
AUGUSTIN MALZAC

**Hidroxiapatita dopada pelo gálio para potencial uso
em ortopedia**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro - Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

CAMPO GRANDE

2008

AUGUSTIN MALZAC

**Hidroxiapatita dopada pelo gálio para potencial uso
em ortopedia**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro - Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Tecnologia e Saúde

Orientador: Prof. Dr. Petr Melnikov

CAMPO GRANDE

2008

Ficha catalográfica elaborada pela
Coordenadoria de Biblioteca Central/UFMS

M262h Malzac, Augustin
 Hidroxiapatita dopada pelo gálio para potencial uso em ortopedia /
Augustin Malzac. – Campo Grande, MS, 2008.
 93 f. ; 30 cm.

 Orientador: Petr Melnikov.
 Tese (doutorado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
 Faculdade de Medicina.

 1. Ossos – Cirurgia. 2. Hidroxiapatita. 3. Gálio. I. Melnikov, Petr.
II. Título.

CDD (22) 617.471
NLMC WE190

DEDICATÓRIA

À DEUS,

Pela fé e coragem dadas a mim em todo momento para
vencer este desafio.

Aos meus pais,

Augustin Maurice Malzac (in memorian) e

Maria Alice Leal Malzac,

Por toda educação e amor que recebi.

À minha esposa e companheira,

Francisca,

Pelo seu amor, suporte e estímulo.

Aos meus filhos,

João Paulo, Lucas e Carolina.

Minhas grandes realizações.

Aos meus alunos,

Todo meu esforço em transmitir meu sólido
Conhecimento.

Aos meus pacientes,

Ofereço sempre o melhor de minha atenção
médica.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Petr Melnikov, orientador e amigo sincero, sempre pronto a ajudar, atencioso, pelo seu espírito acadêmico, por sua contagiante capacidade investigativa, pelo seu imenso conhecimento técnico - científica e pesquisador com vasta experiência, minha grande admiração, respeito e gratidão.

Ao Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, pela oportunidade de cursar esta pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Arthur da Silveira Figueiredo, pelo apoio e estímulo para realização desta tese.

A Prof^a.Dr^a. Maria de Fátima Cepa Matos, pelo inestimável auxílio e orientação nos testes de toxicidade.

À Dr^a. Aby Jaine C. Montes Moura e Prof^a. Dr^a. Andréia C. M. B. Antonioli da Silva, pelas valiosas e oportunas sugestões no exame de qualificação.

Ao Prof. Mestre André Rainho Teixeira, pelo seu importante e valioso auxílio no laboratório de química e esclarecimentos nos métodos.

Ao Dr. Francisco José dos Santos, por sua valiosa ajuda na preparação e análise das imagens da microscopia eletrônica de varredura.

À Dra. Marlene de Barros Coelho, por sua valiosa colaboração na elaboração desta tese.

À secretária da pós-graduação, Sra. Vera Nascimento Silva, por sua paciência e atenção dispensada.

Ao médico Eduardo Sávio de Oliveira Mariúba, por sua prestimosa ajuda com os manuscritos.

Ao Sr. Evaldo de Souza Saraiva por sua valiosa colaboração no laboratório de química.

Aos professores, técnicos administrativos, residentes e acadêmicos da disciplina de Ortopedia e Traumatologia do Departamento de Clínica Cirúrgica, pela tolerância e paciência, enquanto precisei estar ausente para confecção desta tese.

RESUMO

MALZAC, A. Hidroxiapatita dopada pelo gálio para potencial uso em Ortopedia. Campo Grande, 2008. 89 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Um novo material que pode ser recomendado para enxerto e estimular crescimento ósseo em implantes tem sido obtido pela introdução de íons de gálio (acima 11.0 massa %) dentro da rede cristalina de hidroxiapatita. A dopagem foi conseguida utilizando nitrato de gálio e solução de galato de sódio. Em ambos os casos, os parâmetros da rede de hidroxiapatita dopado pelo gálio são idênticos aqueles de hidroxiapatita sintética pura. O gálio não substitui o cálcio como resultado da substituição heterovalente e conseqüentemente não produz distorção no arcabouço da matriz da hidroxiapatita. Ele permanece fortemente fixado na forma de solução sólida de intercalação. A inserção do gálio não causa nenhuma alteração na estrutura morfológica da hidroxiapatita e o produto desenvolvido segue critérios físico-químicos para o biomaterial a ser empregado na prática ortopédica e tratamento local das lesões traumáticas. Foi confirmado que a hidroxiapatita dopada pelo gálio não apresenta citotoxicidade. Sua futura utilização abre oportunidade para melhorar a osteossíntese e retenção de cálcio *in loco*.

ABSTRACT

MALZAC, A. Gallium dopped hydroxiapatite for potential use in orthopedics. Campo Grande, 2008. 89 p. Tese (Doutorado) – Universidade federal do Mato Grosso do Sul.

A novel material that may be recommended for grafts and implants stimulating bone growth has been obtained by introducing gallium ions (up 11.0 mass %) into crystalline lattice of hydroxiapatite. The doping was carried out using gallium nitrate and sodium gallate solutions. In both cases, lattice parameters of gallium doped hydroxiapatite are identical to those of pure synthetic hydroxiapatite. Gallium does not replace calcium as a result of heterovalent substitution and consequently produces no distortions in the framework of hydroxiapatite matrix. It remains strongly fixed in the form of solid solution of intercalation. Gallium insertion does not cause any morphological alterations in hydroxiapatite structure and the product developed meets physico-chemical criteria for biomaterial to be employed in orthopedic practice and local handling of traumatic injuries. It was confirmed that gallium dopped hydroxiapatite exhibits no citotoxicity. Its future usage opens the opportunity to enhance osteosynthesis and calcium retention *in loco*.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Parâmetros de rede de fluoroapatita em misturas contendo Al, Ga e In	31
TABELA 2 - Relação dos reagentes usados	37
TABELA 3 - Médias das leituras de absorbância e percentual de crescimento (sobrevivência) e morte (citotoxicidade) das células MDCK	69
TABELA 4 - Médias das leituras de absorbância e percentual de crescimento (sobrevivência) e morte (citotoxicidade) das células VERO	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Célula unitária da hidroxiapatita Estrutura da hidroxiapatita ao longo eixo c	13
FIGURA 2 -	Estrutura da hidroxiapatita ao longo eixo c	15
FIGURA 3 -	Espectro de raios-X de energia dispersiva da amostra obtida usando nitrato de gálio	55
FIGURA 4 -	Espectro de raios-X de energia dispersiva da amostra obtida usando galato de sódio	55
FIGURA 5 -	Difratograma de raios-X de HA dopada com gálio. Amostra obtida usando nitrato de gálio	57
FIGURA 6 -	Difratograma de raios-X de HA dopada com gálio. Amostra obtida usando galato de sódio	57
FIGURA 7 -	Difratograma de raio-X. “Cerca” correspondente a HA comercial	58
FIGURA 8 -	Curvas da análise termogravimétrica de HA dopada comparado com amostra comercial. I - Amostra usando nitrato de gálio. II - Amostra obtida usando galato de sódio. III - HA comercial tratada a 1000 °C	59
FIGURA 9 -	Curvas da Calorimetria exploratória diferencial de HA dopada comparado com amostra comercial. I - Amostra usando nitrato de gálio; II - Amostra obtida usando galato de sódio; III - HA comercial tratada a 1000 °C.	60
FIGURA 10 -	Curvas da análise termomecânica de HA dopada comparadas com a curva da amostra comercial. I - Amostra obtida usando nitrato de gálio; II - Amostra obtida usando galato de sódio; III - HA comercial tratada a 1000 °C.	62
FIGURA 11-	Imagem da MEV de HA/Ga obtida usando $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. Cristais agregados padronizados. Aumento X 4300	64
FIGURA 12 -	Imagem da MEV dos cristais de HA dopado usando $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. Aumento X 2500	65

FIGURA 13 - Imagem MEV de cristais de HA dopado usando galato de sódio.

Aumento X 3000

66

FIGURA 14 - Imagem MEV de HA em pó, amostra comercial. Aumento X 2500

67

LISTA DE ABREVIATURAS

Ga ⁶⁷	Gálio radioisótopo
Ga ⁷²	Gálio radioisótopo
HA	Hidroxiapatita
Å	Angstron
Rpm	Rotações por minuto
TCA	Trichloroacetic acid
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
K α	Comprimento de onda da radiação
µg	Micrograma
µm	Micrometro
mM	Milimol
KV	Kilovolt
KeV	Kilo electron volt
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid. (ácido etilenodiamino tetra-acético)
PBS	Phosphate Buffered Saline (tampão fosfato)
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
VERO	Linhagem de células epiteliais renais extraídas de macaco verde africano (ATCC-CCL-81)
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney Cells (ATCC-CCL-34)
SRB	Sulforodamina B
BMP	Proteína morfogenética do osso
ASTM	Sociedade americana para testes e materiais

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Hidroxiapatita e suas propriedades gerais	8
2.2. Uso da hidroxiapatita na ortopedia	16
2.3. Gálio e suas propriedades gerais	19
2.3.1. Propriedades do gálio	19
2.3.2. Gálio no osso humano	23
2.3.3. Gálio e hidroxiapatita	24
2.3.4. Gálio e as doenças ósseas	27
2.4. Introdução no gálio na fluoroapatita	30
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo geral	35
3.2. Objetivos específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Reagentes	37
4.2. Métodos Instrumentais	38
4.2.1. Análise de energia dispersiva (EDX)	38
4.2.2. Difratometria de raios-X (DRX)	39
4.2.3. Análise termogravimétrica (TGA)	40

4.2.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	41
4.2.5. Análise termomecânica	41
4.2.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	42
4.2.7. Testes de toxicidade	43
5. RESULTADOS	46
5.1. Técnica experimental elaborada	47
5.1.1. Síntese da hidroxiapatita	47
5.1.2. Síntese da hidroxiapatita com o gálio na forma do sal	48
5.1.3. Síntese da hidroxiapatita com o gálio na forma de galato de sódio	50
5.2. Identificação da hidroxiapatita dopada	54
5.2.1. Composição das amostras	54
5.2.2. Rede cristalina das amostras	56
5.2.3. Comportamento termogravimétrico	58
5.2.4. Efeitos térmicos durante o aquecimento	60
5.2.5. Comportamento termomecânico	61
5.2.5. Morfologia da hidroxiapatita dopada	63
5.2.6. Testes de toxicidade	68
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÕES	78
8. REFERÊNCIAS	80
9. APÊNDICE	

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Biomaterial compreende uma substância pura ou composta, de natureza sintética ou natural, que pode ser utilizada temporária ou definitivamente, com a finalidade de melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou totalmente, tecido ou órgãos. O critério para sua escolha é a similaridade química e física, que possui, em relação ao tecido a ser substituído ^[1].

As pesquisas para desenvolver um substituto ao osso humano, vêm da necessidade do uso de enxerto ósseo, para ajudar a promover a cicatrização das lesões esqueléticas, em tempo adequado. O enxerto de osso esponjoso autólogo oriundo da crista ílfaca permanece o padrão ouro, entretanto, o procedimento cirúrgico que consiste da sua retirada, pode trazer morbidade para o paciente, fazendo com que se busquem alternativas eficazes e menos agressivas para o sucesso do tratamento desejado ^[2].

Devido aos esforços de vários laboratórios e pesquisadores, têm-se acumulado evidências que levam a acreditar que o gálio tem participação direta e relevantemente na atividade osteometabólica ^[1-21]. Este elemento traço é amplamente utilizado na forma de isótopo radioativo Ga-67, em exame de cintilografia do esqueleto, exatamente por sua forte afinidade com o tecido ósseo ^[11]. Os íons de gálio são clinicamente eficazes contra a reabsorção óssea, para o tratamento da osteoporose e hipercalcemia associada à oncologia ^[6, 8, 10, 13, 15, 18-21].

A hidroxiapatita sintética é um fosfato de cálcio cristalino, osteocondutor, manufaturado por um processo de síntese. Estudos em animais sugerem que ela pode possuir alguma capacidade osteoindutora, entretanto, por causa de sua lenta reabsorção *in vivo*, não é usada isoladamente como um substituto ao enxerto ósseo osteocondutor ^[22], fato que levou a nossa pesquisa adiante, pela possibilidade de sua associação aos íons de gálio, criar um novo compósito, mais eficaz do ponto de vista biológico ^[3].

A interação entre o gálio e o osso tem sido mostrada por vários pesquisadores, especialmente nas últimas décadas ^[1-21]. Após administração de gálio radioisótopo (⁷²Ga) por via intravenosa, houve concentração no esqueleto, particularmente nas regiões de crescimento (zona hipertrófica da fise), nos sítios de remodelação óssea (fraturas) e em menor quantidade na superfície endosteal e periosteal ^[2, 11, 12, 16, 17].

Apesar de haver muito pouca informação sobre o mecanismo pelo qual o gálio age na célula óssea, alguns estudos mostram que inibe a atividade reabsortiva dos osteoclastos, sem alterar sua morfologia ou viabilidade e também sem causar citotoxicidade ^[20, 21].

Sabe-se que o gálio é adsorvido *in vitro* pela hidroxiapatita sintética (fase predominante de fosfato de cálcio no osso). Este mecanismo pode ocorrer diretamente de uma pequena quantidade de galato presente no plasma. Além disso, retarda sua cristalização e provavelmente sua dissolução. Este efeito é similar ao que é observado com os íons de metais trivalentes Al, Cr, Fe ^[22].

Os íons de gálio aumentam o conteúdo de cálcio e fósforo no osso, esse efeito é direto e não tóxico nos osteoclastos, em doses surpreendentemente baixas ^[23, 24]. Entretanto, até agora nenhum biomaterial contendo gálio para uso local em ortopedia está disponível ^[14]. Por outro lado, a hidroxiapatita (HA), oxofosfato de cálcio $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, é atualmente utilizada com sucesso, como substituto ao enxerto ósseo homólogo, nas correções do esqueleto em cirurgias ortopédicas e bucomaxilofacial, especialmente por sua forma porosa ^[25]. Associado ao osso autógeno ou a matriz óssea desmineralizada, este composto mostra a capacidade de osteoindução e osteocondução, que são propriedades biológicas fundamentais para formação de tecido ósseo novo ^[26, 27].

A dedução lógica que o gálio vai ocupar sítios específicos onde na hidroxiapatita natural estão localizados o ítrio e o cério e outros elementos de terras raras, assim como os elementos trivalentes comuns ^[28, 29], foi um dado adicional que colaborou para o planejamento desta pesquisa.

A idéia da presente investigação é que a intercalação direta de íons de gálio, dentro da rede cristalina de hidroxiapatita possa melhorar as propriedades biológicas para formação de osso. Outras drogas, como bifosfonatos, calcitonina e fluoreto, testados até agora, parecem não ter o efeito osteoindutor e osteoprotetor ^[30].

Deste modo, o presente estudo apresenta a obtenção de hidroxiapatita com íons de gálio, para emprego em cirurgia ortopédica, como alternativa viável ao enxerto ósseo autólogo.

Esta pesquisa foi realizada, em todas suas etapas, na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, em Campo Grande.

O planejamento da avaliação biológica do material estudado nesta pesquisa está de acordo com parte 5, das normas da Organização Internacional para Padronização (ISO 10993-1: 2003).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O termo substituto ao enxerto ósseo descreve um grande espectro de produtos que tem aplicação na regeneração do tecido ósseo. Infelizmente, existe pouca informação na literatura especializada ^[26].

No início do século 19, vários cirurgiões transplantaram osso com ocasional sucesso. Nesta época, Ollier publicou um grande volume de trabalhos experimentais, mas foi desencorajado porque o enxerto ósseo foi reabsorvido, por ter sido implantado sobre partes moles. O enxerto ósseo era claramente possível, mas não se tornou praticável até o advento da cirurgia anti-séptica. Macewen, que estudou sob orientação de Lister, estava fascinado com o fenômeno do crescimento ósseo, produziu alguns resultados espetaculares neste campo, mas foi seguido por poucos cirurgiões, com sucesso relativo ^[30].

Em 1911, a técnica de retirada de enxerto ósseo autólogo, tornou-se aceita, graças ao trabalho de Fred Albee de Nova York, que utilizou inicialmente osso cortical. A partir daí, Phemister, em 1931, escreveu seu artigo clássico, cuja técnica leva seu nome, utilizando enxerto de osso esponjoso, para tratamento de fraturas não consolidadas. O valor do osso esponjoso não foi amplamente apreciado até a Segunda Guerra Mundial, quando em 1944, Rainsford Mowlem mostrou a supremacia do enxerto com este tipo de osso, época que houve melhora importante dos sistemas de implante ósseo para fixação ^[30].

Em 1965, Marshall Urist identificou a formação óssea por auto-indução ou osteoindução, a partir daí, o conhecimento dos princípios da regeneração óssea

passava a abrir novas frentes de pesquisas e vários trabalhos tentaram mostrar cada passo deste difícil processo, que em algumas situações ocorria de maneira natural, em outras, simplesmente não havia sucesso. Vinte e três anos depois Wozney e Luyten descobriram a proteína responsável por este fenômeno, proteína morfogenética óssea (BMP), este foi o elo que faltava para o entendimento deste bem elaborado processo de neoformação óssea ^[30].

Albee foi também o primeiro a descrever o uso do fosfato de cálcio como alternativa ao osso humano, para enxertia, nos anos 20 do século passado, mas sem o conhecimento do metabolismo entre o material sintético (doador) e o osso humano vivo (receptor) ^[30].

O fosfato de cálcio é um osteocondutor, empregado como substituto ao enxerto ósseo, não possui a propriedade de osteoindução, a menos que seja adicionado algum fator de crescimento, BMP's ou outra substancia para criar um compósito. Ele aumenta a formação óssea especialmente por sua afinidade biológica, porosidade e características cristalinas, que permitem crescimento de osso novo pelos seus poros com baixa tensão de oxigênio, favorecendo desta forma a diferenciação celular dos osteoblastos ^[24].

2.1. Hidroxiapatita e suas propriedades gerais

O desenvolvimento do osso como suporte para tecidos moles tem uma longa história, durante a qual as vértebras começaram a endurecer com este mineral há aproximadamente 400 milhões de anos. Antes disso existiam colunas vertebrais completamente cartilaginosas, as quais ainda são observadas em tubarões ^[30]. No

homem, o esqueleto adulto contém aproximadamente 700g de fósforo na forma de fosfato de cálcio inorgânico ^[31].

O osso é uma estrutura formada por apatita, oxofosfato de cálcio e proteínas fibrinosas do colágeno, o que permitiu que o organismo obtivesse certas vantagens de locomoção e ao mesmo tempo uma reserva de cálcio e fósforo que permanecem em troca contínua ^[32].

A maior parte da informação a respeito da composição do osso foi obtida, paradoxalmente, pelos métodos usados em química e geologia, isto é, por meio de análise elementar e das descrições cristalográficas ^[33]. Isto levou à definição do osso em termos de rocha, conceito que com o desenvolvimento da biologia molecular está sendo seriamente modificado. Ainda assim, os dados químicos e cristalográficos continuam formando base para as pesquisas do osso real e dos materiais destinados para sua substituição na ortopedia ^[34].

A hidroxiapatita, que é o caso particular das apatitas em geral, é o principal constituinte mineral dos ossos e dos dentes; representa em média de 30 a 70% da massa óssea. No seu estado natural é precariamente cristalina. Os cristais têm formas de agulhas, bastonetes ou placas que medem aproximadamente 30 a 50 Å de largura e até 600 Å de comprimento ^[34]. Está presente em quantidades maiores no tecido jovem, recém-formado (40-50%) do que no osso de maior idade biológica, ou seja, modificado com amadurecimento do organismo (25-30%) ^[35].

O principal sólido do osso e do dente contendo Ca e P é uma hidroxiapatita com a fórmula estequiométrica $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, que às vezes, com base nas considerações

cristalográficas, é escrita também como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ^[36]. Frequentemente, o osso também é apresentado através do modelo do fosfato octacálcico com a fórmula $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ^[36]. Na hidroxiapatita de origem biológica, a proporção teórica Ca:P é 1,67, mas na realidade este valor é raramente mantido constante. Assim, as composições ainda estáveis podem ter esta razão reduzida até aproximadamente 1,5 e estendida até 1,72 ^[37].

A hidroxiapatita sintética é o biomaterial mais estudado, especialmente por suas propriedades de biocompatibilidade e osteointegração ^[22], que o torna um substituto ao osso humano, como enxerto em implantes. Além disso, possui a capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas, excelente condição de suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos ^[23].

A hidroxiapatita raramente ocorre na natureza em estado puro, possui estrutura similar a fluoroapatita, mineral que é constituinte de várias rochas ígneas e metamórficas, particularmente em calcários cristalinos. Ao invés de grupo OH^- os túneis de estrutura são ocupados pelos íons de fluoreto, F^- ^[28].

As hidroxiapatitas naturais podem conter uma pequena quantidade de íons trivalentes, representados pelos íons de terras raras. Seu conteúdo não excede 3% em massa, mas sua presença parece ter efeito estabilizador sobre a hidroxiapatita ^[29].

Como regra, a hidroxiapatita tratada a altas temperaturas tem cristalinidade mais pronunciada, devido a maior difusão de moléculas dentro da amostra e permite que o material amorfo existente no meio possa aderir aos cristais, fazendo-os crescer até alcançar tamanhos consideráveis ^[23]. Este processo geralmente é observado em

difratogramas de raios-X, nos quais as reflexões tornam-se mais agudos e de menor largura ^[33]. Em princípio, a hidroxiapatita de menor cristalinidade se aproxima mais daquela do osso, já que ela ainda possui certa atividade química nos cristais menos perfeitos ^[28].

A estrutura porosa da hidroxiapatita permite a osteocondução, aumentando sua similaridade com o osso esponjoso. Sabe-se que para haver formação do osteócito é necessário o mínimo de 100µm por poro, entretanto o tamanho ideal para crescimento ósseo é de 300-500µm; por outro lado, não ocorre crescimento ósseo em poro menor que 40µm ^[31]. Ainda dentro desta estrutura, é fundamental a interconexão entre os poros, para garantir a manutenção da pressão parcial de oxigênio, suficiente para diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos ^[35].

