

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DALTON BERRI

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO ESTROGÊNIO TÓPICO ADMINISTRADO POR DUAS
DIFERENTES FÓRMULAS NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DE RATAS
OSTEOPORÓTICAS

PONTA GROSSA
2021

DALTON BERRI

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO ESTROGÊNIO TÓPICO ADMINISTRADO POR DUAS
DIFERENTES FÓRMULAS NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DE RATAS
OSTEOPORÓTICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski
Coorientador: Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco

PONTA GROSSA

2021

B533 Berri, Dalton
Avaliação do papel do estrogênio tópico administrado por duas diferentes fórmulas na consolidação de fraturas de ratas osteoporóticas / Dalton Berri. Ponta Grossa, 2021.
38 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski.
Coorientador: Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco.

1. Estrogênio tópico. 2. Consolidação de fraturas. 3. Nanotecnologia. 4. Osteoporose. I. Lipinski, Leandro Cavalcante. II. Franco, Gilson Cesar Nobre. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

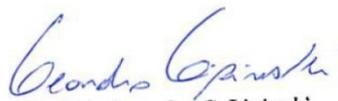
CDD: 616.7

DALTON BERRI

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO ESTROGÊNIO TÓPICO ADMINISTRADO POR DUAS
DIFERENTES FÓRMULAS NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DE RATAS
OSTEOPORÓTICAS

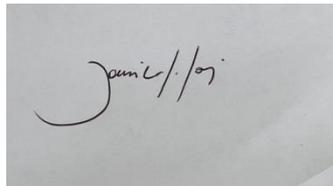
Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

Ponta Grossa, 27 de outubro de 2021.



Leandro Lipinski
Prof. Dr. Leandro C. Lipinski
Universidade Estadual de Ponta Grossa
Médico Veterinário
CRMV-PR 6728

Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski
Doutor em Clínica Veterinária
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Jamil Faissal Soni
Doutor em Medicina
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Ricardo Zanetti Gomes
Doutor em Medicina (Clínica Cirúrgica)
Universidade Estadual de Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, por todas as oportunidades que recebi na vida e pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho nessa jornada.

Gostaria de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam nestes anos e foram fundamentais para a realização desse sonho.

Minha esposa Fernanda, fortaleza do meu lar, sempre serena e motivadora, guia dos nossos caminhos, obrigado pela compreensão, carinho e paciência comigo nesses anos todos.

Meus filhos, Mariana e Henrique, que me ensinaram o valor da vida e o significado do amor incondicional.

Meus pais Valdemar e Iria, que sempre me encorajaram a seguir meus sonhos.

Minha irmã Angela que mesmo de longe, sei que torce e se alegra com minhas conquistas.

Gostaria de agradecer profundamente à Professora Dra. Adriana Yuriko Koga, por todo o companheirismo, auxílio e dedicação, sendo uma pessoa fundamental para que esse processo tenha ocorrido.

Gostaria de agradecer principalmente ao professor Dr. Leandro Cavalcante Lipinski, meu orientador nessa jornada, uma pessoa fantástica que Deus me deu a oportunidade de conhecer. Obrigado amigo, por ter me incentivado nessa jornada e ter depositado confiança em mim, pela paciência, por suas palavras encorajadoras e por compartilhar comigo seu conhecimento. Fez de mim uma pessoa melhor.

RESUMO

Os efeitos do estrógeno no metabolismo ósseo e seu papel protetivo na osteoporose estão bem definidos. No entanto, sua eficácia na consolidação de fraturas osteoporóticas não está clara. A utilização de estrógeno tópico para estimular a formação de calo ósseo é uma estratégia para se evitar os efeitos colaterais desse hormônio, e sua administração em nanocápsulas parece ser efetiva nesse propósito. O objetivo desse estudo foi avaliar o papel do estrógeno administrado por via tópica por meio de duas diferentes formulações na consolidação de fraturas de fêmur em ratas osteoporóticas. Utilizou-se como amostra do estudo, 45 ratas Wistar que foram ooforectomizadas e 40 semanas após, submetidas à fratura da diáfise do fêmur d. As ratas foram divididas em três grupos: grupo controle (G1), tratamento com estrógeno convencional (G2) e tratamento com nanocápsulas de estrógeno (G3). No D15 e D30 metade de cada grupo foi eutanasiado e seus fêmures retirados para avaliação radiográfica e histológica. Os resultados radiográficos apontaram um calo ósseo maior no grupo 3 com 15 dias de tratamento em comparação com o grupo controle (G1). A análise histológica evidenciou uma aceleração no processo de consolidação após 30 dias nas ratas tratadas com estrógeno nanoencapsulado em relação ao grupo controle. Pode-se concluir que a aplicação tópica de nanopartículas de estrógeno acelerou o processo consolidação da fratura de ratas osteoporóticas.

Palavras chave: Estrógeno tópico. Consolidação de fratura. Osteoporose. Nanopartículas.

ABSTRACT

The role of estrogen on the bone metabolism and osteoporosis is well known. Their effects on the osteoporotic bone healing remain controversial. Topical estrogen to enhance bone healing could avoid side effects of systemic treatment, and nanotechnology seems to be an effective form to deliver the drug. The aim of this study was to investigate the effect of local administration of estrogen by two different formulations on the osteoporotic fracture healing. Standardized femoral fractures were created in 45 ovariectomized rats. Animals were divided into three groups. Group A control, group B received conventional estrogen and group C received estrogen by nanocapsules. Fracture healing was assessed at 15 and 30 days post fracture by radiographic analysis. Group C had significantly higher callus formation than control group at D15 and histology demonstrated a higher callus formation in group C at d30. Our results showed that topical nanocapsules of estrogen may enhance the callus formation of osteoporotic femoral fractures in rats.

Keywords: Topical estrogen. Fracture healing. Osteoporosis. Nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura comparando morfologia do estrógeno nas duas formulações.....	24
Figura 2 – Avaliação radiográfica D15 (G1,G2,G3).....	25
Figura 3 – Avaliação radiográfica D30 (G1,G2,G3).....	26
Figura 4 – Cortes histológicos dos grupos G1, G2 e G3 em D15.....	27
Figura 5 – Cortes histológicos dos grupos G1, G2 e G3 em D30.....	28

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Largura e razão largura/istmo do calo ósseo em mm D15 e D30.....	26
Gráfico 2 – Análise histológica do calo ósseo em D15 e D30 conforme escala de Huo <i>et al.</i> (1991).....	28
Gráfico 3 – Espessura do endométrio e miométrio em μm D15 e D30	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Grupos de animais	20
Quadro 2 – Escala numérica utilizada para avaliação histológica da consolidação das fraturas	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e desvio padrão da largura do calo ósseo e da razão entre a largura do calo e a largura do istmo contralateral aos 15 e 30 dias pós fratura em mm.....	25
Tabela 2 – Avaliação do escore histológico de maturação do calo ósseo conforme proposto por Huo <i>et al.</i> (1991).....	27
Tabela 3 – Avaliação da espessura do tecido uterino em μm	28

LISTA DE SÍMBOLOS

E2	17- β -estradiol
HE	Hematoxilina-eosina
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
OPG	Osteoprotegerina
PLGA	Ácido láctico-co-ácido glicólico
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS	19
4.1.1 Obtenção das Nanocápsulas Poliméricas contendo 17- β -estradiol	19
4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO (<i>FIELD EMISSION GUN SCANNING ELECTRON MICROSCOPY – FEG-SEM</i>)	19
4.2.1 Espalhamento de Luz Dinâmico e Microeletroforese Laser Doppler.....	19
4.3 ENSAIO ANIMAL.....	20
4.3.1 Planejamento Amostral	20
4.3.2 Técnica Operatória.....	21
4.3.2.1 Ooforectomia e Fraturas.....	21
4.3.2.2 Produção das Fraturas.....	21
4.3.2.3 Aplicação de Estrógeno.....	22
4.4 ANÁLISE RADIOGRÁFICA	22
4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	22
4.5.1 Tecido Uterino	23
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
5 RESULTADOS	24
5.1 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOCÁPSULAS	24
5.2 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA	25
5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	27
6 DISCUSSÃO	30
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS	34
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	38

1 INTRODUÇÃO

A incidência de fraturas em pacientes com osteoporose vem aumentando significativamente nos últimos anos (RAJFER *et al.*, 2019). A maioria das estratégias de tratamento visa a prevenção da ocorrência dessas fraturas, através do aumento da massa óssea e da prevenção de acidentes, porém pouca ênfase tem se dado ao processo de consolidação do osso osteoporótico (LILL *et al.*, 2003).

