

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

CONRADO AUER TRENTINI

**VALIDAÇÃO DE UM FILME BIODEGRADÁVEL CONTENDO NANOCÁPSULAS
DE ESTRÓGENO NA CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA EM RATAS
OOFORECTOMIZADAS**

PONTA GROSSA

2026

CONRADO AUER TRENTINI

**VALIDAÇÃO DE UM FILME BIODEGRADÁVEL CONTENDO NANOCÁPSULAS
DE ESTRÓGENO NA CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA EM RATAS
OOFORECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina pela Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Ciências da Saúde, área de concentração: Pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica em saúde.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Yuriko Koga

PONTA GROSSA

2026

Trentini, Conrado

T795 Validação de um filme biodegradável contendo nanocápsulas de estrógeno na consolidação óssea em ratas ooforectomizadas / Conrado Trentini. Ponta Grossa, 2026.
35 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Leandro Lipinski.
Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Koga.

1. Osteoporose. 2. Estradiol. 3. Nanocápsulas. 4. Alginato. 5. Consolidação de fraturas. I. Lipinski, Leandro. II. Koga, Adriana. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

CDD: 616

CONRADO AUER TRENTINI

**VALIDAÇÃO DE UM FILME BIODEGRADÁVEL CONTENDO NANOCÁPSULAS
DE ESTRÓGENO NA CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA DE RATAS
OOFORECTOMIZADAS**

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, 28 de Agosto de 2026.

Documento assinado digitalmente
 **LEANDRO CAVALCANTE LIPINSKI**
Data: 06/10/2026 17:57:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **MARCO ANTONIO PEDRONI**
Data: 07/10/2026 05:00:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marco Antônio Pedroni
Doutor em Ciências da Saúde
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Documento assinado digitalmente
 **GIOVANI MARINO FAVERO**
Data: 06/10/2026 17:43:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Giovani Marino Favero
Doutor em Alergia e Imunopatologia
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Dedico este trabalho à minha esposa, Priscila, pelo amor, companheirismo e apoio incondicional em cada etapa desta jornada. À minha família, pelo suporte, incentivo e presença em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde, força e determinação para percorrer esta trajetória com perseverança.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski, pela confiança, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e pelo rigor científico que nortearam cada etapa deste trabalho.

À minha coorientadora, Professora Dra. Adriana Yuriko Koga, pela contribuição valiosa, pelo suporte e pelos conhecimentos compartilhados ao longo do desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UEPG, pelos ensinamentos e pela dedicação à formação científica.

Ao Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UEPG, pelo suporte estrutural e pela colaboração nos procedimentos experimentais.

À minha esposa, Priscila, pelo amor, pela paciência e por estar presente em todos os momentos desta caminhada, tornando-a mais leve e significativa.

À minha família, pelo apoio incondicional, pelo incentivo constante e por acreditar em mim mesmo nos momentos de maior dificuldade.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela oportunidade de realização deste mestrado.

RESUMO

A deficiência estrogênica pós-menopausa está diretamente relacionada à osteoporose e pode comprometer a consolidação de fraturas, tornando o reparo ósseo mais lento e menos eficiente. Estratégias de liberação local de estrógeno podem favorecer o microambiente do foco de fratura, reduzindo a exposição sistêmica ao hormônio. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação periosteal de filmes de alginato reticulados com cloreto de cálcio, contendo ou não nanocápsulas de 17 β -estradiol em diferentes concentrações, sobre a consolidação de fraturas femorais em ratas ooforectomizadas. Foram utilizadas 64 ratas Wistar, distribuídas em quatro grupos: G1, filme de alginato sem estrógeno; G2, filme contendo nanocápsulas de 17 β -estradiol a 0,03%; G3, filme contendo nanocápsulas de 17 β -estradiol a 0,06%; e G4, filme contendo nanocápsulas de 17 β -estradiol a 0,12%. Após 150 dias da ooforectomia, os animais foram submetidos à osteotomia femoral direita estabilizada com fio de Kirschner e implantação do filme sobre o foco de fratura. As eutanásias foram realizadas aos 15 e 30 dias, com avaliação radiográfica do calo ósseo, análise histológica pela escala de Huo, escores de inflamação e fibrose, e quantificação sérica de CTX-I e CTX-II. Aos 15 dias, não houve diferença entre os grupos quanto ao tamanho radiográfico do calo ou à maturação histológica. Aos 30 dias, os grupos tratados apresentaram menor tamanho radiográfico do calo em relação ao controle; entretanto, os grupos 0,06% e 0,12% apresentaram maior maturação histológica. O CTX-II aumentou aos 15 dias nos grupos 0,06% e 0,12%, sugerindo maior remodelação da matriz cartilaginosa na fase inicial/intermediária do reparo. O CTX-I apresentou alterações pontuais, com redução no grupo 0,06% aos 15 dias e no grupo 0,12% aos 30 dias em comparação ao grupo 0,03%. Os resultados indicam que o estrógeno nanoencapsulado liberado localmente por filme de alginato não aumentou o tamanho radiográfico do calo ósseo, mas favoreceu sua maturação tecidual, especialmente nas concentrações de 0,06% e 0,12%.

Palavras-chave: osteoporose; estradiol; nanocápsulas; alginato; consolidação de fraturas; ratas ooforectomizadas.

ABSTRACT

Postmenopausal estrogen deficiency is directly associated with osteoporosis and may impair fracture healing, making bone repair slower and less efficient. Local estrogen delivery strategies may improve the fracture microenvironment while reducing systemic hormone exposure. This study aimed to evaluate the effect of periosteal application of calcium chloride-crosslinked alginate films, with or without 17 β -estradiol nanocapsules at different concentrations, on femoral fracture healing in ovariectomized rats. Sixty-four female Wistar rats were allocated into four groups: G1, alginate film without estrogen; G2, alginate film containing 0.03% 17 β -estradiol nanocapsules; G3, alginate film containing 0.06% 17 β -estradiol nanocapsules; and G4, alginate film containing 0.12% 17 β -estradiol nanocapsules. One hundred and fifty days after ovariectomy, the animals underwent right femoral osteotomy stabilized with a Kirschner wire, followed by implantation of the film over the fracture site. Euthanasia was performed at 15 and 30 days. Radiographic callus size, histological maturation using the Huo score, inflammation and fibrosis scores, and serum CTX-I and CTX-II concentrations were evaluated. At 15 days, no significant differences were observed among groups regarding radiographic callus size or histological maturation. At 30 days, treated groups showed smaller radiographic calluses than the control group; however, the 0.06% and 0.12% groups showed greater histological maturation. CTX-II increased at 15 days in the 0.06% and 0.12% groups, suggesting greater remodeling of the cartilaginous matrix during the early/intermediate phase of repair. CTX-I showed punctual changes, with lower values in the 0.06% group at 15 days and in the 0.12% group at 30 days compared with the 0.03% group. These results indicate that locally released nanoencapsulated estrogen from alginate films did not increase radiographic callus size but improved tendinal callus maturation, especially at concentrations of 0.06% and 0.12%.