Os padrões de difração de raios-X de hidroxiapatita sintética e dos cristais ósseos são semelhantes. O tamanho dos cristais de hidroxiapatita, dependendo das condições de crescimento, pode variar dentro de um intervalo bastante amplo, alcançando as dimensões aproximadamente similares aos do osso ^[5].

Conforme os dados cristalográficos, a hidroxiapatita, como as outras apatitas, pertence ao sistema hexagonal, com o grupo espacial $P6_3m$. Os parâmetros da rede da célula unitária são $a = 9,42 \text{ \AA}$ e $c = 6,88 \text{ \AA}$. O parâmetro b , pela definição do sistema hexagonal, é igual ao parâmetro a . A célula unitária hexagonal da hidroxiapatita contém 10 íons de cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro no sítio I (Ca I) e seis no sítio II (Ca II). Os íons de cálcio no sítio I estão alinhados em colunas, enquanto os íons de cálcio do sítio II estão em triângulos equiláteros perpendiculares à direção c da

estrutura. Os cátions do sítio I estão coordenados a seis átomos de oxigênio, pertencentes a diferentes tetraedros PO_4 e também a três outros átomos de oxigênio, relativamente distantes. A existência de dois sítios de íons de cálcio traz consequências importantes, para as hidroxiapatitas que contêm impurezas catiônicas, pois suas propriedades estruturais podem ser afetadas dependendo do sítio ocupado pelo cátion da impureza ^[31].

O crescimento do osso ocorre de tal maneira que os seus cristais de hidroxiapatita orientam-se ao longo do eixo *c* da rede hexagonal. Isso ocorre no período da ossificação da cartilagem ^[32]. Na superfície do cristal, os íons são mantidos pelas cargas eletrostáticas. Apenas os íons com raios iônicos semelhantes aos dos elementos que compõem o cristal podem se fixar, tornando-se parte da rede cristalina. Naturalmente, os elementos como o estrôncio e o chumbo são capazes de ocupar as posições do cálcio da apatita. Outros íons, como o potássio e o magnésio, parecem estar apenas mantidos na superfície do cristal ^[33].

Os átomos de cálcio e fósforo formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino de mais alta simetria (eixo *c*). Os átomos de oxigênio dos íons de hidroxila estão situados a 0.9 Å abaixo do plano formado pelos triângulos de cálcio (figuras 1 e 2) ^[31].

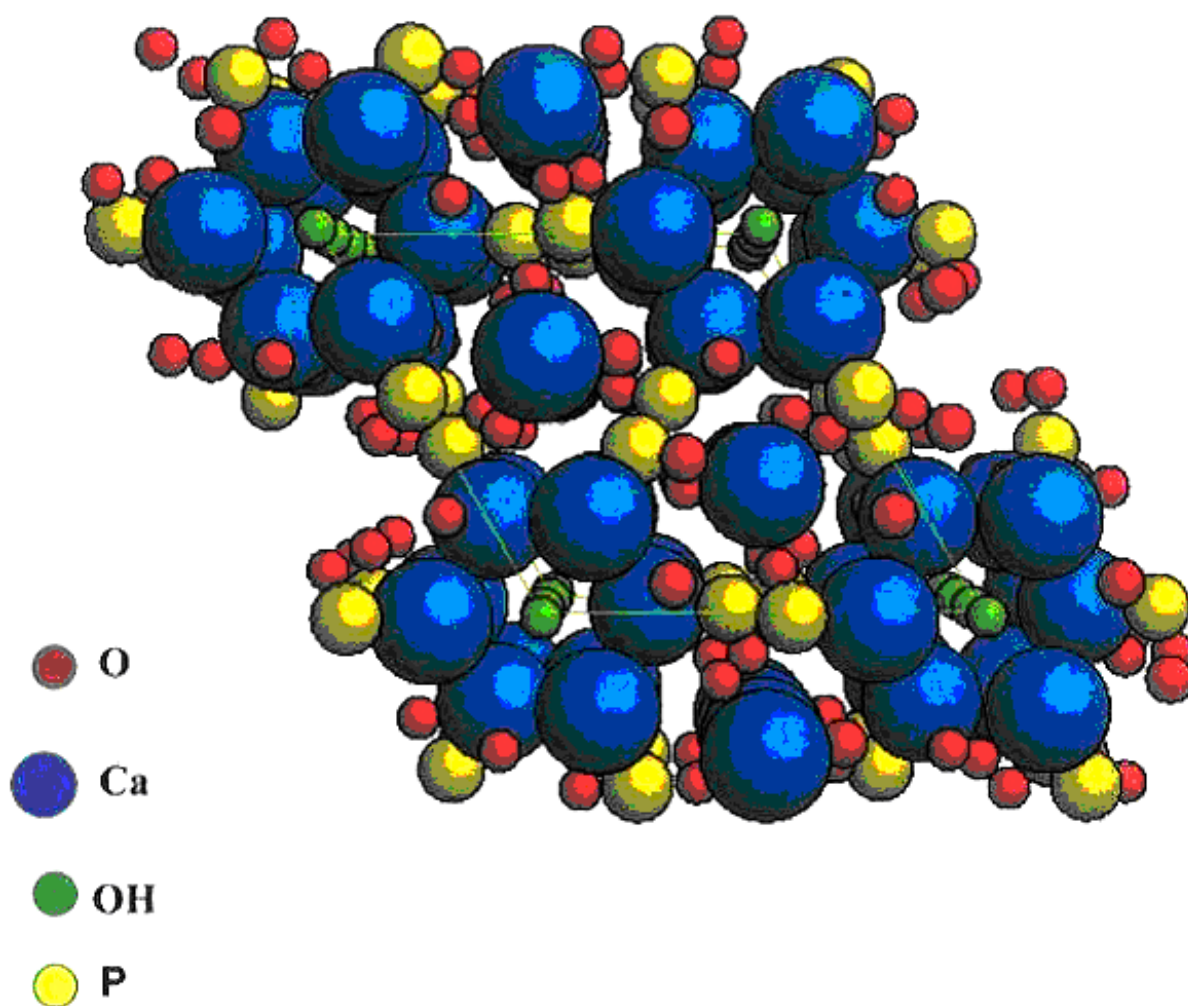


FIGURA 1 – Célula unitária da hidroxiapatita, vista perpendicular aos túneis (Kay et al, 1964)^[31]

A estrutura da hidroxiapatita facilmente permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas. Conforme supracitado, o cálcio na forma de íon Ca^{2+} pode ser substituído por outros metais, tais como: Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , etc.

Todas as substituições supramencionadas podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade do composto^[38].

Os metais bivalentes podem substituir o cálcio totalmente ou parcialmente. No caso da substituição parcial, a hidroxiapatita contém duas espécies bivalentes, as quais com igual probabilidade podem ocorrer tanto no sítio I quanto nos sítios tipo II. Em qualquer caso, a substituição parcial implicará na formação das soluções sólidas de substituição. Evidentemente, os parâmetros cristalinos a e c , serão intermediários, dependendo da proporção Ca:substituinte^[36].

As probabilidades da substituição não são limitadas apenas pela substituição catiônica ou aniônica (hidroxila, etc.) mencionadas. Existe ainda outro tipo de substituição aniônica que pode ocorrer nos tetraedros PO_4 . Nesta situação, os possíveis candidatos serão os elementos do mesmo quinto grupo da Tabela Periódica. A condição é sempre que a diferença entre raios iônicos do outro elemento e o fósforo não supere 15%, neste caso o vanádio pode ser possível candidato para formação de soluções sólidas tipo $\text{P}_x\text{O}_4 - \text{V}_{1-x}\text{O}_4$. A substituição levaria a formação de vanadatoapatita que realmente existe na natureza. As hidroxilas podem ser substituídas por haletos (fluoreto, cloreto, iodeto) e parcialmente por carbonato^[39].

O carbonatoapatita é citado em alguns estudos, já que a carga do íon de carbonato CO_3^{2-} , não possibilita que este grupo substitua os tetraedros de fósforo. Qualquer tentativa de substituição de fosfato por carbonato leva a destruição da matriz de hidroxiapatita e a formação de compostos pertencentes a outras famílias

cristalográficas, contudo, o carbonato pode ser intercalado nos túneis, levando às estruturas estáveis ^[40].

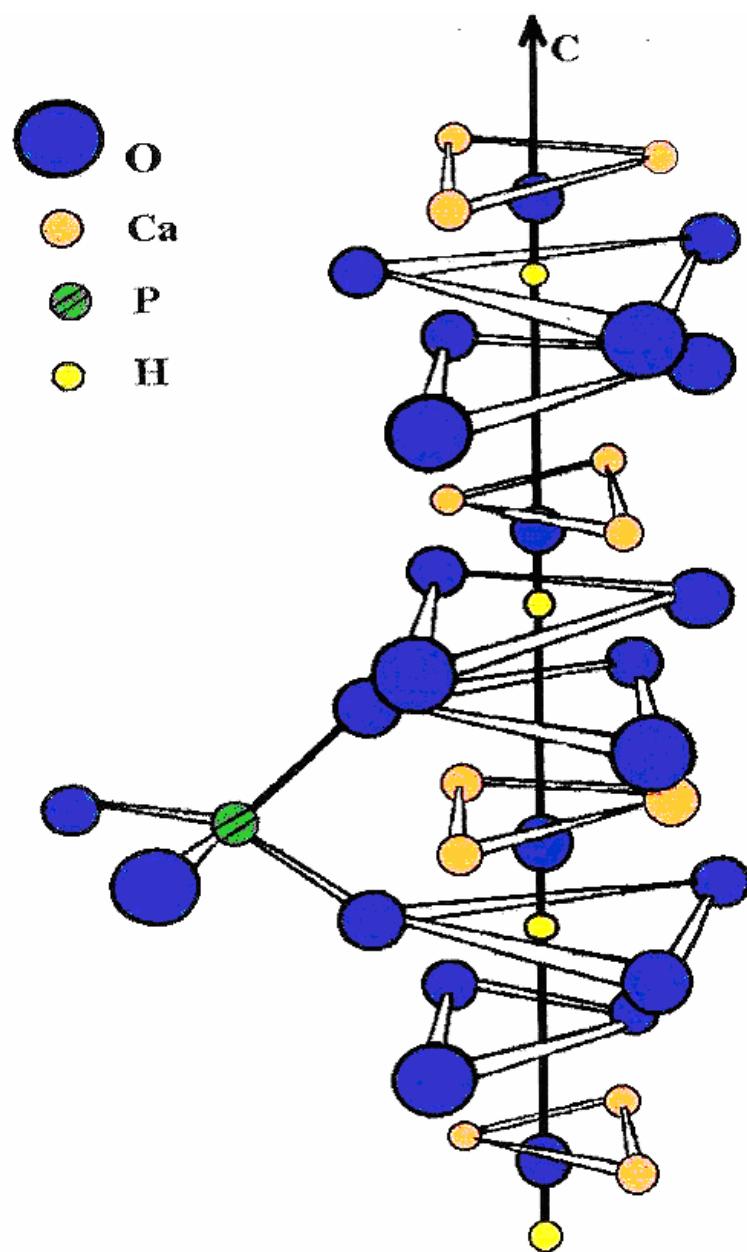


FIGURA 2 - Estrutura da hidroxiapatita ao longo eixo c (Elliot, 1994) ^[31]

2. 2. Uso de hidroxiapatita na ortopedia

O crescente interesse dos pesquisadores por um substituto ideal ao enxerto autólogo de osso esponjoso, ocorre especialmente pela grande quantidade de afecções do aparelho músculo-esquelético, que necessitam deste osso suplementar para êxito no seu tratamento ^[25]. Mais de 500.000 cirurgias de retirada de enxerto ósseo são realizadas anualmente nos EUA ^[26], como parte do tratamento ao trauma ortopédico, para acelerar a consolidação óssea, fusão vertebral, revisão de artroplastia total do quadril, tumores ósseos, implantodontia, etc.

O osso esponjoso autólogo da crista ilíaca continua sendo o padrão-ouro para enxertia, com eficácia comprovada. Todavia, este procedimento cirúrgico aumenta o tempo operatório da cirurgia principal, está associado a um maior sangramento, risco de infecção, dor na região doadora de enxerto, com atraso na reabilitação e até aumento do tempo de internação hospitalar. Além disso, pode haver outras limitações pela quantidade e qualidade de osso a ser enxertado, tal como se vê na osteoporose ou osteomalacia ^[22].

Uma das opções ao autoenxerto ou homoenxerto é o caso do aloenxerto, proveniente de outros indivíduos da mesma espécie, obtido de cadáveres, processado e armazenado em bancos de ossos, possui o risco de contaminação infecciosa, somado aos inerentes problemas imunológicos, sua eficiência é duvidosa, o que está documentado em estudo retrospectivo ^[35].

O xenoenxerto, proveniente de outra espécie, foi empregado em substituição ao osso autógeno, não é utilizado atualmente de maneira rotineira. Os enxertos

aloplásticos, são substâncias sintéticas fabricadas em laboratório, como é o caso da hidroxiapatita, cerâmicas de vidro bioativo, etc. ^[27].

O substituto ideal ao enxerto ósseo autólogo deve possuir um arcabouço para que ocorra vascularização e neoformação óssea dentro do transplante (osteocondução). Além disso, devem estar presentes os fatores de crescimento, que favorecem a mitogênese de células mesenquimais indiferenciadas (osteoindução) e a disponibilidade de células osteoprogenitoras para osteogênese, isto é, a geração de osso oriundo de células especializadas. Estas condições oferecem solução para o desafio da consolidação óssea ^[26].

A engenharia de tecido ou medicina regenerativa é um campo emergente de investigação multidisciplinar envolvendo biologia, medicina, engenharia, física e química. Pesquisas nessa área têm gerado conhecimento capaz de revolucionar o modo de como a abordagem terapêutica de diversos problemas de saúde relacionados com a restauração, manutenção e melhoria das funções de um órgão ou tecido vivo, melhora a qualidade de vida de milhões de pessoas pelo mundo ^[27].

As pesquisas têm levado ao desenvolvimento e obtenção de biomateriais, projetados para substituir partes do corpo e permitir a recuperação de funções biológicas afetadas por doenças ou acidentes. A biocompatibilidade é a aceitação do biomaterial pelo corpo humano, sem reação adversa e a biofuncionalidade representa a habilidade do material em desempenhar a função desejada ^[8].

Na engenharia de tecidos ósseos foram aplicadas especialmente a biocerâmica, materiais com arcabouço em compostos inorgânicos e polímeros, os quais incluem

hidroxiapatita coralina, carbonato de cálcio, ácidos polilático e poliglicólico, bem como copolímeros de ALP e AGP. Não há descrição de nenhum material que isoladamente possa satisfazer todos os critérios necessários para substituir o homoenxerto, no que se refere à resistência, dureza, baixa resposta inflamatória, degradação controlada, osteoindução, osteocondução e osteogênese [26, 32].

A hidroxiapatita foi escolhida para ser utilizada como alternativa ao enxerto ósseo autólogo, especialmente pelas suas características químicas e estruturais [22], sua afinidade com o osso vivo e biocompatibilidade [35]. É empregada também em ortopedia e como material de revestimento nas próteses metálicas para promover a ligação da interface estável entre o metal e o osso [31].

Não surpreende o fato que na busca dos materiais para enxerto, esse material, foi um dos primeiros a ser testado *in vitro*. A idéia, na realidade, era apresentar um enxerto autólogo 'seco' destinado a desempenhar ao mesmo tempo o papel de suporte mecânico e matéria prima para neoformação óssea [22].

No tratamento de tumores ósseos, a hidroxiapatita vem sendo empregada como suporte de ação prolongada. A introdução de drogas anticancerígenas em blocos de hidroxiapatita porosa permite que o tratamento da doença seja realizado com a liberação gradual da droga, *in situ*. Sob este aspecto essa técnica é atrativa, pois combina o tratamento do tumor com a substituição do osso doente [6, 10, 21].

Na área odontológica, a hidroxiapatita é utilizada como implante para preencher cavidades e promover a osteogênese, substituindo o tecido ósseo e garantindo o sucesso no campo da implantodontia, bem como nas correções de deformidades e

fraturas buco-maxilo-faciais. Pinos de titânio revestidos com hidroxiapatita são usados no implante para a substituição da raiz dentária e para facilitar a interação biológica na interface metal-osso ^[25].

A hidroxiapatita sintética é uma alternativa ao enxerto ósseo autólogo, com algumas deficiências, especialmente no que se refere a sua eficácia na fusão óssea. Deste modo, estudar suas falhas e melhorar sua estrutura cristalina pode torná-la mais interessante para o fim que se destina, ou seja, seu emprego no tratamento para a formação de osso novo ^[14].

2. 3. Gálio e suas propriedades gerais

2. 3.1. Propriedades do gálio

Gálio é um elemento metálico, líquido à temperatura maior que 29 °C, encontrado na forma de traços, na bauxita e em outros minerais. Foi descoberto em 1875 por Paul-Émile Lecoq de Boisbaudran, que assim o denominou em honra a França, cujo nome em latim era Gália ^[2]. É usado em tecnologia de semicondutores e como componente de várias ligas de baixo ponto de fusão ^[41].

O gálio existe principalmente no estado trivalente, o seu íon Ga^{3+} comporta-se como um ácido forte, ligando-se avidamente as bases de Lewis fortes, particularmente a hidroxila OH^- . O cátion $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ pode atuar como doador de próton dando $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})]^{2+}$, $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})]^+$, etc. Com o aumento gradual do pH esta desprotonação das espécies mononucleares leva à precipitação do hidróxido e maior

aumento do pH permitindo a formação de íon gallato $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$, conhecido também como tetrahidroxigallato ^[9].

Assim, há dois íons contendo gálio, adequados para os processos bioquímicos metabólicos: $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})]^{2+}$ no meio ácido fraco e $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ em soluções alcalinas de neutras a fracas. O primeiro pode ser encontrado e provavelmente absorvido no estômago e duodeno, enquanto que o último é absorvido exclusivamente no duodeno, devido ao bicarbonato presente ^[12].

O raio iônico do Ga (III) em coordenação tetraédrica é 61 pm e 76 pm em coordenação octaédrica. Logo, é esperado que seja um análogo do Fe(III) (69 pm) e Al(III) (67 pm), particularmente em combinação com fósforo. A afinidade do gálio para este elemento é tão alta que fosfatos de gálio estão entre os compostos mais estáveis ^[42].

O principal interesse clínico deriva da observação que propriedades metabólicas do gálio são similares àsquelas do ferro. Junto com raios iônicos comparáveis, ambos os elementos mostram quase a mesma capacidade de ligação com quelato e proteína. Os mais importantes carreadores do ferro, transferrina e lactoferrina, não distinguem gálio do ferro, portanto todo gálio no sangue está presente no plasma na forma de complexos com estas proteínas ^[4, 13].

Sob circunstâncias normais, cerca de um terço das cavidades de transferrina que ligam o ferro são preenchidas, então, um grande número de sítios não ocupados estão

disponíveis para ligação com o gálio; eles correspondem a 2.7 mg/ml Ga^{3+} , que é um valor considerável ^[43].

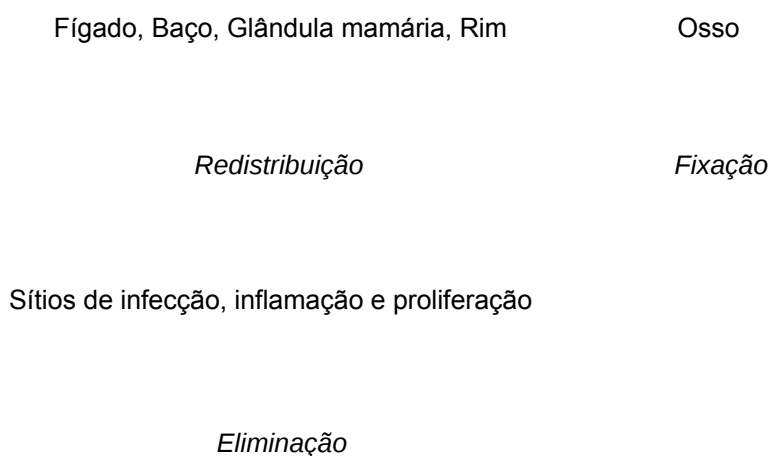
Lactoferrina apresenta maior afinidade com o gálio e pode ligar este elemento depois de ser removido do complexo com transferrina. Seu precursor, apolactoferrina (não contendo átomo metálico), que possui atividade antibacteriana, está concentrado em muitas secreções epiteliais como leite, fluido seminal, lágrima e secreção nasal ^[44]. Foi também observado que o gálio concentra-se em focos de inflamação e infecção, particularmente nos neutrófilos granulados e leucócitos polimorfonucleares ^[45].

Uma vasta literatura agora compartilha o conceito que o complexo ferro (gálio) - transferrina é internalizado pelo processo da endocitose, receptor-mediado. A oxiredutase da membrana plasmática reduz o ferro ligado à transferrina do estado de Fe^{3+} para Fe^{2+} , diretamente ou indiretamente facilitando a remoção do ferro da proteína. Como o gálio não existe no estado de valência 2^+ , ele não poderia seguir o caminho do ferro na célula. A única suposição concebível é a formação do íon pentahidroxioxigálio $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})]^{2+}$, que formalmente tem a mesma carga 2^+ , semelhante ao ferro bivalente, portanto poderia imitar a maneira de transporte e distribuição dos íons Fe^{2+} ^[42-45].

Os grupos incorporados para manter a coordenação octaédrica do gálio (H_2O , OH^-), em princípio, não representam impedimentos estruturais para sua capacidade reativa. Porém, quando se trata dos processos de redox celular, por exemplo, no caso da hemoglobina e citocromas, o gálio não entra no eritrócito nem participa do processo de transporte de oxigênio ^[46].

