

Estriolo: profilo farmacologico e clinico con focus sulla vagina

Alessandra Graziottin

Direttore, Centro di Ginecologia e Sessuologia Medica

H. San Raffaele Resnati, Milano

Presidente, Fondazione Alessandra Graziottin per la cura del dolore nella donna Onlus

www.alessandragraziottin.it

www.fondazionegraziottin.org

Introduzione

Gli **estrogeni naturali** sono **ormoni steroidei endogeni** con numerose azioni fisiologiche. Influenzano infatti la crescita, la differenziazione, la funzione e la riparazione di diversi tessuti bersaglio, in primis quelli dei sistemi riproduttivi maschili e femminili (ghiandola mammaria, utero, ovaie, testicoli, prostata). Gli estrogeni esercitano inoltre un ruolo importante su **trofismo e funzioni** del cervello, degli organi di senso, dell'osso e delle articolazioni, sul sistema intestinale e urinario, nonché sul sistema cardiovascolare, esercitando significativi effetti cardio-protettivi.

L'obiettivo di questa review è riassumere **le evidenze sull'estriolo**, estrogeno di rinnovato interesse nella terapia delle donne in menopausa.

Biosintesi, metabolismo ed escrezione

Il più potente estrogeno naturale umano è il **17- β -estradiolo (E2)**, seguito dall'**estrone (E1)** e dall'**estriolo (E3)**. In gravidanza viene prodotto anche l'**estetrolo (E4)**, prodotto dal fegato fetale esclusivamente in questa fase della vita della donna (**Fig. 1**).

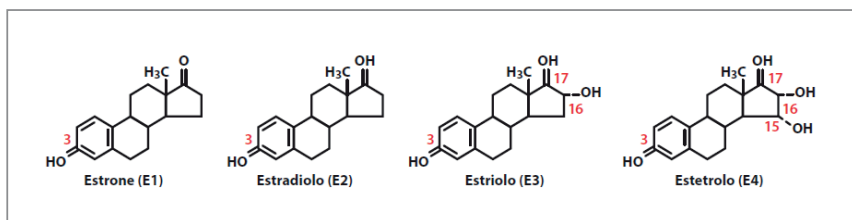


Figura 1. Principali estrogeni naturali (modificato da Katzung et al 2009)

Estradiolo, estrone, estriolo ed estetrolo derivano da **precursori androgenici** (androstenedione, deidroepiandrosterone solfato e testosterone) attraverso l'aromatizzazione dell'anello A. Nel percorso biosintetico degli estrogeni, l'estriolo figura come il prodotto terminale del metabolismo di estrone ed estradiolo nella donna non gravida: l'estradiolo viene ossidato reversibilmente ad estrone, ed entrambi questi estrogeni vengono convertiti irreversibilmente ad estriolo. Queste trasformazioni avvengono prevalentemente a livello del fegato, dove sembra si verifichi un minimo ricircolo entero-epatico dell'estriolo, comunque di grado inferiore rispetto a quanto accade per gli altri estrogeni. I tre estrogeni tipici della

donna non gravida vengono escreti con le urine.

L'estetrolo è uno steroide umano con una formula di struttura caratterizzata dalla presenza di 4 gruppi ossidrilici (-OH), da cui l'acronimo E4. Viene prodotto solo durante la gravidanza ed esclusivamente dal fegato fetale, a partire dall'ossidazione di E2 per aggiunta di 2-OH mediata dalla 15- α -idrossilasi e 16- α -idrossilasi, o di E3 per aggiunta di un gruppo -OH da parte della 15- α -idrossilasi. Le concentrazioni di estetrolo vengono rilevate nelle urine materne a partire dalla nona settimana gestazionale. Durante il secondo trimestre, elevati livelli di E4 di gravidanza sono normalmente riscontrati nel plasma materno, con concentrazioni progressivamente crescenti fino al termine della gravidanza. In seguito al parto, il fegato del neonato perde rapidamente la sua capacità di sintetizzare estetrolo (Visser e Coelingh Bennink 2009) (Tab. 1).

Nel 1984 Longcope ha studiato i livelli di estriolo circolanti nelle donne in post-menopausa e in pre-menopausa, durante la fase follicolare e luteale:

- in **età fertile**, l'**estriolo** è presente in **concentrazioni ridotte** ma sostanzialmente stabili durante la giornata e nel corso del ciclo mestruale; i livelli studiati sono lievemente più elevati nella fase luteale (11 ± 1 pg/ml vs 8 ± 1 pg/ml della fase follicolare);
- **nella donna in post-menopausa** (range di età 50-75 anni), i livelli di estriolo risultano ancora più bassi che nella donna in età fertile (6 ± 1 pg/ml). I livelli misurati risultano comunque notevolmente inferiori a quelli determinati per estradiolo ed estrone (Tab. 1).

Tuttavia, l'estriolo sembra avere un'**affinità di legame** per le globuline leganti gli **ormoni sessuali** (SHBG, Sex-Hormone Binding Protein) considerevolmente **più bassa** rispetto a quella dell'estradiolo (Head 1998). Conseguentemente, **una quota relativamente maggiore di estriolo è disponibile per la sua attività biologica**. Si tratta peraltro di una **dose minima in termini assoluti** date le bassissime concentrazioni plasmatiche. Nel caso dell'estetrolo, non è stata sostanzialmente riscontrata la capacità di legame di tale estrogeno ai siti estrogenici e androgenici delle SHBG (Visser e Coelingh Bennink 2009).

	Estrone	Estradiolo	Estriolo	Estetrolo
Età fertile	37-152 pg/ml (fase post-mestruale) 72-200 pg/ml (ovulazione)	50-100 pg/ml (fase post-mestruale) 400-600 pg/ml (ovulazione)	8 \pm 1 pg/ml (fase follicolare) 11 \pm 1 pg/ml (fase luteale)	assente
Gravidanza	?	40.000 pg/ml al termine	?	130-630 pg/ml (sg 22-31) 670-2.200 pg/ml (sg 37-40)
Menopausa	< 65 pg/ml (senza HRT)	5-30 pg/ml (naturale) 25-50 pg/ml (con HRT sistemica)	6 \pm 1 pg/ml	assente

Tabella 1. Livelli plasmatici dei principali estrogeni nelle diverse fasi di vita della donna (Longcope 1984; Manuale Merck, tabella 296-2)

Proprietà farmacologiche

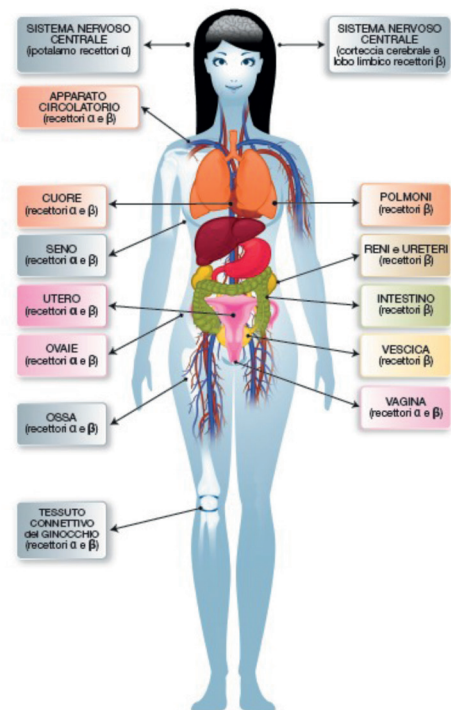
L'attività estrogenica all'interno di un tessuto è influenzata dal tipo di estrogeno ma anche dall'isoforma di recettore per l'estrogeno (ER, Estrogen Receptor) ai quali tali ormoni si legano (Sites 2008). Secreti principalmente da ovaie e testicoli, come tali, e dal tessuto adiposo per effetto della aromatizzazione degli androgeni a estrone, gli estrogeni si legano agli ER a localizzazione intranucleare che, cambiando conformazione, consentono di legare ad alta affinità la cromatina e di modulare la trascrizione di geni target (Kuiper et al 1997).