A consolidação de fraturas osteoporóticas é um desafio para o cirurgião ortopédico (HUNGRIA NETO; DIAS; ALMEIDA, 2011). Esse processo envolve diversos fatores, tanto locais quanto sistêmicos e a deficiência do estrógeno, relacionada com a perda de massa óssea e aumento da osteoclastogênese (HUGHES *et al.*, 1996) tem um importante papel para o atraso da consolidação das fraturas, aumentando assim o índice de complicações mecânicas e falhas do tratamento.

O papel do estrógeno no metabolismo ósseo e seu fator protetivo na densidade mineral óssea são bem conhecidos (SÖZEN; ÖZİŞİK; BAŞARAN, 2017), porém seu efeito na consolidação das fraturas ainda não está claro. Poucos estudos na literatura se dedicaram a avaliar o papel desse hormônio no processo de consolidação de fraturas osteoporóticas pós menopausa (EINHORN, 2005; TAHAMI, 2016; NAMKUNG-MATTHAI *et al.*, 2001).

A redução dos níveis de 17- β -estradiol (E2) está diretamente relacionada com o desequilíbrio na neoformação óssea, devido ao aumento da apoptose dos osteoblastos e à supressão do mecanismo de apoptose dos osteoclastos e esse desequilíbrio pode influenciar no processo de consolidação em pacientes com essa doença (AMADEI *et al.*, 2006; SUDA *et al.*, 1995).

A utilização do estrógeno para a reposição hormonal e tratamento da osteoporose é amplamente difundida e seu uso tópico evita o metabolismo hepático de primeira passagem, reduzindo assim a concentração necessária e seus efeitos colaterais (BOTELHO *et al.*, 2015). A utilização de nanotecnologia para a formulação desse fármaco permite uma via de administração mais efetiva que a formulação convencional, aumentando a efetividade local.

A avaliação do estrógeno por via tópica no processo de consolidação das fraturas osteoporóticas ainda não está clara, a utilização de nanotecnologia para a administração desse fármaco permite uma distribuição mais efetiva que da forma convencional, otimizando os efeitos esperados. A aplicação tópica de compostos em

escala nanométrica permite maior absorção de ativos, menor tempo de tratamento, redução dos efeitos colaterais, ação local, além do baixo custo de obtenção (LEON; CHUNG; RINALDI, 2020).

A administração de drogas transdérmicas através da utilização de nanotecnologia vem se tornando uma realidade na medicina, principalmente devido a facilidade de absorção e passagem pela derme (BOTELHO *et al.*, 2015).

A nanotecnologia é uma área direcionada ao desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas nanométricos. As nanopartículas podem ser obtidas por diferentes processos e aplicadas em diversas áreas (EALIAS; SARAVANAKUMAR, 2017; RADWAN, 2018). A expansão no uso da nanotecnologia deve-se à diversidade e as características físico-químicas ajustáveis dos nanocompostos que oferecem alternativas rápidas e economicamente viáveis de desenvolvimento (JEEVANANDAM *et al.*, 2018).

Os avanços em nanotecnologia permitem a manipulação de partículas para criar veículos de transporte de fármacos em segurança até o órgão alvo, permitindo dessa forma uma melhor efetividade no transporte (PATRA *et al.*, 2018). Os benefícios dos materiais nanoparticulados incluem a maior superfície de contato. Nos sistemas biológicos, o menor tamanho pode ser ideal para absorção celular dos ativos (LEON; CHUNG; RINALDI, 2020). O uso de nanomateriais formados por polímeros e metais tem despertado o interesse de muitos pesquisadores devido aos benefícios desses compostos em aplicações biomédicas (BHARDWAJ; KAUSHIK, 2017).

Os nanossistemas podem ser úteis na liberação de fármacos, o que permite melhorar a biodisponibilidade de ativos com baixa solubilidade, diminuir os efeitos colaterais, liberar o medicamento de maneira controlada e ser administrada em menor dose (MUKAI, K. *et al.* 2019). A utilização de nanotecnologia para a formulação do 17- β -estradiol permite uma via de administração mais efetiva que a formulação convencional, aumentando a efetividade local (PATRA *et al.*, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do estrogênio tópico, administrado através de nanocápsulas, na consolidação de fraturas de fêmur em ratas osteoporóticas pós ooforectomia

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do estrogênio tópico no processo de consolidação das fraturas osteoporóticas

Comparar diferentes veículos de transporte do estrogênio e suas repercussões sistêmicas

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O aumento da expectativa de vida da população fez com que a prevalência da osteoporose se tornasse um problema de saúde pública. Estima-se que 200 milhões de mulheres no mundo sejam afetadas por essa doença e que ocorram 8,9 milhões de fraturas/ano secundárias à osteoporose, 1 fratura patológica a cada 3 segundos. No Brasil 10 milhões de indivíduos são afetados por essa doença (GUARNIERO; OLIVEIRA, 2004).

O impacto da osteoporose na população idosa, especialmente em mulheres pós menopausa está aumentando significativamente (LEE *et al.*, 2020). Uma das principais manifestações da osteoporose são as fraturas do fêmur proximal, que apresentam uma grande morbidade e mortalidade, além de um alto custo de internamento para o sistema de saúde (BURGE *et al.*, 2007). A mortalidade desses pacientes é de 5,5 % durante o internamento; 4,6% ao final de 1 mês de seguimento; 11,9% com três meses; 10,8% com seis meses; 19,2% com um ano e 24,9% após dois anos da cirurgia (SAKAKI *et al.*, 2004).

A osteoporose é caracterizada pelo comprometimento da resistência e da qualidade óssea e é extremamente prevalente na população acima de 65 anos, predispondo ao aumento do risco da ocorrência de fraturas, devido à deterioração da microarquitetura tecidual. Essa doença também pode ser caracterizada pela redução dos valores da densitometria óssea, que mensura a perda de massa óssea em comparação à uma população da mesma faixa etária. Dessa forma ocorrem as seguintes condições: osteopenia: perda de 1 a 2,5 desvios padrão em relação a população da mesma faixa etária; osteoporose perda acima de 2,5 desvios padrão em relação a população da mesma faixa etária (RAMALHO; CASTRO, 1999).

Riggs e Melton em 1983 propuseram uma subdivisão na classificação da osteoporose em primária (quando não há outra condição clínica que predisponha ao seu desenvolvimento) e secundária (quando existe tal condição clínica como anormalidades endócrinas ou neoplásicas). A osteoporose primária ainda é subdividida em: tipo 1 – osteoporose pós menopausa e tipo 2 – osteoporose senil (RIGGS; MELTON, 1998).

A osteoporose primária tipo I se desenvolve devido dois fatores: envelhecimento e hipoestrogenemismo. A deficiência de estrogênio promove um

desequilíbrio no processo de remodelação óssea entre osteoblastos, que são as células responsáveis pela formação e mineralização da matriz óssea e os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea (AMADEI *et al.*, 2006).

