progresivo en las capas de células (al menos 5) en la parte central y distal. En la parte central, las capas superficiales de las células epiteliales fueron en algunos casos cúbicas con mucificación mínima, mientras que en la parte distal, el epitelio de al menos cinco capas de célula fue escamoso con presencia de estrato corneo en la

mayoría de los animales que recibieron placebo o o ZP-025 0,5% o ZP-025 2,3%. Tales cambios son característicos del ciclo estral [22].

Discusión

Nuestro estudio muestra que la aplicación de un nuevo gel vaginal que contiene el calostro purificado durante 4 semanas proporcionó efectos beneficiosos en un modelo animal de atrofia vaginal.

El aumento de la frecuencia-dependiente del flujo de sangre vaginal provocada por la estimulación PN es un paradigma experimental ampliamente utilizado para imitar la respuesta sexual femenina en animales intactos [16,23-25]. La ovariectomía, que reduce los niveles de estrógeno, causa una marcada disminución en la hemodinámica vaginal, también en la respuesta a la estimulación PN [16]; Sin embargo, la sustitución de estrógeno en ratas OVX aminora el flujo de sangre vaginal y los parámetros relacionados, después de la estimulación PN [16].

Tabla 1. Relación del peso corporal del tejido húmedo de la vagina y el útero al final de las 4 semanas de tratamiento en ratas OVX.

Relación en peso del peso corporal húmedo (g/100 g) (promedio ± SEM)				
	Control	Placebo	ZP-025 0.5%	ZP-025 2.3%
Vagina	0.030 ± 0.001	0.032 ± 0.002	0.032 ± 0.001	0.034 ± 0.01
Útero	0.027 ± 0.001	0.026 ± 0.001	0.029 ± 0.001	0.029 ± 0.001

ns = no significativo, ANOVA una vía

93

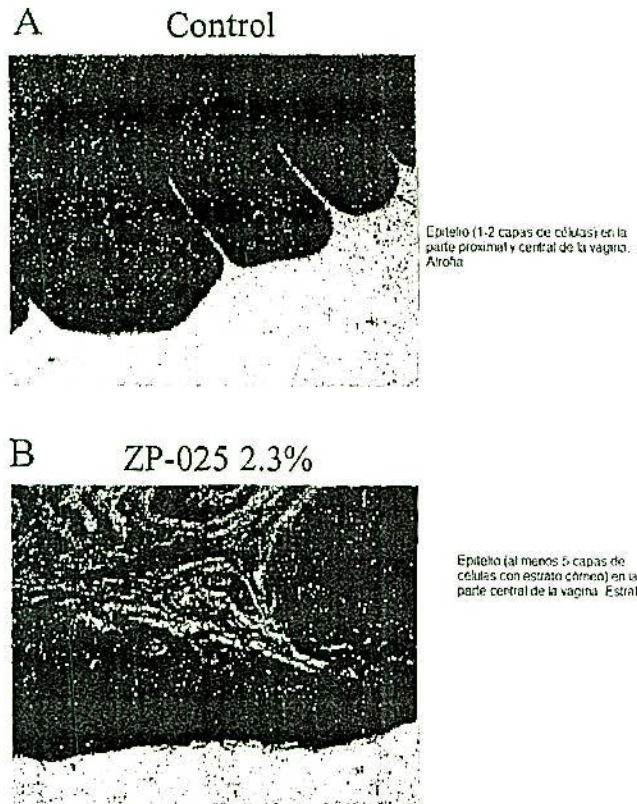


Figura 5 Tinción con hematoxilina y eosina del epitelio vaginal de rata en una ampliación de 100x. Se muestran las secciones de tejido representativas. (A) epitelio vaginal de una rata del grupo de control; (B) epitelio vaginal de una rata que recibió una aplicación intravaginal dos veces al día de ZP-025 2,3% durante 4 semanas. El tejido de control de animales muestra un epitelio vaginal atrófico, con un menor número de capas de células (A). El tratamiento con ZP-025 2,3% es capaz de restaurar una condición estral en ratas ovariectomizadas (B).