Keywords: osteoporosis; estradiol; nanocapsules; alginate; fracture healing; ovariectomized rats.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CTX-I – C-terminal telopeptídeo do colágeno tipo I

CTX-II – C-terminal telopeptídeo do colágeno tipo II

DP – Desvio-padrão

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

G1 – Grupo 1 — Controle (filme sem estrógeno)

G2 – Grupo 2 — Filme com nanocápsulas de 17 β -estradiol 0,03%

G3 – Grupo 3 — Filme com nanocápsulas de 17 β -estradiol 0,06%

G4 – Grupo 4 — Filme com nanocápsulas de 17 β -estradiol 0,12%

OVX – Ooforectomia bilateral

PCL – Poli(ϵ -caprolactona)

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

UEPG – Universidade Estadual de Ponta Grossa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Comitê de Ética	14
3.2 Local de realização do estudo	14
3.3 Obtenção das nanocápsulas de estrógeno	14
3.4 Preparo e reticulação dos filmes de alginato	15
3.5 Modelo animal e grupos experimentais	16
3.6 Técnica anestésica e analgesia	16
3.7 Ooforectomia bilateral	17
3.8 Osteotomia femoral	18
3.9 Aplicação periosteal do filme de alginato contendo ou não estrógeno	18
3.10 Eutanásia e coleta de amostras	19
3.11 Avaliação radiográfica	19
3.12 Análises bioquímicas e imunoenzimáticas	19
3.13 Análise histológica do calo ósseo	20
3.14 Análise histológica uterina	20
3.15 Cálculo amostral e análise estatística	20
4 RESULTADOS	22
4.1 Avaliação radiográfica do tamanho do calo ósseo	22
4.2 Avaliação histológica do calo ósseo	22
4.3 Avaliação sérica de CTX-II	23
4.4 Avaliação sérica de CTX-I	24
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÃO	31
7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXO A: CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA	35

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica caracterizada por redução da massa óssea, comprometimento da microarquitetura do tecido ósseo e aumento da suscetibilidade a fraturas. Em mulheres, a deficiência estrogênica associada à menopausa é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento da osteoporose. O estrogênio participa da regulação do remodelamento ósseo, modulando a atividade de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Sua redução altera o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, favorecendo aumento do número e atividade de osteoclastos, perda de matriz mineralizada e deterioração da qualidade óssea (Weitzmann; Pacifici, 2006; Amadei et al., 2006).

As fraturas osteoporóticas representam um dos principais desafios associados ao envelhecimento populacional. Além de sua elevada frequência, essas lesões estão relacionadas à perda funcional, redução da qualidade de vida, maior dependência de cuidados e aumento dos custos assistenciais. A carga global das fraturas ósseas tem crescido em números absolutos, especialmente pelo aumento da proporção de indivíduos idosos, grupo no qual a fragilidade esquelética e o risco de quedas são mais expressivos (GBD 2019 Fracture Collaborators, 2021). Assim, compreender os mecanismos envolvidos na consolidação óssea em condições osteoporóticas e desenvolver estratégias que favoreçam a regeneração do tecido ósseo tornaram-se prioridades científicas e clínicas.

Além de influenciar a manutenção da massa óssea, a deficiência estrogênica interfere diretamente no processo de reparo após fraturas. A consolidação óssea é um evento biológico complexo e sequencial, que envolve fase inflamatória inicial, formação de calo fibrocartilagenoso, ossificação endocondral, deposição de tecido ósseo imaturo e posterior remodelamento. Em ambiente osteoporótico, essas etapas podem ser prejudicadas por alterações celulares, inflamatórias e vasculares, resultando em calo ósseo de menor qualidade, atraso de mineralização e menor resistência mecânica do tecido reparado (Namkung-Matthai et al., 2001; Gorter et al., 2021).

Modelos experimentais com ratas ooforectomizadas são amplamente utilizados para investigar a osteoporose pós-menopausa e seus efeitos sobre a consolidação de fraturas. A ooforectomia bilateral induz estado de hipoenestrogenismo prolongado, mimetizando aspectos importantes da deficiência hormonal observada em mulheres

após a menopausa. Estudos em modelos animais demonstram que a osteoporose induzida por ooforectomia pode comprometer especialmente as fases iniciais e intermediárias do reparo ósseo, reduzindo a formação adequada do calo e modificando a progressão da ossificação endocondral (Namkung-Matthai et al., 2001; Chen et al., 2016).

A fase inflamatória da consolidação óssea é particularmente relevante. Embora a inflamação inicial seja necessária para o recrutamento celular e início do reparo, sua persistência ou desregulação pode comprometer a diferenciação condrogênica e osteogênica. A deficiência estrogênica está associada ao aumento de mediadores pró-inflamatórios e à maior ativação de vias relacionadas à reabsorção óssea. Haffner-Luntzer et al. (2017) demonstraram que o estado estrogênico influencia a fase inflamatória inicial da consolidação, com aumento de células inflamatórias e citocinas no foco de fratura em animais deficientes em estrogênio. Esses achados reforçam que a osteoporose pós-menopausa não deve ser compreendida apenas como perda de massa óssea, mas também como uma condição de desequilíbrio ósseo.

O estrogênio exerce efeitos relevantes sobre diferentes células envolvidas na regeneração óssea. Além de inibir a formação e a atividade dos osteoclastos, favorece a sobrevivência e a função osteoblástica, contribui para a manutenção da matriz óssea e participa da regulação da formação cartilaginosa durante a ossificação endocondral. Beil et al. (2010) demonstraram que a deficiência estrogênica prejudica a formação periosteal do calo e a mineralização durante a consolidação, enquanto o tratamento com estrogênio melhora a formação cartilaginosa, a mineralização e a espessura da neocortical. Dessa forma, a reposição ou modulação local do estrogênio no foco de fratura pode representar uma estratégia promissora para melhorar a qualidade do reparo ósseo em ambiente osteoporótico.

Entretanto, a utilização sistêmica do estrogênio apresenta limitações importantes, principalmente pelo risco de efeitos em tecidos não esqueléticos e pela necessidade de exposição hormonal prolongada, causando efeitos sistêmicos não desejados. Por esse motivo, estratégias de liberação local e controlada têm ganhado destaque como alternativa para explorar os efeitos benéficos do estrogênio sobre o osso, reduzindo a exposição sistêmica. Assim, sistemas nanoestruturados de entrega de fármacos permitem melhorar a estabilidade, a biodisponibilidade e a liberação gradual de moléculas bioativas, favorecendo maior concentração no local de interesse e potencial redução de efeitos adversos (Guo et al., 2021; Wen et al., 2024).

O uso de nanocarreadores contendo estradiol já demonstrou potencial em modelos experimentais de osteoporose. Guo et al. (2021) relataram que a entrega ósseo-direcionada e controlável de estradiol em ratas ooforectomizadas foi capaz de melhorar parâmetros ósseos e reduzir efeitos em tecidos não esqueléticos. De forma semelhante, estudo prévio do nosso grupo demonstrou que a aplicação tópica de nanocápsulas de estrógeno na região da incisão cutânea melhorou a consolidação de fraturas femorais em ratas osteoporóticas, com maior formação de calo ósseo em fase inicial, melhor maturação histológica em fase tardia e menor repercussão uterina em comparação à formulação convencional de estrógeno (Berri et al., 2025).

Apesar desses resultados, a aplicação tópica cutânea ainda depende da difusão do fármaco até o foco de fratura e pode exigir administrações repetidas. A implantação de um dispositivo biodegradável diretamente sobre a região periosteal do foco de fratura representa uma evolução dessa abordagem, pois permite contato direto entre o sistema carreador e o microambiente reparativo. Essa estratégia pode favorecer uma liberação mais localizada do estradiol, modulando precocemente a resposta inflamatória, a formação do calo e a transição entre matriz cartilaginosa e tecido ósseo mineralizado, com potencial redução de efeitos sistêmicos.