Uma vez dentro do citoplasma celular, o gálio parece estar ligado pelas ferritinas, grandes proteínas que apresentam uma variação específica em respeito aos tecidos, dependendo da combinação de suas subunidades. A maior parte da ferritina está concentrada nas células de Kupfer no fígado. Os agregados das moléculas de ferritina com o tempo formam clusters, os quais são degradados após terem sido fagocitados pelos lisossomos. O produto final deste processo, a hemosiderina, é um aglomerado amorfo de proteína desnaturada e lipídeos com intercalações do hidróxido de gálio e seus polímeros. Pouco é conhecido como o gálio é liberado da ferritina para ser usado. Em todo caso, o elemento aparentemente inativo armazenado em ferritina e hemosiderina está em equilíbrio com o gálio intercambiável, extracelular, circulando no plasma e ligado a moléculas carreadoras de baixo peso molecular [2, 6, 47].

A distribuição primária e secundária do gálio nos tecidos foi estudada usando isótopos ^{67}Ga e ^{72}Ga como marcadores radiativos [48]. Os resultados estão resumidos no seguinte esquema:



Apesar de que estes dados não são unânimes, todos os estudos da distribuição do gálio mostram que o elemento concentra-se no mesmo local do tecido independente da dose, em certa proporção é excretado na urina ou retido pelo osso [13, 17, 41].

Conforme supracitado, o gálio se acumula intensamente nos focos de infecção e inflamação, incluindo aqueles de origem granulomatosa e sinovites associadas com artrite reumatóide [4]. Foi mostrado que o elemento se concentra na maioria dos tumores onde o receptor da transferrina está expresso em grande quantidade [49].

2. 3.2. Gálio no osso humano

Mesmo que o osso seja conhecido como local de concentração do gálio, a cinética, o sítio e efeitos da acumulação do gálio neste tecido estão longe do entendimento prático [48].

O uso do microscópio de raios-X com radiação synchrotron permitiu mapear a distribuição dos níveis traços do gálio depois da curta aplicação *in vivo* de nitrato de gálio em ratos [50]. As quantidades traços (nanogramas) do gálio foram encontradas em regiões metabolicamente ativas, bem como na superfície endosteal e periosteal da diáfise, regiões onde ocorrem nova formação e remodelação óssea [11, 48]. As menores concentrações de gálio foram observadas nas áreas com número de células relativamente baixos, nas regiões médias corticais metabolicamente inativas [17].

A quantidade de gálio acumulada nos implantes ósseos após serem expostos a esse elemento *in vitro* foi muito maior do que os níveis atingidos depois da aplicação *in*

vivo ^[4, 5]. Assim poderia se pensar que a nova matriz óssea que está se formando tenha grande capacidade para acumular gálio ^[7].

Depois da aplicação em ratos por um curto período (14 dias), nitrato de gálio induziu mudanças quantitativamente mensuráveis nas propriedades minerais do osso. Usando a técnica de absorção atômica, foi confirmado que o gálio em baixas concentrações acumula-se preferencialmente nas regiões de formação ativa do osso, 0.54 µg/mg de osso na metáfise versus 0.21 µg/mg de osso na diáfise, com $p < 0.001$. Nos ossos dos animais do grupo controle o gálio não foi encontrado em quantidades detectáveis, mesmo quando a quantidade de osso usada foi dez vezes maior em comparação com as mais baixas doses de nitrato de gálio ^[10].

Recente estudo usando fluorescência de raios-X e sua emissão induzida pelos prótons confirmou estas observações, mostrando que o gálio está depositado em componentes orgânico e inorgânico da célula ^[50]. O acúmulo do elemento na matriz orgânica indica que o mecanismo de ação do gálio é provavelmente mais complexo do que sugerido pela idéia simplista de mera incorporação do íon dentro da rede cristalina ^[12].

2. 3.3. Gálio e hidroxiapatita

O osso contém uma grande população de células em contato íntimo com a matriz mineralizada. Há uma constante troca de compostos através deste tecido. O osso é uma estrutura viva, que está em permanente processo de adaptação funcional, isto é,

ele responde ao estímulo mecânico externo, que reduz ou aumenta sua massa, quando solicitado. ^[22].

O maior equívoco em relação ao osso é a idéia que ele é composto de hidroxiapatita estequiométrica, enquanto não há clara evidência de qual é a verdadeira estrutura do fosfato de cálcio presente no osso vivo ^[5]. Todavia, pesquisadores ainda dão preferência para o modelo apatita porque parece ser a mais adequada aproximação à realidade ^[39].

No que se refere ao uso do gálio, amplos estudos utilizando difração de raios-X mostraram que há significativas mudanças das propriedades dos cristais, na região metafisária do osso de ratos tratados ^[8, 33]. Estas mudanças, avaliadas pela agudização da reflexão 002 do eixo *c*, indicaram que um aumento no tamanho do cristal e/ou perfeição ao longo do mais extenso eixo dos cristalitos da hidroxiapatita tinha ocorrido em ossos tratados ^[31]. O fato que tais mudanças foram observadas nas regiões de formação ativa do osso, onde foram encontradas as maiores concentrações de gálio, faz supor que ele pode ser a causa das transformações observadas ^[50].

A presença do gálio nas regiões metafisárias foi identificada após injeção intravenosa, conforme as densidades ósseas e confirmadas em todas as suas partículas, tanto nas recém formadas (menos densas) quanto nas maduras (mais densas) houve a mesma exposição ^[7, 17].

Por outro lado, experimentos *in vitro* mostraram que o gálio atrasa a formação de HA e/ou aumento da cinética de modo dose relacionada, dando origem aos cristais de maior perfeição ^[24]. Nos experimentos de adsorção, o gálio diminuiu a cinética de

dissolução da HA comparado com grupo controle sem gálio ^[27]. O mecanismo avançado, ou seja, uma significativa adsorção do gálio no processo de formação e crescimento nos núcleos de HA, assim como na superfície dos seus cristais, acredita-se ser responsável pela influência do elemento na proliferação e solubilidade ^[51].

A relação entre gálio e fases contendo fosfato foi estudada incorporando o elemento dentro da medula óssea, na cultura de célula estroma dos ratos ^[10]. A fase dominante desta cultura está constituída de HA com baixa cristalinidade. Foi observado que a substituição do Ca^{2+} pelo Ga^{3+} produz um ambiente local mais distorcido em comparação com a situação quando o Ca^{2+} está substituído pelo Sr^{2+} ^[33]. Na coordenação dos átomos de gálio, na parte mineral da cultura celular, foi possível ao Ga^{3+} substituir o Ca^{2+} , na bruxita sintética Ga - dopada, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A substituição do Ca^{2+} destorce localmente a configuração tipo brushita, em razão ao raio iônico do gálio substancialmente menor. Esta substituição não permite que ocorra a transformação da fase depositada inicialmente em HA, inibindo o crescimento ^[52].

A suplementação de gálio nos últimos estágios de mineralização não influencia o ambiente local do gálio depositado e seus íons parecem estar frouxamente ligados à superfície dos cristais de HA ^[53].

Em conclusão, foi mostrado que o gálio atua como um inibidor na mineralização óssea *in vitro* ^[51]. Dois mecanismos diferentes de sua interação com a parte mineral óssea podem ser diferenciados: (1) substituição do Ca^{2+} e (2) incompatibilidade com a rede cristalina da apatita, com uma possível adsorção na superfície dos seus cristais. Estes dados também foram confirmados pela influência do gálio sobre o crescimento da

hidroxiapatita semeada ^[5, 27]. Estes resultados *in vitro* explicam parcialmente a ação do gálio *in vivo* no tratamento da hipercalcemia pela diminuição da solubilidade da apatita óssea ^[54].

2. 3.4. Gálio e as doenças ósseas

O gálio parece ser um agente que atua unicamente no tratamento de doenças reabsortivas do osso, reduzindo perda óssea acelerada em pacientes com câncer ^[17-21] e doença osteometabólica ^[54-57]. Tem ganho maior confiança, o conceito de se tomar certas medidas terapêuticas, coadjuvantes ao tratamento tradicional anticâncer, para fortalecimento do tecido ósseo frente à erosão metastática ^[19]. No resultado perfeito, tais medidas deveriam não só minimizar perda óssea progressiva, mas também restituir osso previamente desmineralizado. Outras drogas, tais como bifosfonatos, flúor e calcitonina, têm sido previamente propostas para este uso ^[58].

A situação clínica associada com a mais rápida perda de cálcio do tecido ósseo é a hipercalcemia relacionada com o câncer ^[18]. Nesta desordem, fatores procedentes das células cancerígenas provocam um marcante aumento da atividade osteoclástica, que leva a uma diminuição da massa óssea ^[20].

Foi mostrado que baixas doses de nitrato de gálio podem ser usadas com sucesso na prevenção de osteólise em mieloma múltiplo ^[21]. Pacientes foram tratados com nitrato de gálio por seis meses, administrados em ciclos mensais com injeções subcutâneas diárias, durante duas semanas, com uma suplementação de infusão intravenosa por cinco dias nos meses alternados. O cálcio plasmático total diminuiu em quatro dos sete pacientes observados, mas aumentou em nove dos treze pacientes

durante o tratamento com gálio ^[53]. Assim, os resultados não podem ser considerados satisfatórios.

O índice médio das fraturas vertebrais, no grupo avaliado nas radiografias em perfil da coluna, diminuiu 27% durante o tratamento com nitrato de gálio em humanos ^[2, 46]. Concluiu-se que o tratamento coadjuvante com nitrato de gálio diminuiu a velocidade de perda óssea em mieloma múltiplo e pode ser útil para amenizar as consequências da morbidade esquelética, em pacientes com osteólise relacionado com câncer ^[21]. Quanto ao mecanismo envolvido, parece que o nitrato de gálio impede a reabsorção óssea, inibindo a proteína relacionada com o hormônio da paratireóide ^[13].

A doença de Paget é um dos casos mais bem sucedidos de aplicação do gálio na terapia. Esta enfermidade também pode ser considerada como uma condição multifacetária da desordem osteometabólica ^[54]. Pode ser definida como remodelamento anormal do osso, como por exemplo, uma constante reciclagem ou renovação óssea, sem mudanças no tamanho e na forma do próprio osso ^[55, 56]. Alteração do processo de remodelação do osso muda a textura óssea e dá origem a quatro fases da doença observadas radiologicamente: osteolítica, mista, osteoblástica e fase osteoesclerótica inativa, a qual é caracterizada pela atividade óssea normal ou diminuída ^[57].

Na doença de Paget a alteração da remodelação contribui para expansão do osso, que na coluna vertebral pode levar a estenose espinhal. A ação do nitrato de gálio parece ser seguro e prolongado, mesmo que a duração da resposta varie de 6 a 42 semanas. O tratamento reduz significativamente os níveis séricos de fosfatase alcalina

e a excreção de hidroxiprolina urinária. Uma queda na hidroxiprolina precede a supressão de fosfatase alcalina, sugerindo que a supressão da reabsorção óssea osteoclástica (hidroxiprolina diminuída), leve a formação óssea pelos osteoblastos (fosfatase alcalina diminuída). A eficácia do tratamento é proporcional à dose da droga administrada. A resposta do tratamento endovenoso foi mais evidente do que a injeção subcutânea ^[56, 57].

A destruição óssea é a característica básica do mieloma múltiplo, 70% a 80% dos pacientes manifestam envolvimento ósseo ^[18]. Em séries com grande número de participantes, cerca de um a dois terços destes pacientes apresentaram dor óssea no momento do diagnóstico. Radiografias rotineiras do esqueleto mostram anormalidades em aproximadamente 80% deles, incluindo fraturas, osteopenia, lesões líticas ou uma combinação destas. O gálio atua controlando ou revertendo a osteólise provocado por esta doença e reduzindo hipercalcemia ^[21].

No estudo piloto randomizado envolvendo 14 pacientes com mieloma múltiplo, acompanhados até seis meses, o nitrato de gálio foi administrado por via subcutânea notando melhora na dor óssea e estabilizando a densidade óssea no grupo tratado. A interpretação destes resultados deve ser feita com certa reserva. Mesmo que o estudo fosse desenhado usando uma metodologia sofisticada e randomização, o número de pacientes nesta investigação foi pequeno. A outra dificuldade é que a investigação não foi placebo controlada, visto que foi considerado duvidoso se seis meses de injeções de placebo poderia ser justificado ^[58].

Também, em recente análise retrospectiva, pacientes com avançado mieloma múltiplo tratados com protocolo de quimioterapia M-2 mais nitrato de gálio, tinham acentuado aumento da média de sobrevida quando comparados com pacientes similares tratados com quimioterapia M-2 isoladamente ^[54].

Depois de uma série de mudanças nos direitos de propriedade comercial e um período em que a droga não foi disponível comercialmente, nitrato de gálio (Ganite, fabricada por Genta, Inc, Berkeley Heights, New Jersey) deve ser valiosa alternativa na opção de tratamento para uma variedade de doenças ósseas, já que o perfil tóxico do nitrato de gálio não conflita com o dos agentes existentes, sua avaliação merece ser feita em combinação com eles ^[46].

Devido aos esforços de muitos laboratórios e pesquisadores tem-se acumulado evidência que o gálio tem uma participação relevante no metabolismo ósseo ^[1]. Apesar do progresso considerado, são necessários novos estudos nesta área. Maior conhecimento dos mecanismos envolvidos pode fornecer idéias para estratégias terapêuticas, com o objetivo de diminuir perda óssea em ortopedia e traumatologia e condições patológicas relacionadas à oncologia. Também são esperados o desenvolvimento e triagem de testes clínicos dos novos compostos do gálio ^[9].

2. 4. Introdução do gálio na fluoroapatita

Está bem conhecido que a fluoroapatita natural pode conter até 3% de elementos trivalentes na forma dos íons de terras raras ^[38]. Dado que os raios iônicos de terras raras são maiores do que o raio iônico do alumínio, gálio e índio ^[28], supõe-se que estes elementos poderiam colocar-se nos sítios de terras raras ^[29].

O único trabalho que foi realizado na tentativa de introduzir os elementos trivalentes de pequenos raios foi feito com o intuito de substituir o cálcio na rede de fluoroapatita ^[59]. As sínteses foram feitas usando carbonato de cálcio, fluoreto de cálcio, monohidrogenofosfato de amônio e os óxidos correspondentes: Al_2O_3 , Ga_2O_3 e In_2O_3 . As misturas foram aquecidas em 900°C durante 25-30 horas, triturando-as várias vezes, durante o aquecimento. Os resultados da difratometria de raios-X das amostras dopadas estão resumidos na Tabela 1. Na primeira linha desta tabela estão dados os parâmetros da rede da fluoroapatita pura ^[59].

TABELA 1 - Parâmetros de rede de fluoroapatita em misturas contendo Al, Ga e In

Fases	a [Å]	c [Å]
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	9,37(1)	6,88(1)
$\text{Ca}_{9,5}\text{Al}_{0,33}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	9,39(1)	6,91(1)
$\text{Ca}_{9,25}\text{Al}_{0,5}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	9,36(1)	6,88(1)
$\text{Ca}_9\text{Al}_{0,66}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	9,35(1)	6,87(1)
$\text{Ca}_{9,5}\text{Ga}_{0,33}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	9,37(1)	6,89(1)
$\text{Ca}_{9,25}\text{Ga}_{0,5}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	9,37(1)	6,89(1)
$\text{Ca}_9\text{Ga}_{0,66}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	9,36(1)	6,88(1)
$\text{Ca}_{9,5}\text{In}_{0,33}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	9,37(1)	6,88(1)
$\text{Ca}_{9,25}\text{In}_{0,5}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	9,37(1)	6,88(1)
$\text{Ca}_9\text{In}_{0,66}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	9,34(1)	6,86(1)

Fonte: Manca SG, Urquiza N, Baran EJ. Über den Einbau von Al(III), Ga(III) und In(III) in das Calcium-Fluorapatit-Gitter. Z. Naturforsch. 1991; 46b:129-31.

A comparação destes parâmetros com os das amostras contendo cálcio, gálio e índio em quantidades entre 0,33 e 0,66 mol%, mostra que a diferença não supera 0,05Å, que é o limite da resolução do aparelho ^[60].

A conclusão é que os elementos trivalentes estão dentro da fluoroapatita, mas não substituindo cálcio. Caso contrário, *a* e *c* da rede cristalina seriam bem diferentes da fluoroapatita inicial.

A causa da impossibilidade de substituição direta do cálcio pode consistir em que as cargas do cálcio e os elementos trivalentes são diferentes ^[5]. A tentativa de colocar um elemento trivalente no sítio de bivalente acarretaria a presença de uma carga positiva adicional. Outra possibilidade seria a dificuldade de colocar um elemento trivalente com maior raio iônico, mas neste caso a distorção da rede manifestar-se-ia nos difratogramas de raios-X ^[61].

Não foi mencionada na literatura nenhuma referência à introdução do gálio na hidroxiapatita. A semelhança com a fluoroapatita é apenas aparente, já que a fluoroapatita é sintetizada pela reação na fase sólida. Isto quer dizer que o gálio introduzido na mistura inicial obrigatoriamente fica no produto final. Só que isto não significa que ele tenha se incorporado na fluoroapatita de modo fixo. Uma simples lavagem com água pode eliminar o gálio do produto aquecido a 900°C ^[62].

Contrariamente, a hidroxiapatita sempre é sintetizada por via úmida ^[24]. Os métodos de suas sínteses, descritos na literatura, têm a finalidade de se obter um produto com propriedades específicas, como por exemplo, maior cristalinidade ou tamanho de suas partículas. É evidente que devem ser melhoradas para lhes introduzir

elementos bioativos. Consequentemente, o gálio presente na solução ou entra na rede final, ou não. Caso entre, já não poderá ser eliminado pela lavagem do produto dopado^[63]. Esta é estratégia para obtenção deste compósito, o qual justifica o presente trabalho.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Preparação e estudo da hidroxiapatita dopada com gálio para potencial uso em cirurgia ortopédica.

3.2. Objetivos específicos

1. Elaborar um método viável e reprodutível para síntese de hidroxiapatita.
 2. Estudar as propriedades físico-químicas da hidroxiapatita dopada pelo gálio.
 3. Realizar os testes de toxicidade do biomaterial ativo.
-

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Na Tabela 2 estão representados os reagentes que foram utilizados para obtenção da hidroxiapatita, no processo de dopagem com o sal de gálio e gallato de sódio, bem como nos testes de toxicidade.

TABELA 2 – Relação dos reagentes usados

Reagente	Composição	Procedência	Pureza
Nitrato de cálcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cinética	99.0%
Fosfato de amônio	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Synth	98.0%
Óxido de gálio	Ga_2O_3	Gosreagent	99.9%
Nitrato de gálio hidratado	$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	99.9%
Solução de hidróxido de amônio	NH_4OH	Merck	99.0%
Hidróxido de sódio	NaOH	Merck	99.0%
Alizarina amarela	$\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_3\text{NaO}_5$	Vetec	Solução alcoólica, 1%
Álcool etílico	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Chemco	98.0%

TABELA 2 – RELAÇÃO DOS REAGENTES USADOS (continuação)

Reagente	Composição	Procedência	Pureza
Hidróxiapatita comercial	$\text{Ca}_5 (\text{PO}_4)_3 \text{OH}$	Sigma-Aldrich	grau reagente, batch # 07424MD
Cisplatina	$\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$	Sigma-Aldrich	99.0%
Ácido tricloroacético	Cl_3CCOOH	Sigma-Aldrich	99.0%
Sulforodamina	$\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_6\text{Na}$	Sigma-Aldrich	Cat. nº 86183
Ácido clorídrico	HCl	Sigma-Aldrich	99.9%
Tris	$(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$	Sigma-Aldrich	99.8%
EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	Gold Analisa	Cat. nº 330

4.2. Métodos instrumentais

4.2.1. Análise de energia dispersiva (EDX)

O princípio desta análise baseia-se na radiação produzida quando um feixe de elétrons que atinge a amostra, seus átomos são excitados e, ao voltarem para o estado fundamental, produzem radiação característica do átomo. A radiação é identificada conforme sua energia e contada pelo detector localizado dentro da câmara de vácuo.

Dessa forma, o conjunto hardware e software do sistema fazem à aquisição dos sinais e gera o espectro relativo ao número de contagens em função da energia, em keV, identificando, sem lugar a dúvida, os elementos químicos presentes na amostra. São identificáveis os átomos a partir do boro. Além dos espectros característicos, o sistema realiza análise de pontos, linhas e regiões definidas sobre a amostra. O conjunto dos dados permite gerar mapas da distribuição dos elementos (mapeamento) da imagem em estudo.

A análise de EDX foi realizada paralelamente à microscopia eletrônica por varredura, usando uma sonda acoplada ao mesmo equipamento, JEOL 6830 da MEV.

4.2.2. Difratometria de raios-X (DRX).

O princípio de difratometria de raios-X consiste em interação de dois feixes de raios-X coerentes, ou seja, procedentes de uma fonte, com a substância cristalina ^[64]. Devido à proximidade do comprimento de onda de raios-X e as distâncias interplanares (d) de um cristal, este último atua como grade de difração. Dependendo do ângulo de incidência, diferentes planos refletem os raios iniciais que já tem uma diferença de fase. Estes dois feixes refletidos permitem caracterizar a distância interplanar e como os planos são numerosos, o quadro total vai caracterizar a estrutura cristalina do composto. Não se trata da determinação de distâncias interatômicas e ângulos, mas somente do conjunto de intensidades e distâncias interplanares. Estes dados permitem computar os parâmetros da rede cristalina e identificar o composto através de base de dados que atualmente contém até 90.000 itens. Essa técnica é às vezes chamada de

difratometria de pó, já que não precisa de monocristais para o refinamento da estrutura, mas apenas o produto triturado.

A difratometria de raios-X possibilita a identificação dos produtos obtidos, assim como a verificação das fases cristalina e amorfa. Se os sistemas obtidos forem complexos como, por exemplo, soluções sólidas ou compostos mistos, a difratometria de raios-X aponta as fases individualmente, o que permite uma análise semi-quantitativa e qualitativa do processo de obtenção ^[64]. A partir do difratograma de raios-X, em alguns casos, podem ser calculados os parâmetros de rede dos compostos individuais. O equipamento usado para registro de difratogramas foi o Difratômetro Siemens Kristalloflex radiação de Cu, filtro de Ni, no intervalo 2θ 4-70°.

