

Identificação de Cristais de Urato Monossódico no Líquido Sinovial

Identification of Monosodium Urate Crystals in Synovial Fluid

Barros M.R.¹, Laranjeira P.J.¹

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

RESUMO

A análise laboratorial do líquido sinovial (LS) é determinante na distinção entre artrite séptica e artrite induzida por cristais. A identificação dos cristais de urato monossódico (UMS) ou de pirofosfato de cálcio diidratado (PPCD) com uma contagem elevada de neutrófilos são dados laboratoriais usados em reumatologia para o diagnóstico correto de um quadro clínico de gota ou pseudogota, respetivamente.

O microscópio de luz polarizada é o método padrão para a sua deteção e identificação, aproveitando as diferentes características de birrefringência destes cristais.

Diversos estudos demonstram, no entanto, que este método sofre de falta de coerência entre observadores, devido à sua componente subjetiva e a algumas limitações da própria técnica.

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier é aqui apresentada como técnica fiável e eficaz na identificação de UMS isolado a partir da matriz biológica usando etanol como extrator da matéria orgânica e inorgânica a eliminar.

Palavras-Chave: Líquido sinovial, Cristais (UMS e PPCD), Microscopia de luz polarizada, Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier

ABSTRACT

Laboratory analysis of synovial fluid is key on distinguishing septic from crystal induced arthritis. The identification of monosodium urate (MSU) or calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) crystals in the presence of a high neutrophil count is the criteria used in rheumatology for the correct diagnosis of gout and pseudogout, respectively. Polarized light microscopy is the “gold” standard for its detection and identification, based on distinct birefringency properties of these crystals.

Several studies demonstrate, however, a lack of inter-observer agreement, due to subjective issues and limitations of the technique itself.

Fourier transformed infra-red spectroscopy is described herein as an effective and reliable technique for the identification of MSU crystals, isolated from its biological matrix, using ethanol as an extractant of undesirable organic and inorganic matter.

Keywords: Synovial fluid, Crystals (UMS and CPPD), Polarized light microscopy, Fourier Transformed Infrared spectroscopy

¹ Farmacêutico(a) especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos. Departamento de Microbiologia. Medicina Laboratorial Dr. Carlos Torres – a Unilabs Company. Porto. Portugal

Autor para correspondência: Paulo Jorge Laranjeira, Rua do Campo Alegre 231, 4150-172 Porto; pjlaranjeira@labcarlostorres.pt

Submetido/Submitted: 20 junho 2016 | Aceite/Accepted: 27 junho 2016

INTRODUÇÃO

A identificação dos cristais de urato monossódico (UMS)¹ e pirofosfato de cálcio diidratado (PPCD) no líquido sinovial (LS), coexistindo com uma contagem elevada de leucócitos polimorfonucleares (indicativo de inflamação aguda) é a única forma correta de diagnosticar um ataque de gota ou pseudogota, respetivamente.

Os cristais referidos mostram diferentes características de birrefringência, e o microscópio de luz polarizada é o método padrão para a sua deteção. Contudo, diversos estudos têm demonstrado, que a sua identificação, sofre de uma falta de coerência entre diferentes observadores, tanto pela sua componente subjetiva como por algumas limitações da própria técnica^{2,3}.

DEFINIÇÃO

O LS é um líquido viscoso encontrado nas cavidades articulares. É constituído por um ultrafiltrado não seletivo (exceto às proteínas de alto peso molecular) do plasma através da membrana sinovial, cujas células, (sinoviócitos) contribuem ainda com a secreção de um mucopolissacarideo contendo ácido hialurónico (responsável pela viscosidade) e uma pequena quantidade de proteínas, cerca de um quarto da concentração plasmática.

A sua função além da lubrificação das articulações, fornece nutrientes à cartilagem articular e diminui o choque de compressão nas caminhadas e corridas⁴.

São apresentados valores normais de alguns parâmetros do LS na Tabela 1⁵.