Entre os biomateriais utilizados para liberação local de fármacos, o alginato apresenta características favoráveis, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de formar matrizes hidratadas e possibilidade de reticulação iônica. A reticulação do alginato com íons cálcio aumenta a estabilidade estrutural da matriz, permitindo sua utilização na forma de filmes, hidrogéis e dispositivos aplicáveis à engenharia de tecidos e à liberação controlada de compostos bioativos (Sun; Tan, 2013). Assim, filmes de alginato reticulados com cloreto de cálcio podem funcionar como suporte biodegradável para nanocápsulas contendo estradiol, permitindo sua aplicação periosteal no momento da osteotomia.

A avaliação da consolidação óssea em modelos experimentais deve considerar que o tamanho radiográfico do calo não reflete, isoladamente, a qualidade do reparo. Em determinadas situações, calos maiores podem indicar atividade reparativa persistente ou atraso no remodelamento, enquanto calos menores, porém mais organizados histologicamente, podem representar maturação mais eficiente. Por isso, a análise radiográfica deve ser interpretada em conjunto com parâmetros histológicos e marcadores bioquímicos de remodelação da matriz óssea e cartilaginosa (Gorter et al., 2021; Schini et al., 2023).

Marcadores como CTX-I e CTX-II podem contribuir para a interpretação da dinâmica de degradação e remodelação da matriz extracelular durante a consolidação. O CTX-I está relacionado à degradação do colágeno tipo I, principal componente orgânico da matriz óssea, enquanto o CTX-II se relaciona à degradação do colágeno tipo II, associado à matriz cartilaginosa. Embora esses marcadores devam ser interpretados com cautela e sempre em associação a dados morfológicos, eles auxiliam na compreensão da atividade de remodelação óssea e da transição endocondral durante o reparo (Schini et al., 2023).

Entretanto, ainda são escassos os estudos que avaliam a aplicação periosteal única de filmes biodegradáveis contendo estradiol nanoencapsulado diretamente no foco de fratura osteoporótica. Diante disso, a utilização de um filme de alginato reticulado contendo nanocápsulas de estradiol aplicado diretamente sobre o foco de fratura pode representar uma estratégia local para modular a consolidação óssea em ambiente de deficiência estrogênica. A avaliação de diferentes concentrações permite investigar se existe resposta biológica dependente da dose e se a maturação do calo pode ser favorecida sem aumento indesejado de efeitos sistêmicos.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação periosteal de filmes de alginato reticulados com cloreto de cálcio, contendo ou não nanocápsulas de 17β -estradiol em diferentes concentrações, sobre a consolidação de fraturas femorais em ratas ooforectomizadas. A hipótese central é que o estrógeno nanoencapsulado, liberado localmente a partir do filme de alginato, favoreça a maturação histológica do calo ósseo e module a remodelação da matriz óssea e cartilaginosa. Além disso, espera-se que a liberação local e controlada do 17β -estradiol possa minimizar a exposição sistêmica ao hormônio e, conseqüentemente, reduzir a ocorrência de efeitos adversos associados à terapia estrogênica sistêmica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da aplicação periosteal de filmes de alginato reticulados com cloreto de cálcio, contendo ou não nanocápsulas de 17β -estradiol em diferentes concentrações, sobre a consolidação de fraturas femorais em ratas ooforectomizadas.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar radiograficamente o tamanho do calo ósseo aos 15 e 30 dias após a osteotomia femoral.
- Comparar a maturação histológica do calo ósseo entre os grupos experimentais por meio da escala conforme descrito por Huo et al. (1991).
- Avaliar os escores histológicos de inflamação e fibrose no foco de fratura aos 15 e 30 dias.
- Mensurar as concentrações séricas de CTX-I e CTX-II como marcadores de remodelação da matriz óssea e cartilaginosa durante o processo de consolidação.
- Investigar possíveis repercussões sistêmicas relacionadas à exposição ao estrógeno por meio da análise histológica uterina.
- Comparar as respostas obtidas entre as diferentes concentrações de 17β -estradiol nanoencapsulado incorporadas ao filme de alginato.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas a partir do projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG), sob o Processo SEI UEPG nº 25.000080612-8, intitulado "Dispositivo submuscular para ósseo com nanocápsulas hormonais para aceleração de consolidação de fraturas osteoporóticas".

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas brasileiras para o cuidado e uso de animais em ensino e pesquisa, respeitando os princípios éticos de redução, refinamento e bem-estar animal.

3.2 Local de realização do estudo

A obtenção das nanocápsulas de estrógeno e a confecção dos filmes de alginato foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os ensaios com animais, procedimentos cirúrgicos, eutanásias, coletas de amostras, exames radiográficos e processamento histológico foram conduzidos no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UEPG.

As análises bioquímicas e imunoenzimáticas foram realizadas a partir de amostras séricas obtidas no momento da eutanásia. As análises histológicas foram realizadas nos segmentos femorais contendo o foco de fratura e no tecido uterino.

3.3 Obtenção das nanocápsulas de estrógeno

As nanocápsulas poliméricas contendo 17β -estradiol foram obtidas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. Para isso, 100 mg de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) foram dissolvidos em 30 mL de acetona, contendo 0,077 g de Span® 80, 50 mg de 17β -estradiol e 0,33 g de triglicerídeos de cadeia média. A solução orgânica foi mantida sob agitação magnética por 10 minutos.

A fase aquosa foi preparada separadamente com 0,077 g de Tween® 80 dissolvidos em 53 mL de água destilada. Em seguida, a fase orgânica foi adicionada lentamente à fase aquosa, sob agitação magnética contínua a 40 °C. A nanoemulsão formada foi mantida sob agitação por mais 10 minutos. Posteriormente, o solvente

orgânico foi removido por evaporação sob pressão reduzida a 40 °C, resultando em uma suspensão concentrada de nanocápsulas, com volume final aproximado de 10 mL.

Foram obtidas nanocápsulas contendo 17 β -estradiol para incorporação aos filmes de alginato nas concentrações propostas.

3.4 Preparo e reticulação dos filmes de alginato

O preparo dos filmes foi realizado utilizando uma solução composta por 4,5 g de alginato e 12 g de glicerina, solubilizados em 300 mL de água destilada sob agitação constante até completa homogeneização. A glicerina foi utilizada como agente plastificante, com o objetivo de melhorar a maleabilidade e a manipulação dos filmes.

Após o preparo da solução filmogênica, foram vertidos 25 mL da solução em cada placa, totalizando 12 placas. Os filmes foram mantidos em condições controladas até secagem e formação da matriz polimérica.

Posteriormente, todos os filmes foram submetidos à reticulação com cloreto de cálcio, utilizando solução de cloreto de cálcio. A reticulação foi realizada com o objetivo de aumentar a estabilidade estrutural da matriz de alginato, reduzir sua solubilização imediata em meio biológico e permitir maior permanência do filme sobre o foco de fratura durante a fase inicial do reparo ósseo.

Foram confeccionados filmes de alginato reticulados com cloreto de cálcio sem nanocápsulas de estrógeno e filmes de alginato reticulados contendo nanocápsulas de 17 β -estradiol nas concentrações finais de 0,03%, 0,06% e 0,12%. Após a obtenção, os filmes foram cortados em fragmentos padronizados de 0,5 cm $\times$ 1,0 cm, dimensões definidas para permitir a cobertura do foco de osteotomia femoral e contato direto com a superfície periosteal.

