

# IDENTIFICAÇÃO DE CRISTAIS NO LÍQUIDO SINOVIAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Patrícia Nero,  
Isabel Nogueira,  
Rui Vilar,  
J. Bravo Pimentão,  
Jaime C. Branco

Serviço de Reumatologia, Hospital de Egas Moniz, Lisboa  
Unidade de Ciência e Engenharia de Superfícies do Instituto de Ciência  
e Engenharia de Materiais e Superfícies, Instituto Superior Técnico de Lisboa

---

## RESUMO

---

**Introdução:** A identificação de cristais no líquido sinovial é feita habitualmente através do exame microscópico com luz ordinária, luz compensada e algumas colorações. No entanto, dadas as suas pequenas dimensões e diminutas concentrações no líquido sinovial, por vezes nem mesmo após centrifugação estes se conseguem identificar utilizando esses métodos.

**Objectivos:** Analisar a detecção de cristais no líquido sinovial de doentes com monoartrite não infecciosa, sem história de traumatismo ou patologia osteoarticular antecedente, em microscopia de luz polarizada e em microscopia electrónica.

**Material e Métodos:** Foram avaliadas amostras de líquido sinovial de doentes com monoartrite não infecciosa, sem história de traumatismo ou patologia osteoarticular prévia. Os líquidos sinoviais obtidos foram observados numa fase inicial no microscópio de luz polarizada e com a coloração com vermelho de alizarina. Posteriormente, analisámos as mesmas amostras por microscopia electrónica de transmissão e espectroscopia de dispersão de energia, tentando identificar cristais e caracterizar a sua composição química.

**Resultados:** Foram observadas 45 preparações de 23 amostras de líquido sinovial. Por microscopia de luz polarizada identificámos cristais em 11 desses líquidos, 3 com pirofosfato de cálcio, 6 com «cristais contendo cálcio» e 2 com monourato de sódio. Nas restantes 12 amostras não identificámos qualquer tipo de cristal e os líquidos apresentavam características mecânicas. As amostras foram posteriormente analisadas por microscopia electrónica de transmissão convencional e espectroscopia de dispersão de energia. Confirmámos a presença dos cristais anteriormente identificados e na totalidade das 12 amostras sem cristais identificados por microscopia de luz polarizada encontrámos cristais contendo cálcio.

**Discussão:** Os microcristais parecem ser um achado universal em líquidos sinoviais de doentes com osteoartrose. A prevenção da sua formação poderá contribuir para travar a destruição articular nesta patologia.

**Palavras-Chave:** Cristais; Microscopia electrónica; Osteoartrose.

---

---

## ABSTRACT

---

**Background:** In clinical practice crystal identification in synovial fluid is made by polarized light microscopy and with some specific stainings. Nevertheless, sometimes we are unable to identify crystals by these means, either because they are too small or because they are widespread on the fluid.

**Aims:** To compare the identification of crystals in synovial fluid from patients with non-infectious monoarthritis but no history of local trauma or articular disease, using polarized light and electronic microscopy.

**Methods:** We analyzed synovial fluid samples from patients with non-infectious monoarthritis and no history of local trauma or articular disease. First we used a polarized light microscope and alizarin red staining. Later we used conventional transmission electron microscopy and energy dispersive spectroscopy, in order to identify and characterize crystals.

**Results:** Forty-five samples from 23 synovial fluids were analyzed. Under polarized light microscopy we identified crystals on 11 samples: 3 with calcium pyrophosphate crystals, 6 with calcium basic phosphate crystals and 2 with sodium monourate crystals. On the remaining 12 samples we were unable to identify crystals. Samples were then analyzed by conventional transmission electron microscopy and energy dispersive spectroscopy confirming the presence of the previously identified crystals. On the remaining 12 samples we were able to identify calcium basic phosphate crystals.

**Discussion:** Microcrystals seem to be an universal finding in synovial fluid of patients with osteoarthritis. The prevention of their deposition in joints might contribute to stop joint damage in this disease.