A osteoporose tem como sua principal consequência o enfraquecimento do trabeculado ósseo, facilitando o desenvolvimento de fraturas, principalmente do fêmur proximal, coluna vertebral e rádio distal. As fraturas do fêmur proximal são fraturas de difícil manejo, principalmente devido à dificuldade de fixação por implantes em ossos de má qualidade e pelo grau de cominuição e desvio dos fragmentos, fazendo com que a taxa de falha da fixação, antes da consolidação seja alta, aumentando assim, a morbimortalidade, que já é um problema dessa condição. Além dos fatores locais inerentes ao osso, as condições clínicas dos pacientes, que muitas vezes apresentam comorbidades sistêmicas associadas, dificultam o tratamento dessas fraturas. Estima-se que apenas 40,5 % dos pacientes tratados estejam totalmente independentes após 1 ano da fratura (HUNGRIA NETO; DIAS; ALMEIDA, 2011).

A consolidação das fraturas por osteoporose continua um desafio para o cirurgião ortopédico. Existem duas maneiras de melhorar esse processo: primeiro, o desenvolvimento de implantes que minimizem a falha mecânica; segundo, a aceleração do processo de consolidação e melhora da qualidade do calo ósseo formado (STUERMERS *et al.*, 2010).

O E2 é um hormônio esteróide, produzido principalmente pelo folículo ovariano, que possui importante papel na regulação do ciclo reprodutivo, remodelação óssea, sistema cardiovascular, entre outros. O E2 e seus análogos apresentam importante papel na expressão de fatores de crescimento e citocinas sintetizadas e secretadas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos, como a interleucina-1 (IL-1), fator de crescimento transformante beta (TGF- β), e sua deficiência, aumenta a liberação de radicais livres, que induzem a produção de citocinas envolvidas na osteoclastogênese, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (ABDALLA *et al.*, 2011).

O estrogênio tem um importante papel no crescimento e desenvolvimento ósseo, sua atuação se dá principalmente na inibição dos osteoclastos, reduzindo a reabsorção óssea. O estrogênio apresenta ainda importante atuação na expressão de fatores de crescimento e de citocinas sintetizadas e secretadas pelos osteoblastos e osteoclastos. Esses mediadores celulares são responsáveis pelo equilíbrio funcional

da matriz óssea, determinando controle autócrino e parácrino do processo de remodelação (TURNER; RIGGS; SPELSBERG, 1994).

As células da linhagem osteoblástica apresentam receptores de estrógeno (ERIKSEN, 1988), porém a principal atuação desse hormônio se dá na reabsorção óssea. O E2 tem a capacidade de afetar a função osteoclástica pela indução da apoptose em ratos *in vivo* (HUGHES *et al.*, 1996). Achados esses que sugerem que o estrógeno tem a capacidade de diminuir a perda óssea pela redução da função reabsortiva dos osteoclastos.

A regulação da atividade osteoclástica sofre influência de fatores estimuladores liberados pelos osteoblastos. A ligação do estrógeno ou de seus análogos aos receptores dos osteoblastos inibe a liberação de fatores estimuladores da osteoclastogênese e aumenta a atividade dos fatores inibidores dos osteoclastos (SUDA *et al.*, 1995).

Os estrógenos e seus análogos apresentam importante papel na expressão de fatores de crescimento e de citocinas sintetizadas e secretadas tanto por osteoblastos e osteoclastos. Dentre essas citocinas destaca-se a IL-1, que se encontra aumentada na deficiência de estrógeno e possui potente ação indutora da reabsorção óssea (HOROWITZ, 1993). O TGF- β é o fator de crescimento mais influenciado pela ação estrogênica, tem importante função mitogênica sobre os osteoblastos, auxiliando na formação de tecido ósseo e possui ação antirreabsortiva, diminuindo o recrutamento de osteoclastos.

Tanto o estrógeno quanto o TGF- β aumentam a produção de osteoprotegerina (OPG), diminuindo a ativação e diferenciação dos osteoclastos, bem como induzindo a apoptose dessas células (STEEVE *et al.*, 2004). Estudos concluíram que a deficiência de estrogênio aumenta os radicais livres, que induzem a produção de citocinas envolvidas na osteoclastogênese, como a IL-6 e TNF- α . (ABDALLA *et al.*, 2011).

Existe um consenso no papel da osteoporose no atraso do processo de consolidação óssea. Estudos prévios em animais comprovam uma alteração na consolidação óssea em modelos osteoporóticos (CHEUNG *et al.*, 2016). A redução dos níveis de estrogênio está diretamente relacionada com o desequilíbrio da neoformação óssea, devido ao aumento da apoptose dos osteoblastos e à supressão do mecanismo de apoptose dos osteoclastos.

A utilização de estrogênio tópico para o tratamento da menopausa já é amplamente difundida, porém a sua resposta no processo de consolidação de fraturas osteoporóticas ainda não está bem clara. A via tópica apresenta como principal vantagem o não metabolismo hepático de primeira passagem, reduzindo a concentração necessária desse fármaco e seus efeitos colaterais (BOTELHO *et al.*, 2013).

A utilização de nanocápsulas na formulação de fármacos permite que mais droga seja entregue na circulação sistêmica, reduzindo assim a concentração necessária dessa droga na formulação (LENGERT *et al.*, 2020). A administração tópica de medicações foi desenvolvida para transportar a droga através da pele até a circulação sistêmica. A nanotecnologia permite que esse transporte seja mais efetivo, aumentando a penetração através da pele e evitando o primeiro metabolismo hepático. Esses fatores permitem uma administração em doses menores, evitando possíveis efeitos colaterais (ZHENG *et al.*, 2016).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

Os fármacos foram desenvolvidos no Laboratório de produção e desenvolvimento de fármacos e medicamentos. Tanto na nanocápsulas quanto a formulação convencional apresentavam a concentração de 0,06% de 17- β estradiol.

4.1.1 Obtenção das Nanocápsulas Poliméricas contendo 17- β -estradiol

Suspensões de nanocápsulas foram obtidas utilizando a PCL (100 mg) dissolvido em acetona (30 mL) na presença de Span® 80 (0,077g), 17- β -estradiol (50 mg) e triglicerídeos de cadeia média (0,33 g). A solução foi mantida sob agitação por 10 minutos. A fase aquosa foi preparada utilizando Tween 80® (0,077 g) e água destilada (53 mL). Em seguida, a fase orgânica foi adicionada lentamente a fase aquosa sob agitação magnética constante a 40°C. A nanoemulsão resultante dessa mistura foi mantida sob agitação por 10 minutos. Em seguida, o solvente orgânico foi removido por evaporação sob pressão reduzida a 40°C, resultando em uma amostra concentrada (10 mL).

4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO (*FIELD EMISSION GUN SCANNING ELECTRON MICROSCOPY – FEG-SEM*)

A avaliação morfológica e de superfície da nanopartícula e da forma convencional foi realizada em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As amostras foram submetidas à metalização com ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, foi empregada voltagem de aceleração de 15 kV e utilizado *software* específico (*Electron Optical Design*).

4.2.1 Espalhamento de Luz Dinâmico e Microeletroforese Laser Doppler

O tamanho de partícula e potencial zeta das nanopartículas (E2, PCLN e ZnON) foram determinados utilizando o equipamento Zetasizer Nano series ZS90 (MALVERN

INSTRUMENTS, Worcestershire, Reino Unido), após o preparo das amostras (1:500 V/V) em água ultrapura. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3 ENSAIO ANIMAL

4.3.1 Planejamento Amostral

O número da amostra foi calculado com um nível de significância de $\alpha=0,05$, para 03 grupos divididos em: G1 (15 e 30 dias Pós-operatório), G2 (15 e 30 dias Pós-operatório), G3 (15 e 30 dias Pós-Operatório). Cada grupo foi composto por 07 animais na fase D15 e 08 animais na fase D30, totalizando quinze animais em G1, quinze animais em G2, quinze animais em G3. Os cálculos foram realizados com base na média e desvio padrão, estabelecendo um poder de teste em 95%, usando o programa GPower 3.1.9.2. baseado nos resultados encontrados por Stuermers *et al.* (2014).