Tabela 1. Características do líquido sinovial sob condição fisiológica normal

Volume	< 3.5 mL
Cor	Incolor a amarelo pálido
Aspetto	Limpido
Viscosidade	Formar filamento de 4-6 cm
Leucócitos	< 200 células / μ L
Neutrófilos	< 25%
Cristais	Nenhum
Glicose: diferença do plasma	< 10 mg/dL menor do que a glicemia
Proteína total	< 3 g/dL

As lesões nas membranas articulares originam um quadro de artrite (dor e rigidez nas articulações) e os testes laboratoriais mais utilizados no diagnóstico diferencial, incluem contagem de neutrófilos, presença e identificação de cristais, exame bacteriológico direto e cultural. Associando a cor, o aspeto, a viscosidade e o doseamento da glicose, é possível classificar a artrite de acordo com a sua origem: não inflamatória, inflamatória de origem imunológica, inflamatória induzida por cristais, séptica e hemorrágica.

Numa artrite inflamatória induzida por cristais o LS tem aspeto turvo, cor leitosa, baixa viscosidade, contagem de glóbulos brancos até 100.000/ μ L, neutrófilos <70%, valor de glicose diminuído e presença de cristais⁵.

TIPO DE CRISTAIS

Os principais cristais observados no LS em condições patofisiológicas são UMS ou PPCD.

Outros, como hidroxiapatite (fosfato básico de cálcio), colesterol, corticosteroides e de oxalato de cálcio, são de importância clínica relativa.

Algumas patologias associadas ao tipo de cristais encontram-se na Tabela 2⁶.

A gota é uma artrite inflamatória resultante da deposição de cristais de UMS nas articulações e em outras localizações. É mais prevalente em homens, sendo muito rara em mulheres antes da menopausa.

Na Tabela 3⁶ estão descritas as características dos cristais, às quais se associa uma propriedade muito importante sob luz polarizada - birrefringência.

A IDENTIFICAÇÃO DE CRISTAIS

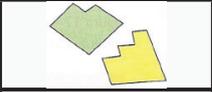
A microscopia de luz polarizada, aproveitando a característica de birrefringência é o método mais utilizado na identificação de cristais no LS.

O microscópio de luz polarizada contém duas lentes, assemelhando-se a grelhas, que permitem a passagem da luz de

Tabela 2. Descrição dos cristais e circunstâncias em que poderão ocorrer

Tipo	Significado
UMS	Gota
PPCD	Pseudogota
Colesterol	Inflamação crónica
Corticosteroide	Após infiltrações
Oxalato de cálcio	Díalise renal
Hidroxiapatita (fosfato de cálcio)	Osteartrose (degeneração da cartilagem calcificada)

Tabela 3. Característica dos cristais que poderão ocorrer no LS em condições não fisiológicas

Cristal	Forma		Luz polarizada compensada
UMS	Agulhas		Birrefringência negativa
PPCD	Quadrado rômboico, varetas		Birrefringência positiva
Colesterol	Placas entalhadas, rômboico		Birrefringência negativa
Corticosteróide	Placas planas, de forma variável		Birrefringência positiva e negativa
Oxalato de cálcio diidratado	Envelope octaédrico, ou duas pirâmides unidas pelas bases		Birrefringência negativa
Apatite (fosfato de cálcio)	Partículas pequenas. Requer microscopia eletrónica.		Sem birrefringência

forma laminar (Figura 1⁷). Se os eixos dos planos em que a luz pode atravessar a 1^a lente (polarizador) e a 2^a lente (analisador) forem ortogonais nenhuma luz passa e o campo fica completamente escuro. Uma estrutura cristalina, com características anisotrópicas (birrefringência), colocada entre as duas lentes, irá refratar a luz incidente num determinado ângulo. A rotação do analisador permitirá a passagem da luz quando o eixo do seu plano coincide com o eixo ótico de anisotropia. Nestas condições, o cristal surgirá brilhante num campo escuro⁷.