**Keywords:** Crystals; Electron microscopy; Osteoarthritis.

---

## IDENTIFICAÇÃO DE CRISTAIS NO LÍQUIDO SINOVIAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Patrícia Nero\*, Isabel Nogueira\*\*, Rui Vilar\*,  
J. Bravo Pimentão\*, Jaime C. Branco\*

### Introdução

Em Portugal, segundo vários estudos publicados, as doenças reumáticas são a principal causa de recurso à consulta de Clínica Geral, o primeiro motivo de absentismo laboral, a primeira causa de reforma precoce e a principal causa de invalidez.<sup>1-4</sup>

De acordo com dados do Inquérito Nacional de Saúde de 1995/1996<sup>1</sup>, as doenças reumáticas constituem 15,5 % das incapacidades temporárias nas 2 semanas que antecederam este inquérito, logo após as doenças do aparelho respiratório (21,1%) e à frente das doenças do aparelho cardiovascular (10%). No entanto, as doenças osteoarticulares aparecem em primeiro lugar como causa de incapacidade temporária por mais de 90 dias: 29,4%, largamente à frente das doenças do aparelho cardiovascular (13,8%).

Segundo um inquérito epidemiológico sobre doenças reumáticas organizado pela Sociedade Portuguesa de Reumatologia em 1996<sup>2</sup>, com a colaboração de 432 clínicos gerais de todo o país, a doença reumática era a causa de reforma em 5,17% da população. No «Estudo Epidemiológico sobre a Doença Reumática em Portugal» este valor foi bastante mais elevado, 34,6%<sup>3</sup>.

A patologia reumática foi a terceira causa de medicação crónica, 21,3%, atrás da patologia psíquica (36,5%) e gastrointestinal (33,2%), num trabalho sobre a importância das doenças reumáticas nos cuidados de saúde primários realizado em 1997 na área da grande Lisboa.<sup>4</sup>

As artropatias microcristalinas são um grupo de doenças crónicas caracterizadas pela deposição de cristais nos tecidos músculo-esqueléticos. Constituem cerca de 6% das doenças reumáticas, de acordo com o inquérito epidemiológico de reumatis-

mos organizado pela Sociedade Portuguesa de Reumatologia em 1996, atrás referido.<sup>2</sup>

Os cristais encontrados nas articulações podem ser inertes ou podem, por mecanismos mecânicos ou bioquímicos, desencadear processos inflamatórios articulares ou lesões degenerativas crónicas.

São vários os tipos de cristais que se podem depositar numa articulação, e podem ser encontradas misturas numa mesma articulação. A sua identificação no líquido sinovial é feita habitualmente através do exame microscópico com luz ordinária, luz compensada e algumas colorações. Os cristais são assim identificados com base nas suas características individuais, nomeadamente a sua forma, a sua birrefringência e as características de coloração.

Os cristais que mais frequentemente conseguimos identificar pela observação microscópica do líquido sinovial são os de monourato de sódio e de pirofosfato de cálcio, através das suas formas e características particulares de birrefringência, e os «cristais contendo cálcio», nos quais se incluem a hidroxiapatite, através da coloração com o vermelho de alizarina.<sup>5</sup> No entanto, dadas as suas pequenas dimensões e diminutas concentrações no líquido sinovial, por vezes nem mesmo após centrifugação estes se conseguem identificar.

Coloca-se então a questão se a frequência da presença de cristais na etiologia das doenças articulares não poderá estar sub-valorizada.

### Objectivos

Analisar a detecção de cristais no líquido sinovial de doentes com monoartrite não infecciosa, sem história de traumatismo ou patologia osteoarticular antecedente, em microscopia de luz polarizada e em microscopia electrónica de transmissão, utilizando a difracção de electrões e a espectroscopia de dispersão de energia.

\*Serviço de Reumatologia, Hospital de Egas Moniz, Lisboa

\*\*Unidade de Ciência e Engenharia de Superfícies do Instituto de Ciência e Engenharia de Materiais e Superfícies, Instituto Superior Técnico de Lisboa

## Material e Métodos

Este foi um estudo transversal, em que foram avaliadas amostras de líquido sinovial, por microscopia de luz polarizada e microscopia electrónica de transmissão convencional. As amostras de líquido sinovial foram obtidas através da realização de artrocentese, em condições de assépsia, em doentes com monoartrite seguidos em consulta externa ou internados no Serviço de Reumatologia do Hospital de Egas Moniz. Nenhum destes doentes tinha história prévia de traumatismo ou doença osteoarticular conhecida, nem tinha realizado sinoviortese ou outra infiltração intra-articular nos 3 meses antecedentes. Todos os doentes consentiram na realização da artrocentese para fins diagnósticos, sem que tenha sido alterado algum procedimento clínico de rotina do Serviço de Reumatologia do Hospital de Egas Moniz.

