

REUMATO

MINAS

ISSN 2675-0902
Ano 5 • N.º 2 • 2023

revisão

Pesquisa de cristais no líquido sinovial e implicações clínicas

Joaquim Vasques
Ricardo Fuller
Murillo Dório

atualização

Como acertar mais diagnosticando espondiloartrites axiais

Gustavo Resende

Pesquisa de cristais no líquido sinovial e implicações clínicas

Joaquim Vasques

Médico Residente de Reumatologia do HC-FMUSP

Ricardo Fuller

Reumatologista Assistente Doutor Responsável pelo Ambulatório de Artrites Microcristalinas do HC-FMUSP; Membro da Comissão de Artrites Microcristalinas da SBR

Murillo Dório

Reumatologista Assistente Doutor do Ambulatório de Artrites Microcristalinas do HC-FMUSP, do Hospital Sírio-Libanês e da Imuno Brasil; Membro da Comissão de Artrites Microcristalinas da SBR

Introdução

Cristais são sólidos constituídos a partir de átomos ou moléculas arranjados em um padrão tridimensional bem definido. Diferentes cristais podem se formar em tecidos intra-articulares, periarticulares e extra-articulares e gerar doenças por diversos mecanismos.^{1,2} Na prática da reumatologia, as doenças microcristalinas (causadas por depósito de cristais) mais frequentes são a gota (causada por depósito de cristais de urato monossódico), a doença por deposição de pirofosfato de cálcio (DDPC) e a doença por deposição de fosfato básico de cálcio (DDFBC).

Na gota, os altos níveis séricos de ácido úrico causam altas concentrações teciduais de urato que cristalizam com íons de sódio, gerando cristais de urato monossódico. O depósito desses cristais na sinóvia gera episódios agudos de artrite, cuja repetição causa destruição

articular e artrite crônica. Esses cristais também podem se depositar no tecido subcutâneo, dando origem aos tofos gotosos, e nos rins, causando cálculos.²

A DDPC pode se manifestar mais frequentemente por ataques agudos semelhantes aos da gota (pseudogota) ou como uma poliartrite crônica (pseudo-artrite reumatoide). Acredita-se, porém, que a manifestação mais comum do depósito desse cristal seja a sua associação com a osteoartrite, com ou sem ataques agudos, e com acometimento frequente de articulações não envolvidas na osteoartrite idiopática, como punhos, metacarpofalângicas e grandes articulações, como ombros e quadris. Na radiografia, o achado característico (embora não exclusivo) dessa doença é a condrocalcinose, caracterizada por calcificação da cartilagem articular, sendo frequentemente observada



Na gota, o achado de cristais de urato monossódico no líquido sinovial de pacientes com pelo menos um episódio de artrite periférica ou bursite é suficiente para o diagnóstico dessa doença, mesmo que a coleta tenha sido realizada fora da crise de gota

na cartilagem e nos meniscos dos joelhos, na fibrocartilagem triangular do punho e na sínfise púbica.¹

Os cristais de fosfato de cálcio básico podem se depositar em tecidos intra-articulares, causando artropatias destrutivas como a síndrome do ombro de Milwaukee, ou em tecidos periarticulares, como é o caso da periartrite calcífica, mais comum no ombro.¹

A identificação dessas doenças passa pela execução de uma boa anamnese, um bom exame físico e pela correta interpretação de exames de imagem e bioquímica sérica. Ademais, continua fundamental para um diagnóstico correto a caracterização desses cristais no líquido sinovial e em tecidos periarticulares. No entanto, a importância da identificação dos cristais esbarra em dificuldades para sua execução, como a escassez de laboratórios e de profissionais capacitados para análise, além de baixa reprodutibilidade e de sensibilidade e especificidade limitadas.³

Formação dos cristais

O ácido úrico é um ácido fraco, com pKa de 5,75. Esse valor significa que em um meio de pH acima de 5,75 a molécula tende a permanecer na forma

ionizada (urato), enquanto em meios com pH abaixo desse valor a forma mais comum será a não ionizada (ácido úrico). No pH da maior parte dos fluidos humanos (7,4) a concentração de íons urato é cerca de 50 vezes maior que a de ácido úrico não ionizado. Já na urina, com seu pH mais ácido, essa relação se inverte e o ácido úrico não ionizado predomina em comparação ao íon urato.