A utilização de um compensador vermelho confere aos cristais variabilidade de cor consoante o alinhamento do seu eixo de vibração

lenta com o maior eixo do cristal. A birrefringência negativa ou positiva tem a ver com o efeito de subtração ou adição que os cristais exercem na luz de vibração rápida do compensador.

O processo de pesquisa de cristais no LS requer, em primeiro lugar, determinar a presença ou não de cristais, e, em seguida, a sua identificação correta. Na medida em que o microscópio de luz polarizada com ou sem compensador é o método padrão para a sua identificação, também é amplamente utilizado para determinar se uma amostra de LS contém ou não cristais. Sendo os cristais de PPCD fracamente birrefringentes, ou em certas ocasiões podendo não sê-lo de todo, a sua deteção poderá passar despercebida no campo escuro se a pesquisa é

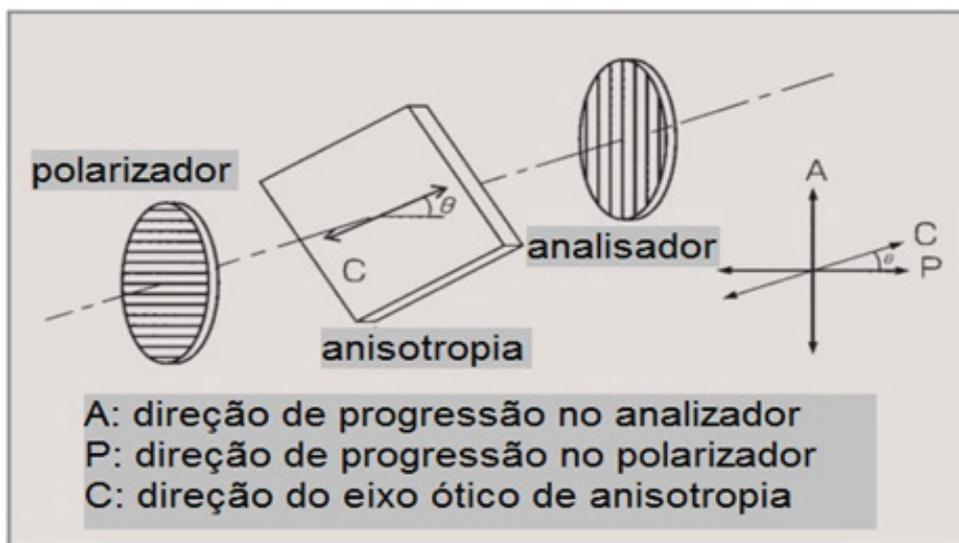


Figura 1. Anisotropia entre grelhas cruzadas

realizada desta forma e, especialmente, se a análise é efetuada por alguém sem experiência^{3,8}. A microscopia ótica convencional deve, por isso, ser o ponto de partida em qualquer investigação.

Os cristais de USM são birrefringentes, com um forte alongamento negativo quando vistos sob luz polarizada compensada. Deverá ser assegurado que os cristais a serem analisados estão alinhados de acordo com o eixo de vibração lenta do compensador. Quando o eixo do cristal de USM se alinha com aquele, toma a cor amarela, e quando fica perpendicular torna-se azul. O cristal de PPCD tem um comportamento inverso, e por isso, quando o maior eixo do cristal de PPCD é paralelo toma a cor azul e quando perpendicular fica amarelo.

As possíveis causas de falha na deteção de cristais de UMS que ocorrem em 25% dos pacientes com artrite gotosa aguda incluem erro de amostragem do LS, a presença de cristais ultramicroscópicos (isto é, cristais pequenos demais para serem observadas por microscopia ótica convencional) ou, sendo

detetáveis, apresentam baixa definição, e a dissolução^{9,10}. Neste último caso, poderia o atraso no processamento da amostra ser a principal causa, contudo, é consensual não ocorrer qualquer alteração em amostras preservadas a 4°C colhidas com ou sem EDTA ou heparina sódica como anticoagulante^{11,12}.