Os líquidos sinoviais obtidos foram observados numa fase inicial no microscópio de luz polarizada disponível no Sector de Técnicas do Serviço de Reumatologia do Hospital de Egas Moniz, com luz ordinária, luz polarizada com e sem compensador e com a coloração com vermelho de alizarina, seguindo o método de rotina praticado nos serviços de Reumatologia.<sup>5</sup>

O microscópio óptico utilizado foi um microscópio Leica® DMLS, com as seguintes características:

- microscópio para as ciências da vida equipado com polarização simples
- objectivas de 10, 40, 60 e 100, semi-planas acromáticas
- tubo triocular
- platina XY e sobre-platina rotativa
- polarizador/analizador
- cmount para ligação de câmara de video
- 30W de luz

Agrupámos os líquidos de acordo com a sua observação, em líquidos de características mecânicas ou microcristalinas, conforme descrito num trabalho realizado no nosso Serviço e publicado anteriormente.<sup>6</sup>

Posteriormente analisámos amostras dos mesmos líquidos por microscopia electrónica, de varrimento e de transmissão, na Unidade de Ciência e Engenharia de Superfícies (UCES) do Instituto Superior Técnico de Lisboa (IST).

As amostras foram preparadas, de acordo com uma técnica anteriormente descrita,<sup>7</sup> na véspera

da sua observação, deixando secar uma gota de líquido sinovial sobre uma grelha de cobre coberta com um filme de formvar com uma fina camada de carbono.

Foi utilizado o microscópio de transmissão Hitachi® H-8100, com as seguintes características:

- filamento de tungsténio
- tensão de aceleração de 75 a 200kV
- resolução de ponto a ponto de 2,7 Å
- detector de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) da marca ThermoNoran®, com resolução energética de 142 eV

O tamanho de feixe utilizado sobre cada cristal para a aquisição dos espectros variou entre 10 e 30 nm.

Algumas amostras, mais significativas e em melhores condições, foram registadas utilizando emulsões fotográficas, através de uma máquina interna do microscópio.

A identificação dos cristais em microscopia electrónica de transmissão (TEM) baseou-se na observação das amostras, juntamente com a difracção electrónica, que permitiu distinguir os cristais de material amorfo depositado na grelha. A caracterização da composição química foi feita através da aquisição de vários espectros de EDS de cristais em cada amostra. Este tipo de espectro é construído com base na detecção dos raios-X emitidos pela amostra ao incidir sobre ela o feixe de electrões, e permite identificar que elementos estão presentes. Da posterior análise destes espectros é possível obter a quantificação dos elementos detectados. A técnica utilizada para a quantificação tem o nome de correcção ZAF, e permite obter as quantidades relativas dos vários elementos, tendo em conta as diferenças entre os números atómicos (Z), a absorção dos raios-X pela própria amostra (A) e a fluorescência induzida por alguns elementos (F). Obtivemos assim a razão entre a percentagem atómica de cálcio e a de fósforo para cada espectro, razão essa que tem o mesmo valor da razão molar entre esses mesmos elementos.

As razões molares de cálcio/fósforo são conhecidas para alguns dos «cristais contendo cálcio», que possuem estes dois elementos na sua composição, permitindo deste modo a sua identificação. Assim, a razão cálcio/fósforo de 1,67:1 está associada a cristais de hidroxiapatite, a de 1,4:1 a cristais de octafosfato de cálcio, a de 1:1 a cristais de dihidrato de fosfato de cálcio ou brushite e a razão 1,5:1 a cristais de trifosfato de cálcio.<sup>7</sup>