Antes da implantação, os filmes foram esterilizados por exposição à luz ultravioleta por 10 minutos. Amostras representativas dos filmes foram submetidas a controle microbiológico em ágar sangue, com o objetivo de verificar possível contaminação bacteriana antes do uso experimental.

3.5 Modelo animal e grupos experimentais

Foram utilizadas 64 ratas da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, sexo feminino, com idade aproximada entre 2 e 3 meses e peso inicial aproximado de 250 g. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico, sob temperatura controlada de 22 ± 2 °C, ciclo claro/escuro de 12 horas e água e ração comercial *ad libitum* para roedores.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, compostos por 16 ratas cada. Em cada grupo, oito animais foram submetidos à eutanásia aos 15 dias e oito animais aos 30 dias após a osteotomia femoral.

Os grupos experimentais foram constituídos da seguinte forma: G1, filme de alginato reticulado com cloreto de cálcio, sem nanocápsulas de 17β -estradiol; G2, filme de alginato reticulado com cloreto de cálcio contendo nanocápsulas de 17β -estradiol na concentração de 0,03%; G3, filme de alginato reticulado com cloreto de cálcio contendo nanocápsulas de 17β -estradiol na concentração de 0,06%; e G4, filme de alginato reticulado com cloreto de cálcio contendo nanocápsulas de 17β -estradiol na concentração de 0,12%.

3.6 Técnica anestésica e analgesia

Para os procedimentos de ooforectomia bilateral e osteotomia femoral, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina na dose de 40 mg/kg e cloridrato de xilazina na dose de 5 mg/kg, administrados por via intraperitoneal.

A analgesia pós-operatória foi realizada com tramadol na dose de 12,5 mg/kg, administrado a cada 8 horas por via intraperitoneal, durante três dias. Não foram utilizados anti-inflamatórios não esteroidais, a fim de evitar interferência na resposta inflamatória fisiológica envolvida no processo de consolidação óssea e na avaliação da resposta local ao estrógeno.

Durante o período pós-operatório, os animais foram monitorados diariamente quanto ao comportamento, ingestão de água e alimento, mobilidade, aspecto da ferida operatória e sinais clínicos compatíveis com dor, estresse ou complicações cirúrgicas.

3.7 Ooforectomia bilateral

Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos a jejum hídrico por 2 horas e jejum alimentar por 4 horas. Após anestesia, foi realizada tricotomia bilateral dos flancos e antissepsia da região operatória.

A ooforectomia bilateral foi realizada por meio de incisões longitudinais de aproximadamente 0,5 cm em cada flanko. Após acesso à cavidade abdominal, os ovários foram identificados, exteriorizados e pinçados com pinça hemostática. A artéria ovariana foi ligada com fio absorvível de poliglactina 910 4-0, seguida da remoção das gônadas.

Após a retirada dos ovários, os planos musculares e a pele foram suturados com fio inabsorvível mononáilon 3-0, conforme técnica padronizada. Os animais permaneceram em observação até completa recuperação anestésica e foram acompanhados diariamente durante o período pós-operatório.

3.8 Osteotomia femoral

Decorridos 150 dias da ooforectomia bilateral, período estabelecido para o desenvolvimento do modelo de deficiência estrogênica prolongada, as ratas foram submetidas à osteotomia femoral direita.

Após anestesia, foi realizada tricotomia ampla do membro posterior direito e antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo. A abordagem cirúrgica consistiu em incisão longitudinal de aproximadamente 2 cm na face lateral da coxa direita, seguida de dissecação romba por planos e afastamento do músculo vasto lateral para exposição da diáfise femoral, com preservação das partes moles adjacentes.

A estabilização intramedular foi realizada previamente à osteotomia, por meio da introdução retrógrada de um fio de Kirschner de 1,0 mm de diâmetro, posicionado no canal medular para garantir alinhamento e estabilidade dos fragmentos ósseos.

Na sequência, foi realizada osteotomia transversa completa no terço médio da diáfise femoral, utilizando osteótomo de 5 mm. O procedimento foi executado de forma padronizada em todos os animais, com o objetivo de produzir uma fratura simples, reprodutível e estabilizada em ambiente de deficiência estrogênica.

3.9 Aplicação periosteal do filme de alginato contendo ou não estrógeno

Após a realização da osteotomia, o filme de alginato correspondente ao grupo experimental foi aplicado diretamente sobre o foco de fratura. Cada filme apresentava dimensões de 0,5 cm × 1,0 cm e foi posicionado em íntimo contato com a superfície óssea e com o tecido periosteal adjacente.

Nos animais do grupo controle, foi aplicado filme de alginato reticulado com cloreto de cálcio, sem nanocápsulas de 17 β -estradiol. Nos animais dos grupos tratados, foram aplicados filmes de alginato reticulados com cloreto de cálcio contendo nanocápsulas de 17 β -estradiol nas concentrações de 0,03%, 0,06% ou 0,12%, conforme a alocação experimental.

Após a implantação do filme, a fáscia muscular foi suturada com fio absorvível de poliglactina 910 2-0, e a pele foi suturada com mononáilon 3-0. Ao final do procedimento, os animais foram mantidos em ambiente aquecido até recuperação anestésica completa e, posteriormente, retornaram às gaiolas para acompanhamento pós-operatório.

3.10 Eutanásia e coleta de amostras

A eutanásia foi realizada em dois tempos experimentais: 15 e 30 dias após a osteotomia femoral. Em cada tempo, oito animais de cada grupo foram anestesiados conforme o protocolo descrito e submetidos à coleta de sangue por punção cardíaca.

Após a coleta sanguínea, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico. Foram coletados o tecido uterino e ambos os fêmures. O sangue foi utilizado para obtenção de soro e posterior realização das análises bioquímicas e imunoenzimáticas. Os fêmures foram destinados às avaliações radiográficas e histológicas. O tecido uterino foi coletado para avaliação de possíveis repercussões sistêmicas relacionadas à exposição ao estrógeno liberado a partir dos filmes implantados.

3.11 Avaliação radiográfica

As radiografias de ambos os fêmures foram obtidas utilizando o aparelho Lotus 630HF e visualizadas/exportadas pelo software VXvue 1.0.2.6pi (Viewworks Co. Ltd.). As imagens foram realizadas de forma padronizada, permitindo a avaliação do fêmur submetido à osteotomia e do fêmur contralateral.

As mensurações do calo ósseo foram realizadas no software ImageJ. O diâmetro do calo ósseo foi medido na região de maior formação óssea, considerando-se a distância de cortical a cortical nas apresentações anteroposterior e em perfil. A média das duas mensurações foi utilizada para estatística.

3.12 Análises bioquímicas e imunoenzimáticas

As amostras de sangue coletadas por punção cardíaca foram centrifugadas para obtenção do soro, que foi aliquotado e armazenado até a realização das análises laboratoriais.

Foram avaliados por meio de reações enzimáticas colorimétricas marcadores relacionados à função hepática e remodelação de matriz óssea e cartilaginosa. O perfil hepático incluiu aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama-glutamilttransferase e fosfatase alcalina.