OBJETIVO

Pretendeu-se com o presente trabalho encontrar um método alternativo à microscopia polarizada que permita uma correta classificação dos cristais em amostras de LS, ultrapassando as limitações da avaliação subjetiva da observação inter-individual, das diferentes abordagens processuais e influências fisiopatológicas que poderão alterar a forma como são revelados. A espectroscopia de infravermelho encontra-se pouco divulgada em trabalhos científicos na área da reumatologia, apesar da reconhecida exatidão que pode oferecer. É um tipo de espectroscopia de absorção que usa a região do infravermelho do espectro

eletromagnético e baseia-se nas vibrações dos átomos de uma molécula. O espectro é obtido pela passagem da radiação do infravermelho através duma amostra cristalina e calculada a fração da radiação incidente que é absorvida a uma determinada energia.

Os espectrofotómetros com um interferómetro e explorando o modelo matemático da transformação de Fourier, fornecem espectros de infravermelho de alta qualidade, e simultaneamente minimizam o tempo necessário para a obtenção de dados e o seu processamento por sistemas computadorizados cada vez mais avançados¹³.

MATERIAL E MÉTODOS

O LS colhido em tubo com K₃EDTA e em tubo sem aditivo foi analisado paralelamente em preparações a fresco, não coradas, por microscopia ótica convencional.

A deteção de cristais com formas de agulhas/varetas determinou o prosseguimento da análise com vista à sua identificação através de microscopia polarizada, não compensada, recorrendo a um Microscópio Olympus BX 51-P acoplado a uma câmara digital DP 71.

Na preparação da amostra para a obtenção do espectrograma de infravermelhos procurou-se isolar os cristais a partir da matriz biológica, aproveitando as propriedades físico-químicas do etanol, nomeadamente, o seu baixo ponto de evaporação, o seu poder dissolvente de compostos polares e apolares e o facto de ser utilizado em inúmeras técnicas de purificação de cristais. Além disso, os cristais de UMS são convenientemente insolúveis no etanol¹³.

Para o efeito, 2,5 a 3 mL de LS colhido

em tubo contendo K₃EDTA e em tubo sem aditivo foram centrifugados a 5.000 r.p.m durante 5` e eliminado o sobrenadante por aspiração.

Os sedimentos obtidos em ambos os tubos foram lavados em 2 ciclos com etanol arrefecido em banho de gelo seguido de centrifugação e eliminação do sobrenadante. A integridade e a recuperação dos cristais foi controlada, em ambos os tubos, por observação microscópica com luz polarizada sem compensador (ver figuras 2C e 2D)

Procedeu-se à retoma apenas do sedimento obtido no tubo original com K₃EDTA, em vidro de relógio, e à obtenção do extrato seco em estufa (Heraeus) a 60°C. A secagem do extrato foi monitorizada por inspeção visual e levou 2 horas a completar-se.

A totalidade do extrato seco, cerca de 0,07mg, foi misturada com 300mg de brometo de potássio (KBr) (FT-IR grade, Sigma Aldrich) por pulverização em almofariz de ágata, seguido da produção de um comprimido com o auxílio de um compressor hidráulico (Graseby Specac). A aquisição do espectrograma de infravermelhos a partir do comprimido obtido foi efetuada num espectrofotómetro ATI Mattson FTIR Genesis Series.

RESULTADOS

A observação das amostras em preparação a fresco e dos extratos obtidos dos tubos com K₃EDTA e sem aditivo, após última lavagem com etanol, usando um microscópio de luz polarizada não compensada, permitiu a visualização e registo digital de alguns campos de grande ampliação (400 x) com cristais de UMS - Figuras 2A e 2B e Figuras 2C e 2D, respetivamente.