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), processo sob o número 0122368/2019 (Anexo A).

Foram utilizados 45 ratos Wistar fêmeas, pesando aproximadamente 250 g, mantidos em gaiolas de plástico e alimentados com ração (Nutival®) e água *ad libitum*, temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas controlados automaticamente.

Os animais foram divididos em grupos conforme o Quadro 1:

Quadro 1 – Grupos de animais

Grupo	Tratamento
G1 (n15)	Animais ooforectomizados e que não receberam tratamento nas fraturas
G2 (n15)	Animais ooforectomizados que receberam tratamento tópico nas fraturas com 17- β -estradiol convencional
G3 (n15)	Animais ooforectomizados que receberam tratamento tópico nas fraturas com 17- β -estradiol nanoesturado

Fonte: O autor (2021).

4.3.2 Técnica Operatória

4.3.2.1 Ooforectomia e Fraturas

Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos a jejum hídrico por 2 horas e alimentar de 4 horas. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (40mg/kg) e cloridrato de xilazina (5mg/kg) por via intraperitoneal. As retiradas das gônadas foram feitas por incisões de 0,5 cm em cada flanco. O ovário foi pinçado com pinça hemostática e feita a ligadura da artéria ovariana com fio absorvível 4-0.

Para analgesia no pós operatório imediato, os animais receberam citrato de fentanila (2 mg/kg) intraperitoneal logo após o procedimento e retorno anestésico. As fraturas foram realizadas 40 semanas após as ooforectomia.

4.3.2.2 Produção das Fraturas

Após 40 semanas da ooforectomia, as ratas foram novamente anestesiadas pela mesma técnica anestésica e submetidas à fratura do fêmur direito. Foi realizado tricotomia e antissepsia com polvidine tópico (PVPI). Uma incisão de 2 cm foi feita na coxa lateral no membro posterior direito e estendida até o joelho, realizado a dissecação por planos e rebatimento da patela com exposição dos côndilos laterais. Introduziu-se 1 fio de Kirschner de 1 mm de diâmetro através dos côndilos até o trocânter maior. Após a fixação intramedular do fêmur afastou-se o músculo vasto lateral, expondo a diáfise do osso. Realizou-se uma osteotomia transversal na diáfise do fêmur com auxílio de osteótomo de 5 mm. Após o procedimento foi realizado sutura da fáscia muscular com fio absorvível de poligalactina 2-0 e pele com mononylon 3-0. Radiografias do pós operatório imediato foram obtidas.

Para analgesia no pós operatório imediato, os animais receberam citrato de fentanila (2 mg/kg) intraperitoneal logo após o procedimento e retorno anestésico. Não foi utilizado anti-inflamatórios pois os mesmos poderiam interferir na resposta do estrógeno no processo de consolidação (fase inflamatória). A própria fixação da fratura já reduziu o quadro algico do procedimento.

4.3.2.3 Aplicação de Estrógeno

Os grupos 2, 3 receberam aplicação diária de estrógeno de acordo com seus respectivos grupos (pasta de estrogênio tópica na concentração de 0,06% ou nanocápsulas de estrogênio tópica na concentração 0,06%) durante 14 dias, ao redor da ferida operatória.

4.4 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Um aparelho Lotus 630HF foi utilizado para se obter as radiografias de ambos os fêmures. Utilizou-se software VXvue 1.0.2.6pi (Viewwoks Co. Ltd.) para a realização das medições do calo ósseo no seu maior diâmetro e do istmo femoral do fêmur contralateral. Avaliou-se a medida absoluta do calo ósseo e a razão entre a medida do calo e o istmo contralateral.

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os ossos, limpos de tecido muscular foram armazenados em formaldeído 10 % e posteriormente descalcificados em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético 10% (EDTA) trocado semanalmente durante 2 meses. O segmento fraturado foi embocado em parafina, cortado longitudinalmente na espessura de 5 μ m e corado por hematoxilina-eosina (HE).

Após análise e seleção, as secções histológicas foram fotografadas com microscópio Olympus DP72 utilizando o programa *CellSens Standard*. Foram realizadas análises qualitativas e quantitativas das amostras. Aplicou-se a escala numérica proposta por Huo *et al.* (1991), de acordo com o estágio de consolidação observado em cada lâmina, conforme quadro abaixo (Quadro 2).

Quadro 2 – Escala numérica utilizada para avaliação histológica da consolidação das fraturas

Pontuação	Achados histológicos no local da fratura
1	Tecido fibroso
2	Tecido fibroso predominante com pequena quantidade de tecido cartilaginoso
3	Tecido fibroso e cartilaginoso na mesma proporção
4	Tecido cartilaginoso predominante com pequena quantidade de tecido fibroso
5	Tecido cartilaginoso
6	Tecido cartilaginoso com pequena quantidade de tecido ósseo imaturo
7	Tecido cartilaginoso e tecido ósseo imaturo na mesma proporção
8	Tecido ósseo predominante com pequena quantidade de tecido cartilaginoso
9	Fratura consolidada por tecido ósseo imaturo
10	Fratura consolidada por tecido ósseo maduro

Fonte: Adaptado de Huo *et al.* (1991).

4.5.1 Tecido Uterino

Após a eutanásia todos os úteros foram coletados e fixados em formol 10%. Em seguida, foi realizado o processamento histológico e a amostra foi seccionada em micrótomo com espessura de 3 μ m e corado com HE. As secções histológicas foram fotografadas utilizando microscópio *Olympus AX70* (aumento 20x), utilizando o programa T capture. A espessura das camadas perimétrio, miométrio e endométrio foram realizadas utilizando o programa *Image J* após padronização da distância conhecida. A média e desvio padrão foram calculados para posterior análise estatística.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística foi realizada utilizando o programa *IBM SPSS Statistics* 2.0 pela análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguido do Teste de Tukey, com intervalo de confiança em 95% ($p \leq 0,05$).

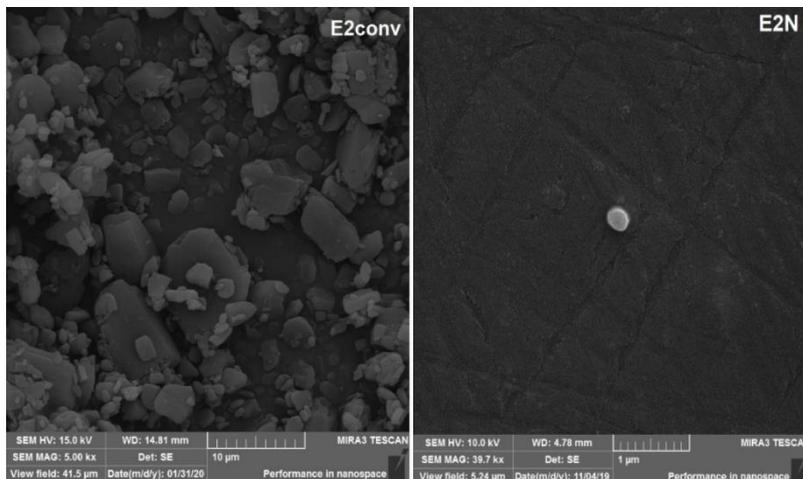
5 RESULTADOS

5.1 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOCÁPSULAS

A avaliação do tamanho da nanopartícula de E2 apresentou valor médio de $191,96 \pm 10,37$ nm. O resultado foi próximo ao descrito por Mittal *et al.* (2009), que obteve nanopartículas com $115 \pm 2,5$ nm de poli PLGA e estradiol para avaliar o efeito em ratas ooforectomizadas e hiperlipidêmicas.