A dinâmica de remodelação da matriz extracelular sistêmica foi avaliada por meio da quantificação sérica de CTX-I e CTX-II, utilizando kits comerciais de ensaio imunoenzimático (ELISA) de inibição competitiva (ELK2221 e ELK2671, respectivamente; ELK Biotechnology Co., Ltd., TX, USA). As análises foram conduzidas de acordo com as instruções do fabricante, com a determinação das concentrações (pg/mL). O CTX-I foi estabelecido como marcador analítico da degradação de colágeno tipo I, predominante na matriz óssea em reabsorção, enquanto o CTX-II atuou como indicador da degradação de colágeno tipo II, refletindo o turnover do molde cartilaginoso do processo de ossificação endocondral.

3.13 Análise histológica do calo ósseo

O segmento femoral fraturado, previamente limpo do tecido muscular adjacente, foi fixado em solução de formaldeído a 10%. Em seguida, os ossos foram submetidos à descalcificação em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%, com substituição semanal da solução durante aproximadamente dois meses.

Após a descalcificação, o segmento contendo a região da fratura foi incluído em parafina e seccionado longitudinalmente em cortes de 5 µm de espessura. Posteriormente, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina para avaliação morfológica do calo ósseo.

Após a seleção das lâminas, as seções histológicas foram fotografadas utilizando microscópio Olympus DP72 (Evident Corp., Shinjuku-ku, Tóquio, Japão), com auxílio do software T Capture.

As análises das amostras foram realizadas por meio da escala numérica proposta por Huo et al. (1991), de acordo com o estágio de consolidação observado em cada lâmina. Essa escala permite classificar a maturação do calo ósseo considerando a predominância de tecido fibroso, cartilaginoso, osteoide e tecido ósseo mineralizado. Adicionalmente, a intensidade da inflamação e da fibrose periosteal/peri-implante foi avaliada de forma semiquantitativa em escores de 0 a 4, adaptando critérios histopatológicos empregados na avaliação de biocompatibilidade de membranas e biomateriais implantáveis, conforme descrito por Lindner et al. (2022).

3.14 Análise histológica uterina

Após a eutanásia, os úteros foram coletados e fixados em solução de formaldeído a 10%. As amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina, incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo.

Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e avaliados em microscopia de luz. A análise uterina foi realizada com o objetivo de investigar possíveis efeitos sistêmicos relacionados à exposição ao estrógeno liberado a partir dos filmes implantados.

3.15 Cálculo amostral e análise estatística

O cálculo amostral foi realizado com base em dados prévios do grupo de pesquisa, utilizando o programa G*Power 3.1. Foi adotado poder estatístico mínimo de 80%, nível de significância de 5% e acréscimo de 10% ao número total de animais para compensar possíveis perdas experimentais.

A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, IBM Corp., Armonk, NY, USA), versão 20.0. Inicialmente, os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação entre os grupos experimentais em cada tempo de avaliação, foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para múltiplas comparações.

Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão. O nível de significância adotado foi de 5%, considerando-se diferença estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação radiográfica do tamanho do calo ósseo

A avaliação radiográfica do calo ósseo foi realizada aos 15 e 30 dias após a osteotomia femoral conforme tabela 1. Aos 15 dias, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Em contrapartida aos 30 dias, observou-se diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados com estrógeno.

Tabela 1. Avaliação radiográfica do calo ósseo (mm) aos 15 e 30 dias.

Grupo	D15	D30
G1	4,96 ± 1,04 ^a	6,75 ± 1,45 ^a
G2	5,40 ± 1,13 ^a	5,54 ± 1,15 ^b
G3	5,05 ± 0,98 ^a	5,47 ± 1,15 ^b
G4	5,24 ± 1,38 ^a	4,67 ± 0,75 ^b

Nota: valores expressos como média ± desvio-padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam $p < 0,05$ (Tukey). G1: controle; G2: 0,03%; G3: 0,06%; G4: 0,12%.

Dessa forma, o tratamento com filmes de alginato contendo nanocápsulas de 17 β -estradiol não promoveu aumento do tamanho radiográfico do calo ósseo. Aos 30 dias, os grupos tratados apresentaram menor dimensão radiográfica do calo em relação ao grupo controle.

4.2 Avaliação histológica do calo ósseo

Aos 15 dias, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto ao escore de maturação do calo ósseo pela escala de Huo et al. (1991). Os dados encontram-se nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Avaliação histológica do calo ósseo aos 15 dias.

Grupo	Maturação ¹	Inflamação ²	Fibrose ²
G1	4,86 ± 1,30 ^a	1,37 ± 0,36 ^{ab}	1,83 ± 0,34 ^a
G2	5,00 ± 1,50 ^a	1,20 ± 0,38 ^a	2,06 ± 0,52 ^{ab}
G3	4,45 ± 1,13 ^a	1,33 ± 0,32 ^{ab}	2,30 ± 0,53 ^{bc}
G4	4,38 ± 1,07 ^a	1,61 ± 0,48 ^b	2,38 ± 0,48 ^c

Nota: valores expressos como média ± desvio-padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam $p < 0,05$ (Tukey). ¹ Escala de Huo et al. (1991). ² Escala de Lindner et al. (2022), escores 0–4.

Embora não tenha havido diferença significativa na maturação histológica aos 15 dias, os escores de inflamação e fibrose apresentaram diferenças entre os grupos. O grupo tratado com 0,03% apresentou menor escore inflamatório em comparação ao

grupo tratado com 0,12%. Em relação à fibrose, os grupos tratados com 0,06% e 0,12% apresentaram maiores escores em comparação ao grupo controle.

Aos 30 dias, observou-se aumento significativo do escore de maturação histológica nos grupos tratados com 0,06% e 0,12% de 17 β -estradiol. Além disso, os escores de inflamação e fibrose não diferiram entre os grupos experimentais. Assim, os achados histológicos indicam que as concentrações de 0,06% e 0,12% de 17 β -estradiol favoreceram a maturação do calo ósseo aos 30 dias.

Tabela 3. Avaliação histológica do calo ósseo aos 30 dias.

Grupo	Maturação ¹	Inflamação ²	Fibrose ²
G1	4,19 $\pm$ 1,03 ^a	1,21 $\pm$ 0,56 ^a	2,09 $\pm$ 0,66 ^a
G2	5,00 $\pm$ 1,21 ^{ab}	1,37 $\pm$ 0,37 ^a	2,27 $\pm$ 0,57 ^a
G3	5,46 $\pm$ 0,94 ^b	1,41 $\pm$ 0,37 ^a	1,94 $\pm$ 0,61 ^a
G4	5,65 $\pm$ 1,41 ^b	1,44 $\pm$ 0,35 ^a	2,02 $\pm$ 0,76 ^a

Nota: valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam $p < 0,05$ (Tukey). ¹ Escala de Huo et al. (1991). ² Escala de Lindner et al. (2022), escores 0–4.

4.3 Avaliação sérica de CTX-II

A dosagem sérica de CTX-II apresentou diferença significativa entre os grupos aos 15 dias. Os grupos controle e 0,03% apresentaram valores expressos em pg/ml semelhantes, respectivamente 11057,34 $\pm$ 1045,45 e 11076,41 $\pm$ 427,84. Os grupos tratados com 0,06% e 0,12% apresentaram valores significativamente maiores, respectivamente 12333,58 $\pm$ 523,71 e 12282,70 $\pm$ 1117,13. Conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4. Avaliação sérica de CTX-I (pg/mL) e CTX-II (pg/mL) aos 15 e 30 dias.