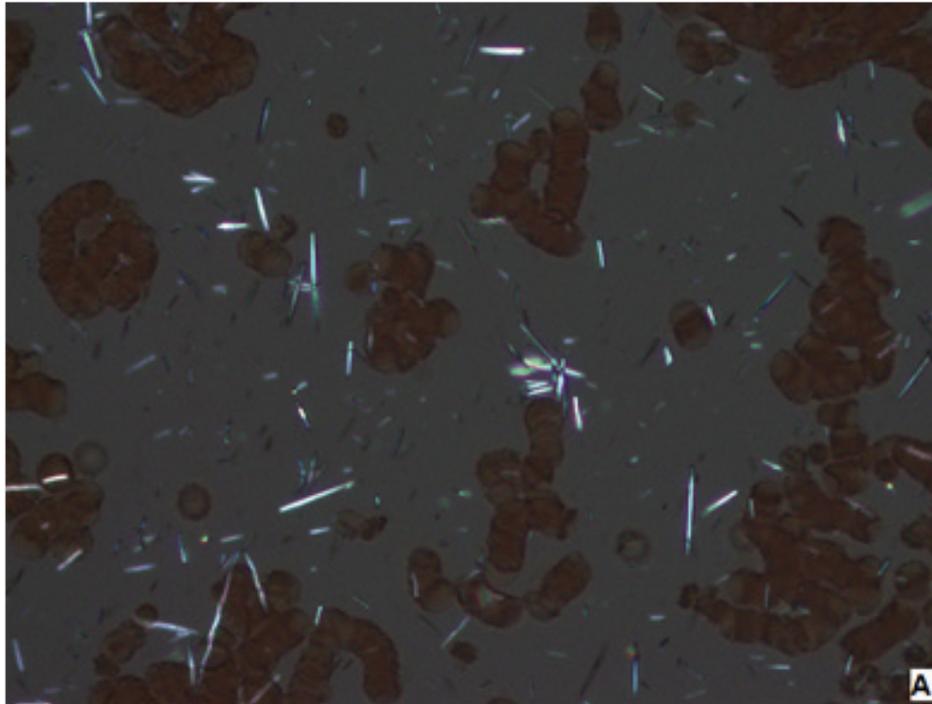


Figura 2A. Preparação a fresco de LS colhido em tubo K3EDTA

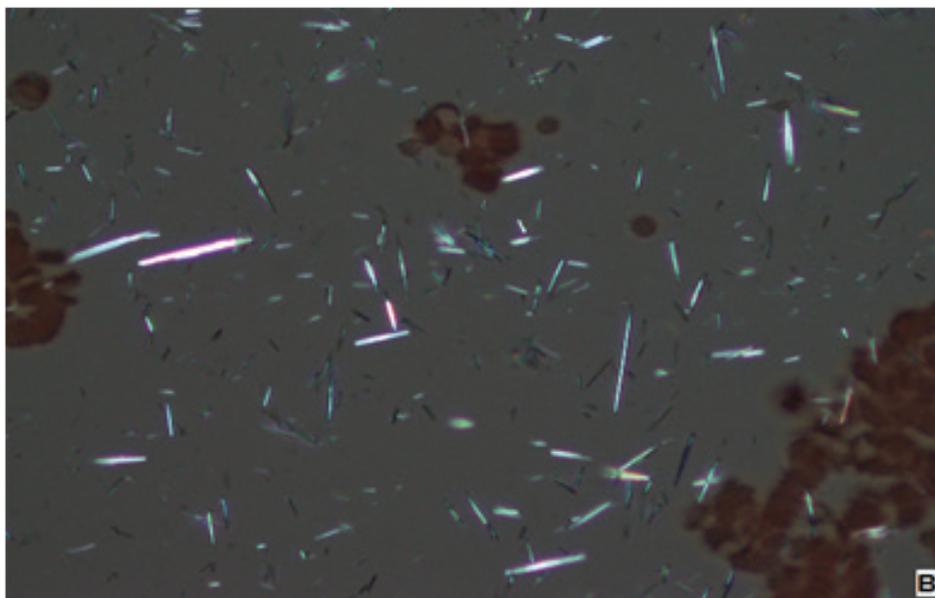


Figura 2B. Preparação a