A caracterização por microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que permite avaliar a influência das condições de síntese sobre a morfologia das nanopartículas (XIE *et al.*, 2011). Os resultados obtidos por MEV do E2 na forma convencional apresentou partes grandes e irregulares. A eletromicrografia da nanopartícula de estradiol mostrou formato esférico com superfície homogênea (Figura 1).

Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura comparando morfologia do estrógeno nas duas formulações



Fonte: O autor (2021).

A determinação da concentração de fármaco incorporado nas nanocápsulas e a eficiência de encapsulação foram realizadas em triplicata utilizando o método previamente validado. As nanocápsulas obtidas pelo método de precipitação do polímero pré-formado apresentaram rendimento superiores a 99%.

5.2 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Na avaliação aos 15 dias todos os animais já apresentavam sinais de formação de calo ósseo no D15. Após 30 dias todas as fraturas estavam consolidadas em seu aspecto radiológico. Os resultados encontrados para largura do calo ósseo estão consubstanciados na Tabela 1.

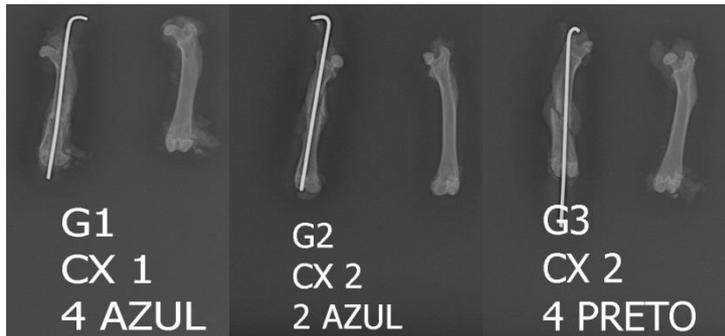
Tabela 1 – Média e desvio padrão da largura do calo ósseo e da razão entre a largura do calo e a largura do istmo contralateral aos 15 e 30 dias pós fratura em mm.

	Largura 15 dias	Razão 15 dias	Largura 30 dias	Razão 30 dias
G1	7,18 ±(0,40) ^a	2,04± (0,19) ^a	8,3 ± (0,97) ^a	2,40± (0,36) ^a
G2	8,37 ± (1,40) ^{ab}	2,43 ±(0,47) ^{ab}	8,51 ± (0,90) ^a	2,49± (0,20) ^a
G3	8,75 ±(0,77) ^b	2,54 ± (0,22) ^b	8,53 ± (1,00) ^a	2,56± (0,27) ^a

Fonte: autor (2021).

Média ± (desvio padrão). Letras diferentes nas colunas denotam diferença significativa $p < 0,05$.

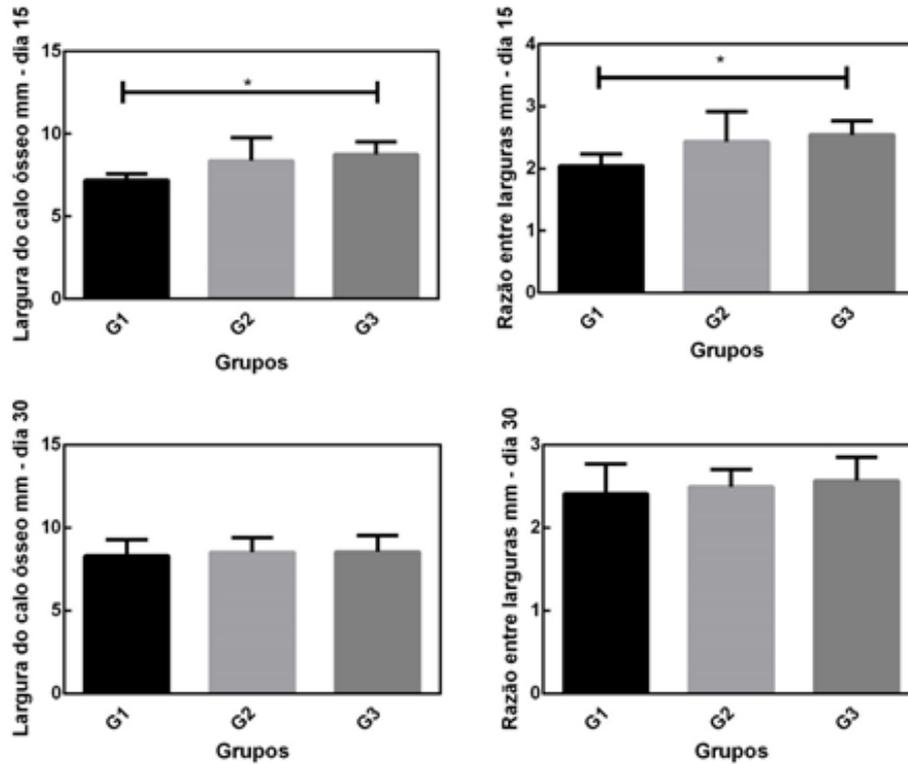
Figura 2 – Avaliação radiográfica D15 (G1, G2, G3)



Fonte: O autor (2021).

Na avaliação realizada aos 15 dias pós fratura, os animais do grupo tratado com nanocápsulas de estrógeno (G3) apresentaram maior calo ósseo que os do grupo controle (G1) ($p < 0,05$), e os animais tratados com estrógeno convencional (G2) apresentaram calo estatisticamente igual em relação ao G1 e G3.

Gráfico 1 – Largura e razão largura/istmo do calo ósseo em mm D15 e D30



Fonte: O autor (2021).

Os resultados para razão dos tamanhos apresentam o mesmo resultado estatístico do tamanho do calo ósseo, demonstrando a consistências dos resultados (Tabela 1). Aos trinta dias não foi observado diferença significativa em relação ao tamanho e razão dos calos ósseos entre os grupos.

Figura 3 – Avaliação radiográfica D30 (G1, G2, G3).



Fonte: O autor (2021).

5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A análise das lâminas, conforme o score histológico proposto por Huo *et al.* (1991) revelou que aos 15 dias toda as ratas apresentavam predominância de tecido cartilaginoso, sem diferença estatística entre os grupos (Tabela 2).

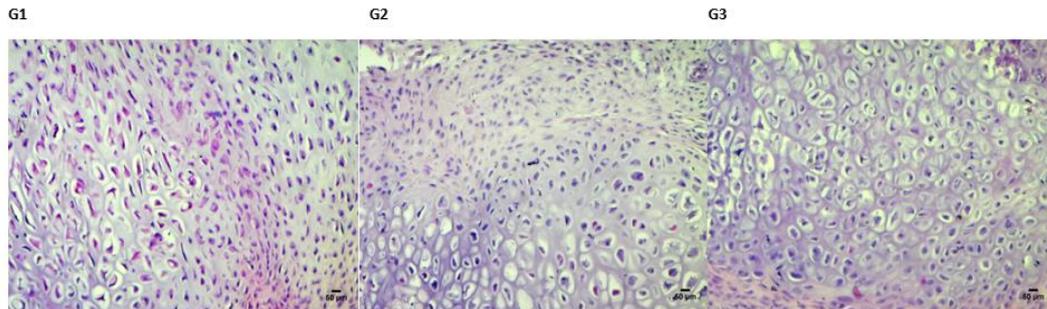
Tabela 2 – Média do escore histológico de maturação do calo ósseo conforme proposto por Huo *et al.* (1991)

	D15	D30
G1	5,28 ±(0,75) ^a	7±(0,78) ^a
G2	5,5 ± (1,20) ^a	6,5 ±(0,79) ^a
G3	5,8 ±(1,31) ^a	7,83 ± (0,71) ^b

Fonte: autor (2021).