## Resultados

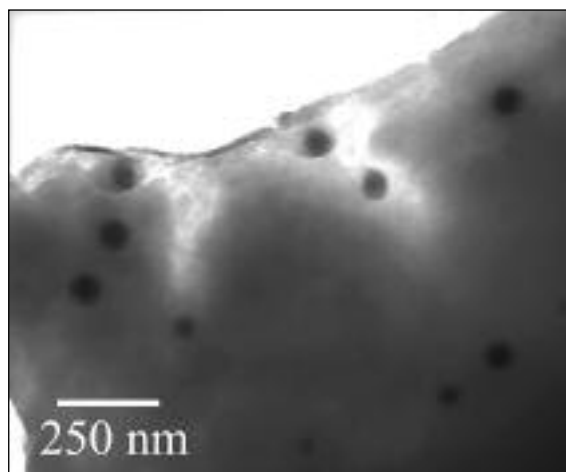
Foram observadas 45 preparações de 23 amostras de líquido sinovial. Por microscopia de luz polarizada identificámos cristais em 11 desses líquidos, sendo 3 com pirofosfato de cálcio, 6 com «cristais contendo cálcio» e 2 com monourato de sódio. Nas restantes 12 amostras não identificámos qualquer tipo de cristal e os líquidos apresentavam características mecânicas.

As 23 amostras foram posteriormente analisadas por TEM. Foram efectuadas mais do que uma preparação por amostra, pois deparámo-nos com algumas dificuldades: 3 líquidos foram eliminados (um microcristalino, com cristais de pirofosfato de cálcio, os outros dois mecânicos) por se encontrarem mal preservados e não permitirem uma análise fiável, algumas amostras ficaram muito espessas, outras danificadas pelo feixe de electrões, noutras ainda os cristais estavam muito condensados ou muito dispersos, obrigando à sua repetição. No total, estudámos por completo 40 preparações, 2 de cada um dos 20 líquidos em boas condições (Quadro I). Foi necessária a observação de duas amostras de cada líquido dada a dispersão dos cristais e a dificuldade em obter boas áreas para análise. Foram realizados em média 6 espectros por cada amostra, dependendo da qualidade das mesmas. Como referido anteriormente, fotografámos as amostras mais representativas dos cristais observados.

### Amostras de líquido microcristalino, como classificado por microscopia de luz polarizada

Como foi anteriormente referido, das 3 amostras onde foram identificados cristais de pirofosfato de cálcio, 1 foi eliminada por má preservação do líquido sinovial. Nas outras duas, por TEM, identificámos cristais de forma rombóide, de dimensões variáveis entre os 100 e 300 nanómetros de comprimento e os 50 e 100 nanómetros de espessura, compatíveis com cristais de pirofosfato de cálcio. Estes cristais danificavam-se rapidamente por acção do feixe de electrões, pelo que não foi possível a análise da sua composição química ou a obtenção de fotografias em boas condições técnicas.

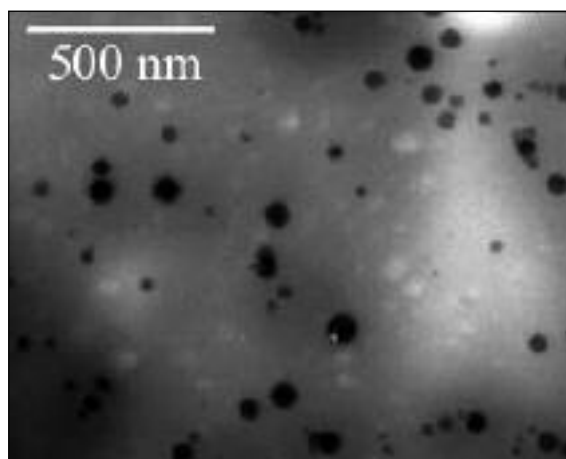
Nas duas amostras com cristais de monourato de sódio, confirmámos a presença de cristais em forma de agulha, com dimensões muito variáveis entre os 300 e os 1.000 nanómetros de comprimento e os 50 nanómetros de espessura. Este tipo de



**Figura 1.** Amostra 5 (correspondente a um líquido sinovial com cristais de cálcio identificados em microscopia de luz polarizada) – Cristais contendo cálcio e fósforo (detectados em espectroscopia de dispersão de energia) visualizados em microscopia electrónica de transmissão.

cristal ainda se danificava mais rapidamente que os de pirofosfato de cálcio, pelo que não foi possível a análise da sua composição química ou a obtenção de qualquer fotografia.

