

Introdução

A ciprofloxacina (CFX), uma fluoroquinolona extensamente usada em infecções bacterianas, tem sido relacionado a episódios de tendinite e ruptura do tendão calcâneo (TC). A droga é conhecida por afetar o metabolismo dos tenócitos (fibroblastos), causando problemas na síntese de colágeno e aumento na degradação da matriz extracelular (MEC). Shakibaei e Stahlmann (2003), observaram que ratos tratados com CFX apresentaram TC com fibras de colágeno mais delgadas e com maior espaçamento. Essa modificação na montagem e no arranjo do colágeno é prejudicial para as propriedades biomecânicas do tendão.

A ordem molecular nas fibras de colágeno tem um significado importante nas propriedades biomecânicas do tendão, como a resistência, e medidas de retardo óptico (RO) e birrefringência de forma (B_f) e intrínseca (B_i) podem ser usadas para quantificar a ordem molecular nessas fibras.

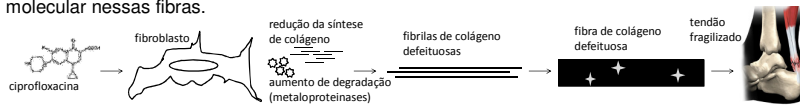


Figura 2. O uso de ciprofloxacina afeta o metabolismo de fibroblastos, levando à formação de fibras de colágeno defeituosas, resultando na fragilidade do tendão, os quais ficam mais susceptíveis à injúrias.

Resultados e Discussão

Tabela 1. Valores de RO medidos em meios com índices de refração (n) crescentes; s: desvio padrão.

Meio	n	RO (nm)				
		Controle (s)	30 (s)	240 (s)	500 (s)	
Água	1.333	48.91 (3.37)	45.22 (2.96)	44.95 (2.01)	43.38 (3.93)	
Glicerol 20%	1.360	37.33 (2.31)	35.87 (2.40)	34.74 (2.05)	33.74 (3.52)	
Glicerol 40%	1.386	29.76 (2.12)	28.47 (2.33)	26.71 (1.64)	25.52 (2.35)	
Glicerol 60%	1.413	24.43 (2.27)	20.69 (2.09)	19.77 (1.41)	18.82 (1.74)	
Glicerol 80%	1.435	17.74 (1.61)	17.05 (1.91)	16.17 (1.30)	15.6 (1.50)	
Nujol	1.471	14.11 (2.01)	10.22 (1.72)	9.41 (1.26)	9.14 (1.15)	
Nujol*	1.479	28.05 (2.50)	22.29 (2.68)	21.96 (1.65)	21.24 (2.31)	

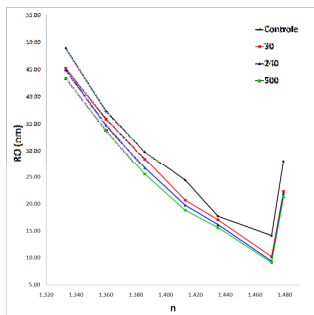


Figura 3. Curvas de B_f para grupos controle e tratados. Não se observam alterações significativas no padrão das curvas. Reduções nas médias de RO evidenciam uma redução na ordem molecular das fibras de colágeno. Cada ponto da curva corresponde à média aritmética (Tabela 1) de 50 medidas.

A matriz dos tendões não apresentaram alterações morfológicas visíveis ao microscópio de luz, comparando grupo controle com os tratados. Os dados da Tabela 1, contudo, mostram o decréscimo nos valores de RO com o aumento da dose de CFX. A diferença entre medidas de RO (em água) para os grupos tratados, comparando-os com controle é significativa ($p < 0.001$). Comparando grupos tratados em pares, o mesmo aconteceu, exceto para a comparação "30 vs 240" ($p = 0.37$). Isso indica que a CFX causa mudanças na distribuição de valores de RO, contudo, parece incerta a diferença de influência das doses mais baixas, do ponto de vista estatístico.