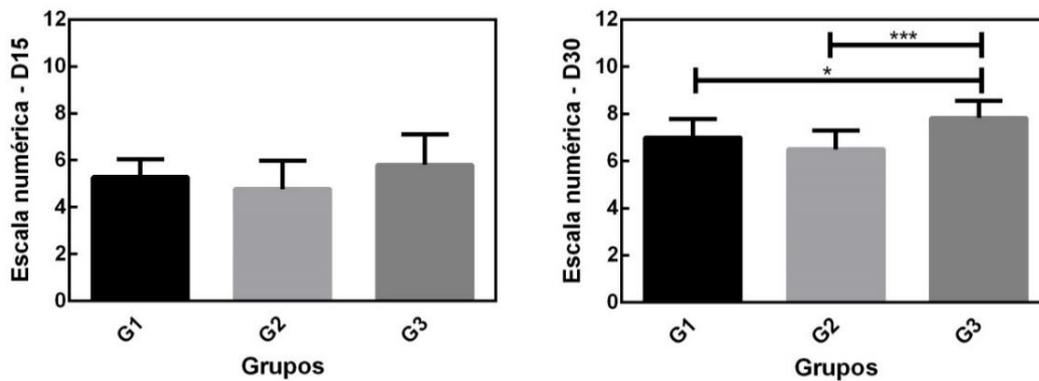
Média ± (desvio padrão). Letras diferentes nas colunas denotam diferença significativa $p < 0,05$.

Figura 4 – Cortes histológicos dos grupos G1, G2 e G3 em D15



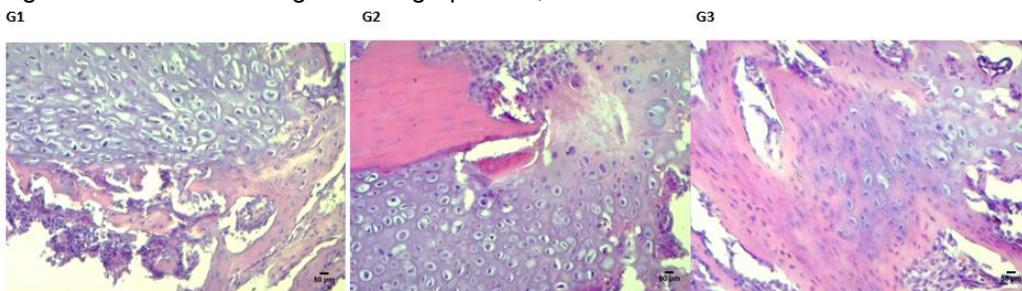
Fonte: O autor (2021).

Aos 30 dias o G3 apresentou predominância de tecido ósseo enquanto os demais grupos ainda apresentavam maior quantidade de tecido cartilaginoso ($p < 0,05$) conforme observado no Gráfico 2.

Gráfico 2 – Análise histológica do calo ósseo em D15 e D30 conforme escala de Huo *et al.* (1991)

Fonte: O autor (2021).

Figura 5 – Cortes histológicos dos grupos G1, G2 e G3 em D30



Fonte: O autor (2021).

Na avaliação do tecido uterino foi observado que aos 15 dias não existiu diferença entre os grupos G2 e G3, sendo que estes foram significativamente maiores que o G1 tanto na avaliação do endométrio como miométrio. Quando da comparação dos grupos aos 30 dias, o G3 apresentou uma redução da espessura do endométrio em comparação ao G2.

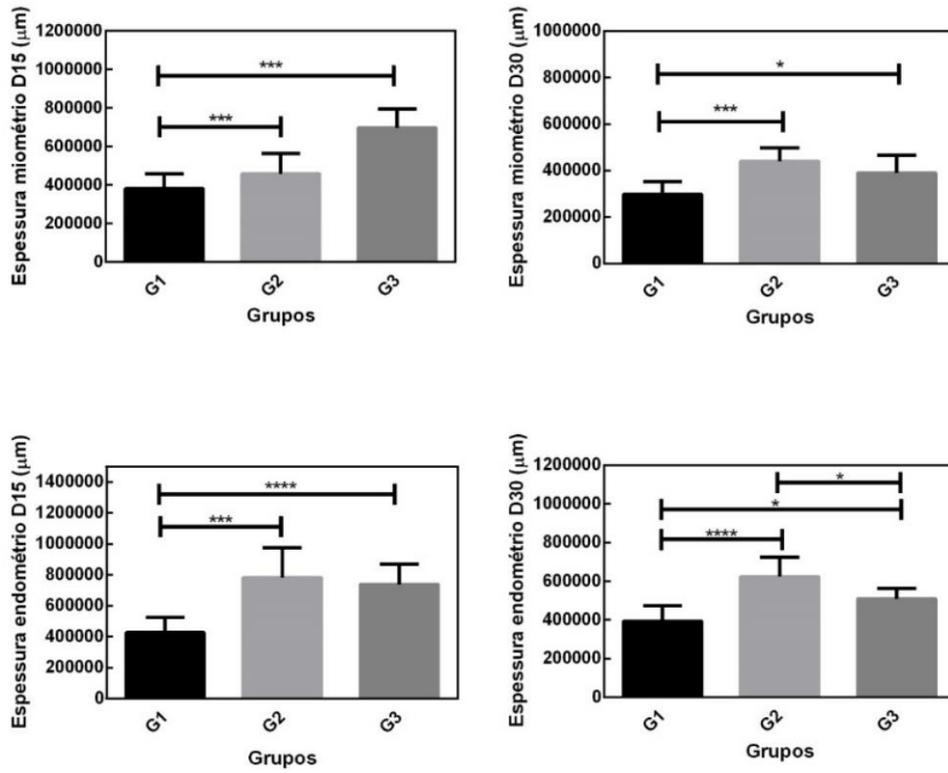
Os resultados das medidas de espessura do endométrio e miométrio encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Avaliação da espessura do tecido uterino em μm .

	Miométrio D15	Miométrio D30	Endométrio D15	Endométrio D30
G1	382096 \pm (75017,84) ^a	298256 \pm (53430) ^a	427311 \pm (97735) ^a	394883 \pm (79977) ^a
G2	458528 \pm (105627,8) ^b	440251 \pm (58007) ^b	783537 \pm (192171) ^b	623729 \pm (101592) ^b
G3	697511 \pm (98439,72) ^b	390452 \pm (76422) ^b	739547 \pm (131672) ^b	510073 \pm (54705,11) ^c

Fonte: O autor (2021).

Média \pm (desvio padrão). Letras diferentes nas colunas denotam diferença significativa $p < 0,05$.

Gráfico 3 – Espessura do endométrio e miométrio em μm D15 e D30

Fonte: O autor (2021).

6 DISCUSSÃO

A utilização de ratos como modelo de osteoporose já está consagrada. Esses animais desenvolvem osteoporose após seis semanas da ooforectomia (CAO *et al.*, 2002). A ooforectomia pelo período realizado nesse experimento (40 semanas) foi suficiente para produzir um modelo de osteoporose e conseqüentemente alterar a formação do calo ósseo.

Lill *et al.* (2003) já indicaram que a osteoporose diminui a formação do calo ósseo nos estágios iniciais da consolidação e a mineralização do calo nos estágios finais, sendo que ratas osteoporóticas apresentavam um calo 40 % menor que o grupo controle. Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram com os dados observados por esses autores.