Nas 6 amostras com «cristais contendo cálcio», foi possível identificarmos a presença de cristais de forma esférica e ovalada, por vezes isolados outras vezes agrupados, com dimensões variáveis entre os



**Figura 2.** Amostra 10 (correspondente a um líquido sinovial sem cristais identificáveis em microscopia de luz polarizada e compatível com uma etiologia mecânica) – Cristais contendo cálcio e fósforo (detectados em espectroscopia de dispersão de energia) visualizados em microscopia electrónica de transmissão.

20 e os 100 nanómetros, tendo a maioria entre os 30 e 50 nanómetros de diâmetro (Figura 1). Avaliámos a sua composição química, confirmando a predominância do cálcio e do fósforo. Quando calculámos a razão molar entre o cálcio e o fósforo para cada uma das amostras, deparámo-nos com valores díspares, sendo grande a heterogeneidade da composição dos cristais em cada preparação destas 6 amostras.

### Amostras de líquido mecânico, como classificado por microscopia de luz polarizada

Em todas as preparações das amostras de características mecânicas (n=10) foram identificados cristais de cálcio e fósforo, com as mesmas características estruturais e morfológicas dos «cristais contendo cálcio» atrás descritos (Figura 2).

### Análise química das 20 amostras

### Discussão

O nosso trabalho vem reforçar a eventual importância dos microcristais nos processos degenerativos articulares, e nomeadamente dos «cristais contendo cálcio».

Em metade das nossas amostras identificámos por luz polarizada diferentes tipos de microcristais, e noutra metade os líquidos apresentavam características mecânicas. Em todos estes sem excepção, a microscopia electrónica de transmissão veio confirmar a presença de «cristais contendo cálcio» de diferentes composições. Estes números são muito superiores aos referidos na literatura, em que os cristais são identificados em 30 a 50% dos líquidos sinoviais de doentes com osteoartrite.<sup>8</sup> Explicações possíveis para a não identificação destes cristais por microscopia de luz polarizada são as suas pequenas dimensões, nalguns casos também a sua pequena concentração e grande disper-

**Quadro I. Estão caracterizadas as 20 amostras, de acordo com os achados na observação por microscopia de luz polarizada e electrónica de transmissão. Para cada amostra são apresentados os tipos de cristais observados por microscopia electrónica e quando não os conseguimos caracterizar apresentámos a razão molar entre o cálcio e o fósforo.**

Número da amostra	Características na luz polarizada	Composição/razão molar Cálcio/Fósforo dos cristais visualizados em que foi possível fazer a caracterização química							
1	Cristais Ca	brushite	0,48	0,85	0,83	1,23	0,78	1,22	0,71
2	Cristais Ca	octacálcio	octacálcio	1,26	0,55	0,78	0,57	–	–
3	Cristais Ca	brushite	brushite	brushite	tricálcio	octacálcio	0,75	0,42	0,64
4	Mecânico	octacálcio	0,85	0,57	0,55	0,80	0,50	0,60	0,67
5	Cristais Ca	brushite	brushite	0,80	0,49	1,21	0,75	0,46	–
6	Cristais PPC	Não foi possível a caracterização química							
7	Mecânico	brushite	brushite	brushite	tricálcio	dihidrato	–	–	–
8	Mecânico	octacálcio	octacálcio	octacálcio	octacálcio	0,61	–	–	–
9	Cristais Ca	dihidrato	dihidrato	dihidrato	octacálcio	0,37	0,8	2,25	–
10	Mecânico	dihidrato	dihidrato	brushite	0,50	0,43	0,74	0,84	0,75
11	Cristais PPC	Não foi possível a caracterização química							
12	Cristais MUS	Não foi possível a caracterização química							
13	Mecânico	brushite	octacálcio	0,64	0,61	apatite	0,72	1,20	–
14	Mecânico	octacálcio	0,74	0,88	0,63	0,80	0,66	0,79	–
15	Cristais Ca	octacálcio	brushite	dihidrato	0,64	1,20	0,87	0,66	–
16	Cristais MUS	Não foi possível a caracterização química							
17	Mecânico	brushite	0,56	0,80	0,86	0,83	0,62	0,42	–
18	Mecânico	brushite	brushite	brushite	apatite	0,64	–	–	–
19	Mecânico	tricálcio	octacálcio	octacálcio	octacálcio	2,38	0,67	–	–
20	Mecânico	octacálcio	octacálcio	brushite	brushite	1,20	–	–	–

Legenda: Cristais Ca: cristais contendo cálcio; PPC: pirofosfato de cálcio; MUS: monourato de sódio; brushite: cristais de dihidrato de fosfato de cálcio; octacálcio: cristais de octafluorato de cálcio; tricálcio: cristais de trifosfato de cálcio; apatite: hidroxiapatite

são no líquido sinovial e ainda a sua libertação intermitente a partir da cartilagem.