Gru po	CTX-I D15	CTX-I D30	CTX-II D15	CTX-II D30
G1	16362,68 $\pm$ 763,13 ^a	15958,40 $\pm$ 622,76 ^{ab}	11057,34 $\pm$ 1045,45 ^a	10150,51 $\pm$ 622,05 ^a
G2	16578,44 $\pm$ 740,20 ^{ac}	16778,62 $\pm$ 1145,75 ^a	11076,41 $\pm$ 427,84 ^a	10458,00 $\pm$ 442,12 ^a
G3	14895,14 $\pm$ 840,75 ^b	15896,08 $\pm$ 142,91 ^{ab}	12333,58 $\pm$ 523,71 ^b	9539,73 $\pm$ 455,00 ^a
G4	15587,72 $\pm$ 472,18 ^{abc}	15149,44 $\pm$ 825,41 ^b	12282,70 $\pm$ 1117,13 ^b	10242,10 $\pm$ 706,88 ^a

Nota: valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam $p < 0,05$ (Tukey). G1: controle; G2: 0,03%; G3: 0,06%; G4: 0,12%.

4.4 Avaliação sérica de CTX-I

Aos 30 dias, o grupo tratado com 0,12% apresentou menor concentração sérica de CTX-I em comparação ao grupo 0,03%. Os valores foram de $15958,40 \pm 622,76$ no grupo controle, $16778,62 \pm 1145,75$ no grupo 0,03%, $15896,08 \pm 142,91$ no grupo 0,06% e $15149,44 \pm 825,41$ no grupo 0,12%.

Foram observadas diferenças pontuais nas concentrações séricas de CTX-I, com menor valor no grupo 0,06% aos 15 dias e no grupo 0,12% aos 30 dias em comparação ao grupo 0,03%.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a aplicação periosteal de filmes de alginato contendo nanocápsulas de 17 β -estradiol não promoveu aumento do tamanho radiográfico do calo ósseo. Aos 15 dias, não foram observadas diferenças entre os grupos, indicando que, nesse período inicial/intermediário da consolidação, o tratamento ainda não havia produzido alteração mensurável no volume radiográfico do calo. Aos 30 dias, entretanto, os grupos tratados com estrógeno apresentaram calos significativamente menores que o grupo controle. Em modelos de fratura, especialmente em ambiente osteoporótico, o reparo ósseo deve ser avaliado de forma integrada, considerando volume do calo, composição tecidual, mineralização, remodelamento e maturação histológica (Chen et al., 2016; Gorter et al., 2021).

A presença de maior calo radiográfico no grupo controle aos 30 dias não indica, obrigatoriamente, consolidação superior. Durante o reparo secundário de fraturas, o calo passa por fases sucessivas de formação fibrocartilaginosa, mineralização e remodelamento. Assim, a persistência de um calo mais volumoso em fase tardia pode refletir manutenção de tecido reparativo imaturo ou atraso no remodelamento, especialmente quando esse achado não é acompanhado por maior maturação histológica. Nesse sentido, a avaliação radiográfica do calo deve ser interpretada em conjunto com parâmetros histológicos e bioquímicos, uma vez que o volume do calo, isoladamente, não representa necessariamente melhor qualidade do reparo ósseo (Eastaugh-Waring et al., 2009; Gorter et al., 2021). No presente estudo, essa interpretação é reforçada pelo fato de que o grupo controle, embora tenha apresentado maior tamanho radiográfico do calo aos 30 dias, apresentou menor escore de maturação histológica em comparação aos grupos tratados com 0,06% e 0,12% de estrógeno. Estudos em modelos osteoporóticos demonstram que a deficiência estrogênica pode comprometer a qualidade do calo e atrasar a consolidação, tornando a avaliação histológica fundamental para interpretar adequadamente os achados radiográficos (Namkung-Matthai et al., 2001; Gorter et al., 2021).

Esses resultados diferem parcialmente do estudo prévio do nosso grupo, no qual a aplicação tópica de nanocápsulas de estrógeno na incisão cutânea aumentou o tamanho radiográfico do calo aos 15 dias e melhorou a maturação histológica aos 30 dias. No estudo anterior, a formulação foi aplicada topicamente sobre a pele

durante 14 dias, dependendo da difusão do fármaco até o foco de fratura. No presente estudo, por outro lado, o estrógeno nanoencapsulado foi incorporado a um filme de alginato reticulado e aplicado diretamente sobre o foco de osteotomia, em íntimo contato com a superfície periosteal. Essa diferença metodológica pode ter modificado a cinética de liberação e a disponibilidade local do fármaco, favorecendo mais a maturação do calo do que seu aumento volumétrico radiográfico (Berri et al., 2025).

Dessa forma, a interpretação mais adequada dos achados radiográficos é que o estrógeno nanoencapsulado não estimulou simplesmente a formação de um calo maior, mas pode ter favorecido um reparo mais eficiente, com menor persistência de calo exuberante aos 30 dias. Essa hipótese é sustentada pela associação entre menor tamanho radiográfico do calo e maior maturação histológica nos grupos tratados com 0,06% e 0,12%. Em estudos envolvendo osteoporose e fármacos moduladores do remodelamento ósseo, o volume do calo pode não acompanhar diretamente a qualidade do tecido formado, sendo necessário interpretar os achados radiográficos em conjunto com marcadores histológicos e bioquímicos (Gorter et al., 2021; Schini et al., 2023).

Na avaliação histológica, não foram observadas diferenças significativas no escore de maturação do calo ósseo aos 15 dias. Esse achado é compatível com a fase intermediária do reparo, na qual ainda predominam eventos de organização tecidual, resposta inflamatória, formação de matriz fibrocartilaginosa e início da ossificação endocondral. A literatura demonstra que a deficiência estrogênica interfere especialmente nas fases iniciais da consolidação, alterando a resposta inflamatória local, a formação periosteal e a evolução da matriz cartilaginosa, o que pode dificultar a observação de diferenças globais de maturação em momentos muito precoces (Beil et al., 2010; Haffner-Luntzer et al., 2017).

Apesar da ausência de diferença no escore de maturação aos 15 dias, foram observadas diferenças nos escores de inflamação e fibrose. O grupo tratado com 0,03% apresentou menor inflamação em comparação ao grupo tratado com 0,12%, enquanto os grupos tratados com 0,06% e 0,12% apresentaram maior fibrose em relação ao controle. Esses achados sugerem que as maiores concentrações de estrógeno nanoencapsulado podem ter induzido resposta tecidual inicial mais intensa no foco de fratura. A fase inflamatória é indispensável para o início do reparo ósseo, pois participa do recrutamento celular e da ativação de vias reparativas; entretanto, sua intensidade e duração precisam ser reguladas para permitir a adequada transição

para as fases condrogênica e osteogênica (Haffner-Luntzer et al., 2017; Weitzmann; Pacifici, 2006).

Aos 30 dias, os grupos tratados com 0,06% e 0,12% apresentaram escores de maturação histológica significativamente superiores ao grupo controle. O estrogênio exerce efeitos sobre osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células mesenquimais, modulando formação óssea, reabsorção, condrogênese e mineralização. Em modelo experimental, Beil et al. (2010) demonstraram que o tratamento com estrogênio melhorou a consolidação óssea, com aumento da formação cartilaginosa, mineralização do calo e espessura da neocortical.