O íon urato (com sua carga negativa) pode então complexar com o sódio, íon de carga positiva de maior concentração no meio extracelular, formando o cristal de urato monossódico. A solubilidade desse cristal dependerá da temperatura, do pH do meio e da concentração de íons urato e íons sódio. Em testes *in vitro* com pH de 7,0 e temperatura de 37 °C, observa-se cristalização de urato monossódico a partir de concentrações de urato de 6,8 mg/dL. Em temperatura de 36,0 °C a cristalização ocorre com concentrações de urato a partir de 6 mg/dL.² A redução da solubilidade em temperaturas mais baixas é um dos mecanismos propostos para maior formação do cristal em certos locais, como a primeira metatarsal-falângica, médio pé e tendão de Aquiles, já que são porções mais distais e, portanto, mais frias do corpo.

Esses cristais de urato monossódico podem então ser reconhecidos por células da imunidade inata como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), iniciado uma intensa reação inflamatória.

Na DDPC os cristais são o produto da cristalização de íons cálcio e íons pirofosfato. O fato de esses cristais serem encontrados quase exclusivamente em fibrocartilagens e cartilagens hialinas sugere a influência de fatores específicos desses tecidos na formação desses cristais, mas ainda se desconhece sobre esse processo. Componentes da matriz extracelular e enzimas expressas na membrana de condrócitos da cartilagem articular parecem aumentar a concentração de íons pirofosfato e gerar um *milieu* químico que favorece a cristalização com o cálcio. Doenças metabólicas como hemocromatose, hiperparatireoidismo e hipofosfatase são associadas a DDPC. Também são descritas mutações genéticas raras que causam formas precoces dessa doença.⁴

Os cristais de fosfato de cálcio básico incluem o fosfato octacálcico ($\text{Ca}_8\text{H}_2[\text{PO}_4]_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), o fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$) e a hidroxiapatita de cálcio ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sendo esta última a que mais frequentemente se cristaliza nos tecidos. O mecanismo da formação desses cristais é pouco conhecido, mas é notável a associação com trauma e isquemia, de forma que os mecanismos propostos para a formação desses cristais de cálcio são atrelados à lesão tecidual. Isso explica em parte a alta prevalência desses cristais em regiões pouco vascularizadas do tendão do músculo supraespinhoso e na cartilagem articular de articulações com osteoartrite avançada. Nessas situações, os cristais também funcionam como indutores de reação inflamatória, gerando mais lesão tecidual.¹

Identificação dos cristais na prática

Em casos suspeitos de artropatia por cristais, a sua identificação no líquido sinovial é uma ferramenta muito útil na definição diagnóstica. Dessa forma, o reumatologista deve ser capaz de realizar a coleta e de conhecer os princípios por trás da identificação dos cristais.

Coleta

A coleta é feita por meio da artrocentese diagnóstica realizada com técnica asséptica da articulação acometida. A maioria dos laboratórios exige um volume mínimo de 1 mL de líquido sinovial para identificação de cristais. Esse volume deve ser acondicionado em tubo de coleta com anticoagulante (heparina, citrato ou EDTA). Idealmente, a amostra é

analisada a fresco dentro de 24 horas da coleta, mas períodos de até 72 horas parecem não prejudicar a pesquisa de cristais. Caso antecipe-se que o intervalo entre a coleta e a análise da amostra seja superior a um dia, é interessante manter a amostra refrigerada entre 4 °C e 8 °C.⁵

Técnicas para identificação do cristal

Microscopia óptica simples

O líquido sinovial pode ser analisado em um microscópio simples para a pesquisa de cristais. Nesse caso, a identificação do cristal será pela morfologia. Classicamente, cristais de urato monossódico possuem formato de agulha (apiculado nas duas extremidades), enquanto os cristais de pirofosfato de cálcio são romboides. No entanto, eventualmente os cristais assumem morfologia diferente, assim como outras substâncias podem ter formatos similares, de forma que a microscopia óptica isoladamente pode não ter sensibilidade e especificidade suficientes.⁶

Através da microscopia óptica simples não se consegue observar cristais de fosfato de cálcio básico uma vez que eles têm tamanhos muito pequenos (abaixo da resolução da microscopia óptica), sendo necessário o uso de corantes, como o vermelho de alizarina. Esse corante marca sais contendo cálcio com uma coloração alaranjada. No entanto, o vermelho de alizarina não é capaz de diferenciar cristais de hidroxiapatita dos outros cristais de fosfato de cálcio básico, já que todos contêm cálcio em suas estruturas.⁶

Microscopia óptica com luz polarizada

A luz é uma onda eletromagnética com diversas propriedades físicas, sendo uma delas a direção de vibração da onda. Fontes luminosas produzem o feixe de luz com vibração de onda em todas as direções (luz não polarizada). Com a aplicação de um filtro, pode-se isolar somente uma direção de vibração (luz polarizada).