Appartenenti alla superfamiglia dei **recettori steroidei nucleari**, gli ER esistono in due sottotipi, alfa e beta, codificati da due geni distinti situati su cromosomi separati, con simile sequenza primaria ma con differenze strutturali a supporto della diversa funzione biologica (**Box 1**) e diverso profilo di espressione tra le due isoforme (**Fig. 2**).

Box 1. Recettori estrogenici alfa e beta

Recettori estrogenici alfa (ER- α)	Recettori estrogenici beta (ER- β)
- sono localizzati soprattutto nell'ipotalamo, nella mammella e nell'utero - mediano le azioni proliferative	- sono ubiquitari, in tutti gli organi e tessuti - sono molto più numerosi degli alfa - mediano le azioni antiproliferative e riparative

Figura 2. Localizzazione anatomica femminile dei recettori estrogenici (ER) di tipo α e β



La **distribuzione tissutale** dei due sottotipi di ER rappresenta un altro significativo **determinante della selettività di azione del ligando**.

Gli ER- α sono collocati prevalentemente nel sistema riproduttivo femminile (specialmente in vagina, endometrio, ovaio), così come nella ghiandola mammaria, nell'ipotalamo, nella muscolatura vascolare liscia.

Gli ER- β sono stati riscontrati a livello di prostata, vagina e ovaie, nella vescica, nel rene, nelle ossa, nel tessuto connettivo di alcune articolazioni (per esempio, il ginocchio), nella mucosa intestinale, nelle cellule endoteliali e, con espressione minore, nel cervello e nel polmone (Böttner et al 2014; Kuiper et al 1997; Shanle e Xu 2010; Sites 2008; Thaler et al 2014).

In particolare, il dominio A/B di localizzazione N-terminale, che include la regione di *activation function 1* (AF-1), con funzione di attivazione recettoriale ligando-indipendente, rappresenta il dominio meno conservato tra Er- α ed ER- β (solo il 17% di similarità di sequenza). La variabilità

strutturale di tale regione svolge un ruolo importante nel conferire specificità d'azione a ciascun recettore: la regione AF-1 del **recettore ER- β** (al contrario di ER- α) contiene una porzione con **funzione repressiva** che **inibisce l'attività trascrizionale**, coerentemente all'attività **anti-proliferativa** attribuita all'isotipo β opposta a quella di ER- α , in grado invece di stimolare la **proliferazione e il differenziamento cellulare** (Sites 2008). Inoltre, il rapporto ER- α e ER- β contribuisce a determinare la sensibilità cellulare agli estrogeni e la sua conseguente risposta biologica a tali ormoni (Böttner et al 2014).

Tra i diversi estrogeni (Tab. 2):

- il **17- β -estradiolo (E2)** è quello che possiede la **maggiore affinità per i recettori estrogenici**. Interessante, presenta la **stessa affinità di legame sia per ER- α che per ER- β** . Per tale ragione, viene considerato come il valore standard pari a 100. In natura esiste anche un secondo stereoisomero chirale dell'estradiolo, cioè il 17- α -estradiolo, normalmente prodotto per sintesi chimica e ritenuto fino a poco tempo fa inattivo biologicamente. La caratterizzazione biochimica dei recettori estrogenici di Kuiper et al (Kuiper et al 1997) ha infatti evidenziato come il legame dell'estradiolo a ER- α ed ER- β sia altamente stereospecifico e selettivo per l'isoforma beta. Tuttavia, come emerso da recenti evidenze cliniche, il composto, riscontrato come forma dominante nel cervello di ratti maschi, potrebbe essere coinvolto nello sviluppo cerebrale adulto tramite sistema con importanti funzioni autocrino/paracrine invece che nel classico sistema endocrino recettore-ormone (Ikeda et al 2015);
- l'**estrone (E1)** presenta affinità di legame dalle isoforme α e β rispettivamente di **60** e di **37**. Questa maggiore affinità per il recettore alfa, che media azioni proliferative, spiega perché l'estrone, presente ad elevati livelli in post-menopausa e ottenuto prevalentemente da conversione periferica, soprattutto nel tessuto adiposo, sia l'**estrogeno più temuto**. Alcuni studi hanno dimostrato infatti l'esistenza di una significativa correlazione tra l'indice di massa corporea (BMI, Body Mass Index) e i livelli di estrone, oltre che maggiori livelli di colesterolo, maggior diabete e maggiore ipertensione. In particolare i **livelli di estrone più elevati** sono stati riscontrati nelle **donne obese** (BMI \geq 30 Kg/m²), senza invece marcate differenze tra le donne normopeso e quelle in sovrappeso (Silva et al 2008);
- l'**estriolo (E3)** presenta affinità di legame stimata di **14** per ER- α e **21** per ER- β . Per questo è stato definito come "**short-acting**". È inoltre l'unico estrogeno con più **spiccata affinità per il recettore beta**, legame che sottende una maggiore **azione antiproliferativa e riparativa**: dunque sostanzialmente protettiva, a fianco della minima azione trofica mediata dal recettore alfa. Modulazione particolarmente favorevole a livello vaginale, per garantire un buon trofismo mucoso, **senza impatto endometriale**. In sintesi, la **potenza di azione** dell'estriolo varia da 1/10 a 1/100 di quella dell'estradiolo, con **1/80** come il rapporto più riportato in letteratura (Sites 2008);
- l'**estetrol (E4)**, prodotto dal fegato fetale durante la gravidanza, e su cui solo recentemente è stata attivata un'intensa ricerca clinica, esibisce una moderata affinità per i recettori estrogeni alfa e beta, con una pre-

ferenza di legame di circa 4-5 volte superiore per i recettori di tipo alfa (valori di K_i , costante di inibizione: $4,9 \pm 0,567$ nmol/l per ER- α e 19 ± 1 nmol/l per ER- β). Ha **attività antagonista sui recettori alfa della mammella**, il che ne spiega l'effetto protettivo rispetto agli altissimi livelli di estradiolo in gravidanza (Visser et al 2008).

	ERα	ERβ
Estradiolo	100	100
Estrone	60	37
Estriolo	14	21
Estetrolo	n.d.	n.d.

Tabella 2. Affinità di legame (RBA) di E1, E2, E3, E4 per ER- α e ER- β (elaborato da Kuiper 1997; Sites 2008). RBA (relative binding affinity) calcolata come il rapporto tra le concentrazioni di E2 e quelle del composto, richieste per ridurre lo specifico legame del 50% (= rapporto tra i valori di IC_{50}).

L'insieme dei dati presentati permette quindi di concludere che la risposta estrogenica dei singoli tessuti è il risultato di una sommatoria di fattori: non è solo il "ligando" ormone bensì **la molteplicità relativa ai recettori** (isoforma α e β , localizzazione anatomica, rapporto cellulare ER- α /ER- β) **a determinare l'insieme delle azioni mediate dagli estrogeni** (Böttner et al 2014).

Estriolo: farmacocinetica

Come anticipato, l'estriolo è il più "leggero" tra gli estrogeni presenti nella donna adulta non gravida, con una potenza di azione circa 100 volte inferiore a quella dell'estradiolo (mediamente 1/80 dai dati di Letteratura). Ha **preferenza di legame per i recettori beta ad attività anti-proliferativa e riparativa**.