fresco de LS colhido em tubo sem aditivo

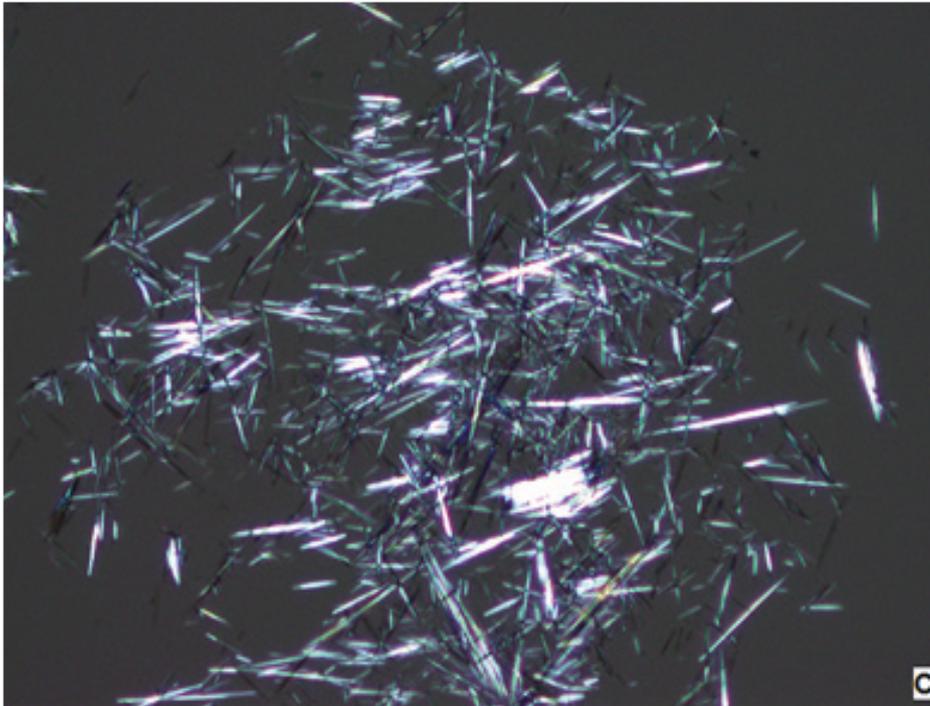


Figura 2C. Controlo do extrato no tubo K3EDTA após última lavagem do sedimento com etanol