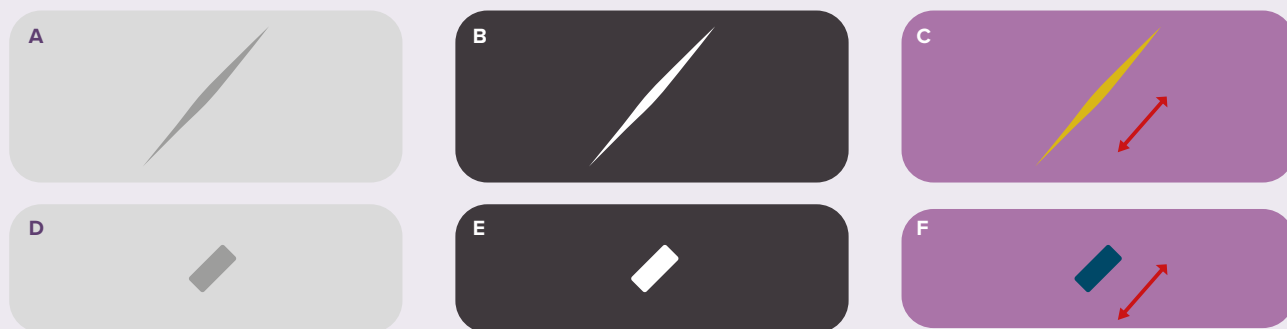
A estrutura básica de um microscópio de luz polarizada consiste na sobreposição de dois filtros polarizadores com eixos perpendiculares, sendo o primeiro denominado polarizador e o segundo analisador. Como os eixos dessas duas peças é perpendicular, a luz polarizada que emerge da primeira peça não consegue passar pela segunda, sendo então observado um fundo escuro no microscópio.⁷

Cristais são capazes de desviar a luz, uma propriedade conhecida como refração e medida

pelo índice de refração. Dessa forma, quando posicionamos um cristal entre o polarizador e o analisador, a luz muda de direção e consegue atravessar o analisador, de forma que o cristal exibe contraste com o fundo escuro do microscópio. Alguns cristais possuem a propriedade de ter dois índices de refração (birrefringência), sendo um para cada eixo da estrutura cristalina. Dessa forma, um feixe de luz polarizada é desviado de forma diferente a depender do seu alinhamento com o cristal birrefringente. À medida que esse cristal é girado no microscópio, mais ou menos luz atravessa o analisador, de forma que o brilho do cristal contra o fundo escuro vai do máximo ao mínimo (extinção). Se ao conjunto óptico acrescentamos um filtro de cor, denominado compensador, a interação do cristal birrefringente com o feixe de luz polarizada deixa de ser em relação ao brilho e passa a ser de adição ou subtração de cores. O compensador mais frequentemente utilizado transforma o fundo preto em magenta e o cristal birrefringente, a

depender da orientação em relação ao compensador, pode gerar luz azul ou amarela. Por convenção, um cristal birrefringente que gera luz azul quando paralelo ao eixo do compensador possui birrefringência positiva, enquanto um cristal birrefringente que gera luz amarela quando paralelo ao eixo do compensador possui birrefringência negativa.^{8,9}

Cristais de urato monossódico possuem forte birrefringência negativa, ou seja, brilham fortemente no microscópio de luz polarizada, emitem luz amarela quando alinhados ao eixo do compensador e luz azul quando perpendiculares ao eixo do compensador. Já os cristais de pirofosfato de cálcio possuem fraca birrefringência positiva, ou seja, brilham fracamente no microscópio de luz polarizada, emitem luz azul quando alinhados ao eixo do compensador e luz amarela quando perpendiculares ao eixo dessa peça. Cristais de fosfato de cálcio básico não possuem birrefringência⁶ (Figura 1 e Tabela 1).



Arquivo pessoal dos autores.

Figura 1. Representação esquemática de cristais de urato monossódico e de pirofosfato de cálcio: cristal de urato monossódico visualizado sob microscópio óptico simples (a), sob luz polarizada sem compensador (b) e sob luz polarizada com compensador (c), cristal de pirofosfato de cálcio visualizado sob microscópio óptico simples (d), sob luz polarizada sem compensador (e) e sob luz polarizada com compensador (f). A seta dupla em vermelho representa o eixo do compensador.