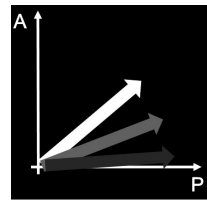
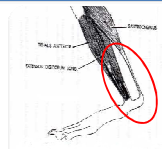


Figura 1. Objeto perfeitamente birrefringente posicionado a 45° entre o polarizador (P) e o analisador (A) exibe brilho máximo; quando paralelo ao polarizador, não há brilho – posição de extinção

Materiais e métodos



12 Ratos Wistar (12 semanas) tratados via oral com CFX, 7 dias, 4 grupos:
• Controle: recebendo veículo
• 30: 30 mg/kg b wt
• 240: 240 mg/kg b wt
• 500: 500 mg/kg b wt



Tendão calcâneo
• Extração
• Fixação em paraformaldeído 4% pH 7.4
• Inclusão em parafina
• Uso de cortes com 7 µm
• Desparafinização



Análise por microscopia de polarização (medidas de RO)
• Sem uso de corantes
• Uso de filtro de luz para 546nm
• Uso de meios com índice de refração crescente (n)
• Compensadores Sénarmont eBírcie-Köhler

Os ratos (3 animais por grupo) foram tratados via oral com volumes de 10ml/kg b wt (quilograma de massa corporal) com concentrações crescentes de CFX diluída em solução de amido de milho a 2% (veículo). Os TC foram extraídos e fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.05 M pH 7.4.

Cortes em parafina com 7 µm de espessura foram embebidos em meios com índices de refração (n) crescentes: água destilada, soluções de 20% a 80% de glicerol em água, glicerol e óleo mineral (Nujol®). Foram tomadas medidas de RO para a construção de curvas de B_f .

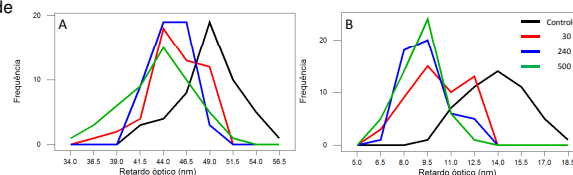


Figura 4. Distribuição dos valores de RO. **A:** Birrefringência total (medida em água), representando a contribuição dos elementos da MEC para B_f e B_i . **B:** B_f (medida em glicerol) representando, basicamente, a contribuição das transições eletrônicas nas moléculas de colágeno.

A curva de B_f confirma a queda na birrefringência, causada pela administração de CFX, mas, como a forma das curvas não foi severamente afetada, pode-se dizer que a concentração de colágeno no tecido não foi alterada significativamente, apesar de ter havido diminuição na agregação e na supraorganização das fibras de colágeno.

Diferenças na distribuição de RO (Fig. 4) são mais proeminentes para o grupo 500 (verde) com grande redução no desvio padrão (s), comparando birrefringência total ($s = 3.97$) e intrínseca ($s = 1.15$ nm). Isso pode indicar que doses altas de CFX afetam o tenócito de maneira homogênea, causando um tipo de erro característico na formação das fibras de colágeno e/ou na degradação da MEC. Contudo, doses baixas também são capazes de causar alterações nos estados de agregação das fibras de colágeno.

Com perdas na ordem molecular da matriz colagênica, pode também haver perda nas propriedades mecânicas do tecido, o que justifica a ocorrência de dor e ruptura do tendão calcâneo. Ainda, como as fibras de colágeno agem como transdutores de informação para os fibroblastos, também podem ocorrer problemas relacionados com sinalização biomecânica para as células.

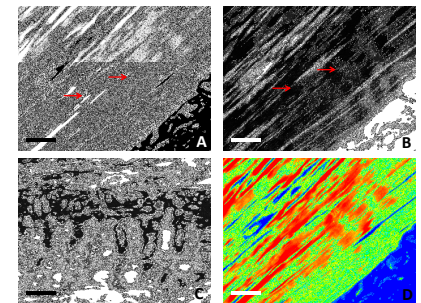


Figura 5. Birrefringência (BR) do tendão calcâneo com longo eixo posicionado a 45° do polarizador (A, B, D). Fibras de colágeno paralelas ao longo eixo do tendão exibem BR máxima (maior brilho). B: Compensação (seta) da BR para medida de RO. C: Tendão posicionado paralelamente ao polarizador, em posição de extinção para as fibras de colágeno; aparecem, contudo, fibras não paralelas ao longo eixo do tendão (brilhantes) D: Imagem com código de cor para BR mostrando a variação de brilho ao longo do eixo do tendão; essa variação mostra que as fibras de colágeno tem orientações diferentes. O gradiente de cor usa 0 para ausência de brilho e 255 para brilho máximo. Barra: 50 µm.

Conclusão

O uso de CFX pode reduzir significativamente a ordem molecular das fibras de colágeno em tendões calcâneo, devido a falhas na síntese de colágeno e proteoglicanos e ao aumento na degradação da MEC. Essas alterações parecem ser dose dependentes.

Perdas na ordem molecular das fibras de colágeno podem prejudicar a sinalização na MEC, causando problemas na resposta dos fibroblastos mediante aos estímulos, justificando problemas biomecânicos relatados para o tendão calcâneo.