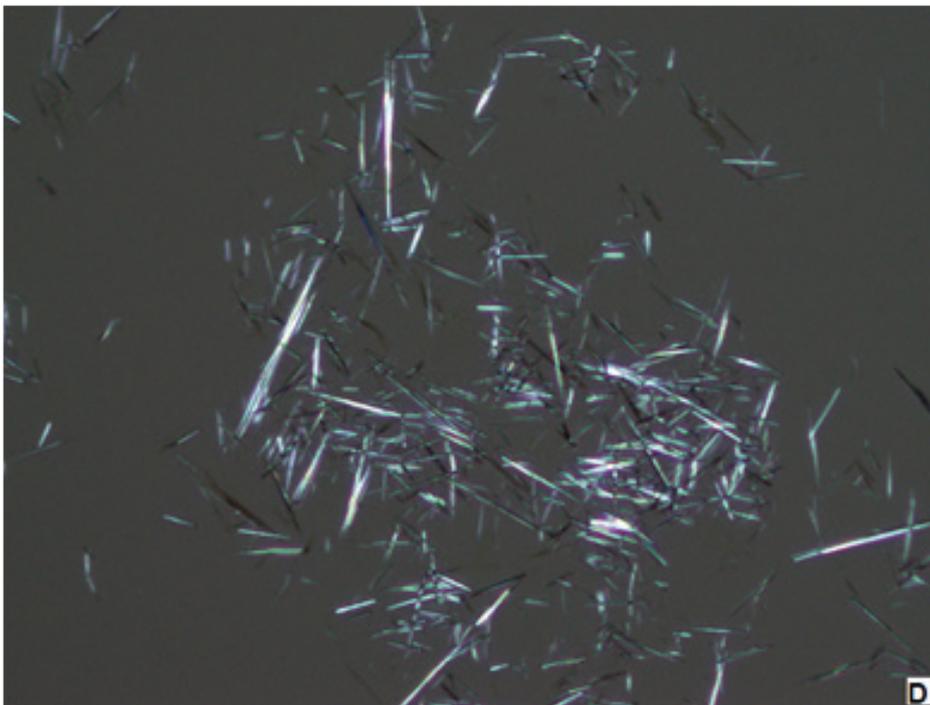


Figura 2D. Controlo do extrato no tubo sem aditivo após última lavagem do sedimento com etanol

O espetrograma de infravermelho revelou a presença de cristais de UMS com um coeficiente de correlação de 0,8696 para a amostra pura. O espectro de absorção do UMS (foto digital do écran do computador ligado ao espectrofotómetro ATI Mattson FTIR Genesis Series) e respetiva tabela de coeficientes de correlação com os mais semelhantes de uma livraria KS da base de dados, encontram-se representados na Figura 3.

CONCLUSÃO

A análise microscópica do LS é um dos procedimentos básicos para diagnosticar doenças das articulações, tais como a artrite séptica, ou a induzida por cristais, como por exemplo, a gota, para a qual existe tratamento eficaz.

A clínica altamente característica de gota tem permitido o seu reconhecimento desde a antiguidade, e constituiu, especialmente em associação com hiperuricemia, a base do reconhecimento

da doença.

A descrição de McCarty e Hollander de cristais de UMS no LS, em 1961, tornou-se o teste padrão. Contudo, a adesão ao diagnóstico, comprovado pela presença de cristais, tanto para a gota como para a artrite associada a cristais de PPCD, manteve-se baixa entre reumatologistas, persistindo a abordagem clássica associada a critérios mais focados na componente clínica.

A observação por microscopia ótica convencional complementada com a de luz polarizada, sem compensador, parece-nos suficiente para a classificação correta de cristais desde que acompanhada por programas de avaliação externa da qualidade que uniformizem critérios de avaliação entre diferentes observadores. Os cristais de PPCD são facilmente identificados pelo seu aspeto romboidal ou forma paralelepípedica e uma vez que lhes falta frequentemente a birrefringência, podem ser melhor visualizados por

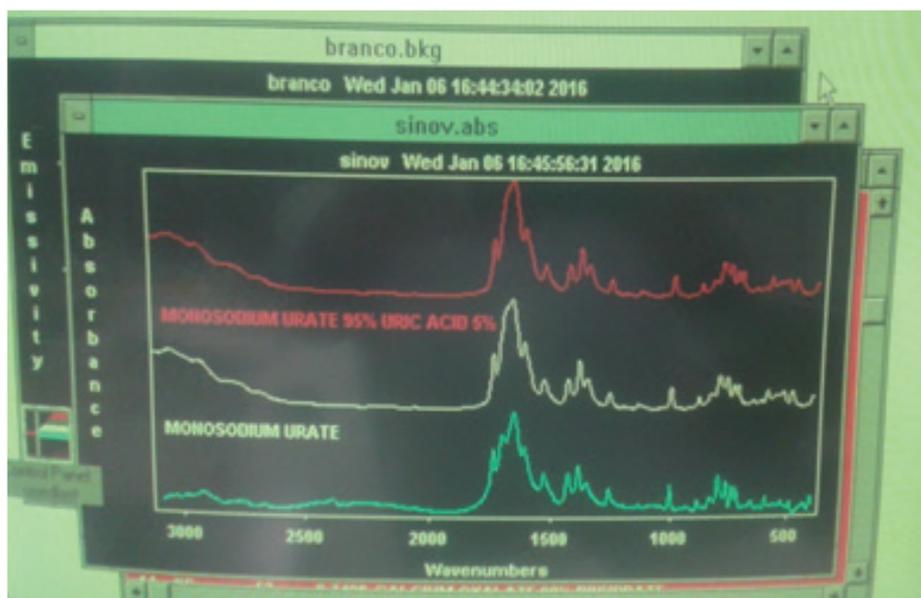


Figura 3 - Espetrograma de infravermelho do UMS

microscopia ótica convencional. Apenas os cristais em bastonete de PPCD são suscetíveis de serem confundidos com a forma de agulha dos cristais de UMS, e é aqui que o microscópio de luz polarizada, com ou sem compensador, tem um papel definitivo quer na sua distinção, quer na identificação definitiva dos últimos.