A deficiência do estrógeno induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 nas fases iniciais do processo de consolidação, o que reduz a capacidade osteogênica nas primeiras fases da formação do calo ósseo e com isso, atrasando o processo de consolidação (CAO *et al.*, 2018). Uma das ações do estrógeno é aumentar a liberação de TGF- β , que uma vez liberado no local da fratura estimula a produção de colágeno e proteoglicanos pelas células mesenquimais e osteoblastos, além de estimular a produção de fibronectina no tecido ósseo (ATCI *et al.*, 2021).

Beil *et al.* (2011) analisaram o efeito do estrógeno na fratura de ratas osteoporóticas e encontraram um aumento da formação de condrócitos nas fases iniciais do processo de consolidação nas ratas tratadas com pérolas de E2 o que demonstra que esse hormônio tem efeito na estimulação condral. No presente estudo a administração de estrógeno em forma de nanocápsulas induziu uma produção de um maior calo ósseo aos 15 dias, conforme observado nas medições realizadas. Existe uma regulação positiva da função e maturação dos condrócitos influenciadas pelo estrógeno em culturas desse tecido, na superfície articular e em epífises de crescimento (RICHMOND *et al.*, 2000). Essa observação encontrada pelos autores supracitados, se reforça, dado que o tamanho do calo ósseo era maior nos grupos tratados com estrógeno, sendo significativamente maior que o controle o grupo G3, que foi igual ao G2.

Sabe-se que quanto antes se ultrapassa a fase inflamatória e se inicia o processo de formação condral, antes teremos a mineralização desse tecido e o reparo

da fratura. O papel do estrógeno vai além da estimulação da condrogênese em estágios iniciais. Ele também influencia o processo de consolidação periosteal nas fases finais da formação do calo ósseo (BEIL *et al.*, 2011). Os autores ainda encontraram altos índices de calceína, um marcador da atividade osteoblástica, em ratas osteoporóticas tratadas com E2. Embora esse estudo não avaliou este marcador, podemos inferir que o resultado encontrado macroscopicamente foi devido a uma melhor atuação celular por efeito do estrogênio.

O resultado de uma maior formação de calo ósseo encontrado no G2 e G3, mostrou uma aceleração do processo atribuído ao estrógeno, com um resultado estatisticamente melhor para o grupo tratado com as nanocápsulas, sendo este resultado atribuído a uma melhor ação local do fármaco. O uso de nanocápsulas de estrógeno melhora ação local aos 15 dias, já que o grupo tratado com as nanocápsulas apresentou maior calo ósseo. Segundo Salimi e Mohammadipanah (2021), a utilização do estrógeno na forma nanoparticulada pode permitir o controle na taxa de liberação do ativo, prolongando o efeito farmacológico no local da lesão.

A avaliação da consolidação da fratura é realizada de forma radiográfica (TAHAMI *et al.*, 2016). Aos trinta dias de avaliação radiográfica, todos os grupos apresentavam estatisticamente iguais em relação ao tamanho do calo ósseo $p > 0,05$.

Embora o G3 apresentasse um maior calo ósseo aos 15 dias, no aspecto microscópico não foi observado diferença entre o estágio de maturação de calos entre os grupos. Na avaliação histológica aos 30 dias o grupo G3 apresentou melhor maturação. Embora todos os grupos apresentassem o mesmo tamanho de calo aos 30 dias, a qualidade foi diferente. Essa resposta se justifica pela melhor fase inicial estimulada pelas nanocápsulas de estrógeno, uma vez que o E2 aumenta a população de células osteocondrogênicas na fase inicial da formação do calo ósseo (NEGULESCO; EGLITIS, 1975).

Uma melhor formação de calo ósseo foi observada no grupo G3 em relação aos demais. Um maior calo ósseo aos 15 dias com melhor qualidade aos 30 dias. O resultado é atribuído por uma melhor ação e permeação do fármaco. Kaur e Ajitha (2019) avaliaram a utilização de uma formulação de fluvastatina através de nanocápsulas por via transdérmica e encontraram uma permeabilidade superior à formulação convencional no tratamento de ratas osteoporóticas. As nanocápsulas atingiram a circulação sanguínea com mais facilidade que a apresentação

convencional e promoveram melhora da microarquitetura óssea e resistência a cargas. Esses achados corroboram com os resultados encontrados em nosso trabalho, pois a aplicação de estrógeno através da nanotecnologia apresentou um resultado significativamente melhor quando comparado a G1 e G2. A difusão desse fármaco até o local da fratura foi mais efetiva através de nanocápsulas.

A avaliação do útero como órgão sentinela nesse trabalho, serviu para acompanhar o efeito dos tratamentos no tecido endometrial. Em ambos os grupos tratados aos 15 dias foi observado aumento do tecido endometrial e miometrial em relação ao não tratado, contudo aos 30 dias houve um menor tamanho do endométrio no G3 em relação ao G2. A observação reforça os resultados encontrados no processo de formação do calo ósseo. Fármacos nanoencapsulados chegam melhor ao sítio de ação e assim resta uma quantidade menor para efeitos sistêmicos. No entanto, Silva *et al.* (2017) não observaram efeitos sistêmicos do tratamento tópico com estrógeno, discordando do encontrado nesse trabalho.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados desse estudo, o E2 acelerou o processo de consolidação das fraturas em ratas osteoporóticas, principalmente acelerando o processo de formação do calo ósseo na fase condral e culminando com uma matriz óssea de melhor qualidade aos trinta dias.

A administração de estrógeno em nanocápsulas obteve um resultado melhor que a administração convencional. Parece haver um espaço para a utilização de estrógeno local em nanocápsulas para o tratamento das fraturas osteoporóticas pós menopausa. Uma concentração de estrógeno no local da fratura estimula e acelera o processo de formação do calo ósseo, evitando dessa forma complicações inerentes a esse tipo de fratura. A dose ministrada, bem como a redução das repercussões sistêmicas devem ser melhor analisadas por estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA M. *et al.* Piper sarmentosum enhances fracture healing in ovariectomized osteoporotic rats: a radiological study. **Clinics**, v. 66, n. 5, p. 865-72, 2011.
- AMADEI, U.S. *et al.* A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 42, n. 1, p 5-12, 2006.
- ATCI, T. *et al.* Effects of different vardenafil doses on bone healing in a rat fracture model. **Joint Diseases and Related Surgery**, v. 32, n. 2, p. 313-22, 2021.
- BEIL, F.T. *et al.* Effects of increased bone formation on fracture healing in mice. **J Trauma**, v. 70, n. 4, p 857-62, 2010.
- BHARDWAJ, V.; KAUSHIK, A. Biomedical applications of nanotechnology and nanomaterials. **Micromachines**, v. 8, n. 10, p. 1-3, 2017.
- BOTELHO, M. A. *et al.* Effects of a new testosterone transdermal delivery system, Biolipid B2 testosterone in healthy middle age men: a Confocal Raman Spectroscopy Study. **J Pharm Sci Innov.**, v. 2, n. 2, p. 1-7, 2013.
- BOTELHOM, A. *et al.* Effects of a transdermal testosterone metered-dose nanoemulsion in peri- and postmenopausal women: a novel protocol for treating low libido. **Medical Express (São Paulo on line)**, v. 2, n. 5, p. 1-7, 2015.
- BURGE R. *et al.* Incidence and economical burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. **J bone miner res**, v. 22, n. 3, p. 465-75, 2007.
- CAO Y. *et al.* Raloxifene estrogen and alendronate affect the process of fracture repair differently in ovariectomized rats. **J Bone Miner Res**, v. 17, n. 12, p. 2237-46, 2002.
- CAO, G.L. *et al.* Strontium ranelate combined with insulin is as beneficial as insulin alone in treatment of fracture healing in ovariectomized diabetic rats. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 24, p. 6525-36, 2018.
- CHEUNGA, W.H. *et al.* Fracture healing in osteoporotic bone. **Injury**, v. 47 (suppl. 2: S21-6), 2016.
- EALIAS, A.M.; SARAVANAKUMAR, M.P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. **Materials Science and Engineering**. v. 263, n. 3, p. 1-16, 2017.
- EINHORN, T.A. The science of fracture healing. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 19, n. 10 (suppl. 10: S4-6), 2005.
- ERIKSEN, E.F. *et al.* Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. **Science**, v. 241, n. 4861, p. 84-6, 1988.