Tabela 1. Principais diferenças entre os cristais mais frequentes

Cristal	Tamanho e formato	Microscopia óptica simples	Luz polarizada com compensador	Quantidade no líquido sinovial	Intracelular
Urato monossódico		Formato de agulha	Forte birrefringência negativa	+++	+
Pirofosfato de cálcio		Romboide	Fraca birrefringência positiva	+	++
Fosfato básico de cálcio		Visualizado com vermelho de alizarina	Sem birrefringência	0/+	0/+

Arquivo pessoal dos autores.

Outras técnicas

A microscopia eletrônica é capaz de ampliar a imagem com riqueza de detalhes bem maior do que a microscopia óptica. Dessa forma, as características morfológicas de um cristal visualizado sob microscopia eletrônica são suficientes para a correta identificação desse cristal. Essa ferramenta é especialmente útil na diferenciação entre cristais de pirofosfato de cálcio e cristais de fosfato básico de cálcio. No entanto, a microscopia eletrônica é uma técnica cara, pouco disponível e com necessidade de operadores experientes para reconhecer as características morfológicas que definem um cristal.⁶

Outra técnica que também pode ser aplicada à identificação de cristais é a cristalografia de raios X. Nessa técnica, deduz-se a estrutura de um cristal a partir da interação não com a luz, mas com o raio X. Ao passar na estrutura cristalina, o raio X sofre diversos desvios, gerando padrões de difração muito específicos para cada cristal, de forma que o padrão de difração de um cristal em estudo pode ser comparado ao de cristais já conhecidos. É uma técnica pouco disponível na prática clínica e que pode não ser capaz de identificar cristais quando a quantidade de material é muito pequena.⁶

Implicações diagnósticas

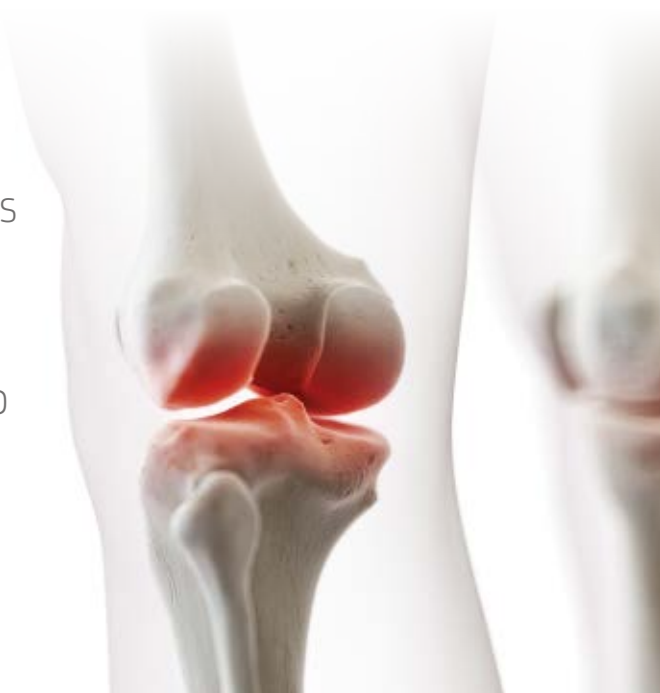
Na gota, o achado de cristais de urato monossódico no líquido sinovial de pacientes com pelo menos um episódio de artrite periférica ou bursite é suficiente para o diagnóstico dessa doença, mesmo que a coleta tenha sido realizada fora da crise de gota.¹⁰ A sensibilidade e especificidade desse

método é influenciada pela concentração de cristais no líquido sinovial e pela experiência do examinador. Examinadores experientes conseguem atingir sensibilidade de 95,3% e especificidade de 97,2%,¹¹ mas a sensibilidade pode cair até 69% entre examinadores menos experientes.¹² A presença de cristais de urato monossódico é utilizada como padrão-ouro na validação de outras ferramentas diagnósticas, como ultrassonografia e tomografia. Na ultrassonografia, achado de duplo contorno na cartilagem confere uma sensibilidade de 60,1% e especificidade de 91,3% para a identificação de cristais de urato monossódico, enquanto a tomografia de dupla energia apresenta sensibilidade entre 78%-100% e especificidade entre 76%-93%.³ A acurácia de ambos esses testes é superior nos pacientes com doença de longa data.