I dosaggi e le vie di somministrazione rappresentano fattori chiave nell'interpretazione degli studi di farmacocinetica dell'estriolo. Sono stati studiati gli effetti della somministrazione sia orale sia vaginale dell'estriolo in forma non coniugata:

- i livelli di **estriolo** raggiungono il picco massimo di concentrazione dopo circa 3 ore dalla dose orale (10 mg), mantenendosi elevati per le 12 ore successive. Un secondo picco è stato invece osservato a 4 ore dopo un pasto (Head 1998). La somministrazione vaginale non risente invece in alcun modo di variabili legate all'alimentazione o a problematiche gastroenteriche, offrendo così la possibilità di un **regime più standardizzato ottenibile rispetto alle formulazioni orali**. L'insieme di questi aspetti si traduce nell'**utilizzo di dosaggi inferiori per ottenere un equivalente effetto terapeutico**. Inoltre, grazie anche a una diminuzione delle fluttuazioni nei livelli farmacologici, le pazienti possono beneficiare di as-

sunzioni meno frequenti e, conseguentemente, di una minor incidenza di effetti collaterali (Krause et al 2009);

- il profilo farmacocinetico dell'estriolo somministrato per via vaginale (1 mg estriolo in ovuli) evidenzia un raggiungimento dei livelli massimi dopo 1-2 ore dall'applicazione, mentre i livelli sierici pre-trattamento vengono ripristinati dopo circa 8 ore, al contrario di quanto è stato osservato per la formulazione orale. Dopo 21 giorni di somministrazioni ripetute (1 mg di estriolo in ovuli) l'assorbimento di estriolo (misurato come AUC, Area Under Curve) è risultato significativamente ridotto ($p=0.05$) rispetto al primo giorno di trattamento (2634 vs 1944 $\text{pg/ml} \times \text{h}$). **Il ridotto assorbimento sistemico dopo applicazioni ripetute è dovuto al migliorato trofismo della mucosa vaginale ed è comune a tutte le somministrazioni ormonali per via vaginale** (Heimer e Englund 1984).

Questi dati implicano che l'estriolo viene rapidamente assorbito in vagina ma l'assorbimento diminuisce considerevolmente dopo un trattamento prolungato con questo estrogeno. Un simile profilo farmacocinetico è stato riscontrato anche per dosaggi più bassi di estriolo somministrati per via vaginale (0,02 e 0,05 mg in un'applicazione da 1 gr di gel vaginale). Tuttavia tali dosaggi hanno determinato concentrazioni plasmatiche di estriolo significativamente inferiori, sia dopo singola dose sia dopo 21 giorni di somministrazioni ripetute, rispetto a dosaggi almeno 10 volte superiori (0,5 mg/gr estriolo crema vaginale). Le concentrazioni plasmatiche (AUC) sono risultate sostanzialmente trascurabili dopo dosi ripetute (36 ± 30 , 73 ± 46 rispettivamente vs 800 ± 363 pg/ml/h), riducendo al minimo il rischio di possibile assorbimento sistemico (Nieto et al 2011) (Fig. 3).

L'applicazione vaginale di estrogeni non è comunque solo una via di somministrazione locale, ma è rapidamente seguita, grazie alle caratteristiche di assorbimento della mucosa vaginale, da un certo grado di assorbimento sistemico e da una distribuzione preferenziale regionale (Cicinelli 2008).

Alla luce del profilo farmacologico e farmacocinetico, l'estriolo si presenta come l'estrogeno più idoneo ad una preparazione vaginale per:

- la sua potenza bioridotta;
- i bassissimi livelli plasmatici;
- la sua selettiva azione antiproliferativa e riparativa.

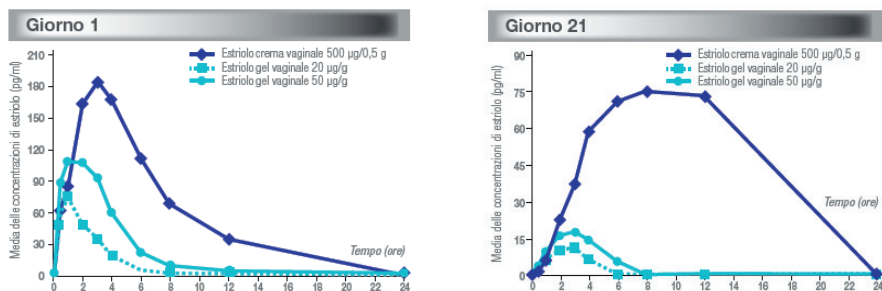


Figura 3. Concentrazioni plasmatiche di estriolo a differenti dosaggi e in diverse formulazioni di estriolo dopo singola dose (giorno 1) e dopo somministrazioni ripetute (giorno 21) (elaborato da Nieto et al 2011).

Atrofia vaginale post-menopausale

L'**atrofia vaginale** o **atrofia vulvo-vaginale (VVA)** è stata recentemente ridefinita come **sindrome genitourinaria della menopausa** (Genitourinary Syndrome of Menopause, GSM) (Portman et al 2014). Definisce l'insieme di **segni e sintomi associati con la riduzione degli estrogeni circolanti**, che determinano cambiamenti a livello vaginale, vulvare, dell'uretra e della vescica. Questi cambiamenti si traducono in **sintomi vaginali** quali **secchezza** (nel 75% dei casi), **bruciore**, **perdite** e **dolore** (stimato al 15%).

La **perdita delle pliche rugose vaginali** e l'assottigliamento dell'epitelio si manifestano circa 2-3 anni dopo la menopausa con un esordio variabile (Dennerstein et al 2000). La perdita della rugosità è la conseguenza di un'**alterazione del collagene di supporto** dell'epitelio vaginale che presenta un aspetto citologico completamente variato, con una percentuale di cellule basali superiore a quella delle cellule intermedie, mentre le cellule superficiali risultano quasi completamente assenti, costituendo la base anatomopatologica dell'atrofia vaginale.

Un quadro caratteristico, e sottostimato, riguarda l'**incremento di citochine infiammatorie** in corso di **vaginite atrofica (Tab. 3)** (Donders et al 2000). La **riduzione dei livelli estrogenici postmenopausali** si accompagna a:

- aumento del **pH**;
- riduzione dei **lattobacilli**;
- alterazione dell'**ecosistema vaginale**, con aumento della flora batterica usualmente minoritaria/marginale e con aumentata vulnerabilità all'invasione di saprofiti patogeni di origine intestinale (*Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*), responsabili di vaginiti ricorrenti e di cistiti da *Escherichia coli* uropatogeno (Uropathogenic *Escherichia Coli*, UPEC), spesso in comorbilità nella postmenopausa;
- aumento dell'**interleuchina 1 (IL-1)** e dell'**interleuchina 8 (IL8)**, che indicano l'aumento della componente infiammatoria nell'involuzione atrofica, con progressiva perdita dell'epitelio vaginale, riduzione della ricca tessitura vascolare sottomucosa, aumento della collagenizzazione della sottomucosa e conseguente riduzione di elasticità e abitabilità vaginale.

Lattobacilli, ecosistema vaginale ed infiammazione

	Lattobacilli normali	Lattobacilli modicamente ridotti	Lattobacilli moderatamente ridotti	Lattobacilli fortemente ridotti
pH vaginale	4,5	4,8	5,6	6,1
Lattalo (mg/dL)	126	110	56	24
IL-1 (mg/dL)	127	243	821	1033
IL-8 (mg/dL)	2,2	4,5	6,9	8,1

Tabella 3. Caratteristiche del fluido vaginale in funzione del crescente grado di alterazione della flora lattobacillare (elaborato da Donders et al 2000).

La **secchezza vaginale** aumenta rapidamente ed esponenzialmente dopo la menopausa, fino ad interessare il 47% delle donne già nei primi

tre anni dopo la menopausa, in assenza di terapia estrogenica (Dennerstein et al 2000).