En este estudio, después de la estimulación PN a frecuencias diferentes, sólo el tratamiento con ZP-025 que contiene 2,3% de calostro aumenta todos los parámetros de congestión de sangre vaginal, es decir, amplitud máxima de la respuesta, AUC de la respuesta, y la capacitancia vascular de una manera estadísticamente significativa. Por el contrario, para los mismos parámetros no se observaron diferencias entre el control y el placebo y sólo una tendencia con la baja dosis de calostro estaba presente cuando se compara con placebo.

Estudios anteriores demuestran que la ovariectomía produce una disminución significativa en el útero de los animales y el peso húmedo del tejido vaginal y el espesor epitelial [16,19, 26]. De hecho, el epitelio escamoso estratificado, que

consiste en aproximadamente seis a ocho capas de células en ratas intactas, se reduce a una o dos capas de células después de la ovariectomía. Los estrógenos, cuando se entrega por vía subcutánea, restauran el útero y el peso húmedo vaginal, así como el espesor epitelial, con el mismo número de capas vistas en las ratas no-OVX [16,26].

Nuestro estudio muestra que una aplicación dos veces al día de placebo, ZP-025 a 0,5% y a 2,3% de calostro a ratas OVX durante 4 semanas aumenta el espesor del epitelio vaginal en comparación con las ratas OVX no tratadas y se observa un aspecto morfológico de ciclo estral fisiológico del epitelio vaginal. A pesar del hecho de que el producto no es capaz de restaurar completamente el espesor epitelial a la misma condición que antes de la ovariectomía o con estrógenos [26], ni es capaz de mejorar significativamente el peso húmedo del tejido, presenta un efecto evidente en los animales tratados, con un epitelio de al menos cinco capas de células, en comparación con una o dos capas de células en los animales no tratados. Este efecto de ZP-025 en todas las concentraciones de calostro podría ser debido no sólo a los factores de crecimiento bien conocidos comprendidos en el calostro per se, sino también a los otros componentes presentes en la fórmula re-epitelizante, tales como betaína, sericina y pantenol [27, 28]. Además, el compuesto antioxidante (vitamina E) incluido en el producto podría retardar las reacciones químicas biológicamente destructivas en la vida de los organismos a través de su capacidad para eliminar los oxidantes y los radicales libres [29]. Como consecuencia, el placebo no se puede considerar totalmente desprovisto de cualquier efecto, como se muestra en el análisis de la histología del epitelio vaginal, donde la respuesta al placebo indica que no es completamente inerte; sin embargo, se obtuvo una respuesta más completa con el gel que contiene el calostro sobre los otros parámetros.

25

Por último, el hecho que la atrofia del útero se mantenga histológicamente sin cambios en todos los grupos experimentales después de un tratamiento de 4 semanas indica que los efectos del producto se limitan específicamente a la vagina, como se esperaba para una preparación tópica. Esto está en contraste con las preparaciones de estrógeno para uso tópico, que de todos modos conduce a un aumento de los niveles de estrógeno sistémico, aumentando así el riesgo bien conocido de las acciones sistémicas [30-32].

Aunque muchas mujeres reportan que ganaron peso en o cerca del momento de la menopausia [33], la amplitud e incluso la realidad de la ganancia en peso relacionada con la menopausia no es consistente entre los estudios [34,35].

En ratas, la ovariectomía se asocia a un aumento de peso corporal [23,36], debido principalmente a hiperfagia e hipoactividad [37,38]. Se ha demostrado que el reemplazo hormonal con 17β estradiol es capaz de reducir la ganancia en peso corporal en ratas OVX [36,38], mientras que en el presente estudio con ZP-025 no hay diferencia significativa entre los grupos experimentales en el peso corporal de los animales, medidos tanto al comienzo de los tratamientos y al final (después de 4 semanas de tratamiento).