Para a indexação dos difratogramas e refinamento dos parâmetros cristalinos, foi usado o pacote de programas computacionais que se baseia na interpretação de imagens e no método dos mínimos quadrados (Diffrac, ACPAR, DHKL e outros).

4.2.3. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica avalia a variação da massa de uma amostra durante uma transformação em função da temperatura. Tal método permite tirar conclusões a respeito da estabilidade térmica da amostra, da composição e estabilidade de compostos intermediários e da composição do resíduo. Os dados obtidos experimentalmente são usados para avaliação de evaporação, sublimação, decomposição e outros processos. No nosso caso, a técnica foi utilizada para testar a estabilidade térmica da hidroxiapatita sintetizada. O equipamento que foi utilizado é o

instrumento marca Shimadzu modelo TGA-50, atmosfera de nitrogênio, velocidade de aquecimento 10 °C por minuto, a massa de amostra aproximadamente 5 mg. O intervalo de temperaturas entre 25 e 800 °C.

4.2.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Essa técnica consiste, basicamente, em medir o fluxo de calor diferencial entre a amostra em questão e uma referência termicamente inerte, por exemplo, Al_2O_3 , no intervalo de temperaturas estudado, podendo ser determinado o tipo de reação, exotérmica ou endotérmica, ocorrida na amostra durante o aquecimento. Pode ser considerada acessória da DTA nos casos de difíceis interpretações.

Para a análise das amostras vítreas, foi utilizado o equipamento Shimadzu DSC – 50, no intervalo de temperatura entre a temperatura ambiente e 390°C. As demais condições foram idênticas ao caso de TGA.

4.2.5. Análise Termomecânica (TMA)

A análise termomecânica baseia-se na determinação das deformações ocorridas em uma amostra quando submetida à carga constante não oscilatória, em função do tempo e da razão de aquecimento ou resfriamento.

Essa análise permite a determinação rápida das características intrínsecas da amostra, como por exemplo, a temperatura de transição vítrea (T_g), a temperatura de escoamento (T_m) e o coeficiente de expansão térmica linear.

O aparelho é composto basicamente por um compartimento de temperatura controlada onde é colocada a amostra, sendo esta ligada a um suporte de cargas e conectada a um transformador linear diferencial variável (LVDT), responsável por captar as deformações sofridas ao longo do ensaio.

Do ensaio TMA são obtidas curvas deformação x tempo x temperatura. O formato da curva, sua inclinação, pontos de máximo, mínimo e inflexões, dentre outros aspectos caracterizam cada material ensaiado. Variações na composição das amostras resultam em variações no formato da curva e no valor dos parâmetros obtidos.

Para a análise das amostras vítreas, foi utilizado o equipamento Shimadzu TMA – 50.

4.2.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000x) e resolução. As imagens possuem um caráter virtual, pois o que é visualizado no monitor do aparelho é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons, ao contrário da radiação de luz a qual estamos habitualmente acostumados. O princípio de funcionamento consiste na emissão de feixe de elétrons mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV. Essa variação de voltagem permite controlar a aceleração dos elétrons e, também, provoca o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo.

A MEV está destinada à análise morfológica do corpo sólido. Essa técnica, até certo grau, pode diferenciar as fases cristalinas das amorfas, bem como caracterizar o tamanho dos germes, dos cristalitos e de seus aglomerados. Nesse sentido, é fundamental na verificação da não homogeneidade do material, que pode passar despercebida na microscopia óptica. Também pode indicar a instabilidade das fases sob o feixe dos elétrons.

É preciso destacar que há necessidade de recobrimento por um material condutor, já que as amostras com amolecimento ou temperatura de fusão relativamente baixas podem sofrer transformações devido à exposição ao feixe de elétrons. Nesse caso, poderiam surgir efeitos artificiais que dificultam a interpretação das imagens.

As micrografias foram obtidas utilizando um equipamento JEOL 6830.

4.2.7. Testes de toxicidade

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso clínico, depois de comprovada sua não toxicidade, o estudo pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório^[65, 66].

Foram realizados experimentos com duas linhagens de células normais, de rim de cachorro, MDCK, (ATCC-CCL- 34) e de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), VERO, (ATCC-CCL-81), adquiridas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo - SP.

A inibição do crescimento celular é um indicador da toxicidade causada pelos compostos avaliados. O teste de citotoxicidade adotado nesta pesquisa, baseia-se na

coloração das proteínas, pelo corante sulforrodamina B (SRB), de cor rósea brilhante, com dois grupos sulfônicos que se ligam às proteínas das células fixadas na placa, precipitadas pelo ácido tricloro-acético (TCA) ^[66].

Ambas as linhagens das células foram cultivadas em frascos estéreis contendo meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) com 10% de soro fetal bovino, 100U/ml de penicilina, 0,1mg/ml de estreptomicina e 0,25µg/ml de anfotericina B. Mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Como estas células são aderentes, foi necessário fazer a sua remoção com a solução de tripsina (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS (Phosphate buffered saline), pH 7,4. Em seguida, foram transferidas para tubos cônicos, centrifugadas (1000 rpm) durante 4 minutos, logo após o meio e a tripsina foram desprezados. A contagem dessas células, em uma câmara de Neubauer, ocorreu de maneira que em cada cavidade fosse depositado um volume de 100 µl da suspensão de células em cada cavidade da placa de 96 cavidades, contendo para a linhagem MDCK 5.000 células por cavidade (50.000/ml) e para a linhagem VERO 10.000 células por cavidade (100.000/ml).

Após 20 horas, para permitir a fixação das células semeadas, o meio foi aspirado para a adição dos compostos – testes, C-7 (hidroxiapatita dopada com o sal de gálio) e C-10 (hidroxiapatita dopada usando galato de sódio) e do controle positivo, dissolvidos previamente em meio de cultura (DMEM).

No controle negativo, as células cresceram na ausência de qualquer composto-teste. O controle positivo utilizado foi cisplatina (cis-diclorodiamino-platina). Os compostos-testes C-7 e C-10 foram utilizados em três concentrações 50, 500 e 5000

µg/ml e o controle positivo em duas 2,5 e 5,0 µg/ml. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Todas as placas foram mantidas na incubadora a 37°C por 48 horas, após este período de exposição das células aos compostos – testes, o meio foi removido e substituído por 100 µl de TCA a 20%. As placas foram incubadas por meia hora, a 4°C em geladeira. Posteriormente, a solução TCA foi removida e as placas lavadas cinco vezes com água destilada. Adicionou-se 50 µl de sulforrodamina B 0,1% (diluída em ácido acético 1%) e novamente incubadas por mais meia hora em temperatura ambiente. Após a remoção da solução de SRB, as placas foram lavadas quatro vezes com ácido acético a 1%, secas e logo foram adicionados 10 mM da solução tampão (Tris Base). Em seguida, foram submetidas à agitação por 10 minutos para a dissolução das proteínas coradas. A absorbância foi medida a um comprimento de onda 540 nm, usando leitor de microplacas.

A absorbância encontrada para o controle negativo, correspondeu ao valor de 100% de sobrevivência (% de crescimento). O parâmetro para a citotoxicidade utilizado foi o percentual de morte (% morte), determinada pelas médias dos valores da leitura ótica (absorbância) a 540 nm, entre o controle negativo (sem tratamento) e os compostos-testes ou controle positivo (com tratamento).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Técnica experimental elaborada

5.1.1. Síntese da hidroxiapatita

O método químico úmido descrito abaixo, foi elaborado neste trabalho, especialmente para a síntese da hidroxiapatita pura de baixa cristalinidade. Essa técnica posteriormente foi modificada para se obter as amostras dopadas com gálio. A síntese incluiu as seguintes etapas:

(1) *Em 100 ml de água destilada foram dissolvidos 41,37 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (solução I). Em 75 ml de água destilada foram dissolvidos 9,90 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (solução II).*

(2) *Após misturar as soluções I e II formou-se uma massa branca coloidal (produto III), à qual foi adicionado hidróxido de amônio até pH entre 10 e 11. A solução de NH_4OH gotejava-se de uma bureta; no total foram consumidas aproximadamente 4 ml.*

(3) *O produto (III) assim tratado foi aquecido sob agitação durante 2 horas a 40°C; a seguir se deixou em repouso durante 20 horas para permitir uma melhor cristalização. O precipitado cristalino acumulou-se no fundo deixando um sobrenadante límpido.*

(4) *A solução foi novamente aquecida sob agitação a 95°C durante 3 horas.*

(5) O precipitado foi separado por filtração no funil á vácuo e lavado cinco vezes com água destilada no próprio funil. Para garantir uma precipitação completa, adicionou-se NH_4OH ao filtrado. Não foi observada a formação de fosfatos de cálcio, confirmando que este tinha-se consumido na formação do composto.

(6) O funil com o precipitado foi colocado em um dessecador que continha aproximadamente 20 ml de nitrogênio líquido, para evitar a reação com CO_2 do ar formando carbonatoapatita.

(7) Após 24 horas no dessecador, foi introduzida uma cápsula com P_2O_5 para desidratar o produto. Após outras 24 horas a cápsula foi trocada por uma contendo P_2O_5 fresco para completar a secagem a temperatura ambiente.

(8) Finalmente, o produto deixou-se secar em uma estufa a 60°C até massa constante.

(9) Quando necessitado de um produto tratado a alta temperatura, este foi aquecido à temperatura de 1100°C durante 3 horas.

5.1.2. Síntese da hidroxiapatita com o gálio na forma do sal

Nesta experiência, o sal de gálio foi utilizado para se obter hidroxiapatita dopada com este elemento. Não obstante a intenção de introduzir o gálio, não foi especialmente na forma de nitrato, mas na forma de qualquer sal contendo o íon Ga^{3+} e supondo que este íon atue junto com íon NH_4^+ na formação da dupla $\text{Ga}^{3+} + \text{NH}_4^+$, capaz de substituir

2Ca^{2+} . Assim, o íon de nitrato não participaria nas reações ficando primeiramente em solução e logo sendo eliminado em águas de lavagem da hidroxiapatita. De modo que para o procedimento poderia ser usado, por exemplo, sulfato $\text{Ga}_2(\text{SO}_4)_3$ ou cloreto GaCl_3 .

Síntese da hidroxiapatita com o gálio na forma do sal incluiu as seguintes etapas:

(1) Em 100 ml de água destilada foram dissolvidos 41,37 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (solução I). Em 50 ml de água destilada foram dissolvidos 0,26 g de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (solução II). Em 75 ml de água destilada foram dissolvidos 9,90 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (solução III). Previamente foi estabelecido que o coeficiente x do hidrato $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, corresponde a ~ 6 .

(2) Misturam-se as soluções I e II obtendo um volume de 100 ml (solução IV).

(3) Misturam-se as soluções III e IV rapidamente formando imediatamente uma massa volumosa coloidal (V).

(4) À massa branca coloidal (V) foi adicionado hidróxido de amônio até pH entre 10 - 11. A solução de NH_4OH gotejava-se de uma bureta; no total foram consumidas aproximadamente 4 ml.

(5) O produto V tratado com NH_4OH foi aquecido sob agitação durante 2 horas a 40°C ; logo se deixou em repouso durante 20 horas para permitir uma melhor cristalização. O precipitado cristalino acumulou-se no fundo deixando um sobrenadante límpido.

(6) A solução foi novamente aquecida sob agitação a 95°C durante 3 horas.

(7) O precipitado foi separado por filtração no funil á vácuo e lavado cinco vezes no próprio funil. Para garantir uma precipitação completa, adicionou-se NH_4OH ao filtrado. Não foi observada a formação de fosfatos de cálcio, confirmando que este tinha-se consumido inteiramente no composto.

(8) O funil com o precipitado foi colocado em um dessecador que continha aproximadamente 20 ml de nitrogênio líquido, para evitar o contato com CO_2 do ar que poderia levar a formação carbonatoapatita.

(9) Após 24 horas no dessecador foi introduzida uma cápsula com P_2O_5 para desidratar o produto. Após outras 24 horas a cápsula foi trocada por uma contendo P_2O_5 fresco para completar a secagem a temperatura ambiente.

(10) Finalmente o produto deixou-se secar em uma estufa a 60°C até massa constante.

(11) Quando necessitado de um produto tratado a alta temperatura, este foi aquecido à temperatura de 1100 °C durante 3 horas.

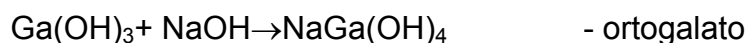
5.1.3. Síntese da hidroxiapatita com o gálio na forma de galato de sódio

No procedimento descrito abaixo foi o galato de sódio o reagente utilizado para se obter hidroxiapatita dopada. Este foi obtido usando uma metodologia especialmente elaborada.

Obtenção do galato de sódio:

2,69 g do óxido de gálio, Ga_2O_3 , foram dissolvidos em ácido clorídrico concentrado sob agitação e aquecimento. O processo é lento e demora 2-3 horas, assim que o ácido clorídrico deve ser constantemente adicionado a medida de sua evaporação. A solução obtida foi diluída com água na proporção 1:3. Ao adicionar hidróxido de amônio precipitou o hidróxido de gálio $Ga(OH)_3$. Este foi lavado cinco vezes por decantação. É importante que o hidróxido de gálio não envelheça, pois ao fim de duas horas (ou até antes) ocorrem processos de desidratação e polimerização que bloqueiam os grupos OH^- e o composto fica não reativo.

Logo, à suspensão de $Ga(OH)_3$ gota a gota foi adicionada a solução de $NaOH$ a 20%, até o hidróxido de gálio se dissolva formando galato de sódio:



A adição de $NaOH$ em grande excesso é indesejável, pois este iria lixiviar silício do vidro de Becker, formando ortosilicato. Nestas condições, a espécie que fica na solução é o ortogalato de sódio.

Assim, foi obtida a solução base contendo 2,69 g em Ga_2O_3 ou 1,3 g em gálio. É importante que não contenha anions e somente o íon hidroxila como espécie com carga negativa. Esta solução foi utilizada para se obter hidroxiapatita dopada usando galato de sódio, conforme as seguintes etapas:

(1) *Em 100 ml de água destilada foram dissolvidos 41,37 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (solução I).*

(2) *A solução I foi misturada com a solução do galato de sódio (50 ml) previamente obtido (solução II).*

(3) *Em 75 ml de água destilada foram dissolvidos 9,90 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_2$ (solução III).*

(4) *Foram misturadas as soluções II e III obtendo um volume de 150 ml, formando imediatamente uma massa volumosa coloidal (IV)*

(5) *À massa IV adicionou-se 5 ml de alisarina amarelada.*

(6) *À massa IV foi adicionado hidróxido de amônio até pH 11. A solução de NH_4OH gotejava-se de uma bureta; no total foram consumidos aproximadamente 4 ml. O pH foi controlado pela cor da alisarina que se torna amarelado ao pH 11.*

(7) *O produto tratado com NH_4OH foi aquecido sob agitação durante 2 horas a 40°C ; logo se deixou em repouso durante 20 horas para permitir uma melhor cristalização. O precipitado cristalino acumulou-se no fundo deixando um sobrenadante límpido.*

(8) A solução foi novamente aquecida sob agitação a 95°C durante 3 horas.

(9) O precipitado foi separado por filtração no funil á vácuo e lavado cinco vezes no próprio funil. Para garantir uma precipitação completa, adicionou-se NH_4OH ao filtrado. Não foi observada a formação de fosfatos de cálcio, confirmando que este tinha entrado inteiramente no composto.

(10) O funil com o precipitado foi colocado em um dessecador que continha aproximadamente 20 ml de nitrogênio líquido, para evitar a reação com CO_2 do ar formando carbonatoapatita.

(11) Após 24 horas no dessecador foi introduzida uma cápsula com P_2O_5 para desidratar o produto. Após outras 24 horas a cápsula foi trocada por uma contendo P_2O_5 fresco para completar a secagem a temperatura ambiente.

(12) Finalmente o produto deixou-se secar em uma estufa a 60°C até massa constante.

(13) Quando necessitado de um produto tratado a alta temperatura, este foi aquecido à temperatura de 1100 °C durante 3 horas.

Observação: Em razão da presença de alizarina, o produto pode ter uma coloração levemente amarelada. Isto não interfere de modo algum nas propriedades da hidroxiapatita dopada. A finalidade de se adicionar a alizarina é controlar com maior precisão o pH da solução e não introduzir em excesso NH_4OH .

5.2. Identificação da hidroxiapatita dopada

5.2.1. Composição das amostras.

Os espectros de raios-X da energia dispersiva (EDX) das amostras preparadas por ambos os métodos (figuras 3 e 4), mostram as linhas $K\alpha$ de cálcio e fósforo dominando o quadro, além dessas linhas estão presentes as linhas $K\beta$ e $L\gamma$ do cálcio com pequenas intensidades. A linha $K\alpha$ de oxigênio está bem resolvida nos dois espectros. O mapeamento do cálcio, fósforo e gálio mostram que os elementos são distribuídos estatisticamente, isto é, a homogeneidade é completa.

Como previsto, os espectros contêm a linha $L\alpha$, do gálio. O conteúdo desse elemento calculado dos dados de raios-X para a amostra obtida com o uso do $Ga(NO_3)_3$ foi 3.74%; enquanto que para a amostra obtida com galato de sódio foi 11.0%, este último valor mostra que no caso de usar o galato de sódio praticamente todo o gálio introduzido foi incorporado na hidroxiapatita. A quantidade de sódio incorporado é insignificante, isto é, sua linha $K\alpha$ está localizada somente no ombro da linha do gálio.

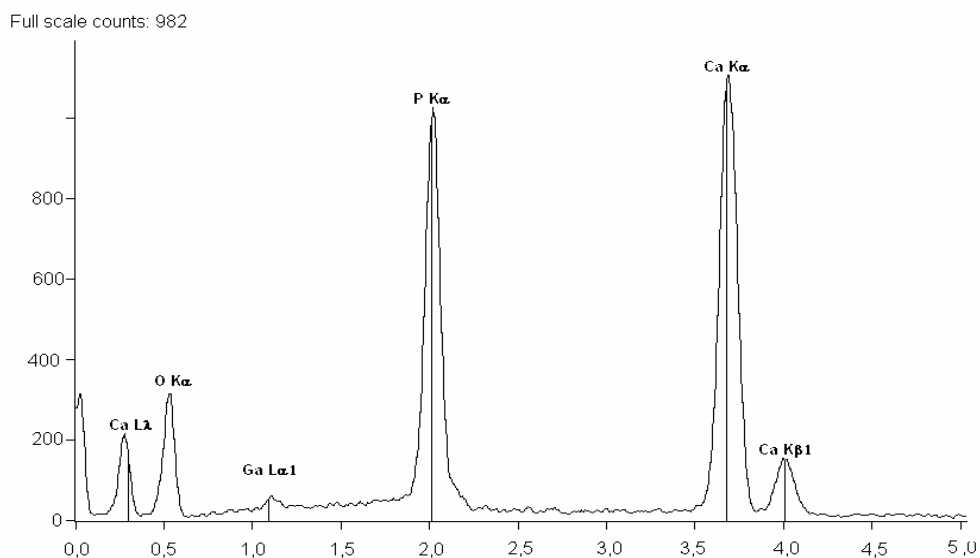


FIGURA 3 - Espectro de raios-X de energia dispersiva da amostra obtida usando nitrato de gálio.

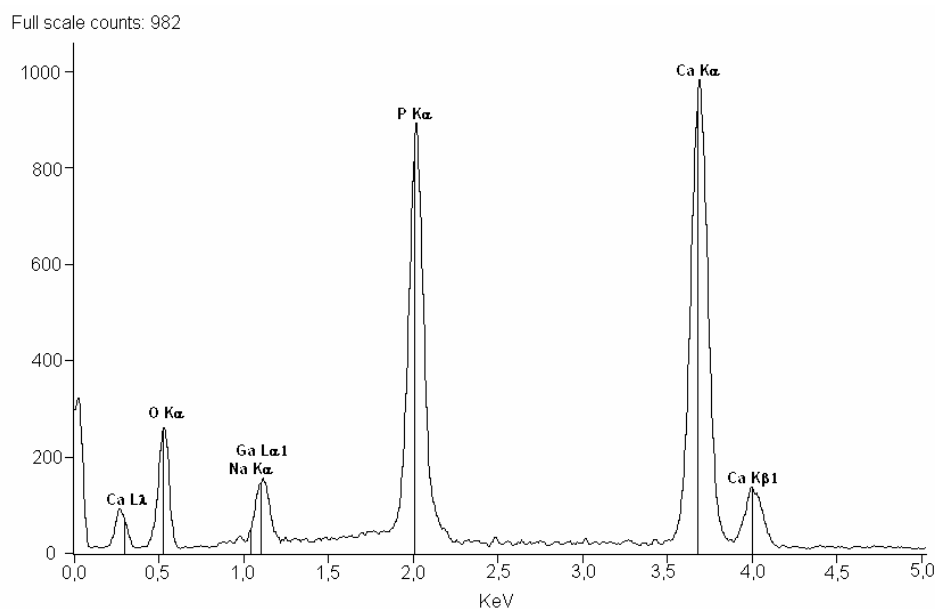


FIGURA 4 - Espectro de raios-X de energia dispersiva da amostra obtida usando galato de sódio.

5.2.2. Rede cristalina das amostras

Os difratogramas das amostras obtidas com uso do sal de gálio e do galato de sódio, apresentados nas figuras 5 e 6, são praticamente idênticos. O “background” presente no difratograma da amostra com uso de galato é mais pronunciado, mas não influi nas comparações já que o diagrama de pó foi registrado nas condições de menor resolução. O conjunto de intensidades e distâncias interplanares mostra que em ambos os casos a rede cristalina é hexagonal. Os parâmetros a e c calculados a partir desses dados são 9.421Å e 6.884Å, respectivamente.

As distâncias interplanares e índices de Miller, sem exceções, correspondem à ficha 09-0432 do banco de dados ASTM que caracteriza a hidroxiapatita sintética, seu difratograma gerado na forma de “cerca” a partir da ficha supracitada está apresentado na figura 7, mostrando mais uma vez que a identificação foi correta.

O conjunto desses dados mostra que não houve qualquer deformação na rede da HA ao introduzir o gálio.