La **dispareunia** può comparire come effetto della secchezza (stimata nel 38% dei casi), come riflesso del minor flusso sanguigno ai tessuti vaginali e minore produzione di secrezioni da parte dell'epitelio cervicale. All'esame clinico l'epitelio vaginale presenta un aspetto pallido, fragile e suscettibile ai danni meccanici (Sturdee e Panay 2010; Bachmann e Nevadunsky 2000; Castel-Branco et al 2005; NAMS 2007).

Atrofia vulvovaginale: indicazioni terapeutiche

Le più recenti linee guida delle società scientifiche nord-americane – IMS 2010 (Sturdee e Panay 2010), NAMS 2013 (Portman e Gass 2014) – indicano come la **terapia estrogenica locale** sia da preferirsi qualora la **VVA/GSM sia l'unico sintomo**, e come sia probabilmente la più efficace per i problemi vaginali rispetto alla terapia ormonale sistemica.

Entrambe concordano nel raccomandare **l'utilizzo di bassi dosaggi**, visto comunque il grado di assorbimento sistemico degli estrogeni applicati localmente, in particolare nelle fasi iniziali del trattamento, quando l'epitelio è ancora atrofico.

L'**estriolo** viene suggerito come **estrogeno a bassa potenza di azione, efficace a livello vaginale ma con effetti sistemici limitati, grazie a livelli plasmatici ridotti e alla selettività di legame per i recettori beta ad attività antiproliferativa e riparativa**. E' l'ideale quindi anche per i trattamenti a lungo termine in piena sicurezza: aspetto questo essenziale sia per la donna, sia per il medico curante.

Efficacia clinica dell'estriolo

L'**efficacia clinica dell'estriolo**, sui parametri citologici e sui segni/sintomi dell'atrofia vaginale in post-menopausa, è stata comprovata da diversi studi clinici, pubblicati nell'ultimo trentennio (**Tab. 4**). Le preparazioni vaginali a base di estriolo hanno evidenziato una rapida azione farmacologica sulla VVA/GSM sin dalle prime settimane di trattamento, da proseguire a frequenza di applicazione ridotta, per mantenere i benefici ed evitare il ripresentarsi dei sintomi.

L'utilizzo di **preparazioni estrogeniche vaginali a base di estriolo** è stata anche confrontata con l'impiego di diverse formulazioni locali di **estradiolo**, dimostrando **un'equiparabile efficacia nella gestione terapeutica dell'atrofia vaginale**.

Tabella 4. Principali studi di efficacia di preparazioni vaginali a base di estriolo su parametri citologici vaginali/uretrali e su segni e sintomi di VVA/ GSM

Studio	Popolazione (n)	Disegno dello studio	Outcomes di efficacia su VVA/GSM	Outcomes di sicurezza
Haspels et al 1981	11 donne in post-menopausa con sintomi di VVA	Longitudinale prospettico Trattamento (8 settimane): estriolo 0,5 mg crema vaginale: 1 applicazione/die per le prime 3 settimane + 1 applicazione/2 volte alla settimana (settimane 4-8)	- Miglioramento dell'MV - Moderato miglioramento dei parametri relativi al muco cervicale (ferning/spinnbarkeit)	- Livelli plasmatici di E3 post-trattamento significativamente inferiori rispetto ai basali - Invariati valori di SHBG, CBG, TBG, PRL, TSH, GH
Foidart et al 1991	109 donne con atrofia vaginale e sintomi vasomotori	Randomizzato, in doppio cieco, controllato verso placebo Trattamento (6 mesi): estriolo 3,5 mg ovuli a rilascio prolungato o placebo: 1 ovulo/2 volte alla settimana per le prime 3 settimane + 1 ovulo/settimana per le settimane successive	Nel gruppo estriolo vs placebo: - aumento significativo della percentuale di cellule superficiali (P<0,01) - diminuzione del pH, con predominanza della componente lattobacillare - diminuzione dell'indice urogenitale (UGI) (P<0,001)	In entrambi i gruppi: - lieve proliferazione endometriale nelle prime settimane, che rimane invariata nel tempo - peso, pressione sanguigna, valutazione mammaria invariati dopo 6 mesi
Heimer e Hengglud 1992	40 donne in post-menopausa con VVA e sintomi urogenitali	Longitudinale prospettico, randomizzato Trattamento (7 settimane)*: estriolo 0,5 mg crema vaginale 1 applicazione/die per le prime 3 settimane + 1-2 applicazioni/settimana per le settimane successive * preparazione endometriale con medrossiprogesterone acetato 5 mg per 7 gg nelle 2 settimane prima del trattamento con E3	- Significativo miglioramento del KPI dopo 3 settimane (p < 0,001) - Valori KPI ritornati simili ai basali dopo 4 settimane di terapia di mantenimento	- Nessuna infezione sintomatica del basso tratto urinario - Nessun sanguinamento vaginale - Nessun effetto collaterale
Barentsen et al 1997	165 donne in post-menopausa con segni/sintomi VVA	Randomizzato, open-label, a gruppi paralleli, controllato con una valutazione in cieco della citologia vaginale e una fase di cross-over per la preferenza di trattamento Trattamento (12 settimane): - anello vaginale di estradiolo (7,5 µg/24 h per 90 giorni) - estriolo 0,5 mg crema vaginale: 1 applicazione/die per le prime 2 settimane + 1 applicazione/3 volte alla settimana per le settimane successive	- Miglioramento dell'MV e del pH vaginale, di segni e sintomi di VVA/GSM senza differenze statisticamente significative tra i due gruppi	Uguale incidenza di eventi avversi tra i due gruppi di trattamento

Studio	Popolazione (n)	Disegno dello studio	Outcomes di efficacia su VVA/GSM	Outcomes di sicurezza
Dugal et al 2000	96 donne in post-menopausa con segni/sintomi VVA	Randomizzato, a gruppi paralleli, singolo-cieco Trattamento (24 settimane): 17-β-estradiolo 25 µg compresse vaginali o estriolo 0,5 mg ovuli vaginali: 1 applicazione/die per le prime 2 settimane + 1 applicazione/2 volte alla settimana per le settimane successive	- Rapido miglioramento della citologia vaginale (MV) senza differenze significative tra i due gruppi - Miglioramento significativo dei principali sintomi in entrambi i gruppi (p=0.0001 per tutti i sintomi, ad eccezione del prurito p= 0.03) - Miglioramento della secchezza superiore nel gruppo trattato con ovuli di estriolo (p= 0.0001)	- Valori plasmatici di estradiolo nei range post-menopausali - Nessuna variazione dei livelli sierici di FSH - Minor aumento dello spessore endometriale dopo 2 settimane nel gruppo trattato con estriolo (0,5 mm vs 1 mm estradiolo)
Chuery et al 2011	31 donne in post-menopausa con VVA	Longitudinale, prospettico Trattamento (21 giorni): estriolo 1 mg ovulo/die	- Miglioramento della citologia vaginale, dei parametri del pap-test e della valutazione colposcopica - Riduzione dei casi di colpite atrofica (dal 71% al 6,4% post-trattamento)	Non rilevati
Cano et al 2012	167 donne in post-menopausa con VVA	Randomizzato, doppio-cieco, controllato verso placebo Trattamento (12 settimane): estriolo 50 µg/g gel vaginale o 1 gr gel placebo: 1 applicazione/die per le prime 3 settimane + 1 applicazione/2 volte alla settimana per le settimane successive	Miglioramenti significativi del gruppo estriolo rispetto al placebo: - MV (p<0,001) - pH vaginale (p<0,001) - secchezza vaginale (p=0,001) - valutazione globale dei sintomi di VVA (p=0,018) - principali segni di VVA	In entrambi i gruppi: - stesso pattern di eventi avversi correlati al trattamento - nessun evento avverso di natura endometriale e mammaria - livelli di FSH/LH sostanzialmente invariati al termine dello studio

Effetti sul pH e sul microbiota vaginale

Nelle donne in pre-menopausa gli estrogeni circolanti incoraggiano la colonizzazione vaginale da parte di lattobacilli che costituiscono la popolazione dominante del biofilm fisiologico vaginale. Essi producono acido lattico dal glicogeno, mantenendo un pH vaginale acido (con valori compresi tra 3.5 e 4.5) e inibendo la crescita di microrganismi uro-patogeni (Ewies e Alfhaily 2010). La deplezione estrogenica che subentra in post-menopausa determina una progressiva diminuzione delle cellule superficiali dell'epitelio vaginale e la relativa produzione di glicogeno con conseguente riduzione della normale flora di lattobacilli (Archer 2010). L'azione sul pH e il microbiota costituisce il prerequisito biologico per comprendere poi somiglianze e differenze nell'azione dei diversi estrogeni sulla vagina, e il suo microbiota, e sulla vescica.