A ausência de diferenças entre os grupos quanto à inflamação e fibrose aos 30 dias indica que as alterações observadas no período inicial foram transitórias. Esse comportamento é biologicamente relevante, pois sugere que a resposta tecidual inicial observada nas maiores concentrações não evoluiu para inflamação persistente ou fibrose tardia, mas foi acompanhada por maior maturação do calo. A consolidação adequada depende da transição coordenada entre inflamação, formação de tecido cartilaginoso, ossificação e remodelamento; quando essa sequência é desregulada, podem ocorrer atraso de consolidação e persistência de tecido imaturo no foco de fratura (Haffner-Luntzer et al., 2017; Gorter et al., 2021).

Os resultados histológicos deste estudo se alinham ao estudo anterior do grupo, no qual a formulação nanoencapsulada de estrógeno também promoveu melhor maturação histológica do calo aos 30 dias em ratas osteoporóticas. No presente trabalho, a aplicação periosteal única por meio de filme de alginato representa um avanço metodológico, pois posiciona o sistema de liberação diretamente no microambiente da fratura. Essa estratégia pode ter favorecido a ação local do estrógeno sobre células osteocondrogênicas e sobre o processo de remodelação do calo, reduzindo a dependência de aplicações repetidas e de difusão transcutânea (Berri et al., 2025; Sun; Tan, 2013).

O fato de a concentração de 0,03% não ter promovido diferença significativa de maturação histológica em relação ao controle sugere que essa dose pode ter sido insuficiente para produzir efeito robusto no modelo utilizado. Por outro lado, as concentrações de 0,06% e 0,12% apresentaram respostas mais consistentes, principalmente aos 30 dias. Essa resposta não foi estritamente linear em todos os parâmetros, o que é esperado em intervenções biológicas locais, nas quais a ação do fármaco depende da concentração, liberação, interação com o biomaterial, fase do

reparo e sensibilidade celular do microambiente de fratura (Gorter et al., 2021; Schini et al., 2023).

A interpretação dos marcadores CTX-II e CTX-I contribui para compreender a dinâmica da matriz extracelular durante a consolidação. O CTX-II está relacionado à degradação do colágeno tipo II, componente predominante da matriz cartilaginosa. Durante a ossificação endocondral, a cartilagem formada no calo inicial precisa ser progressivamente degradada, mineralizada e substituída por tecido ósseo. Assim, alterações de CTX-II podem refletir atividade de remodelação da matriz cartilaginosa durante as fases intermediárias da consolidação (Schini et al., 2023).

No presente estudo, os grupos tratados com 0,06% e 0,12% apresentaram aumento significativo de CTX-II aos 15 dias, enquanto o grupo 0,03% permaneceu semelhante ao controle. Esse resultado sugere que as maiores concentrações de estrógeno nanoencapsulado aumentaram a atividade de remodelação da matriz cartilaginosa na fase inicial/intermediária da consolidação. Essa interpretação é coerente com os efeitos descritos do estrogênio sobre a fase condral do reparo ósseo, incluindo regulação da atividade de condrócitos, formação cartilaginosa e mineralização subsequente do calo (Beil et al., 2010).

A elevação inicial de CTX-II nos grupos 0,06% e 0,12% também se relaciona com a maior maturação histológica observada nesses mesmos grupos aos 30 dias. Isso sugere que a maior atividade sobre a matriz cartilaginosa no período inicial pode ter favorecido a transição endocondral e a substituição da cartilagem por tecido ósseo mais maduro. Portanto, o aumento de CTX-II aos 15 dias não deve ser interpretado como simples degradação patológica de cartilagem, mas como possível indicador de remodelação ativa da matriz cartilaginosa dentro do processo fisiológico de consolidação óssea (Beil et al., 2010; Gorter et al., 2021).

A ausência de diferença no CTX-II aos 30 dias reforça a hipótese de que esse efeito foi transitório e relacionado à fase inicial/intermediária da consolidação. À medida que o calo progride para estágios mais maduros, a matriz cartilaginosa tende a reduzir sua participação relativa, e a remodelação passa a envolver predominantemente matriz óssea rica em colágeno tipo I. Essa sequência é compatível com a ossificação endocondral e com a observação de que os grupos 0,06% e 0,12% apresentaram maior escore de maturação histológica aos 30 dias (Beil et al., 2010; Schini et al., 2023).

O CTX-I, por sua vez, está associado à degradação do colágeno tipo I, principal componente orgânico da matriz óssea. Em estudos de metabolismo ósseo, é utilizado como marcador de reabsorção e turnover ósseo; entretanto, sua interpretação exige cautela, pois os níveis séricos podem refletir simultaneamente eventos locais do calo e alterações sistêmicas do metabolismo ósseo, especialmente em animais ooforectomizados (Schini et al., 2023).

Aos 15 dias, o grupo tratado com 0,06% apresentou menor concentração de CTX-I em relação ao controle, sugerindo menor degradação precoce da matriz óssea ou remodelação mais controlada do colágeno tipo I nesse período. O estrogênio é reconhecido por reduzir a atividade osteoclástica e modular a reabsorção óssea, o que oferece sustentação biológica para a redução de marcadores relacionados à degradação do colágeno tipo I em grupos expostos ao hormônio. Esse efeito pode ter contribuído para um microambiente mais favorável à organização do calo em fase subsequente (Weitzmann; Pacifici, 2006; Schini et al., 2023).

O grupo tratado com 0,12% apresentou valor intermediário de CTX-I aos 15 dias, sem diferença direta em relação ao controle, indicando que a resposta não foi linearmente dose-dependente nesse tempo experimental. Esse comportamento reforça que o reparo ósseo é um processo dinâmico, no qual formação, reabsorção e remodelamento ocorrem simultaneamente, mas em intensidades variáveis conforme a fase da consolidação. Assim, diferentes concentrações de estrógeno podem exercer efeitos distintos sobre matriz cartilaginosa e matriz óssea ao longo do tempo (Gorter et al., 2021; Schini et al., 2023).

Aos 30 dias, o grupo tratado com 0,12% apresentou menor CTX-I em comparação ao grupo 0,03%. Embora essa diferença não tenha sido demonstrada diretamente em relação ao controle, ela sugere que a maior concentração de estrógeno pode ter modulado a degradação do colágeno tipo I em fase mais tardia. Esse achado ganha maior relevância quando interpretado em conjunto com a histologia, pois o grupo 0,12% apresentou maior maturação do calo e menor tamanho radiográfico, sugerindo um reparo mais organizado e com menor persistência de calo volumoso e imaturo (Gorter et al., 2021; Schini et al., 2023).

De forma integrada, os resultados de CTX-II e CTX-I sugerem que as concentrações de 0,06% e 0,12% modularam diferentes etapas da consolidação. O aumento de CTX-II aos 15 dias indica maior atividade sobre a matriz cartilaginosa inicial, enquanto as alterações de CTX-I apontam para modulação da remodelação da

matriz óssea em momentos distintos. Essa sequência é compatível com o processo de ossificação endocondral, no qual a cartilagem inicial é substituída por tecido ósseo e posteriormente remodelada para formar um calo mais maduro (Beil et al., 2010; Schini et al., 2023).