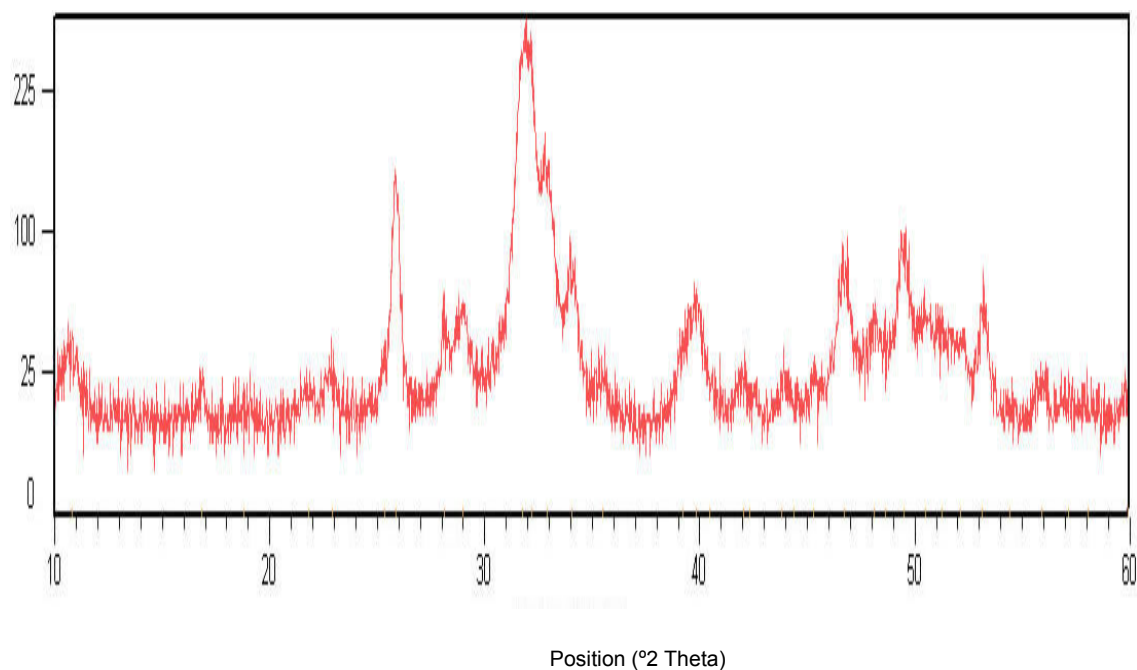


FIGURA 5 – Difratoograma de raios-X de HA dopada com gálio. Amostra obtida usando nitrato de gálio.

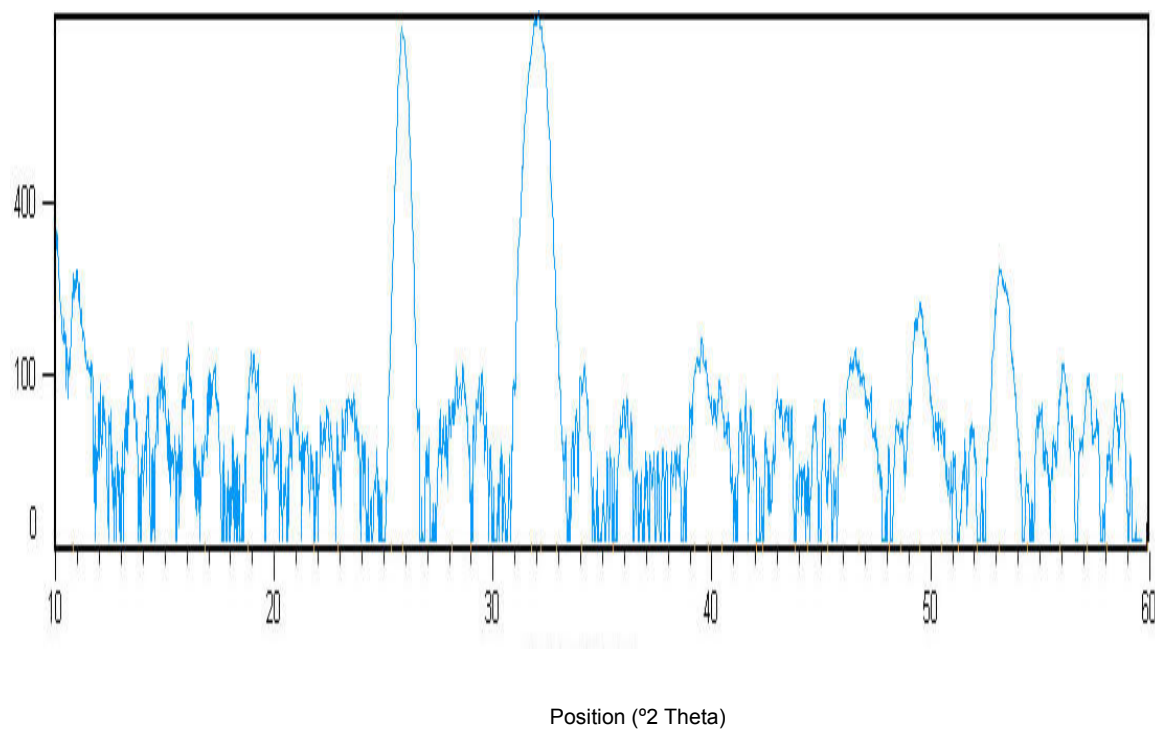


FIGURA 6 - Difratoograma de raios-X de HA dopada com gálio. Amostra obtida usando galato de sódio.

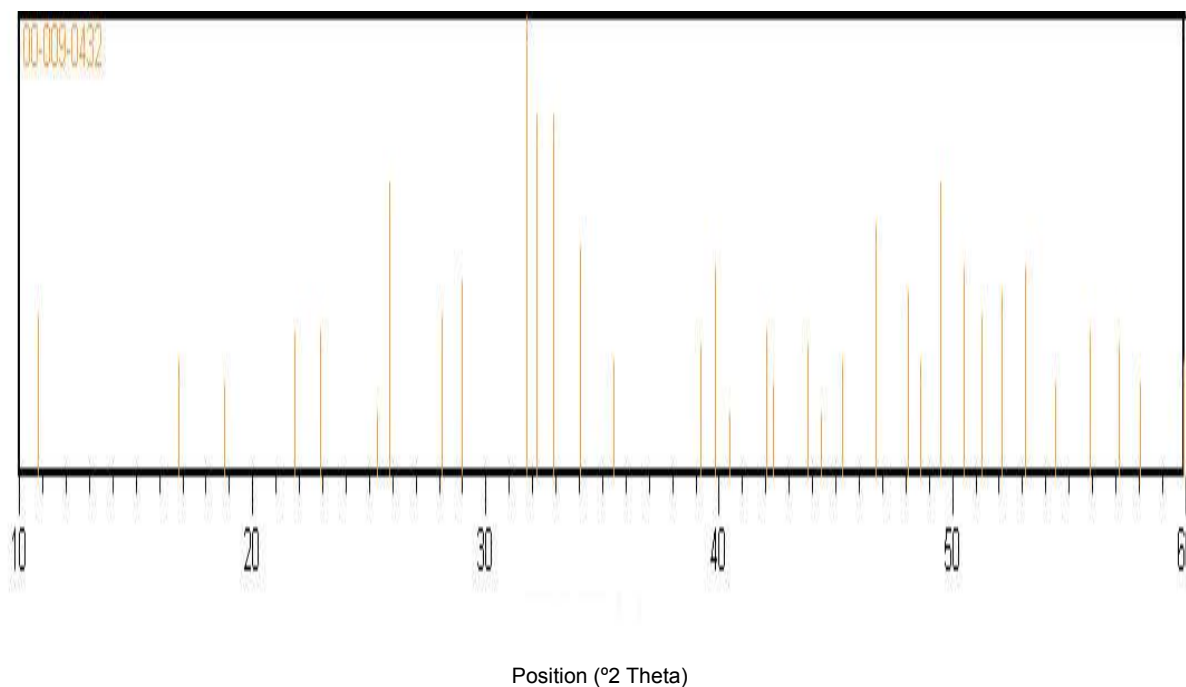


Figura 7 – Difratograma de raios -X na forma de “cerca” corresponde a HA comercial.

5.2.3. Comportamento termogravimétrico (TGA)

As curvas TGA-I e TGA-II das amostras obtidas por ambos os métodos estão apresentadas na figura 8. Pode-se observar que a quantidade de água mantida nos pós da hidroxiapatita não excede 6.5% no caso da amostra I e 10% no caso da amostra II. Esta água não é nem constitucional, nem do cristalohidrato. Trata-se de moléculas absorvidas de um modo frouxo, que estão sendo eliminadas gradualmente no intervalo 60-300 °C. Uma pequena quantidade de água constitucional elimina-se aproximadamente a partir de 400 °C. As curvas de TGA não acusam quaisquer efeitos que poderiam ser atribuídos à decomposição da hidroxiapatita dopada.

Na curva TGA-III referente à hidroxiapatita comercial, não se registram quaisquer efeitos de perda de massa. O que não é surpresa, já que o composto comercial foi previamente aquecido até 1000 °C, operação que faz parte da sua preparação pelo método convencional, isto mostra que a hidroxiapatita não se reidrata após seu resfriamento até a temperatura ambiente.

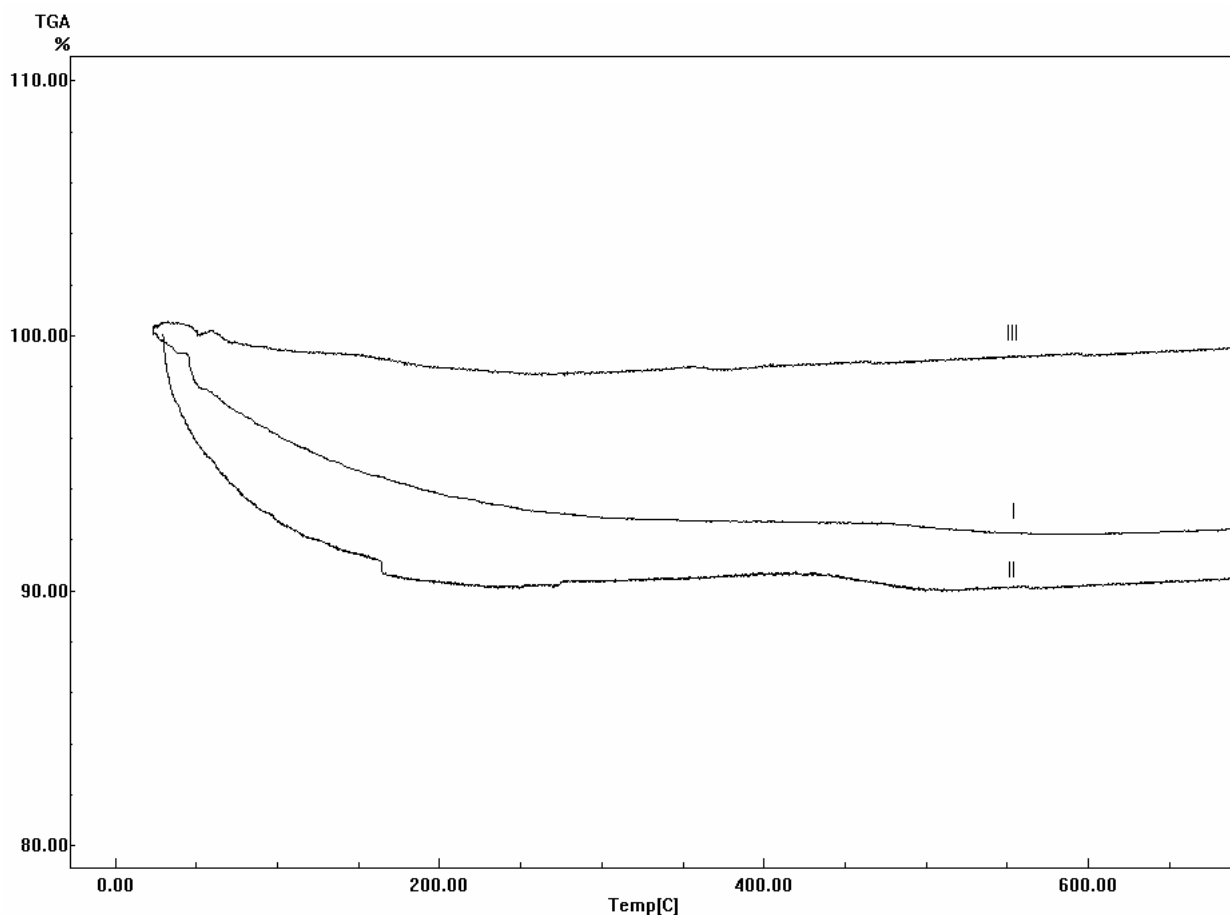


FIGURA 8 - Curvas da análise termogravimétrica de HA dopada comparadas com a curva da amostra comercial. I - Amostra obtida usando nitrato de gálio. II - Amostra obtida usando galato de sódio. III - HA comercial tratada a 1000°C.

5.2.4. Efeitos térmicos durante o aquecimento.

As Curvas típicas de calorimetria exploratória diferencial não acusam qualquer fase de transição durante o aquecimento, mostrando somente leve inclinação após $\sim 420\text{ }^{\circ}\text{C}$, correspondendo ao processo de desidratação final, efeito que concorda com os resultados da termogravimetria e com estrutura cristalina da hidroxiapatita extremamente estável..

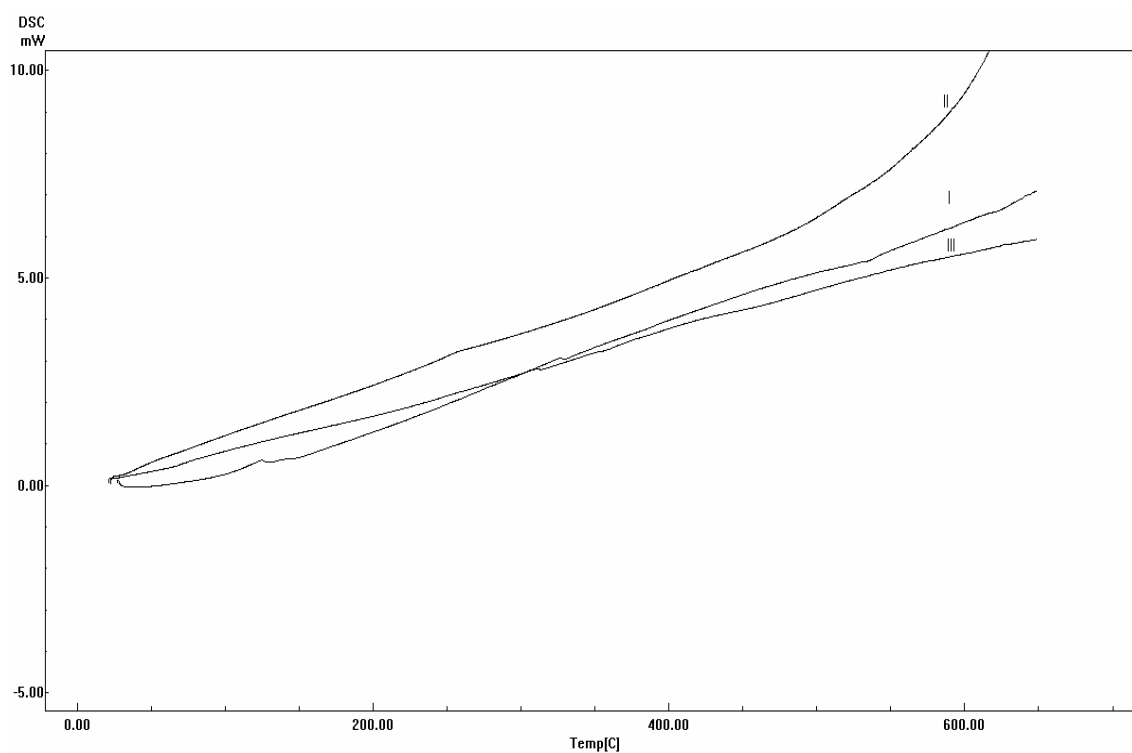


FIGURA 9 - Curvas da calorimetria exploratória diferencial de HA dopada comparadas com a curva da amostra comercial. I - Amostra obtida usando nitrato de gálio; II - Amostra obtida usando galato de sódio; III - HA comercial tratada a $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.5. Comportamento termomecânico

As curvas das análises termomecânicas estão apresentadas na figura 10. As amostras com gálio têm comportamentos idênticos, ou seja, houve uma leve contração do componente com o aumento da temperatura, em resposta a eliminação de traços de água. A terceira curva, hidroxiapatita comercial, acusa um efeito da mesma natureza, mas ele é apenas perceptível, já que a amostra foi previamente tratada a 1000 °C, durante sua preparação. Entretanto, no caso de porção não tratada, certa expansão compensada pela contração simultânea, não pode ser excluída. Isto é confirmado pela medição das mudanças Δa e Δc na estrutura constante da unidade celular. As amostras tratadas e não tratadas não excedem a margem de erro. A respeito das aplicações práticas, o importante é que não existe nenhum efeito termomecânico considerável entre 25-400 °C. Posto que a presença do gálio não produz contração/retração relevante, seu uso não induziria deslocamento ou rachadura quando o biomaterial for empregado como componente de um compósito inorgânico ou misto.

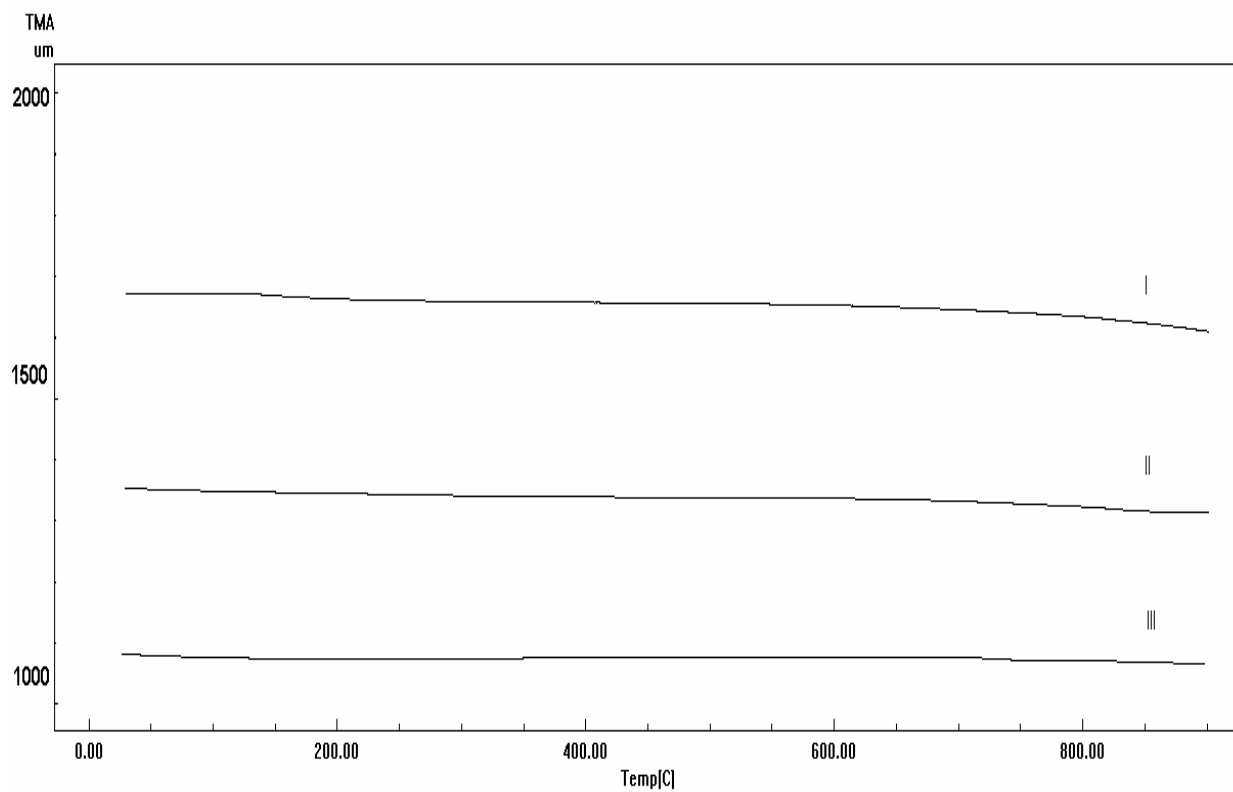


FIGURA 10 – Curvas da análise termomecânica de HA dopada comparadas com a curva da amostra comercial. I - Amostra obtida usando nitrito de gálio; II - Amostra obtida usando galato de sódio; III - HA comercial tratada a 1000 $^{\circ}\text{C}$.

5.2.5. Morfologia da hidroxiapatita dopada

As imagens da microscopia eletrônica de varredura das amostras obtidas usando o nitrato de gálio e o galato de sódio estão apresentadas nas figuras 11, 12 e 13. Os campos de observação foram escolhidos para poder mostrar os cristais individuais. O tamanho médio dos cristais em ambos os casos são 2-3 μm . Na imagem da amostra obtida com $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (figura 10), os cristais tem a forma de paralelepípedos ou prismas regulares. Na parte superior da figura enxerga-se aglomerados de cor branca que contêm microcristais com as formas variando de esférica até prismática alargada, os quais são os cristais que não tiveram tempo de aumentar de tamanho durante o repouso do precipitado na solução mãe.

A figura 12 mostra que estes grupos de microcristais, oriundos dos aglomerados pseudoamorfs de morfologia provavelmente lamelar (metade inferior da imagem). Realmente, no plano de fundo observam-se os mesmos grupos aglomerados da figura anterior, mas ainda com arestas primitivas lisas.

Na figura da amostra obtida usando galato de sódio observam-se cristalitos de forma irregular (centro e parte esquerda), assim como seus agregados possivelmente lamelares. Além dos cristais transparentes (centro) observa-se uma camada fina do material amorfo. Outra possibilidade seria a cristalização incompleta dos próprios microcristais. Em todo caso, a presença da fase amorfa está corroborada pela difratometria de raios-X (vide supra). De todo modo, a cristalinidade de ambas as amostras obtidas nesta pesquisa, quando comparadas aproximadamente no mesmo

aumento, está expressa muito melhor do que no caso da hidroxiapatita comercial em pó, apresenta-se compacta e morfologicamente irregular (figura 14). A presença do material alheio (pequenas quantidades de partículas brancas) não pode ser excluída.