Estriolo e infezioni vaginali da *Candida*

Attualmente, invece, è ancora dibattuta la correlazione tra la condizione di carenza estrogenica post-menopausale e l'incidenza di altre infezioni vaginali (vaginosi batterica, candidiasi vulvovaginale e tricomoniasi).

In particolare, sebbene per effetto dell'ipoestrogenismo si riduca la flora lattobacillare di difesa contro questi microorganismi patogeni, **gli estrogeni esogeni rappresenterebbero potenziali fattori predisponenti endocrini all'insorgenza di episodi di *Candida*.**

Nella conclusione di una recente review, è stato infatti riportato come donne in post-menopausa, già predisposte a **vulvovaginiti da *Candida* (VVC)** o con storia di recidive, siano più suscettibili a sviluppare VVC se hanno intrapreso una **terapia ormonale sostitutiva** rispetto a donne non trattate (Fischer e Bradford 2011).

Analogamente a quanto dimostrato per i contraccettivi orali (Odds 1988; Spinillo et al 1995), **l'assunzione di estrogeni può infatti influenzare la recettività della donna e/o l'aggressività della *Candida* stessa**, con una certa selettività per il tipo di estrogeno.

Infatti, alcuni studi su colture di cellule di *Candida Albicans*, hanno evidenziato come **l'aggiunta di estriolo o di 17- α -estradiolo non provochi alcun effetto significativo sulla formazione del tubo germinale del lievito.** Questo al contrario del 17- β -estradiolo o dell'**etinil-estradiolo, che determinano il passaggio netto dallo stadio di spora a ifa attiva, in maniera dose-dipendente e variabile a seconda del ceppo di *Candida*.** La mancanza di un effetto su *Candida Albicans* all'esposizione del 17- α -estradiolo potrebbe risiedere nella stereo specificità della proteina Ebp1p (Estrogen binding protein 1) espressa dal lievito che lega ad alta affinità il 17- β -estradiolo, analogamente a quanto riportato per i recettori estrogenici ER (Cheng et al 2006).

Effetti sulla continenza uretro-vescicale

In Letteratura sono presenti numerose e significative evidenze riguardanti **l'importante ruolo degli estrogeni sul tratto urinario inferiore femminile** (Ewies e Alfhaily 2010).

Gli estrogeni svolgerebbero infatti molteplici azioni sui **meccanismi della continenza**, con una minore efficienza della funzione uretrale e vescicale legata alla carenza estrogenica dovuta alla post-menopausa e all'età (Zullo et al 2005).

Dalle conclusioni dell'ultima Cochrane, **la terapia estrogenica vaginale locale** è stata rivalutata, anche rispetto alla terapia ormonale sistemica (HRT), nel migliorare **l'incontinenza**, con un migliore profilo di sicurezza (Cody et al 2012) (**Box 2**).

Box 2. Estrogeni e tratto urinario inferiore femminile

Evidenze a supporto del ruolo trofico e funzionale degli estrogeni nel tratto urinario inferiore femminile:

- **Origine embriologica comune** (seno uro-genitale) fra tratto genitale femminile e tratto urinario inferiore (Ewies e Alfhaily 2010)
- **Presenza di recettori per gli estrogeni (soprattutto di tipo beta)** nel tratto urinario inferiore (**uretra prossimale e distale, trigono, vescica**) (Robinson et al 2013)
- **Reattività della vescica della donna agli estrogeni** probabilmente mediata solo attraverso i recettori di tipo beta (Tincello et al 2009); inoltre presenza in questo organo di numerosi recettori per il testosterone
- Associazione di sintomi del tratto urinario inferiore, quali **frequenza, urgenza, nicturia, incontinenza da urgenza, sindrome della vescica iperattiva (Overactive Bladder, OAB)**, ad atrofia vaginale da carenza estrogenica post-menopausale (Ewies e Alfhaily 2010; Robinson et al 2013)

Azioni degli estrogeni sui meccanismi della continenza (Ewies e Alfhaily 2010; Robinson et al 2013):

- **Ripristino del rivestimento epiteliale di vagina, uretra e vescica**, incrementando l'attività cellulare (aumento del numero di cellule intermedie e superficiali)
- **Incremento della vascolarizzazione peri-uretrale** e della pressione di chiusura massima uretrale con conseguente **aumento della resistenza dell'uretra**
- **Innalzamento della soglia sensoria della vescica o della sensibilità α -adrenergica della muscolatura liscia uretrale**

Gli estrogeni nella terapia dell'incontinenza (Cody et al 2012)

- La terapia estrogenica vaginale locale **può migliorare la sintomatologia dell'incontinenza** soprattutto per i sintomi di urgenza e frequenza

In sintesi, grazie alla sua preferenzialità di legame per i recettori beta, un ottimo profilo di sicurezza dato dalla potenza d'azione bioridotta e livelli plasmatici rassicuranti, l'**estriolo**, soprattutto se somministrato per via vaginale, è potenzialmente il migliore candidato al **trattamento di lungo termine** dell'atrofia vaginale e delle problematiche urinarie spesso correlate, quale **l'incontinenza urinaria da urgenza**, come evidenziato da diversi studi clinici (Tab. 5).

Tabella 5. Principali studi clinici sull'utilizzo di preparazioni vaginali a base di estriolo nella gestione terapeutica dell'incontinenza urinaria femminile in post-menopausa

Studio	Popolazione (n)	Disegno dello studio	Outcomes di efficacia sull'incontinenza
Iosif 1992	48 donne con VVA/GSM e SUI	Longitudinale, prospettico Trattamento (1-10 anni): estriolo 0,5 mg ovuli vaginali: 1 ovulo/die per 2 settimane + 1 ovulo/2 volte alla settimana da 1 a 10 anni	Miglioramenti significativi: - SUI (75% dei casi) - PTR (P<0.01)
Schar et al 1995	135 donne con VVA/GSM e incontinenza urinaria	Longitudinale, prospettico Trattamento (3 mesi): estriolo 3,5 mg ovuli a rilascio prolungato: 1 ovulo/2 volte alla settimana per le prime 3 settimane + 1 ovulo/settimana per le settimane successive	Miglioramenti significativi: - incontinenza urinaria (63% dei casi) - SUI (50% dei casi) - minzione e frequenza - valutazione soggettiva dell'incontinenza (questionario di Gaudenz)
Dessole et al 2004	88 donne con VVA/GSM, incontinenza urinaria e infezioni urinarie ricorrenti	Randomizzato, controllato verso placebo Trattamento (6 mesi): estriolo 1 mg ovuli vaginali: 1 ovulo/die per 2 settimane + 2 ovuli /settimana per le settimane successive	Miglioramenti significativi vs placebo - valutazione soggettiva dell'incontinenza (78% gruppo trattato vs 16% controlli) (P<0,01) - MUP (P<0,05) - MUUCP (P<0.05) - PTR (P<0.05)
Zullo et al 2005	56 donne sottoposte a TVT per trattamento SUI	Randomizzato Trattamento (6 mesi): estriolo 1 mg ovulo vaginale o senza trattamento estrogenico: 1 ovulo/die per 1 mese dopo TVT + 2 ovuli/settimana per 5 mesi successivi	A 6 mesi di follow-up: - minore incidenza di urgenza urinaria nel gruppo trattato con estriolo rispetto al non trattato (P=0,01) - assenza di differenze significative su frequenza e nicturia tra i due gruppi
Serati et al 2009	229 donne con DO sintomatica e comprovata da prove urodinamiche	Prospettico Trattamento (almeno 12 settimane): somministrazione giornaliera di estriolo vaginale in crema + 4 mg tolterodina a rilascio prolungato o solo tolterodina	- Assenza di differenze significative tra i due gruppi in termini di efficacia della terapia (p=0,86) - Minore responsività alla monoterapia o all'associazione in pazienti con DO da manovre provocative o con incontinenza urinaria all'orgasmo