Conclusión

El nuevo gel vaginal ZP-025 que contiene el calostro mejora la hemodinámica vaginal y espesor del epitelio vaginal en ratas con atrofia vaginal inducida por OVX. Los marcados cambios en la hemodinámica vaginal y la histología como consecuencia de la privación de estrógeno son mejorados por un tratamiento con ZP-025 que contiene la concentración de 2,3% de calostro purificado. Los ensayos clínicos son necesarios para determinar si estos beneficios podrían ser trasladados a las mujeres menopáusicas.

Autor correspondiente: Silvia Vailati, MSc, Zambon SpA, Via Lillo del Duca 10, 20091 Bresso (Milán), Italia. E-mail: silvia.vailati@zambongroup.com

Conflicto de interés: S. Vailati, E. Melloni y M. Sardina son empleados de Zambon SpA y E. Riscassi es un consultor independiente de apoyo en Zambon SpA en los proyectos de desarrollo.

Referencias

- 1 Iosif CS, Bekassy Z. Prevalence of genito-urinary symptoms in the late menopause. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984;63:257–60.
- 2 Bygdeman M, Swahn ML. Replens versus dienoestrol cream in the symptomatic treatment of vaginal atrophy in postmenopausal women. *Maturitas* 1996;23:259–63.
- 3 Labrie F, Diamond P, Cusan L, Gomez JL, Bélanger A. Effect of 12-month DHEA replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3498–505.
- 4 Sarrel PM. Ovarian hormones and vaginal blood flow using Laser Doppler velocimetry to measure effects in a clinical trial in post-menopausal women. *Int J Impot Res* 1998;10:S91–3.
- 5 Myers LS, Morokoff PJ. Physiological and subjective sexual arousal in pre- and postmenopausal women taking replacement therapy. *Psychophysiology* 1986;23:283–92.
- 6 Semmens JP, Wagner G. Estrogens deprivation and vaginal function in postmenopausal women. *JAMA* 1982;248:445–8.
- 7 Bercovici B, Uretzki G, Palti Y. The effects of estrogens on cytology and vascularization of the vaginal epithelium in climacteric women. *Am J Obstet Gynecol* 1972;113:98–103.
- 8 Abrams RM, Stanley H, Carter R, Notelovitz M. Effect of conjugated estrogens on vaginal blood flow in surgically menopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 1982;143:375–8.
- 9 Campbell S, Whitehead M. Oestrogens therapy and the menopausal syndrome. *Clin Obstet Gynaecol* 1977;4:31–47.
- 10 Notelovitz M. Urogenital aging: Solutions in clinical practice. *Int J Gynaecol Obstet* 1997;59(suppl 1):S35–S39.
- 11 The Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. The detection and management of vaginal atrophy. *Int J Gynaecol Obstet* 2005;88:222–8.
- 12 Ibe C, Simon JA. Vulvovaginal atrophy: Current and future therapies. *J Sex Med* 2010;7:1042–50.