Na DDPC a capacidade de identificação de cristais é menor do que na gota, dado que os cristais de pirofosfato são menores e com birrefringência mais fraca e habitualmente estão em menor quantidade no líquido sinovial. Assim, a sensibilidade da microscopia com luz polarizada no diagnóstico da DDPC é de 82% e a especificidade de 78%.¹² Exames de imagem também podem ser utilizados no diagnóstico, com a ultrassonografia demonstrando sensibilidade de 89% e especificidade de 94%, mas com ampla variedade a depender da articulação e da estrutura avaliada.¹³

O achado de cristais de fosfato básico de cálcio no líquido sinovial é bastante desafiador, dado o mínimo tamanho desses cristais, a ausência de birrefringência e a falta de especificidade dos corantes, como vermelho de alizarina. Assim, o diagnóstico da DDFBC é feito na maioria das vezes pela clínica e por exames de imagem.¹

O achado de cristais de fosfato básico de cálcio no líquido sinovial é bastante desafiador, dado o mínimo tamanho desses cristais, a ausência de birrefringência e a falta de especificidade dos corantes, como vermelho de alizarina. Assim, o diagnóstico da DDFBC é feito na maioria das vezes pela clínica e por exames de imagem



Implicações terapêuticas

Considerando-se a fisiopatologia da gota, fica claro que o principal alvo terapêutico é reduzir o nível sérico e a quantidade de ácido úrico no corpo. Ao se controlar o nível sérico de ácido úrico, verifica-se uma redução de novas crises de artrite e da formação de novos tofos, bem como verifica-se a solubilização dos cristais já formados, com redução dos tofos estabelecidos.² A redução de ácido úrico sérico pode ser feita com medicações que reduzem a produção de ácido úrico, como o alopurinol ou com medicações que aumentam a excreção renal desta molécula, como a benzobromarona. Ambas são disponíveis no

Brasil e apresentam bom perfil de eficácia e segurança.¹⁴ No caso de nefrolitíase por ácido úrico, além da concentração urinária de ácido úrico, o pH urinário é um determinante importante na formação desses cristais. Dessa forma, a alcalinização da urina é uma ferramenta terapêutica interessante, podendo ser realizada com o uso do citrato de potássio ou bicarbonato de sódio, por exemplo.¹⁵

Já nas doenças por deposição de cristais de cálcio, ainda não há disponibilidade de medicações que ajam na dissolução dos cristais, de forma que o tratamento se baseia em medicamentos sintomáticos e na prevenção de crises.¹

Referências

1. McCarthy GM, Dunne A. Calcium crystal deposition diseases — beyond gout. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14:592-602.
2. Dalbeth N, Choi HK, Joosten LAB, Khanna PP, Matsuo H, Perez-Ruiz F, et al. Gout. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5.
3. Zell M, Zhang D, Fitzgerald J. Diagnostic advances in synovial fluid analysis and radiographic identification for crystalline arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2019;31: 134-43.
4. Williams CJ, Rosenthal AK. Pathogenesis of calcium pyrophosphate deposition disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2021;35:101718.
5. Tausche AK, Gehrisch S, Panzner I, Winzer M, Range U, Bornstein SR, et al. A 3-day delay in synovial fluid crystal identification did not hinder the reliable detection of monosodium urate and calcium pyrophosphate crystals. *Journal of Clinical Rheumatology*. 2013;19:241-5.
6. Rosenthal AK, Mandel N. Identification of Crystals in Synovial Fluids and Joint Tissues. *Curr Rheumatol Rep*. 2001;3:11-6.
7. Chayen J. Polarised light microscopy: Principles and practice for the rheumatologist. *Ann Rheum Dis*. 1983;42:64-7.
8. Lazarevic M, Skosey J, Vitic J, Mladenovic V, Myones B, Popovic J, et al. Cholesterol crystals in synovial and bursal fluid. *Semin Arthritis Rheum*. 1993;23:99-103.
9. Jansen TL, Rasker JJ. Therapeutic consequences of crystals in the synovial fluid: a review for clinicians. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29:1032-9.
10. Neogi T, Jansen TLTA, Dalbeth N, Fransen J, Schumacher HR, Berendsen D, et al. 2015 Gout classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2015;74:1789-98.
11. Chen LX, Schumacher HR. Current trends in crystal identification. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;18:171-3.
12. Gordon C, Swan A, Dieppe P. Detection of crystals in synovial fluids by light microscopy: sensitivity and reliability. *Ann Rheum Dis*. 1989;48:737.
13. Filippou G, Adinolfi A, Iagnocco A, Filippucci E, Cimmino MA, Bertoldi I, et al. Ultrasound in the diagnosis of calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease. A systematic literature review and a meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24:973-81.
14. Kydd ASR, Seth R, Buchbinder R, Edwards CJ, Bombardier C. Uricosuric medications for chronic gout. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014;2014.
15. Pak CYC, Sakhaee K, Fuller C. Successful management of uric acid nephrolithiasis with potassium citrate. *Kidney Int*. 1986;30:422-8.



reumatominas.com.br