Portanto, os resultados indicam que o estrógeno nanoencapsulado liberado localmente por filme de alginato reticulado melhorou a maturação do calo ósseo em ratas ooforectomizadas. O efeito foi mais consistente nas concentrações de 0,06% e 0,12%, enquanto a concentração de 0,03% apresentou resposta limitada. A principal contribuição do tratamento parece ter sido deslocar o reparo de um calo volumoso e menos maduro para um calo radiograficamente menor, porém histologicamente mais avançado. Esses achados ampliam os resultados prévios do grupo e sugerem que a aplicação periosteal única de estrógeno nanoencapsulado pode representar uma estratégia promissora para modular a consolidação óssea em ambiente de deficiência estrogênica (Berri et al., 2025; Gorter et al., 2021).

6 CONCLUSÃO

A aplicação periosteal de filmes de alginato reticulados com cloreto de cálcio contendo nanocápsulas de 17β -estradiol não aumentou o tamanho radiográfico do calo ósseo em ratas ooforectomizadas. Aos 30 dias, os grupos tratados apresentaram calos radiograficamente menores que o grupo controle.

Apesar do menor tamanho radiográfico do calo, os filmes contendo 17β -estradiol nas concentrações de 0,06% e 0,12% favoreceram maior maturação histológica do calo ósseo aos 30 dias, indicando melhora qualitativa do processo de consolidação.

As alterações observadas nos marcadores CTX-II e CTX-I sugerem que o tratamento modulou a remodelação da matriz cartilaginosa e óssea durante a consolidação, especialmente nas concentrações de 0,06% e 0,12%.

Dessa forma, conclui-se que o estrógeno nanoencapsulado, liberado localmente por filme de alginato aplicado diretamente sobre o foco de fratura, melhorou a maturação do calo ósseo em ambiente de deficiência estrogênica, sem que esse efeito estivesse associado ao aumento do volume radiográfico do calo.

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O estudo também não avaliou a curva de liberação do 17 β -estradiol a partir dos filmes de alginato nem a concentração local do hormônio no foco de fratura. Dessa forma, a interpretação do efeito biológico das diferentes concentrações foi realizada a partir dos desfechos radiográficos, histológicos e bioquímicos, sem mensuração direta da cinética de liberação ou da biodisponibilidade local do estradiol.

Os marcadores CTX-I e CTX-II foram mensurados em soro, o que limita a diferenciação entre eventos locais no foco de fratura e alterações sistêmicas do metabolismo ósseo. Embora esses marcadores auxiliem na interpretação da remodelação da matriz óssea e cartilaginosa, sua análise deve ser integrada aos achados histológicos e radiográficos.

Por fim, embora o modelo de ooforectomia seja amplamente utilizado para simular deficiência estrogênica, a confirmação direta da osteoporose por densitometria, microtomografia ou análise biomecânica prévia à osteotomia não foi incluída nesta etapa. Ainda assim, o período de 150 dias após a ooforectomia foi adotado para permitir a instalação de alterações ósseas compatíveis com hipoestrogenismo prolongado.

REFERÊNCIAS

- AMADEI, S. U.; SILVEIRA, V. A. S.; PEREIRA, A. C.; CARVALHO, Y. R.; ROCHA, R. F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.
- BEIL, F. T. et al. Effects of estrogen on fracture healing in mice. **Journal of Trauma**, Philadelphia, v. 69, n. 5, p. 1259-1265, 2010.
- BERRI, D.; MACHINSKI, E.; TRENTINI, C. A.; FARAGO, P. V.; KOGA, A. Y.; LIPINSKI, L. C. Topical application of estrogen nanocapsules on skin incision improves fracture healing in osteoporotic rats. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 1-7, 2025.
- CHEN, L. et al. Biomechanical characteristics of osteoporotic fracture healing in ovariectomized rats: a systematic review. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 4, e0153120, 2016.
- EASTAUGH-WARING, S. J.; JOSLIN, C. C.; HARDY, J. R. W.; CUNNINGHAM, J. L. Quantification of fracture healing from radiographs using the maximum callus index. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 467, n. 8, p. 1986-1991, 2009.
- GBD 2019 FRACTURE COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet Healthy Longevity**, London, v. 2, n. 9, p. e580-e592, 2021.
- GORTER, E. A.; REINDERS, C. R.; KRIJNEN, P.; APPELMAN-DIJKSTRA, N. M.; SCHIPPER, I. B. The effect of osteoporosis and its treatment on fracture healing: a systematic review of animal and clinical studies. **Bone Reports**, Amsterdam, v. 15, 101117, 2021.
- GUO, Y. et al. Remote-controllable bone-targeted delivery of estradiol for the treatment of ovariectomy-induced osteoporosis in rats. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 19, n. 1, 248, 2021.
- HAFFNER-LUNTZER, M. et al. The inflammatory phase of fracture healing is influenced by oestrogen status in mice. **European Journal of Medical Research**, London, v. 22, 23, 2017.
- HUO, M. H.; TROIANO, N. W.; PELKER, R. R.; GUNDBERG, C. M.; FRIEDLAENDER,

G. E. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. **Journal of Orthopaedic Research**, Hoboken, v. 9, n. 3, p. 383-390, 1991.

LINDNER, C. et al. In Vivo Biocompatibility Analysis of a Novel Barrier Membrane Based on Bovine Dermis-Derived Collagen for Guided Bone Regeneration.

Membranes, v. 12, n. 4, p. 378, 2022.

NAMKUNG-MATTHAI, H. et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. **Bone**, New York, v. 28, n. 1, p. 80-86, 2001.

SCHINI, M.; VILACA, T.; GOSSIEL, F.; SALAM, S.; EASTELL, R. Bone turnover markers: basic biology to clinical applications. **Endocrine Reviews**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 417-473, 2023.

SUN, J.; TAN, H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. **Materials**, **Basel**, v. 6, n. 4, p. 1285-1309, 2013.

WEITZMANN, M. N.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 116, n. 5, p. 1186-1194, 2006.

WEN, C.; XU, X.; ZHANG, Y.; XIA, J.; LIANG, Y.; XU, L. Bone targeting nanoparticles for the treatment of osteoporosis. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 19, p. 1363-1383, 2024.

ANEXO A: CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA

20/10/2026, 15:35

SEI/UEPG - 2844289 - Carta



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

CARTA

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo SEI UEPG: 25.000080612-8

Projeto de Pesquisa: DISPOSITIVO SUBMUSCULAR PARAÓSSEO COM NANOCÁPSULAS HORMONAIS PARA ACELERAÇÃO DE CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS OSTEOPORÓTICAS

Interessado: Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski

e-mail: lclopinski@uepg.br

Data de Entrada do Processo SEI na CEUA: 02/10/2025

Resultado: Aprovado

Vigência: 10/10/2025 à 10/10/2028

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 DISPOSITIVO SUBMUSCULAR PARAÓSSEO COM NANOCÁPSULAS HORMONAIS PARA ACELERAÇÃO DE CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS OSTEOPORÓTICAS supracitado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), estabelecida pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizado o uso de: número: 224 ratos Wistar, sendo 112 machos e 112 fêmeas, no Processo SEI Nº.: 25.000080612-8.

Obs.:

- O relatório final deverá ser encaminhado em até 60 dias após a conclusão do Processo SEI Nº.: 25.000080612-8.

Ponta Grossa, 23 de outubro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Abdallah da Rocha Oliveira, Vice-Coordenador(a) da Comissão de Ética no Uso de Animais/PROPESP**, em 23/10/2025, às 15:26, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.