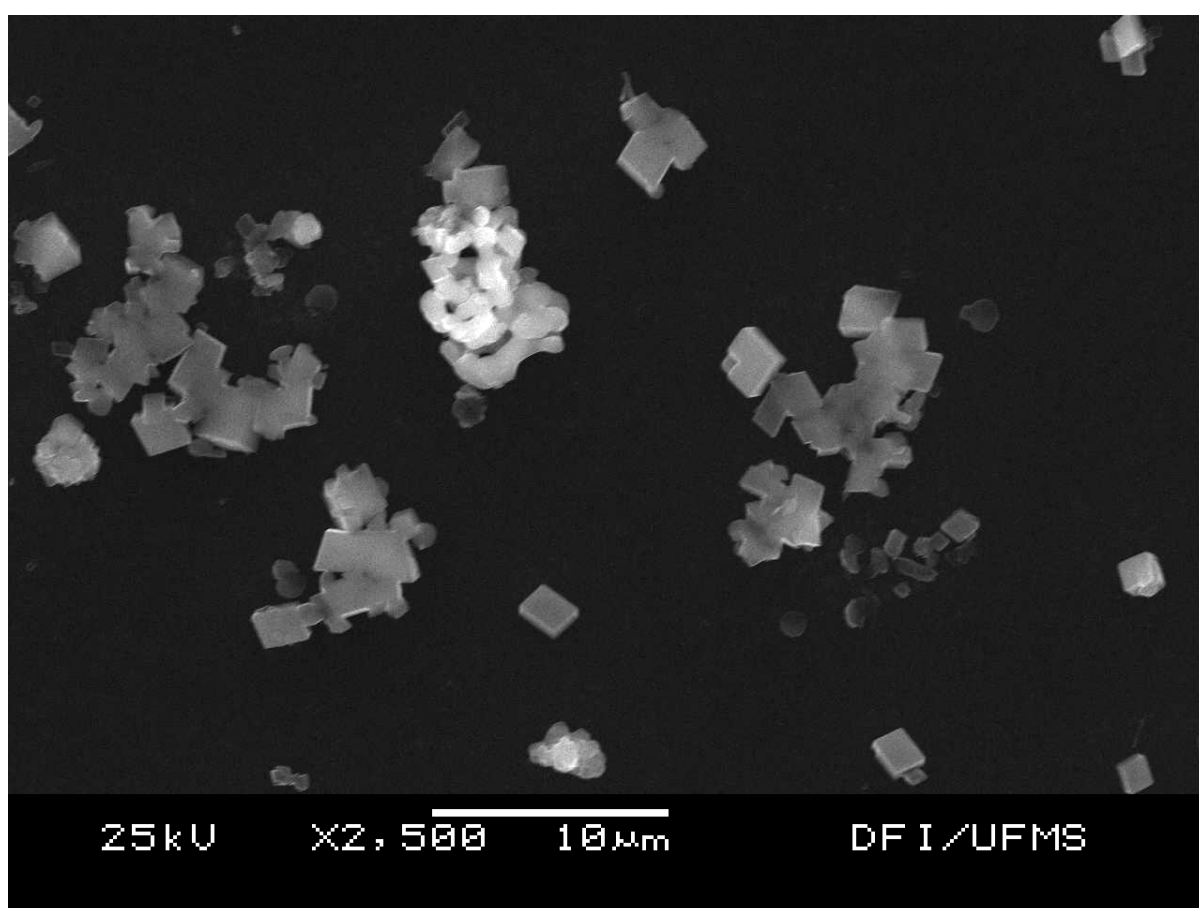


FIGURA 11 - Imagem da MEV dos cristais de HA dopado usando $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. Aumento X 2500.

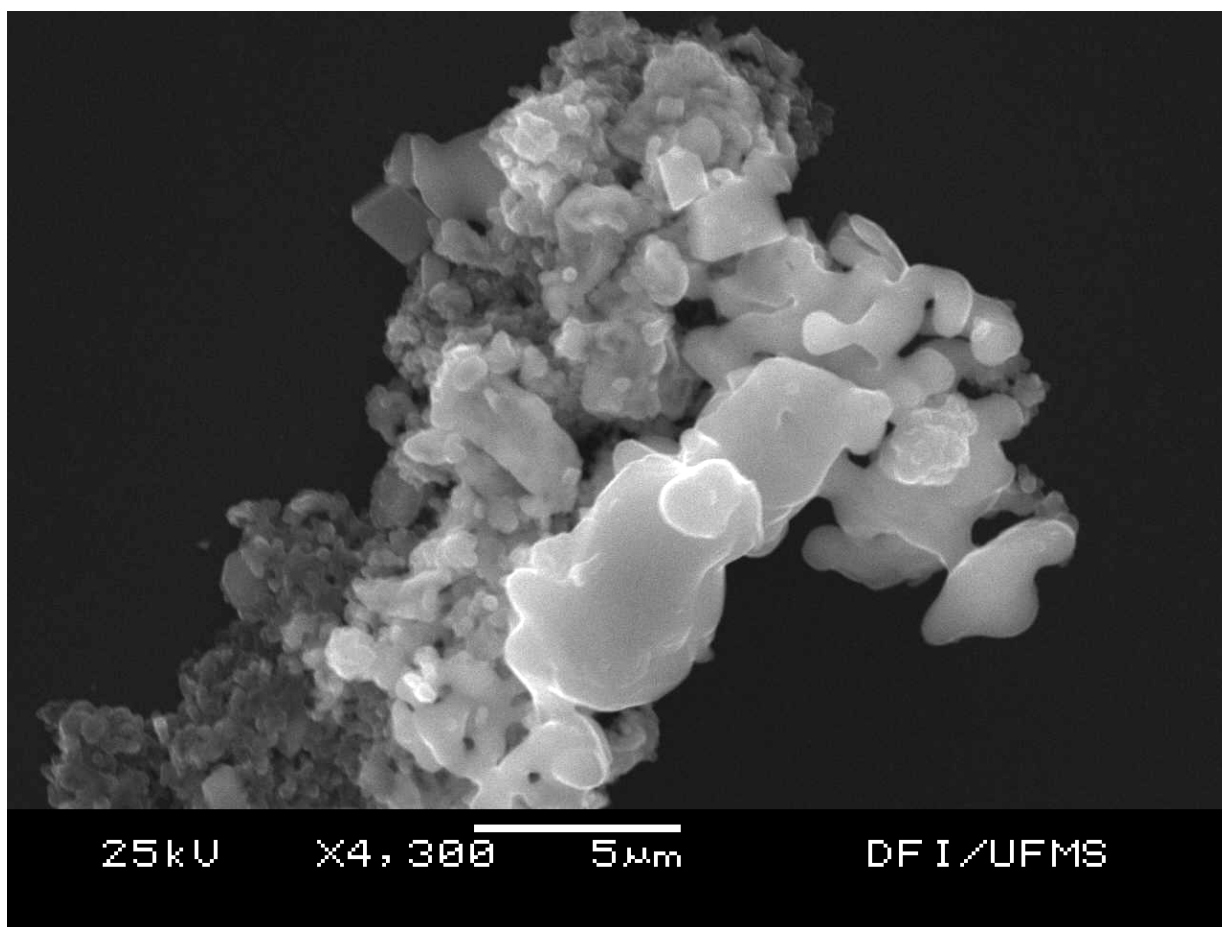


FIGURA 12 - Imagem da MEV de HA/Ga obtida usando $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. Cristais agregados padronizados. Aumento X 4300.

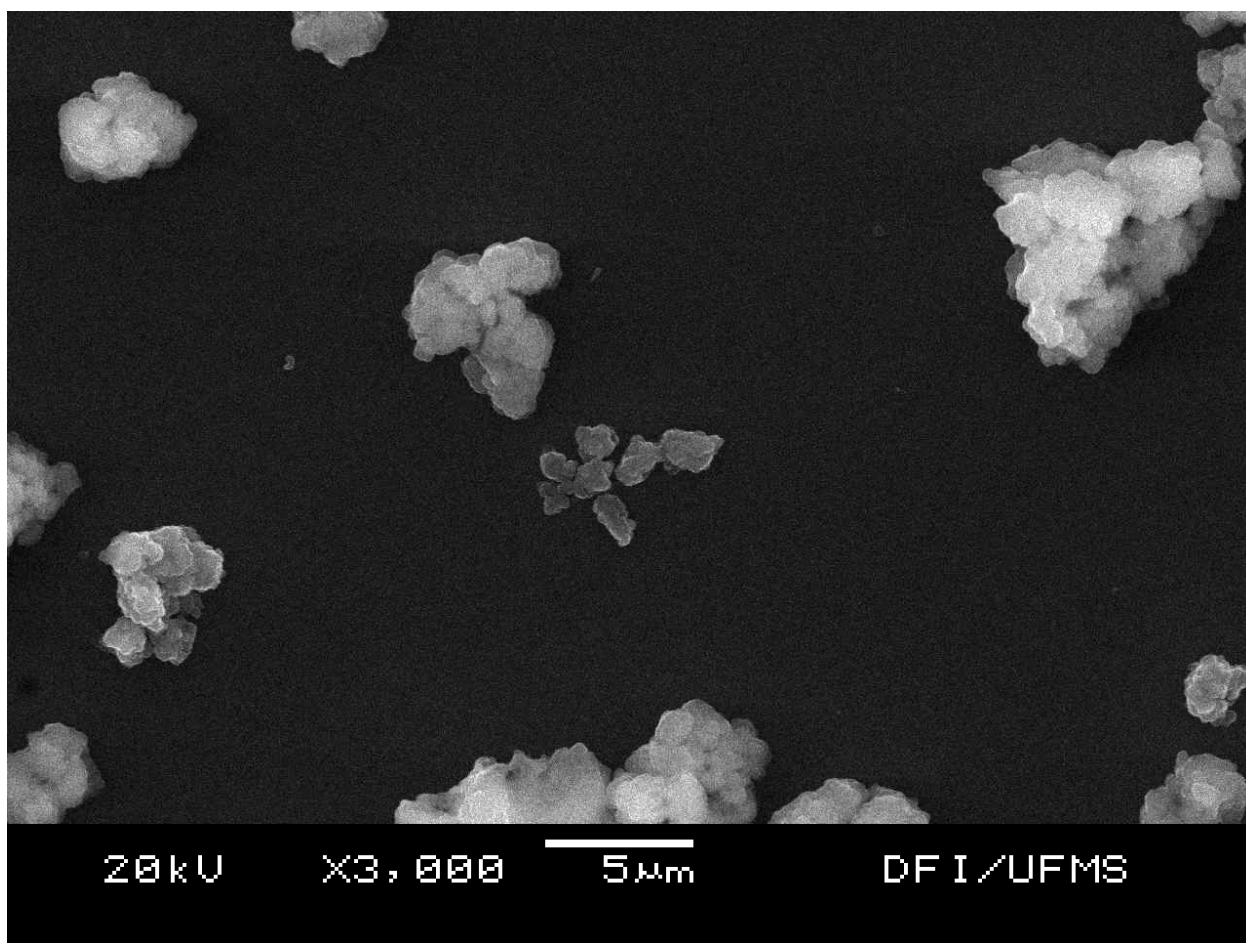


FIGURA 13 - Imagem MEV de cristais de HA dopado usando galato de sódio.

Aumento X 3000.

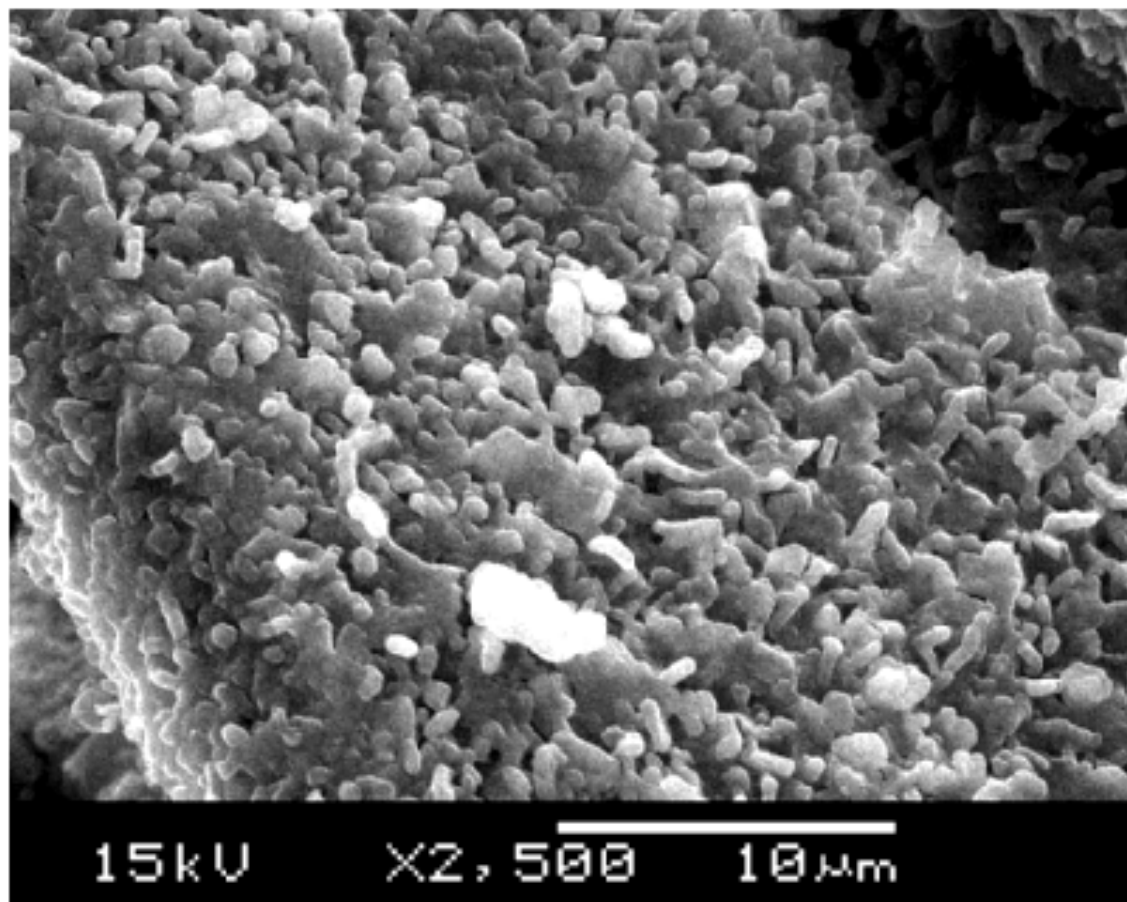


FIGURA 14 - Imagem MEV de HA em pó, amostra comercial. Aumento X 2500.

5.2.6. Testes de toxicidade

A viabilidade celular foi avaliada pela coloração das proteínas, a partir do corante sulforrodamina B, medida pela sua absorbância, nas linhagens de células normais MDCK e VERO, semeadas em placas de 96 cavidades e mantidas em meio de cultura DMEM.

Na coluna denominada controle negativo, as células cresceram na ausência de qualquer composto-teste. O controle positivo utilizado foi Cisplatina (cis-diclorodiaminoplatina). Os compostos-testes C-7 e C-10 foram utilizados em três concentrações 50, 500 e 5000 µg/ml e o controle positivo em duas 2,5 e 5,0 µg/ml. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A absorbância encontrada para o controle negativo, correspondeu ao valor de 100% de sobrevivência (% de crescimento). O parâmetro para a citotoxicidade utilizado foi o percentual de morte (% morte), determinada pelas médias dos valores da leitura ótica (absorbância) a 540 nm, entre o controle negativo (sem tratamento) e os compostos-testes ou controle positivo (com tratamento).

Os resultados da avaliação da atividade citotóxica, *in vitro*, dos componentes – testes estão apresentados nas tabelas abaixo:

TABELA 3 – Média das leituras de absorbância e percentual de crescimento (sobrevivência) e morte (citotoxicidade) das células MDCK*

	Controle negativo	(C-7) HA dopada com o sal de gálio (µg/ml)			(C-10) HA dopada com galato de sódio (µg/ml)			Controle positivo Cisplatina (µg/ml)	
[]	Meio+Cel	5000	500	50	5000	500	50	2,5	5,0
Média	2,223	2,429	2,391	2,404	2,217	2,373	2,364	1,411	0,280
Crescimento %	100	100	100	100	100	100	100	63,5	12,5
Morte %	0	0	0	0	0	0	0	36,5	87,5

- MDCK- suspensão com 5000 células/cavidade ou 50.000 por ml

Conforme mostra a tabela 3, não houve morte celular com os compostos C7 e C10, mesmo na maior concentração 5.000 µg/ml, para células MDCK. Não há citotoxicidade com os compostos-testes estudados, porque os valores da leitura ótica (absorbância) a 540 nm, foram semelhantes aqueles do controle negativo.

TABELA 4 – Médias das leituras de absorbância e percentual de crescimento (sobrevivência) e morte (citotoxicidade) das células VERO*

	Controle negativo	HA dopada com o sal de gálio (µg/ml)			HA dopada com galato de sódio (µg/ml)			Controle positivo Cisplatina (µg/ml)	
[]	Meio+Cel	5000	500	50	5000	500	50	2,5	5,0
Média	1,572	1,558	1,669	1,678	1,718	1,615	1,650	0,930	0,706
Crescimento %	100	100	100	100	100	100	100	59,2	44,9
Morte %	0	0	0	0	0	0	0	40,8	55,1

* VERO - suspensão com 10.000 células/cavidade ou 100.000 por ml

Conforme mostra a tabela 4, não houve morte celular com os compostos C7 e C10, mesmo na maior concentração 5.000 µg/ml, para células VERO. Não há citotoxicidade com os compostos-testes estudados, porque os valores da leitura ótica (absorbância) a 540 nm, foram semelhantes aqueles do controle negativo.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A retirada de enxerto ósseo autógeno é um procedimento cirúrgico, que complementa outro, são realizados na mesma oportunidade e conseqüentemente implica em aumento do tempo operatório, maior perda sanguínea, ferida operatória adicional, risco de infecção, dor na região doadora, fatores que concorrem para aumento do tempo de internação hospitalar. Esta opção cirúrgica pode ser limitada pela quantidade e qualidade do osso a ser retirado, como no caso de osteoporose ^[26].

O arcabouço osteocondutor da hidroxiapatita sintética, associado à participação direta do gálio na atividade osteometabólica, foram informações relevantes para que esta investigação experimental fosse possível. A preparação e estudo de um novo biomaterial, foi o objetivo principal deste estudo, que foi elaborado dentro dos mais rígidos critérios científicos. Toda metodologia é facilmente reproduzível.

A hidroxiapatita foi sintetizada inicialmente, neste estudo, por um método químico úmido, sem qualquer outra substância, ou seja, na sua forma pura ^[32]. Foi posteriormente submetida aos testes físico-químicos, em seguida, realizada a síntese deste novo compósito, que por definição: compreende todo material constituído pela mistura e aglutinação de duas ou mais substâncias. Logo, a hidroxiapatita dopada pelo gálio é um novo compósito, ainda não mencionado na literatura especializada.

Há duas possíveis maneiras da incorporação do metal trivalente dentro do arcabouço cristalino da hidroxiapatita: através da substituição heterovalente e através

de intercalação, isto é, pela formação de solução sólida de substituição/intercalação ^[63]. Como a soma do raio iônico $\text{Ga}^{3+} + \text{NH}_4^+ = 2.69 \text{ \AA}$ excede o espaço disponível para $2\text{Ca}^{2+} = 1.98 \text{ \AA}$ e ao mesmo tempo, os parâmetros de rede não aumentam, isto significa que quando utilizamos $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, gálio forma solução sólida de intercalação e não de substituição. Neste caso o dopante fica nos interstícios da estrutura, sem substituir os cátions nos nós da rede ^[35].

Por outro lado, quando o galato de sódio é utilizado para a síntese ($\text{Ga}^{3+} + \text{Na}^+ = 1.64 \text{ \AA}$), o par heterovalente, em princípio, pode substituir 2Ca^{2+} disponível na estrutura, mas é muito pequeno para formar solução sólida de substituição, ou seja, até poderia formar, mas a estrutura resultante seria mecanicamente instável. Isto justifica os resultados apresentados nos quadros dos espectros de raios-X da energia dispersiva, da amostra obtida usando galato, onde o sódio praticamente não foi registrado. Entretanto, a falha para obter solução sólida de substituição pode ser devida a maior solubilidade destes componentes, em comparação com a hidroxiapatita clássica sem gálio ^[38].

Desde o lavado da hidroxiapatita dopada depois de sua preparação até sua fabricação final, o íon de gálio pode ser considerado como firmemente fixado na estrutura cristalina, mesmo após a lavagem dos precipitados, no filtro, a quantidade de gálio introduzido está em conformidade com o conteúdo dos metais trivalentes firmemente aderidos a apatita natural da Península de Kola, ou seja, cerca de 2,0 mass% ^[61]. A discrepância aparente nas concentrações pode ser em razão da limitada disponibilidade, de metais de terras raras no ambiente geoquímico de Kola ou uma maior afinidade do gálio com a matriz da apatita.

Atualmente a engenharia de tecidos busca o desenvolvimento de um biomaterial que tenha composição, nano estrutura, propriedades biomecânicas e bioquímicas, bem como comportamento biológico semelhante ao osso humano natural. Este estudo pretende colaborar para o desenvolvimento de um material com características ideais, para ser utilizado, como alternativa ao enxerto de osso esponjoso.

Há um estudo experimental, cujo objetivo foi substituir o cálcio na estrutura da apatita com cátions trivalentes. Fluoroapatita foi utilizado como matriz para substituição heterovalente para alumínio, índio e gálio, o que coincidiu com nossos dados, não foi observado qualquer mudança nos parâmetros cristalográficos. Todavia, estes autores falharam na verificação da adsorção do gálio por qualquer outro mecanismo, além da inserção dentro dos sítios de cálcio. Logo, permanece desconhecido se o material resultante continha gálio nos interstícios da rede. Esta incerteza é devida a uma falha metodológica, que é confirmar a presença do gálio por uma técnica independente, a análise química ou espectro de raios-X da energia dispersiva ^[59].