- GUARNIERO, R.; OLIVEIRA, L.G. Osteoporose: Atualização no diagnóstico e princípios básicos para o tratamento. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 39, n. 9, p. 477-85, 2004.
- HOROWITZ, M.C. Cytokines and estrogen in bone. **Science**, v. 260, n. 5108, p. 626-28, 1993.
- HUGHES, D.E. *et al.* Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclast mediated by TGF-beta. **Nat Med**, v. 2, n. 10, p.132-6, 1996.
- HUNGRIA NETO J.S.; DIAS, C.R.; ALMEIDA, J.D.B. Características Epidemiológicas e causas da fratura do terço proximal do fêmur em idosos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, n. 6, p. 660-7, 2011.
- HUO, M.H. *et al.* The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. **J Orthop Res**, v. 9, n. 3, p. 383-90, 1991.
- JEEVANANDAM, J. *et al.* Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**. v. 9, n. 1, p.1050-74, 2018.
- KAUR, R.; AJITHA, M. Transdermal delivery of fluvastatin loaded nanoemulsion gel: Preaparation, characterization and in vivo anti-osteoporosis activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 136, p. 1-10, 2019.
- LEE, H.H. *et al.* Rutin improves bone hitomorphometric values by reduction os osteoclastic activity in osteoporosis mouse model induced by bilateral ovariectomy. **J Korean Neurosurg Soc**, v. 63, n. 4, p. 433-43, 2020.
- LENGERT, E.V. *et al.* Prospective Nanotechnology – Based Strategies for Enhanced Intra – and transdermal delivery of antifungal drugs. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 5, p. 261-9, 2020.
- LEON, L.; CHUNG, E.J.; RINALDI, C. A brief history of nanotechnology and introduction to nanoparticles for biomedical applications. In: **Nanoparticles for Biomedical Applications**. Elsevier, 2020. p. 1-4.
- LILL, C.A. *et al.* Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model os osteoporosis. **J. Orthop. Res**, v. 21, n. 5, p. 836-42, 2003.
- MITTAL, G. *et al.* Pharmacodynamic Evaluation of Oral Estradiol Nanoparticles in Estrogen Deficient (Ovariectomized) High-Fat Diet Induced Hyperlipidemic Rat Model. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 1, p. 218-23, 2009.
- MUKAI, K. *et al.* Topical estrogen application to wounds promotes delayed cutaneous wound healing in 80-week-old female mice. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, p. 1-14, 2019.

NAMKUNG-MATTHAI, H. *et al.* Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. **Bone**, v. 28, n. 1, p. 80-6, 2001.

NEGULESCO, J.A.; EGLITIS, J.A. Effect of hypophysectomy and estrogen treatment on long bone fracture healing of young domestic fowls. **The Ohio Journal of Science**, v. 75, n. 5, p. 217-22, 1975.

PATRA, J.K. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **J Nanobiotechnol**, v. 16, n. 71, p. 1-33, 2018.

RADWAN, F.A.A. Nanotechnology and medicine. **Mat Sci nanotechnol**, v. 2, n.2, p. 10-11, 2018.

RAJFER, R.A. *et al.* Prevention of osteoporosis in the ovariectomized rat by oral administration of a nutraceutical combination that stimulates nitric oxide production. **Journal of osteoporosis**, v. 2019, p. 1-11, 2019.

RAMALHO, A.C.; CASTRO, M.L. Fisiopatologia da Osteoporose Involutiva. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 43, n. 6, 1999.

RICHMOND, R.S. *et al.* Functional estrogen receptors in adult articular cartilage: Estrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insulin-like growth factor binding protein 2. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 43, n. 9, p. 2081-90, 2000.

RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. An unitary model for involutional osteoporosis: estrogen causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. **J Bone Miner Res**, v. 13, n. 5, p. 763-73, 1998.

SAKAKI M H. *et al.* Estudo na mortalidade da fratura do fêmur proximal em idosos. **Acta Ortop Bras**, v. 12, n. 4, p. 242 -9, 2004.

SALIMI, F.; MOHAMMADIPANAH, F. Nanomaterials Versus The Microbial Compounds With Wound Healing Property. **Frontiers in Nanotechnology**, v. 2, p. 1-17, 2021.

SILVA, L.A. *et al.* Collagen concentration on the facial skin of postmenopausal human after topical treatment with estradiol and genistein: a randomized double-blind controlled trial. **Gynecol Endocrinol**, v. 33, n. 11, p. 845-8, 2017.

SÖZEN, T.; ÖZİŞİK, L.; BAŞARAN, N.Ç. An overview and management of osteoporosis. **European journal of rheumatology**, v. 4, n. 1, p. 46-56, 2017.

STEEVE, K.T. *et al.* IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Citokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 1, p. 49-60, 2004

STUERMERS, E.K. *et al.* Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 395, n. 2, p.163-72, 2010.

- STUERMERS, E.K. *et al.* Whole body vibration during fracture healing intensifies the effects of estradiol and raloxifene in estrogen-deficient rats. **Bone**, v. 64, p. 187-94, 2014.
- SUDA, T. *et al.* Modulation of Osteoclast Differentiation by Local Factors. **Bone**, v. 17, n. 2, p. 87-91, 1995.
- TAHAMI M. *et al.* Potencial role of local estrogen in enhancement of fracture healing: Preclinical study in rabbits. **Arch Bone Jt Surg**, v. 4, n. 4, p. 323-9, 2016.
- TURNER, C.H.; RIGGS, B.; SPELSBERG, T.C. Skeletal effects of estrogen. **Endocrine Rev**, v. 15, n. 3, p. 275-300, 1994.
- XIE, J. *et al.* Simple fabrication and photocatalytic activity of ZnO particles with different morphologies. **Powder Technology**, v. 207, p. 140-4, 2011.
- ZHENG, Y. *et al.* Effects of Carbopol 934 proportion on nanoemulsion gel for topical and transdermal drug delivery: a skin permeation study. **Int. J. Nanomedicine**, v. 11, p. 5971-87, 2016.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

SEI/UEPG - 0122368 - Carta

https://sei.uepg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visual...

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

CARTA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo/ Process CEUA: 0122368/2019

Protocolo UEPG: 19.000005671-7

Título: Avaliação da consolidação óssea em fraturas de fêmur de ratas osteoporóticas tratadas com estrogênio tópicos através de dois diferentes veículos**Interessado:** Dr. Leandro Cavalcanti Lipinski**e-mail:** leandrolipinski@yahoo.com.br**Data de Entrada:** 13/06/2019**Resultado:** Aprovado

Considerações

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCDA), estabelecida pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 90 ratas Wistar com peso aproximado de 350g obtidos do Biotério da Universidade

1 of 2

05/12/2019 11:31

SEI/UEPG - 0122368 - Carta

https://sei.uepg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visual...

Estadual de Ponta Grossa no início dos experimentos para a execução desse projeto.

Ponta Grossa, 04 de dezembro de 2019

Profª. Dra. Cheila Roberta Lehnen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG



Documento assinado eletronicamente por **Cheila Roberta Lehnen, Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais/PROPESP**, em 04/12/2019, às 14:01, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **0122368** e o código CRC **CA120B77**.

19.000005671-7

0122368v2

2 of 2

05/12/2019 11:31