É grande a polémica sobre o papel dos microcristais na fisiopatologia dos processos degenerativos articulares. Alguns autores defendem que os microcristais são responsáveis pelo desencadear de alterações que destroem a cartilagem, outros defendem que estes se formam durante a sua evolução, contribuindo posteriormente para o seu agravamento.<sup>8</sup>

O que parece unânime é que têm de facto um papel importante na fisiopatologia da osteoartrose. O facto de os termos identificado em todos os líquidos mecânicos, abona a favor desta teoria. Nesse pressuposto, se conseguirmos evitar a sua formação e deposição, alterando as características do meio articular, poderemos eventualmente contribuir para a prevenção da osteoartrose ou pelo menos para o atraso da sua evolução.

No nosso trabalho não conseguimos caracterizar todos os cristais identificados devido à grande dispersão dos resultados obtidos para algumas amostras. Uma razão que terá contribuído para esta dispersão é o facto de os cristais se danificarem facilmente sob a acção do feixe de electrões, perdendo, ao fim de algum tempo, as suas características cristalinas. De facto, dadas as pequenas dimensões dos cristais e a sua composição, os tempos necessários à aquisição dos espectros foram bastante longos (entre 3 a 4 minutos), o que terá agravado a degradação dos cristais. Por outro lado, nos cristais mais pequenos há a considerar a dispersão do feixe após incidir na amostra, que pode ter levado à detecção do sinal proveniente do cristal em questão, mas também de uma determinada área em seu redor, podendo introduzir distorções no espectro. Além destes factores, a técnica utilizada para a análise química (EDS) tem associados erros não desprezíveis, que podem, em certos casos, chegar aos 20% do valor quantificado. Estes erros poderão ser reduzidos se forem utilizados padrões de composição certificada e semelhante à das amostras a analisar. Por fim, não podemos excluir a hipótese de termos identificado cristais que não foram ainda caracterizados.

Confirmámos ainda que a microscopia de luz polarizada parece ser um método fidedigno na identificação de cristais de monourato de sódio e de pirofosfato de cálcio. O estudo da sua composição química não parece ser possível por microscopia electrónica de transmissão, uma vez que se danificam rapidamente por acção do feixe de electrões, como já havia sido descrito.<sup>7</sup>

Em resumo, os microcristais parecem ser um achado universal em líquidos sinoviais de doentes com osteoartrose. A prevenção da sua formação poderá contribuir para travar a destruição articular nesta patologia.

### Referências

1. Inquérito Nacional de Saúde 1995/1996. Departamento de Estudos e Planeamento da Saúde, Ministério da Saúde.
2. Neto A, Parente M, Alves Matos AC, Pereira Silva JA. Epidemiologia das doenças reumáticas em Portugal -uma revisão bibliográfica. Sociedade Portuguesa de Reumatologia, 1996.
3. Estudo sobre a doença reumática em Portugal. IP-SOS, Portugal.
4. Coelho P, Matos ML. Doenças reumáticas nos cuidados de saúde primários: qual a sua importância? *Acta Reumatol Port* 1997; 80: 9-19.
5. Jesus H. Metodologia da análise de microcristais e células no líquido sinovial. *Acta Reumatol Port* 2001; 26: 87-95.
6. Nero P, Bravo Pimentão JM, Branco JC. Estudo do líquido sinovial: é útil na prática clínica? *Acta Reumatol Port* 2003; 28: 13-18.
7. H. Ralph Schumacher Jr, Antonio J. Reginato. Atlas of synovial fluid analysis and crystal identification. Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, 1991.
8. Jaovisidha K, Rosenthal AK. Calcium crystals in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14: 298-302.

### Endereço para correspondência:

Patrícia Nero  
Rua Prof. Luís da Cunha Gonçalves, nº 9 – 5ºdt.  
1600-826 Lisboa  
Tel: 916 421 656

Este trabalho foi realizado com uma bolsa de estudo da Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde, atribuída em 2001.