Conforme as curvas termogravimétricas, a amostra precipitada pode conter até 3% de H₂O depois de seco a 100 °C. Essa água é expelida no intervalo 442-475°C. Evidentemente, a hidroxiapatita comercial previamente tratada a 1000 °C não mostra esta perda de massa. A natureza e o modo de coordenação desta água adicional não está esclarecido, entretanto, este efeito foi observado por outros pesquisadores, incluindo aqueles que a hidroxiapatita foi dopada. Isto significa que mesmo mantidas por ligações fracas, as moléculas de H₂O possuem sítios de coordenação bem definidos ^[62].

Como o gálio contido na hidroxiapatita dopada não produz qualquer distorção na rede, a sua presença não deve prejudicar a compatibilidade estérica deste dopante com a hidroxiapatita do osso humano e fosfatos envolvidos. A virtual distorção cristalográfica não poderia ser confundida com imperfeições de seus microcristais. Se os compartimentos da rede têm diferentes tamanhos e formas e sua distribuição é homogênea, suas distâncias comuns variam e eles constroem uma rede paracristalina, situação mais apropriada para poder servir como substituto ósseo. Justamente, a característica paracristalina faz a hidroxiapatita artificial compatível com biopolímeros ^[5].

A estrutura, a fase cristalina e a morfologia da hidroxiapatita dopada pelo gálio foram investigadas pelo uso de vários métodos analíticos e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados comprovaram que este compósito possui comportamento estável, a sua obtenção foi um objetivo alcançado e sua metodologia pode ser facilmente reproduzível, isto coaduna confiabilidade e rigor científico.

Um agente terapêutico ideal para doenças ósseas, supõe que sua atividade esteja restrita a este órgão, gerando efeitos mínimos em outros tecidos. A hidroxiapatita contendo gálio pode ser viável para tal finalidade, pois não apenas apresenta alta atividade no tecido ósseo, isoladamente, mas fornece o gálio para osteogênese, como foi observado nos trabalho que utilizou ratos ^[14].

Uma excepcional classe de moléculas, que mostra forte afinidade com hidroxiapatita sob condições fisiológicas é o bifosfonato. Entretanto, a interação entre a hidroxiapatita óssea e bifosfonato é devido à forma aniônica, enquanto que o gálio é

parte da metade catiônica. Assim, abre-se a possibilidade de usar bifosfonato e gálio ao mesmo tempo, aproveitando ambos os mecanismos de ligação com o osso [2].

Foi mostrado que gálio não substituiu o cálcio e conseqüentemente não produziu distorção no arcabouço da matriz da hidroxiapatita, permanecendo fortemente fixado na forma de solução sólida por intercalação. A inserção do gálio não causa qualquer alteração morfológica na estrutura da hidroxiapatita e a solução sólida desenvolvida responde aos critérios físico-químicos para um biomaterial. Pode ser empregado na prática ortopédica e manuseio de lesões ósseas traumáticas. Seu futuro uso abre oportunidades de aumento de crescimento ósseo e paralelamente, retenção de cálcio já existente no osso.

A hidroxiapatita dopada pelo gálio é um biomaterial inorgânico complexo que oferece uma nova alternativa como substituto ósseo para a engenharia de tecidos. Nesta pesquisa, vários aspectos foram considerados para sua obtenção, como propriedades físico-químicas, morfologia, estrutura, tipo e volume dos poros.

O teste de citotoxicidade da sulforrodamina B é um dos mais utilizados para avaliar a viabilidade celular [66]. Este corante possui dois grupos sulfônicos que se ligam às proteínas das células, evidenciando as células viáveis. Os compostos-testes não causaram qualquer efeito nas células, uma vez que a intensidade da cor medida a 540nm, foi semelhante àquela medida para o controle negativo.

O controle em relação ao uso de animais de laboratórios está cada vez mais rigoroso, por isso os testes de toxicidade *in vitro* têm acentuado sua importância. Nesta

pesquisa os resultados foram inéditos, pois se demonstra pela primeira vez que os compostos sintetizados não foram citotóxicos.

O percentual de sobrevivência celular foi de 100%, comprovando a ausência de toxicidade in vitro para as duas linhagens de células normais, MDCK e VERO, utilizadas neste estudo, mesmo na maior concentração (5000 µ/ml). Ao contrário, o controle positivo dos testes, cisplatina na concentração de 5,0 µg/ml, causou morte celular de 87,5% em células MDCK e 55,1 % em células VERO.

Esta pesquisa possibilitará o planejamento de etapas futuras, deste estudo, como o teste de biocompatibilidade, cujos compostos-testes C-7 e C-10, serão implantados no organismo de animal de laboratório e avaliados, posteriormente, os efeitos no tecido vivo adjacente. Somente a partir daí poderá dar início os testes com seres humanos, seguindo o protocolo ISO 10993.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. Foi obtida a hidroxiapatita dopada pelo gálio para potencial uso em ortopedia, como alternativa ao enxerto ósseo autólogo.
 2. Foi elaborado um método viável da síntese de hidroxiapatita.
 3. Foram estudadas as propriedades físico-químicas da hidroxiapatita dopada pelo gálio, mostrando que o compósito preenche as exigências para um biomaterial.
 4. A hidroxiapatita dopada pelo gálio não apresenta citotoxicidade e pode ser recomendada para testes pré-clínicos.
-

8.REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- [1] Bernstein LR. Mechanisms of therapeutic activity for gallium. *Pharm Reviews*. 1998; 50:665-72.
 - [2] Bernstein LR. ^{67}Ga Therapeutic Gallium Compounds. In: Gielen M, Tiekink ER. *Metallotherapeutic drugs & metal-based diagnostic agents – The use of metals in medicine*. London: Wiley; 2005. p. 259-77.
 - [3] Blair HC, Teitelbaum SL, Tan HL, Schlesinger PH. Reversible inhibition of osteoclastic activity by bone-bound gallium(III). *J Cell Biochem*. 1992; 48: 401-10.
 - [4] Blumenthal NC, Cosma V. The effect of aluminum and gallium ions on the mineralization process. *Bull Hosp Jt Dis Orthop Inst*. 1989; 49:192-203.
 - [5] Bockman RS, Boskey AL, Blumenthal NC. Gallium increases bone calcium and crystallite perfection of hydroxiapatite. *Proc Natl Acad Sci*. 1986; 39:376-81.
 - [6] Bockman RS. Studies on the mechanism of action of gallium nitrate. *Semin Oncol*. 1991; 18:21-5.
 - [7] Bockman RS, Guidon PT, Pan LC. Gallium nitrate increases type I collagen and fibronectin mRNA and collagen protein levels in bone and fibroblast cells. *J Cell Biochem*. 1993; 52:396-403.
-

- [8] Bockman R. The effects of gallium nitrate on bone resorption. *Semin Oncol.* 2003; 30:5-12.
 - [9] Koerbas M, Rokita E, Meyer-Klaucke W, Ryzek J. Bone tissue incorporates in vitro gallium with a local structure similar to gallium-doped brushite. *J Biol Inorg Chem.* 2004; 9:67-76.
 - [10] Jenis LG, Waud CE, Stein GS. Effect of gallium nitrate *in vitro* and in normal rats. *J. Cell. Biochem.* 1993; 52:330-6. .
 - [11] Dudley HC, Maddox GE. Deposition of radiogallium (^{72}Ga) in skeletal tissue. *J Pharmacol Exp Ther.* 1949; 96:224-7.
 - [12] Dudley HC, Maddox GE, Larue HC. Studies of the metabolism of gallium. *J Pharmacol Exp Ther.* 1949; 96:135-8.
 - [13] Foster BJ, Clagett-Carr K, Hoth D, Leyland-Jones B. Gallium nitrate: The second metal with clinical activity. *Cancer Treat Rep.* 1986; 70:1311-9.
 - [14] Guidon PT Jr, Salvatori R, Bockman RS. Gallium nitrate regulates rat osteoblast expression of osteocalcin protein and mRNA levels. *J Bone Miner Res.* 1993; 8:103-112.
 - [15] Hall TJ, Chambers TJ. Gallium inhibits bone resorption by a direct effect on osteoclasts. *Bone Miner.* 1990; 8:211-6.
 - [16] Melnikov P, Malzac A, de Barros Coelho M. Gallium and bone pathology. *Acta Ortopedica Bras.* 2008; 16:54-7.
-

- [17] Nelson B, Hayes RL, Edwards C L et al. Distribution of gallium in human tissues after intravenous administration. J Nucl Med. 1972; 13:92-100.
 - [18] Niesvizky R, Choy CG, Siegel D, Lyons L, Michael J. Extended survival in advanced-stage multiple myeloma patients treated with gallium nitrate. Leuk Lymphoma. 2002; 43:603-5.
 - [19] Warrell RPJr, Bockman RS, Coonley CJ, Isaacs M, Staszewski H. Gallium nitrate inhibits calcium resorption from bone and is effective treatment for cancer-related hypercalcemia. J Clin Invest. 1984; 73:4149-53.
 - [20] Warrell RPJr. Gallium in the treatment of hypercalcemia and bone metastasis. In: Bockman RS. Important advances in oncology. Philadelphia: Lippincott; 1989. p.182-98.
 - [21] Warrel RP, Lovett D, Dilmanuan FA, Schneider R, Heelan RT. Low-dose gallium nitrate for prevention of osteolysis in myeloma: result of a pilot randomized study. J Clin Oncol. 1993; 11:2443-50.
 - [22] Damien CJ, Parsons JR, Prewett AB, Huismans F, Shors EC, Holmes RE. Effect of demineralized bone matrix on bone growth within a porous HA material: a hystologic and hystometric study. J Biomater Appl. 1995; 9:275-88.
 - [23] Garg R. Adsorption on and surface chemistry of hydroxyapatite. In: Misra DN. Inorganic chemistry. New York: Plenum Press; 1982. p.34-7.
-

- [24] Blumenthal NC, Cosma V, Levine S. Effect of gallium on the *in vitro* formation, growth and solubility of hydroxiapatite. *Calcif Tissue Int.* 1989; 45:81-87
- [25] Wheeler SL, Holmes RE, Callhoun CJ. Six-year clinical and hystologic study of sinus-lift implants. *Int. J. Oral & Maxillofac.Implants.* 1996; 11:26-34.
- [26] Zigler JE, Boden S, Anderson PA, Bridwell K, Vacarro A. What's new in spine surgery? *J Bone Joint Surg [Am].* 2002; 84:1282-8.
- [27] Donnely R, Boskey A. The effect of gallium on seeded hydroxiapatite growth. *Calcif Tissue Int.* 1989; 44:138-42.
- [28] Kanuka JV. Substituição isomorfa do cálcio na hidroxiapatita pelos elementos do grupo de terras raras, [Tese de doutorado], Ucrânia, Donetsk: Universidade Técnica Nacional; 2001.
- [29] Zakharova B, Transquine V, Komissarova L, Melnikov P. Precipitation of rare earth phosphates from phosphoric acid solutions. *Phosphorus, Sulfur and Silicon.* 1996; 111:44-5.
- [30] Rang M. The story of orthopaedics. Philadelphia: Saunders; 2000.
- [31] Brown WE, Mathew M, Tung MS. The crystal chemistry of octocalcium phosphate. *Prog.Cryst. Growth Charact.* 1981; 4:59-73. Rang M. The story of orthopaedics. Philadelphia: Saunders; 2000.
-

- [32] Mavropoulos EA. hidroxiapatita como absorvedor de metais, [Dissertação de mestrado], Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1999.
- [33] Williams RJP, Da Silva JR RF. New trends in bioinorganic chemistry. In: Kaim, W. Biomineralization. London: Academic Press; 1978. p.334-78.
- [34] Weeler JE, Lewis D. An X-ray study of the paracrystalline nature of bone apatite. *Calcif Tissue Res.* 1977; 24:243-8.
- [35] Grayson M. Crystal field theory. In: Averbuch-Pouchout MT, Durif A. Crystal chemistry of inorganic and organometallic compounds. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 1994. p.22-36.
- [36]. Bonucci E. Biological calcification, normal and pathological processes in the early stages. Berlin: Springer Verlag; 2007.
- [37] Greenwood NN, Earshow A. Chemistry of the elements. 2nd ed. Oxford: Butterford & Heinemann; 1985.
- [38] James E. Coordination, kinetic and mechanism. In: Huheey JE, Keiter EA, Keiter RL. Inorganic chemistry: Principles of structure and reactivity. 4th ed. New York: Collins; 1993. p.3-20.
- [39] Poutard FGE. Phosphorus and bone. In: Williams RJP, da Silva JR RF. New trends in bio-inorganic chemistry. 2nd ed. London: Academic Press; 1978. p.160-192.
-

- [40] White GK. Diffraction and the reciprocal lattice. In: Gersten JI, Smith FW. The Physics and Chemistry of Materials. 3rd ed. New York: Wiley; 2001. p.266-79.
- [41] Ho DH, Lin JR, Brown NS, Newman RA. Bioavailability of gallium nitrate. Eur. J. Pharmacol. 1990; 183:1200-03.
- [42] Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: a general review. Haematologica. 1995; 80: 252-67.
- [43] Brittenham GM. Disorders of iron metabolism. In: Hematology: Basic Principles and Practice. New York: Churchill Livingstone; 1991. p.133-72.
- [44] Logan KJ, Ng PK, Turner CJ, Schmidt R, Scott JR. Comparative pharmacokinetics of ^{67}Ga and ^{59}Fe in humans. Int J Nucl Med Biol. 1981; 8:271-6.
- [45] Chitambar CR, Narasimhan J, Guy J, Sem DS, O'brien WJ. Inhibition of ribonucleotide reductase by gallium in murine leukemic L1210 cells. Cancer Res. 1991; 51:6199-201.
- [46] Chitambar CC. Gallium nitrate revisited. Semin Oncol. 2003; 30:1-4.
- [47] Collery P, Millart H, Ferrand O. Clinical pharmacology of gallium chloride after oral administration in lung cancer patients. Anticancer Res. 1989; 9: 353-6.
-

- [48] Green MA, Welch MJ. Gallium radiopharmaceutical chemistry. *Nucl Med Biol.* 1989; 16:435-48.
 - [49] Feremans W, Bujan W, Neve P, Delville JP, Schandene L. CD71 phenotype and the value of gallium imaging in lymphomas. *Am J Hematol.* 1991; 36:215-6.
 - [50] Bockman RS, Repo MA, Warrell RP. Distribution of trace levels of therapeutic gallium in bone as mapped by synchrotron X-ray microscopy. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87:4149-53.
 - [51] Repo MA, Bockman RS, Betts F, Boskey AL, Alcock NW, Warrel RPJr. Effect of gallium on bone mineral properties. *Calcif Tissue Int.* 1988; 43:300-6.
 - [52] Arnold DS, Plate U, Wieserman HP. Quantitative analysis of the biopolimerization of different hard tissues. *J Microsc.* 2001; 202:488-94.
 - [53] Adamson RH, Canellos GP, Sieber S M. Studies on the antitumor activity of gallium nitrate (NSC-15200) and other group IIIa metal salts. *Cancer Chemother.* 1975; 59:599-610.
 - [54] Hashimoto J, Ohno I, Nakatsuka N. Prevalence and clinical features of Paget's disease of bone in Japan. *J Bone Miner Met.* 2006; 23:186-90.
 - [55] Bockman RS, Bosco B. Treatment of patients with advanced Paget's disease of bone with two cycles of gallium nitrate. *Semin Arthritis Rheum.* 1994; 23:268-9.
-

- [56] Bockman RS, Wilhelm F, Siris E. A multicenter trial of low dose gallium nitrate in patients with advanced Paget's disease of bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 80:595-602.
- [57] Hadjipavlou AG, Gaitanis IN, Katonis PG, Lander P. Paget's disease of the spine and its management. *Eur Spine J.* 2001; 10:370-84.
- [58] Callander NS, Roodman GD. Myeloma bone disease. *Semin Hematol.* 2001; 38:276-85.
- [59] Manca SG, Urquiza N, Baran EJ. Über den Einbau von Al(III), Ga(III) und In(III) in das Calcium-Fluorapatit-Gitter. *Z Naturforsch.* 1991; 46:129-131.
- [60] Pearson RG. Absolute electronegativity and hardness: Application to inorganic chemistry. *Inorg Chem.* 1988; 27:734-40.
- [61] Melnikov PP, Efremov VA, Stepanov AK, Komissarov LN, Romanova TS. Gallium Phosphates. *J Inorg Chem.* 1986; 21:46-50.
- [62] Rokita E, Korbas M, Mutsaers PHA, Taton G, Voigt MJA. Micro-PIXE studies of gallium incorporation in mineralized tissue. *Nucl Inst Methods in Physics Research.* 2001; 181:529-32.
- [63] Hancock RD. Metal complexes in aqueous solution. New York: Plenum Press; 1996.
- [64] Komissarova L, Melnikov P, Golub L, Bobylev A. Apatite rock lixiviation with phosphoric acid solutions. *Phosphorus, Sulfur and Silicon.* 1996; 111:3-4.
-

- [65] Freshney IR. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 4th ed. New York: Wiley; 1994.
- [66] Skehan P, Storeng R, Scudiero D. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J Nat Cancer Inst. 1990; 82:1107-12.
-

APÊNDICE

O GÁLIO E A PATOLOGIA ÓSSEA

GALLIUM AND BONE PATHOLOGY

PETR MELNIKOV¹, AUGUSTIN MALZAC², MARLENE DE BARROS COELHO³

RESUMO

Proposta: Revisão de trabalhos científicos referentes à incorporação do gálio no tecido ósseo, ao mecanismo da atividade terapêutica desse elemento, bem como a formação, crescimento e solubilidade da hidroxiapatita na presença dos sais de gálio. Justificativa: Diferente de outras drogas que impedem a perda de cálcio, os sais de elemento traço gálio são eficazes em hipercalcemia severa. O gálio (geralmente na forma de nitrato) aumenta a concentração de cálcio e fósforo no osso, influi nos osteoclastos de maneira direta não tóxica, em doses surpreendentemente baixas. Apesar de que os detalhes do mecanismo de ação do gálio não são bem esclarecidos, está comprovado que esse mecanismo envolve a inserção do gálio na matriz de hidroxiapatita, protegendo-a contra a reabsorção e melhorando as propriedades biomecânicas do sistema esquelético. Este fármaco age também nos componentes celulares do osso, impedindo sua absorção ao diminuir a secreção ácida dos osteoclastos. São necessárias mais publicações sobre o uso do gálio no tratamento de várias doenças onde prevalece esta patologia. Conclusões: Devido às suas características interessantes e promissoras, o gálio merece ser futuramente avaliado do ponto de vista experimental e clínico, como um agente antiabsorvente em ortopedia, traumatologia e doenças relacionadas com o câncer. Maior conhecimento dos mecanismos envolvidos pode fornecer as idéias para estratégia terapêutica, com o objetivo de diminuir hipercalcemia e perda óssea. Espera-se que novos compostos do gálio sejam desenvolvidos e avaliados clinicamente.

Descritores: Gálio, Hipercalcemia, Hidroxiapatita, Reabsorção óssea, Osteogênese.

SUMMARY

Purpose: To review the literature concerning the incorporation of gallium into bone tissue, mechanisms of therapeutic activity of this element, as well as the formation, growth and solubility of hydroxiapatite in the presence of gallium salts. Justification: In contrast to other calcium-saving drugs, salts of trace element gallium are effective in severe hypercalcemias. Gallium (most commonly in the form of its nitrate) enhances calcium and phosphorus content of the bone and has direct, noncytotoxic effects on osteoclasts at markedly low doses. Although the details of gallium action on the bone are still uncertain, it is well established that the mechanism involves gallium insertion into the hydroxiapatite matrix protecting it from resorption and improving biomechanical properties of the skeletal system. The drug also acts on the cellular components of bone to reduce bone resorption by decreasing acid secretion by osteoclasts. More has to be published about the use of gallium in managing a series of clinical conditions in which this pathology is pronounced. Conclusions: Due to its interesting and promising profile gallium merits further experimental and clinical evaluation as an antiresorptive agent in orthopaedics, traumatology and cancer-related conditions. Greater knowledge of the mechanisms involved may provide insights for therapeutic strategies aimed at diminishing hypercalcemia and bone loss. New gallium compounds are expected to be developed and tested clinically.

Keywords: Gallium, Hypercalcemia, Hydroxiapatite, Bone resorption, Osteogenesis.

Citação: Melnikov P, Malzac A, Coelho MB. O gálio e a patologia óssea. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2008; 16(1):54-57. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Melnikov P, Malzac A, Coelho MB. Gallium and bone pathology. *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2008; 16(1):54-57. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

Estima-se que mais de 200.000 cirurgias para fusão da coluna vertebral são realizadas a cada ano nos EUA. Artrodese lombar posterolateral intertransversalis é o procedimento mais comum realizado, ainda que a falha para obter uma sólida união óssea ocorre em 10% a 40% dos pacientes com único nível envolvido e mais frequentemente em múltiplos níveis. Esta alta taxa de pseudoartrose indica que eventos fisiológicos, biológicos e químicos, cruciais para este processo, não são adequadamente compreendidos. A não união óssea frequentemente leva a uma resolução insatisfatória dos sintomas clínicos e usualmente resulta em maior custo médico e morbidade, bem como a necessidade de intervenções adicionais⁽¹⁾. Infelizmente, o efeito dos íons metálicos no processo de mineralização não tem recebido considerável atenção até recentemente, entretanto dados interessantes da participação do alumínio e gálio no metabolismo ósseo foram publicados há mais de 15 anos⁽²⁾. Atualmente, o número de publicações dedicadas ao papel do gálio na patologia óssea está crescendo rapidamente, todavia, revisões abrangentes não estão disponíveis. A intenção do presente estudo é preencher esta lacuna, considerando a formação, crescimento e solubilidade da hidroxiapatita na presença de sais de gálio, a

incorporação do gálio dentro do tecido ósseo e o mecanismo de atividade terapêutica deste elemento.