28

- 13 Kelly GS. Bovine colostrums: A review of clinical uses. *Altern Med Rev* 2003;8:378–94.
- 14 Uruakpa FO, Ismond MAH, Akobundu ENT. Colostrum and its benefits: A review. *Nutr Res* 2002;22:755–67.
- 15 Donovan SM, Odle J. Growth factors in milk as mediators of infant development. *Annu Rev Nutr* 1994;14:147–67.
- 16 Kim SW, Kim NN, Jeong SJ, Munarriz R, Goldstein I, Traish AM. Modulation of rat vaginal blood flow and-estrogens receptor by estradiol. *J Urol* 2004;172:1538–43.
- 17 Kim SW, Jeong SJ, Munarriz R, Kim NN, Goldstein I, Traish AM. An in vivo rat model to investigate female vaginal arousal response. *J Urol* 2004;171:1357–61.
- 18 Vachon P, Simmerman N, Zahran AR, Carrier S. Increases in clitoral and vaginal blood flow following clitoral and pelvic plexus nerve stimulations in the female rat. *Int J Impot Res* 2000;12:53–7.
- 19 Jelinsky SA, Choe SE, Crabtree JS, Cotreau MM, Wilson E, Saraf K, Dorner AJ, Brown EL, Peano BJ, Zhang X, Winneker RC, Harris HA. Molecular analysis of the vaginal response to estrogens in the ovariectomized rat and postmenopausal woman. *BMC Med Genomics* 2008;1:27–38.
- 20 Munarriz R, Kim SW, Kim NN, Traish AM, Goldstein I. A review of the physiology and pharmacology of peripheral (vaginal and clitoral) female genital arousal in the animal model. *J Urol* 2003;170(2 suppl):S40–5.
- 21 Park K, Goldstein I, Andry C, Siroky MB, Krane RJ, Azadzoi KM. Vasculogenic female sexual dysfunction: The hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency. *Int J Impot Res* 1997;9:27–37.
- 22 Westwood FR. The female rat reproductive cycle: A practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol* 2008;36:375–84.
- 23 Kim NN, Stankovic M, Armagan A, Cushman TT, Goldstein I, Traish AM. Effects of tamoxifen on vaginal blood flow and epithelial morphology in the rat. *BMC Womens Health* 2006;6:14–23.
- 24 Park K, Ahn K, Lee S, Ryu S, Park Y, Azadzoi KM. Decreased circulating levels of estrogens alter vaginal and clitoral blood flow and structure in the rabbit. *Int J Impot Res* 2001;13:116–24.

- 25 Ting AY, Blacklock AD, Smith PG. Estrogens regulates vaginal sensory and autonomic nerve density in the rat. *Biol Reprod* 2004;71:1397–404.
- 26 Pessina MA, Hoyt RF, Goldstein I, Traish AM. Differential effects of estradiol, progesterone, and testosterone on vaginal structural integrity. *Endocrinology* 2006;147:61–9.
- 27 Aramvit P, Sangcakul A. Effect of sericin cream on wound healing in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;74:2473–7.
- 28 Ebner F, Heller A, Rippke F, Tausch I. Topical use of dexpanthenol in skin disorders. *Am J Clin Dermatol* 2002;3:427–33.
- 29 Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* 1992;669:7–20.
- 30 Martin PL, Yen SS, Burnier AM, Hermann H. Systemic absorption and sustained effects of vaginal estrogens creams. *JAMA* 1979;242:2699–700.
- 31 Labrie F. Effect of one-week treatment with vaginal estrogens preparations on serum estrogens levels in postmenopausal women. *Menopause* 2009;16:30–6.
- 32 Deutsch S, Ossowski R, Benjamin I. Comparison between degree of systemic absorption of vaginally and orally administered estrogens at different dose levels in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 1981;139:967–8.
- 33 Nachtigall LE. Enhancing patient compliance with hormone replacement therapy at menopause. *Obstet Gynecol* 1990;75(4 suppl):S77–80.

- 34 De Aloyisio D, Villedo AS, Fabiani AG. Body mass index distribution in climacteric women. *Maturitas* 1988;9:359-66.
- 35 Panotopoulos G, Raison J, Ruiz JC, Guy-Grand B, Basdevant A. Weight gain at the time of menopause. *Hum Reprod* 1997;12(suppl 1):126-33.
- 36 Babaei P, Mehdizadeh R, Ansar MM, Damirchi A. Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on visceral adipose tissue and serum adiponectin levels in rats. *Menopause Int* 2010;16:100-4.
- 37 Wade GN, Zucker I. Modulation of food intake and locomotion activity in female rats by diencephalic hormone implants. *J Comp Physiol Psychol* 1970;72:328-36.
- 38 Witte MM, Resuehr D, Chandler AR, Mehle AK, Overton JM. Female mice and rats exhibit species-specific metabolic and behavioral responses to ovariectomy. *Gen Comp Endocrinol* 2010;166:520-8.

AB