SUI = Stress Urinary Incontinence
MUP = Maximum Urethral Pressure
MUUCP = Maximum Urethral Closure
PTR = Pressure Transmission Ratio
TVT = Tension Free Vaginal Tape
DO = Detrusor Overactivity

Sinergia tra estriolo vaginale e riabilitazione urogenitale

Tra le diverse opzioni di trattamento conservativo della SUI, inclusa la terapia estrogenica, la **riabilitazione del pavimento pelvico è ritenuta**

di prima linea, in particolare nei casi di **risultati di scarsa qualità nei test perineali** o di **inversione del comando perineale**.

Due studi randomizzati sono stati pubblicati sulla possibile **sinergia di trattamento tra esercizi del pavimento pelvico ed estriolo**; il primo di Ishiko et al (2001) **ha concluso positivamente sulla combinazione terapeutica nei casi di SUI**, valutandone periodicamente l'efficacia sul punteggio di questionari specifici per l'incontinenza urinaria.

Lo studio di Capobianco et al (2012) invece, partendo dai dati pubblicati in precedenza dallo stesso gruppo (Dessole et al 2004) e seguendone lo stesso schema terapeutico, ha dimostrato che **l'applicazione di estriolo vaginale associata a riabilitazione del pavimento pelvico**, rispetto al solo trattamento estrogenico vaginale, determina un **aumento statisticamente significativo di MUP, MUCP e PTR**.

Estriolo e infezioni del basso tratto urinario

L'instaurarsi di valori di **pH vaginale** superiori a quelli fisiologici (fino oltre 6) comporta un **cambiamento della composizione del microbiota vaginale** che risulta prevalentemente **colonizzato da Enterobatteri**, specialmente da Escherichia Coli. La presenza di questi uro-patogeni espone le donne in post-menopausa a una maggiore suscettibilità alle infezioni del tratto urinario.

Gli estrogeni svolgono quindi un ruolo fondamentale nella patogenesi delle UTIs, **agendo sia sul pH e il microbiota vaginale sia potenziando la resistenza del tratto uretrale inferiore agli uro-patogeni** (Lüthje et al 2013; Hannan et al 2013).

Una revisione Cochrane (Cody et al 2012) ha evidenziato il **beneficio** che la **terapia estrogenica potrebbe apportare sulle UTI ricorrenti nelle donne in post-menopausa**, rispetto al placebo. In particolare, è stata evidenziata l'efficacia delle **preparazioni estrogeniche vaginali** (Robinson et al 2013). Nello specifico, l'impiego di **estriolo vaginale (0,5 mg in crema)** si è dimostrato in grado di ridurre l'incidenza di ricorrenze da UTI (Raz e Stamm 1993) ed è stato raccomandato per il trattamento delle UTI ricorrenti nelle donne in post-menopausa dalle linee guida della European Association of Urology Guidelines (EAU) del 2011 (grado C) (Wagenlehner et al 2013) (**Tab 6**).

Tabella 6. Estriolo e UTI

Razionale scientifico di utilizzo (estrogeni topici)	Dati clinici di efficacia nelle UTIs	Raccomandazioni di utilizzo
<ul style="list-style-type: none"> • Effetti sul pH e sul microbiota vaginale • Attivazione di meccanismi di difesa epiteliale vaginale 	<ul style="list-style-type: none"> • Riduzione significativa degli episodi di bacteriuria (0.5 vs 5.9 episodi/anno, p<0.001) rispetto al placebo • Riduzione significativa del pH vaginale (da 5.5 a 3.8 p<0.01) rispetto al placebo • Cambiamento flora vaginale: <ul style="list-style-type: none"> - comparsa lattobacilli nel 61% dei casi; assenti nei controlli (p<0.001) - diminuzione enterobatteri (dal 67% al 31% dei casi); invariati nei controlli (p<0.005) 	<ul style="list-style-type: none"> • Linee guida EAU (2011): indicato nella prevenzione delle UTI ricorrenti (grado C)

Effetti sull'endometrio

E' possibile identificare alcuni fattori biologici a supporto del profilo di sicurezza nell'utilizzo dell'estriolo, soprattutto vaginale, sull'endometrio:

1. Profilo farmacologico e farmacocinetico dell'estriolo

L'estriolo, metabolita terminale del percorso biosintetico degli steroidi sessuali, è un estrogeno "leggero" con potenza di azione bio-ridotta rispetto all'estradiolo (circa 1/80), con livelli plasmatici dopo somministrazione vaginale estremamente rassicuranti, data la preferenza di legame a recettori estrogenici di tipo β , ad azione antiproliferativa e riparativa.

Il rischio di stimolazione endometriale associato all'uso di estriolo è quindi limitato o addirittura trascurabile, data la bassa affinità dell'estrogeno agli ER endometriali che sono prettamente di tipo α (circa il 10% di quella dell'estradiolo).

Inoltre, la preferenza di legame recettoriale ne rafforza il profilo di sicurezza endometriale: la presenza di ER- β è stata riscontrata, con grado notevolmente inferiore ad ER- α , in tutti i tipi di cellule endometriali nelle diverse età di vita della donna. Una recente revisione sistematica della Letteratura ne ha ipotizzato il coinvolgimento nella regolazione del destino cellulare delle cellule endometriali, definendo ER- β come il "guardiano dell'endometrio", dato il possibile ruolo protettivo contro gli effetti indesiderati causati da ER- α (Hapagama et al 2015).

2. Il dosaggio

Sebbene i dati di letteratura supportino l'impiego sicuro di estriolo vaginale **senza aumentato rischio di proliferazione endometriale o iperplasia** (Vooijs and Guerts 1995), evidenze recenti hanno tuttavia messo in dubbio questo paradigma, evidenziando come i **dosaggi** possano essere un fattore determinante l'eventuale rischio di effetti utero-trofici.

In alcuni lavori è stato infatti osservato un aumento dei livelli di mRNA dei recettori per gli estrogeni e per il progesterone a livello endometriale in donne trattate con estriolo vaginale, così come sono emerse evidenze di stimolazione endometriale a livello istologico (van Haaften 1997; Brys 2009).

Infatti, nonostante la selettività recettoriale dell'estriolo, la saturazione dei siti di legame sui ER- β provocata da alti dosaggi induce inevitabilmente l'estrogeno ad occupare ER- α .