Partindo da hipótese de que a transição de uma articulação saudável para uma articulação artrítica deve ser acompanhada por uma alteração na composição do fluido sinovial, a “impressão digital molecular” infra vermelha, combinada com os métodos de reconhecimento padronizados pode distinguir amostras “normais” de LS daquelas com tipos específicos de doença. No entanto, a variabilidade natural (sem relação com qualquer estado de doença) limita a interpretação das diferenças que existem entre pacientes. A espectroscopia de infravermelho da amostra total de LS tem por isso grandes limitações.

O espectro de FTIR de cristais no LS é praticável na análise de rotina desde que estes sejam isolados facilmente a partir da matriz biológica. A identificação de cristais no LS através de FTIR encontra-se pouco documentada e será, decerto, pouco utilizada, porque lhe falta a rapidez que oferece a microscopia de luz polarizada e pela aparente dificuldade no isolamento dos cristais. No entanto, numa perspetiva laboratorial, a experiência aqui documentada oferece sensibilidade, especificidade e rapidez permitindo ultrapassar as limitações da subjetividade de uma observação microscópica e da interpretação das possíveis variantes da artropatia por cristais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MCCARTY DJ, HOLLANDER JL. Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. *Ann Intern*; 1961 Mar;54:452–60.
2. Dieppe P, Swan A. Identification of crystals in synovial fluid. *Ann Rheum Dis*. 1999;58:261–3.
3. Segal JB, Albert D. Diagnosis of crystal-induced arthritis by synovial fluid examination for crystals: lessons from an imperfect test. *Arthritis Care Res [Internet]*. 1999;12(6):376–80. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081008>
4. Shmerling RH. Synovial fluid analysis. A critical reappraisal. *Rheum Dis Clin North Am [Internet]*. 1994;20(2):503–12. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8016423>
5. Henry JB. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Philadelphia: WB Saunders; 2001. 1512p.
6. Strasinger SK, Schaub Di Lorenzo M. *Urinalysis and Body Fluids*. F. A. Davis Company Copyright. 2008. 311 p.
7. [Http://physics.berkeley.edu/research/yildiz/Teaching/PHYS250/Lecture_PDFs/polarization%20microscopy.pdf](http://physics.berkeley.edu/research/yildiz/Teaching/PHYS250/Lecture_PDFs/polarization%20microscopy.pdf). Basics of Polarizing Microscopy. Olympus. :28.
8. Lumbreras B, Pascual E, Frasquet J, González-Salinas J, Rodríguez E, Hernández-Aguado I. Analysis for crystals in synovial fluid: training of the analysts results in high consistency. *Ann Rheum Dis [Internet]*. 2005;64(4):612–5. Disponível em: <http://ard.bmj.com/content/64/4/612.short>
9. Agudelo CA. Gout and hyperuricemia. *Curr Opin Rheumatol*. UNITED STATES; 1989 Oct;1(3):286–93.

10. Dieppe P, Hornby J, Swan A, Hlutton C, Preece A. Laboratory handling of crystals. 1983;60–3.
11. Gálvez J, Sáiz E, Linares LF, Climent a, Marras C, Pina MF, et al. Delayed examination of synovial fluid by ordinary and polarised light microscopy to detect and identify crystals. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(5):444–7.
12. Tausche A-K, 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. *J Clin Rheumatol* [Internet]. 2013;19(5):241–5. Disponível em: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00124743-201308000-00003>.
13. Stuart BH. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* [Internet]. *Methods.* 2004. 224 p. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/0470011149>.