Propriedades do Gálio

Gálio é um elemento traço metálico que é líquido próximo à temperatura ambiente, expande-se em estado sólido, e é encontrado como elemento traço no carvão, bauxita e outros minerais. É usado em tecnologia de semicondutores e como componente de várias ligas de baixo ponto de fusão. Principalmente trivalente em seus compostos, o íon Ga^{3+} é um ácido forte, assim liga-se fortemente às bases de Lewis fortes, particularmente a hidroxila OH^- . O cátion $[Ga(H_2O)_6]^{3+}$ pode atuar como doador de próton dando $[Ga(H_2O)_5(OH)]^{2+}$, $[Ga(H_2O)_4(OH)]^+$, etc. Com o aumento gradual do pH esta desprotonação das espécies mononucleares leva a precipitação do hidróxido e maior aumento do pH permitindo a formação de íon gallato $[Ga(OH)_4]^-$, conhecido também como tetrahidroxigallato³. Assim há dois íons contendo gálio adequados para os processos bioquímicos metabólicos: $[Ga(H_2O)_5(OH)]^{2+}$ no meio ácido fraco e $[Ga(OH)_4]^-$ soluções alcalinas de neutro a fraco. O primeiro pode ser encontrado e provavelmente absorvido no estômago, enquanto que o último é absorvido no duodeno devido ao bicarbonato presente. O raio iônico do Ga (III) em coordenação

Trabalho desenvolvido na Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

Endereço para correspondência: Cidade Universitária - Bairro Universitário - Caixa Postal 549, Campo Grande-MS / Brasil - CEP: 79070-900 - E-mail: petrmelnikov@yahoo.com

1. Professor Associado, Doutor, Faculdade de Medicina, UFMS.

2. Professor Assistente, Mestre, Faculdade de Medicina, UFMS.

3. Professora Associada, Doutora, Departamento de Física, UFMS.

Trabalho recebido em 02/10/06 aprovado em 09/04/06

tetraédrica é 61 pm e 76 pm em coordenação octaédrica, então é esperado ser um análogo do Fe(III) (69.0 pm) e Al(III) (67.5 pm), particularmente em combinação com fósforo. A afinidade do gálio para este elemento é tão alta que fosfatos de gálio estão entre os mais estáveis compostos⁽⁴⁾.

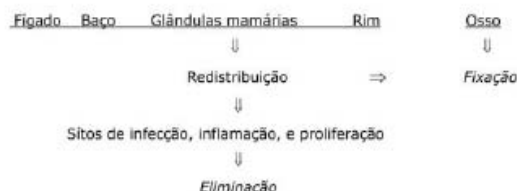
O principal interesse clínico deriva da observação que propriedades metabólicas do gálio são similares aquelas do ferro. Junto com raios iônicos comparáveis, ambos os elementos mostram quase a mesma capacidade de ligação com quelato e proteína. Os mais importantes carregadores do ferro, transferrina e lactoferrina, não distinguem gálio do ferro, portanto todo gálio no sangue está presente no plasma na forma de complexos com estas proteínas.

Sob circunstâncias normais, cerca de um terço das cavidades de transferrina que ligam o ferro são preenchidas, e um grande número de sítios não ocupados estão disponíveis para ligação com o gálio; eles correspondem a 2.7 mg/ml Ga^{3+} , que é um valor considerável⁽⁵⁾. Lactoferrina apresenta afinidade mais alta com o gálio e pode ligar este elemento depois de ser removido do complexo com transferrina. Seu precursor, apolactoferrina (não contendo átomo metal), que possui atividade antibacteriana, está concentrada em muitas secreções epiteliais como leite, fluido seminal, lágrima e secreção nasal. Foi também observado que o Gálio concentra-se em focos de inflamação e infecção particularmente nos neutrófilos granulados e leucócitos polimorfonucleares⁽⁶⁾.

Uma vasta literatura agora compartilha o conceito que o complexo ferro (gálio)-transferrina é internalizado pelo processo da endocitose, receptor-mediado. A oxiredutase da membrana plasmática reduz o ferro ligado a transferrina do estado de Fe^{3+} para Fe^{2+} , diretamente ou indiretamente facilitando a remoção do ferro da proteína. Como o gálio não existe no estado de Valência 2^{+} , ele não pode seguir o caminho do ferro na célula. A única suposição concebível é a formação do íon pentahidroxioxigálio $[Ga(H_2O)_5(OH)]^{2+}$, que formalmente tem a mesma carga 2^{+} semelhante ao ferro bivalente e portanto poderia imitar a maneira de transportar dos íons Fe^{2+} . Os grupos incorporados para manter a coordenação octaédrica do gálio (H_2O , OH), em princípio, não representam impedimentos estruturais para sua capacidade reativa. Até mesmo, quando se trata dos processos de redox celular, principalmente, por exemplo, no caso da hemoglobina e citocromas, o gálio não entra no eritrócito nem participa do processo de transporte de oxigênio⁽⁷⁾.

Uma vez dentro do citoplasma celular, o gálio parece estar ligado pelas ferritinas, grandes proteínas que apresenta uma variação específica em respeito aos tecidos, dependendo da combinação de suas subunidades. A maior parte da ferritina está concentrada nas células de Kupfer no fígado. Os agregados das moléculas de ferritina com o tempo formam clusters, os quais são degradados após terem sido fagocitados pelos lisossomos. O produto final deste processo, a hemosiderina, é um aglomerado amorfo de proteína desnaturada e lipídeos com intercalações do hidróxido de gálio e seus polímeros. Pouco é conhecido como o gálio é liberado da ferritina para ser usado. Em todo caso, elemento metabolicamente inativo armazenado em ferritina e hemosiderina está em equilíbrio com o gálio intercambiável circulando no plasma e ligado a moléculas carregadoras de baixo peso molecular.

A distribuição primária e secundária do gálio nos tecidos foi estudada usando isótopos ^{67}Ga e ^{72}Ga como marcadores radiativos. Os resultados estão resumidos no seguinte esquema:



Apesar de que estes dados não são inteiramente convincentes, todos os estudos da distribuição do gálio mostram que o elemento concentra-se no mesmo local do tecido independente da dose, com certa proporção é excretado na urina e retido pelo osso. Gálio se acumula intensamente nos focos de infecção e inflamação, incluindo aqueles de origem granulomatosa e sinovites associadas com artrite reumatóide. Foi mostrado que o elemento se concentra na maioria dos tumores onde o receptor da transferrina está expresso em grande quantidade⁽⁸⁾.

Gálio no Osso

Mesmo que o osso seja conhecido como local de concentração do gálio, a cinética^(9,10), o sítio e efeitos da acumulação do gálio neste tecido estão longe do entendimento prático. O uso do microscópio de raios-X com radiação *synchrotron* permitiu mapear a distribuição dos níveis traços do gálio depois da curta aplicação *in vivo* de nitrato de gálio em ratos. As quantidades traços (nanograma) do gálio foram encontradas em regiões metabolicamente ativas, bem como na superfície endosteal e periosteal da diáfise óssea, regiões onde ocorrem nova formação e remodelação óssea. As menores concentrações de gálio foram observadas nas áreas com número de células relativamente baixos, nas regiões médio corticais metabolicamente inativas. A quantidade de gálio acumulada nos implantes óssea após serem expostos a esse elemento *in vitro* foi muito maior do que os níveis atingidos depois da aplicação *in vivo*. Assim poderia se pensar que a nova matriz óssea que está se formando tem grande capacidade para acumular gálio⁽¹⁰⁾. Depois da aplicação em período curto (14 dias) em ratos, nitrato de gálio induziu mudanças quantitativamente mensuráveis nas propriedades minerais do osso. Usando a técnica de absorção atômica, foi confirmado que o gálio em baixas concentrações acumula-se preferencialmente nas regiões de formação ativa do osso, 0.54 $\mu g/mg$ de osso na metafase versus 0.21 $\mu g/mg$ de osso na diáfise, $P < 0.001$. Nos ossos dos animais do grupo controle o gálio não foi encontrado em quantidades detectáveis, mesmo quando a quantidade de osso usada foi dez vezes maior em comparação com as mais baixas doses de nitrato de gálio⁽¹¹⁾. Recente estudo usando fluorescência de raios-X e sua emissão induzida pelos prótons confirmou estas observações mostrando que o gálio está depositado em componentes orgânico e inorgânico da célula. O acúmulo do elemento na matriz orgânica indica que o mecanismo de ação do gálio é provável mais complexo do que sugerido pela idéia simplista de mera incorporação do íon dentro da rede cristalina⁽¹²⁾.

Gálio e Hidroxiapatita

O maior equívoco em relação ao osso é a idéia que ele é composto de hidroxiapatita estequiométrica (HA), enquanto não há clara evidência qual é a verdadeira estrutura do fosfato de cálcio presente no osso vivo. Esse contém uma grande população de células em contato íntimo com a matriz mineralizada, que os rodeia e há uma constante troca de compostos através do tecido. Diferente da pérola, o osso é uma estrutura viva, que está em processo permanente de mudança, que deve ser visto da mesma maneira como o fígado ou cérebro⁽¹³⁾.

Todavia, pesquisadores ainda dão preferência para o modelo apatita porque ela parece ser a mais adequada aproximação à realidade. Foi mostrado que vários íons metálicos causadores de doenças ósseas interagem com HA. No que se referem ao uso do gálio, amplos estudos utilizando difração de raios-X mostraram que há significantes mudanças das propriedades do cristal, na região metafásica do osso de ratos tratados. Estas mudanças, avaliadas pela agudização da reflexão 002 do eixo C, indicaram que um aumento no tamanho do cristal e/ou perfeição ao longo do mais extenso eixo dos cristallitos da HA tinham ocorrido em ossos tratados. O fato que tais mudanças foram observadas nas regiões de formação ativa do osso, onde foram encontradas as maiores concentrações de gálio, fazendo supor que ele pode ser a causa das transformações

observadas⁽¹¹⁾. Por outro lado, experimentos *in vitro* mostraram que o gálio atrasa a formação de HA e/ou aumento da cinética de modo dose relacionada, dando origem aos cristais de maior perfeição. Também, em experimentos de adsorção, o gálio diminuiu a cinética de dissolução da HA comparado com grupo controle sem gálio. O mecanismo avançado – uma significante adsorção do gálio no processo de formação e crescimento nos núcleos de HA, assim como na superfície dos seus cristais – acredita-se ser responsável pelo efeito do elemento na proliferação e solubilidade⁽¹⁴⁾. A relação entre gálio e fases contendo fosfato foi estudada incorporando o elemento dentro da medula óssea na cultura de célula estroma dos ratos. A fase dominante desta cultura está constituída de HA com baixa cristalinidade. Foi visto que a substituição do Ca^{2+} pelo Ga^{3+} produz um ambiente local mais distorcido em comparação com a situação quando o Ca^{2+} está substituído pelo Sr^{2+} . A coordenação dos átomos de gálio na parte mineral da cultura celular foi ao Ca^{2+} substituído pelo Ga^{3+} , na bruxita sintética Ga-dopada, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Substituição do Ca^{2+} distorce localmente a configuração tipo bruxita devido ao raio iônico do gálio substancialmente menor. Esta substituição não permite que ocorra a transformação da fase depositada inicialmente em HA, inibindo o crescimento. Suplementação de gálio nos últimos estágios de mineralização não influencia o ambiente local do gálio depositado e seus íons parecem estar frouxamente ligados à superfície dos cristais de HA⁽¹⁵⁾. Em conclusão, foi mostrado que o gálio atua como um inibidor na mineralização óssea *in vitro*. Dois mecanismos diferentes de sua interação com a parte mineral óssea podem ser diferenciados: (1) substituição do Ca^{2+} e (2) incompatibilidade com a rede cristalina da apatita, com uma possível adsorção na superfície dos seus cristais^(14,15). Estes dados também foram confirmados pela influência do gálio sobre o crescimento das HA semeadas⁽¹⁶⁾. Estes resultados *in vitro* explicam parcialmente a ação do gálio *in vivo* no tratamento da hipercalemia pela diminuição da solubilidade da apatita óssea. Determinações do gálio nas frações do osso metafisário foram separadas conforme as densidades, sendo confirmadas que todas as partículas incluindo recém formadas (menos densas) e as partículas maduras (mais densas) sofreram a mesma exposição ao gálio, já que a proporção Ga/Ca foi a mesma nos dois casos. A densidade específica média teve discreto deslocamento para a direita nas curvas (maior densidade), o que faz supor um maior conteúdo de Ca pela unidade do osso, indicando que maiores quantidades de Ca foram preservadas ou acumuladas^(17,18).

Gálio e as Doenças Ósseas

Gálio parece ser um agente que atua unicamente no tratamento de doenças reabsorptivas do osso, reduzindo perda óssea acelerada em pacientes com câncer e doença osteometabólica. Tem ganhado maior confiança o conceito de usar certas medidas terapêuticas como adjuvantes ao tratamento tradicional anticâncer para fortalecimento do tecido ósseo frente à erosão devida às metástases. No resultado perfeito, tais medidas deveriam não só minimizar perda óssea progressiva, mas também restituir osso previamente erodido, por exemplo, em ortopedia. Outras drogas, tais como bifosfonatos, flúor e calcitonina, têm sido previamente propostas para este uso⁽¹⁹⁾.

A situação clínica associada com a mais rápida perda de cálcio do tecido ósseo é a hipercalemia relacionada com o câncer. Nesta desordem, fatores procedentes das células cancerígenas provocam um marcante aumento na absorção óssea pelos osteoclastos. O cálcio sai do osso tão rapidamente que sobrecarrega a capacidade excretora renal. Foi mostrado que baixas doses de nitrato de gálio poderiam ser usadas com sucesso na prevenção de osteólise em mieloma múltiplo. Pacientes foram tratados com nitrato de gálio por 6 meses, administrado em ciclos mensais com injeções subcutâneas diariamente durante duas semanas, com uma suplementação de infusão intravenosa por 5 dias nos meses alternados. Cálcio total diminuiu em 4 dos 7 pacientes observados, mas aumentou em 9 dos 13 pacientes durante o tratamento com gálio. O índice médio das fraturas vertebrais no grupo avaliado nas radiografias em perfil

da coluna diminuiu 27% durante a observação, comparada com 2% durante tratamento com nitrato de gálio. Concluiu-se que o tratamento adjuvante com nitrato de gálio abaixou a velocidade de perda óssea em mieloma múltiplo e pode ser útil para amenizar as consequências da morbidade esquelética em pacientes com osteólise relacionada com câncer⁽²⁰⁾. Enquanto o mecanismo envolvido parece que nitrato de gálio impede a reabsorção óssea inibindo a proteína relacionada com o hormônio da partireólise⁽²⁰⁾.

A doença de Paget é um dos casos mais bem sucedidos de aplicação do gálio na terapia. Esta enfermidade também pode ser considerada como uma condição multifacetária da desordem osteometabólica. Ela pode ser definida como remodelamento anormal do osso, por exemplo, uma constante renovação óssea ou reciclagem, sem mudanças no tamanho e na forma do osso. Alteração do processo de remodelação do osso muda a textura óssea e dá origem a quatro fases da doença observadas radiologicamente: osteolítica, mista, osteoblástica e fase osteoesclerótica inativa, a qual é caracterizada pela atividade óssea normal ou diminuída. Na doença de Paget a alteração da remodelação contribui para expansão do osso que leva a estenose espinhal⁽²¹⁾. A ação do nitrato de gálio parece ser seguro e prolongado, mesmo que a duração da resposta varie de 6 a 42 semanas. O tratamento reduz significativamente os níveis séricos de fosfatase alcalina e a excreção de hidroxiprolina urinária. Uma queda na hidroxiprolina precede a supressão de fosfatase alcalina, sugerindo que a supressão da reabsorção óssea osteoclástica (hidroxiprolina diminuída) leve a formação óssea pelos osteoblastos (fosfatase alcalina diminuída). A eficácia do tratamento é proporcional à dose da droga administrada. A resposta do tratamento endovenoso foi mais evidente do que a injeção subcutânea⁽²²⁾.

A destruição óssea é a característica básica do mieloma múltiplo, com 70% a 80% dos pacientes manifestando envolvimento ósseo. Em séries com grande número de participantes, cerca de um a dois terços dos pacientes com mieloma múltiplo apresentam dor óssea no momento do diagnóstico. Radiografias rotineiras do esqueleto mostram anormalidades em aproximadamente 80% dos pacientes, incluindo fraturas, osteopenia, lesões líticas ou uma combinação destas. Gálio atua controlando ou revertendo a osteólise produzido pelo mieloma múltiplo e reduzindo hipercalemia. No estudo piloto randomizado envolvendo 14 pacientes com mieloma múltiplo, acompanhados até seis meses, o nitrato de gálio foi administrado por via subcutânea notando melhora na dor óssea e estabilizando a densidade óssea no grupo tratado^(23,24). A interpretação destes resultados deve ser feita com certa reserva: Mesmo o estudo sendo desenhado usando uma metodologia sofisticada e randomização, o tamanho da amostra nesta investigação foi pequena. A outra dificuldade é que a investigação não foi placebo controlada, visto que foi considerado duvidoso se 6 meses de injeção parenteral placebo poderia ser justificado⁽²⁵⁾. Também, em recente análise retrospectiva, pacientes com avançado mieloma múltiplo tratado com protocolo de quimioterapia M-2 mais nitrato de gálio tinham acentuado aumento da média de sobrevida em comparação com pacientes similares tratados com quimioterapia M-2 isoladamente⁽²⁴⁾.

Depois de uma série de mudanças nos direitos de propriedade comercial e um período em que a droga não foi disponível comercialmente, nitrato de gálio (Ganite, manufactured for Genta, Inc, Berkeley Heights, New Jersey) deve ser valiosa alternativa na opção de tratamento para uma variedade de doenças ósseas. Já que o perfil tóxico do nitrato de gálio não conflita com o dos agentes mais novos, sua avaliação merece ser feita em combinação com eles⁽²⁵⁾.

Devido aos esforços de muitos laboratórios e pesquisadores tem-se acumulado evidência que o gálio tem uma participação relevante no metabolismo ósseo. Apesar do progresso considerado, ainda mais deve ser esclarecido. Maior conhecimento dos mecanismos envolvidos pode fornecer idéias para estratégias terapêuticas, com o objetivo de diminuir perda óssea em ortopedia, traumatologia e condições patológicas relacionadas com câncer. Também são esperados o desenvolvimento e triagem de testes clínicos dos novos compostos do gálio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zigler JE, Boden S, Anderson PA, Bridwell K, Vacarro A. What's new in spine surgery? *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84:1282-8.
2. Blumenthal NC, Cosma V. The effect of aluminum and gallium ions on the mineralization process. *Bull Hosp Jt Dis Orthop Inst.* 1989; 49:192-203.
3. Greenwood NN, Earnshaw A. Chemistry of the elements, 2nd ed. Oxford: Butterford & Heinemann; 1985.
4. Melnikov PP, Efremov VA, Stepanov AK, Komissarova LN, Romanova TS. Gallium phosphates. *J Inorg Chem.* 1996; 21:46-50.
5. Brittenham GM. Disorders of iron metabolism. In: Hoffman R. Hematology: basic principles and practice. New York: Churchill Livingstone; 1991.
6. Bernstein LR. Mechanisms of therapeutic activity for gallium. *Pharmacol Rev.* 1998; 50:665-72.
7. Logan KJ, Ng PK, Turner CJ, Schmidt R, Scott JR. Comparative pharmacokinetics of ⁶⁷Ga and ⁵⁹Fe in humans. *Int J Nucl Med Biol.* 1981; 8: 271-8.
8. Dudley HC, Maddox GE, La Rue HC. Studies of the metabolism of gallium. *J Pharmacol Exp Ther.* 1949; 96:135-9.
9. Dudley HC, Maddox GE. Deposition of radiogallium (⁷²Ga) in skeletal tissue. *J Pharmacol Exp Ther.* 1949; 96:224-7.
10. Bockman RS, Repo MA, Warrell RP, Pounds JG, Schidlovsky G, Gordon BM. Distribution of trace levels of therapeutic gallium in bone as mapped by synchrotron X-ray microscopy. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87:4149-53.
11. Bockman RS, Boskey AL, Blumenthal NC, Alcock NW, Warrel RP. Gallium increases bone calcium and crystallite perfection of hydroxiapatite. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93:376-81.
12. Rokita E, Korbac M, Mutsaers PHA, Taton G, Voigt MJA. Micro-PIXE studies of gallium incorporation in mineralized tissue. *Nucl Inst Methods in Physics Research, Section B: Beam interactions with materials and atoms.* 2001; 181:529-32.
13. Williams RJP, Da Silva JRRF. New trends in bioinorganic chemistry. London: Academic Press; 1978.
14. Blumenthal NC, Cosma V, Levine S. Effect of gallium on the in vitro formation, growth and solubility of hydroxiapatite. *Calcif Tissue Int.* 1989; 45:61-7.
15. Korbac M, Rokita E, Mayer-Klaucke W, Ryzek J. Bone tissue incorporates in vitro gallium with a local structure similar to gallium-doped brushite. *J Biol Inorg Chem.* 2004; 9:67-76.
16. Donnelly R, Boskey A. The effect of gallium on seeded hydroxiapatite growth. *Calcif Tissue Int.* 1989; 44:138-42.
17. Repo MA, Bockman RS, Betts F, Boskey AL, Alcock NW, Warrel RP Jr. Effect of gallium on bone mineral properties. *Calcif Tissue Int.* 1988; 43: 300-6.
18. Bockman R. The effects of gallium nitrate on bone resorption. *Semin Oncol.* 2003; 30:5-12.
19. Warrel RP Jr. Gallium for treatment of bone diseases. In: Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids – Bioinorganic medicine. New York: Marcel Dekker. 1995; p.1253-65.
20. Warrel RP, Lovett D, Dilmanian FA, Schneider R, Heelan RT. Low-dose gallium nitrate for prevention of osteolysis in myeloma: result of a pilot randomized study. *J Clin Oncol.* 1993; 11:2443-50.