La dose ha quindi un significativo impatto sugli effetti dell'estriolo vaginale a livello dell'endometrio. L'utilizzo di preparazioni estrogeniche vaginali a base di estriolo **non richiede l'associazione a un progestinico** per contrastare la stimolazione endometriale, ma **a condizione di basse dosi di impiego**. A tale proposito, la ricerca farmaceutica degli ultimi anni si è concentrata sull'individuare dosaggi ultra-ridotti di questo estrogeno, in grado di minimizzare il rischio di assorbimento sistemico e stimolazione endometriale, garantendo parallelamente l'efficacia nella ripresa del tro-

fismo vaginale.

In quest'ottica, studi di farmacocinetica hanno mostrato come il dosaggio di estriolo 50 mcg/gr per applicazione vaginale sia in grado di determinare concentrazioni plasmatiche dell'estrogeno inferiori rispetto a quelle standard (500 mcg) di circa 3 volte dopo singola dose (406 ± 199 vs 1221 ± 549 pg/ml x h) e di oltre 10 volte dopo 21 giorni di somministrazioni ripetute (73 ± 46 vs 800 ± 363 pg/mL x h). Il miglioramento della citologia epiteliale vaginale è risultato paragonabile per entrambi i dosaggi in studio (Nieto et al 2011).

3. La formulazione farmaceutica

Tutti gli estrogeni applicati per via vaginale vengono rapidamente assorbiti, soprattutto nelle fasi iniziali del trattamento quando l'epitelio è ancora atrofico. Inoltre, sebbene le preparazioni estrogeniche vengano normalmente rilasciate nella porzione inferiore della vagina, evitando così la distribuzione preferenziale vagina-verso-utero, tuttavia la formulazione farmaceutica può rappresentare un fattore discriminante per la sicurezza, oltre al dosaggio. Non tutte le formulazioni sono infatti ugualmente in grado di limitare l'assorbimento e favorire la protezione endometriale (Cicinelli 2008).

Grande attenzione è stata quindi recentemente rivolta ai **sistemi bioadesivi vaginali**, il cui vantaggio principale è rappresentato dall'aumentare il **tempo di permanenza *in situ*** del principio attivo estrogenico, con conseguente potenziamento dell'azione a livello locale e possibilità di utilizzo di bassi dosaggi (das Neves e Bahia 2006). L'insieme di questi fattori si riverbera anche sul profilo di sicurezza della preparazione, limitandone la distribuzione e il passaggio nel torrente ematico.

L'utilizzo dell'estriolo vaginale in post-menopausa si è dimostrato generalmente sicuro senza aumentato rischio di proliferazione endometriale o iperplasia, e senza differenze tra le formulazioni farmaceutiche disponibili (crema, ovuli, compresse vaginali). Tuttavia, come detto sopra, anche i trattamenti vaginali a base di estriolo non sembrerebbero essere completamente scevri da effetti utero-trofici.

Con la finalità di minimizzare questo rischio, è stata recentemente sviluppata una formulazione in gel muco-adesivo in grado di aumentare la distribuzione dell'estriolo a livello vaginale, riducendo così l'esposizione sistemica e il rischio di stimolazione endometriale. In uno studio condotto su ratti ovariectomizzati, l'impiego di questo gel a bassissimo dosaggio di estriolo (50 mcg/gr di applicazione) ha dimostrato di esercitare un effetto vagino-trofico completo senza tuttavia aumentare il peso o lo spessore dell'utero, contrariamente ad altre formulazioni a base dello stesso principio attivo (Lopez-Belmonte et al 2012).

Conclusioni

L'**estriolo** è un estrogeno naturale che presenta un'affinità maggiore per i recettori di tipo beta, ad azione antiproliferativa e riparativa, di

cui sono ricche la vagina e, soprattutto, l'uretra e la vescica. La potenza biologica è 1/80 di quella dell'estradiolo.

La **somministrazione vaginale dell'estriolo** ha effetti molto favorevoli sull'epitelio vaginale, sulla vascolarizzazione e sulla lubrificazione, sul pH e sul microbiota vaginale, ripristinando l'ecosistema più favorevole ricco in lattobacilli. Riduce inoltre gli indici infiammatori vaginali.

In parallelo, evidenze crescenti sottolineano l'**effetto positivo sull'urotelio e sui vasi periuretrali**, da un lato riducendo la tendenza all'iperattività detrusoriale e dall'altro ottimizzando il meccanismo di continenza uretrale.

La sostanziale **neutralità sull'endometrio**, specialmente ai **bassi dosaggi**, e con **formulazioni farmaceutiche** che potenzino l'azione locale riducendo l'assorbimento endometriale, sottolinea il profilo di sicurezza.

L'**estriolo vaginale** presenta quindi caratteristiche di **efficacia** sulle mucose vaginali e vescico-uretrali, **innocuità, sicurezza e maneggevolezza** tali da farne la **terapia di prima scelta e a lungo termine** nella cura della **distrofia/atrofia urogenitale, o sindrome genitourinaria postmenopausale**.

Bibliografia

- Archer DF. Efficacy and tolerability of local estrogen therapy for urogenital atrophy. *Menopause* 2010; 17: 194-203.
- Bachman GA, Nevadunsky NS. Diagnosis and treatment of atrophic vaginitis. *Am Fam Physician* 2000; 61: 3090-96.
- Barentsen R, van de Weijer PH, Schram JH. Continuous low dose estradiol released from a vaginal ring versus estriol vaginal cream for urogenital atrophy. *Eur J Obstet Gynecol* 1997; 71: 73-80.
- Böttner M, Thelen P, Jarry H. Estrogen receptor beta: tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function. *J Steroid Biochem Mol Bio* 2014; 139: 245-51.
- Brys M, Szylló K, Romanowicz-Makowska H, Dobrowolski Z, Masłowska I, Krajewska W. Expression of estrogen and progesterone receptor genes in endometrium, myometrium, and vagina of postmenopausal women treated with estriol. *Sao Paulo Medical Journal* 2009; 127: 128-33.
- Cano A, Estevez J, Usandizaga R, Gallo JL, Guinot M, Delgado JL, Castellanos E, Moral E, Nieto C, Moscoso del Prado J, Ferrer J. The therapeutic effect of a new ultra low concentration estriol gel formulation (0.005% estriol vaginal gel) on symptoms and signs of postmenopausal vaginal atrophy: results from a pivotal phase III study. *Menopause* 2012; 19: 1130-39.
- Capobianco G, Donolo E, Borghero G, Dessole F, Cherchi PL, Dessole S. Effects of intravaginal estriol and pelvic floor rehabilitation on urogenital aging in postmenopausal women. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 285: 397-403.
- Castelo-Branco C, Cancelo MJ, Villero J, Nohales F, Julia MD. Management of post-menopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. *Maturitas* 2005; 52: S46-52.
- Cheng G, Yeater KM, Hoyer LL. Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. *Eukaryotic Cell* 2006; 5: 180-91.
- Chuery AC, Speck NM, de Moura KF, Belfort PN, Sakano C, Ribalta JC. Efficacy of vaginal use of topical estriol in postmenopausal women with urogenital atrophy. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2011; 38: 143-5.
- Cicinelli E. Intravaginal oestrogen and progestin administration: advantages and disadvantages. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2008; 22: 391-405.
- Cody JD, Jacobs ML, Richardson K, Moehrer, Hextall A. Oestrogen therapy for urinary incontinence in post-menopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 10: CD001405.
- das Neves J, Bahia MF. Gels as vaginal drug delivery systems. *Int J Pharm* 2006; 318: 1-14.
- Dennerstein L, Dudley EC, Hopper JL, Guthrie JR, Burger HG. A prospective population-based study of menopausal symptoms. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 351-8.
- Dessole S, Rubattu G, Ambrosini G, Gallo O, Capobianco G, Cherchi PL, Marci R. Efficacy of low-dose intravaginal estriol on urogenital aging in postmenopausal women. *Menopause* 2004; 11: 49-56.
- Donders GG, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Vereecken A, Van Bulck B, Spitz B. Pathogenesis

- of abnormal vaginal bacterial flora. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 872-8.
- Dugal R, Hesla K, Sordal T, Aase KH, Lilleidet O, Wickstrom E. Comparison of usefulness of estradiol vaginal tablets and estriol vagitories for treatment of vaginal atrophy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79: 293-7.
 - Ewies AA, Alfhaily F. Topical vaginal estrogen therapy in managing postmenopausal urinary symptoms: a reality of gimmick?. *Climateric* 2010; 13: 405-18.
 - Fisher G, Bradford J. Vulvovaginal candidiasis in postmenopausal women: the role of hormone replacement therapy. *J Low Genit Tract Dis* 2011; 15: 263-7.
 - Foidart JM, Vervliet J, Buytaert P. Efficacy of sustained-release vaginal oestriol in alleviating urogenital and systemic climateric complaints. *Maturitas* 1991; 13: 99-107.
 - Hannan TJ, Hooton TM, Hultgren SJ. Estrogen and Recurrent UTI: what are the facts? *Sci Transl Med* 2013; 5: 190fs23.
 - Hapagama DK, Kamal AM, Bulmer JM. Estrogen receptor β : the guardian of endometrium. *Hum Reprod Update* 2015; 21: 174-93
 - Hasples AA, Luisi M, Kicovic P. Endocrinological and clinical investigations in post-menopausal women following administration of vaginal cream containing oestriol. *Maturitas* 1981; 3: 321-7.
 - Head KA. Estriol: safety and efficacy. *Alt Med Rev* 1998; 3: 101-13.
 - Heimer G, Englund D. Estriol: Absorption after long-term vaginal treatment and gastrointestinal absorption as influenced by a meal. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984; 63: 563-567.
 - Heimer G, Englund D. Effects of vaginally-administered oestriol on post-menopausal disorders: a cytochemical study. *Maturitas* 1992; 14: 171-179.
 - Ikeda T, Makino J, Yamada MK. 17α -estradiol is generated locally in the male rat brain and can regulate GAD65 expression and anxiety. *Neuropharmacology* 2015; 90: 9-14.
 - Iosif CF. Effects of protracted administration of estriol on the lower genito urinary tract in postmenopausal women. *Arch Gynecol Obstet* 1992; 251: 115-120.
 - Ishiko O, Hirai K, Sumi T, Tatsuta I, Ogita S. Hormone replacement therapy plus pelvic floor exercise for postmenopausal stress incontinence. A randomized controlled trial. *J Reprod med* 2001; 46: 213-20.
 - Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Basic & Clinical Pharmacology*. 11th edition 2009 The McGraw-Hill Companies, Inc.
 - Krause M, Wheeler TL 2nd, Snyder TE, Richter HE. Local effects of vaginally administered estrogen therapy: a review. *J Pelvic Med Surg* 2009; 15: 105-14.
 - Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 1997; 138: 863-70.
 - Longcope C. Estriol production and metabolism in normal women. *J Steroid Biochem* 1984; 20: 959-62.
 - Lopez-Belmonte J, Nieto C, Estevez J, Delgado JL, Moscoso del Prado J. Comparative uterine effects on ovariectomized rats after repeated treatment with different vaginal estrogen formulations. *Maturitas* 2012; 72: 353-358.
 - L uthje P, Brauner H, Ramos NL,  vregaard A, Gl aser R, Hirschberg AL, Aspenstrom P, Brauner A. Estrogen support urothelial defense mechanisms. *Sci Transl Med* 2013; 5: 190ra80.
 - Nieto C, Delgado JL, Estevez J, Usandizaga R, De la Calle M, Castellanos E. Comparative pharmacokinetics and preliminary efficacy of two topical vaginal formulations of estriol (0.005% estriol vaginal gel, and 0.002% estriol vaginal gel) vs. the marketed reference product (Ovestin, estriol vaginal cream 0.1%) in post-menopausal healthy volunteers. *Climateric* 2011; 14: 66.
 - Odds F. *Candida and candidosis*. 2nd ed Balliere Tindall, London, England 1988.
 - Portman DJ, Gass MLS. Genitourinary syndrome of menopause: new terminology for vulvovaginal atrophy from the International Society for the Study of Women's Sexual Health and The North American Menopause Society. *Climacteric* 2014; 17: 557-563
 - Raz R, Stamm WE. A controller trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *N Engl J Med* 1993; 329: 753-6.
 - Robinson R, Toozs-Hobson P, Cardozo L. The effect of hormones on the lower urinary tract. *Menopause Int* 2013; 19: 155-162.
 - Schar G, Kochli OR, Fritz M, Heller U. Effect of vaginal estrogen therapy on urinary incontinence in postmenopause. *Zentralbl Gynakol* 1995; 117: 77-80.
 - Serati M, Salvatore S, Uccella S, Cardozo L. Is there a synergistic effect of topical oestrogens when administered with antimuscarinics in the treatment of symptomatic detrusor overactivity? *Eur Urol* 2009; 55: 713-20.
 - Shanle E, Xu W. Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62: 1265-76.
 - Silva TC, Barrett-Connor E, Ramires JA, Mansur AP. Obesity, estrone, and coronary artery disease in postmenopausal women. *Maturitas* 2008; 59: 242-48.
 - Sites CK. Bioidentical hormones for menopausal therapy. *Women's Health (Lond Engl)* 2008;

4: 163-71.

- Spinillo A, Capuzzo E, Nicola S, Baltaro F, Ferrari A, Monaco A. The impact of oral contraception on vulvovaginal candidiasis. *Contraception* 1995; 51: 293-297.
- Sturdee DW, Panay N; on behalf of the International Menopause Society Writing Group. Recommendations for the management of postmenopausal vaginal atrophy. *Climateric* 2010; 13: 509-22.
- Thaler JD, Achary J, Lu T, Shrive NG, Hart DA. Estrogen receptor beta and truncated variants enhance the expression of transfected MMP-1 promoter constructs in response to specific mechanical loading. *Biol Sex Differ* 2014; 5: 14.
- The North American Menopause Society. The role of local vaginal estrogen for treatment of vaginal atrophy in postmenopausal women: 2007 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 2007; 14: 357-69.
- Tincello DG, Taylor AH, Spurling SM, Bell SC. Receptor isoforms that mediate estrogen and progestagen action in the female lower urinary tract. *J Urol* 2009; 181: 1474-81.
- van Haften M, Donker GH, Sie-go DM, Haspels AA, Thijssen JH. Biochemical and histological effects of vaginal estriol and estradiol applications on the endometrium, myometrium and vagina of postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 1997; 11: 175- 85.
- Visser M, Foidart JM, Bennink HJ. In vitro effects of estetrol on receptor binding, drug targets and human liver cell metabolism. *Climateric* 2008; 11 (Suppl 1): 64-8.
- Visser M, Coelingh Bennink HJ. Clinical applications for estetrol. *J Steroid Biochem Mol Bio* 2009; 114: 85-9.
- Vooijs GP, Guerts TB. Review of the endometrial safety during intravaginal treatment with estriol. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995; 62: 101-6.
- Wagenlehner FM, Vahlensieck W, Bauer HW, Weider W, Piechota HJ, Naber KG. Prevention of recurrent urinary tract infections. *Minerva Urol Nefrol* 2013; 65: 9-20.
- Zullo MA, Plotti F, Calcagno M, Palaia I, Muzii L, Mancini N, Angioli R, Benedetti Panici PB. Vaginal estrogen therapy and overactive bladder symptoms in postmenopausal patients after a tension-free vaginal tape procedure: a randomized clinical trial. *Menopause* 2005; 12: 421-427.