

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde
e Medicina Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DEFINIÇÃO DA ESPESSURA DA MEMBRANA BASAL GLOMERULAR PARA O
DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS GLOMERULARES NA BAHIA – UM ESTUDO EM
BIÓPSIA**

DÉBORA LEAL VIANA

Salvador - Bahia

2018

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde
e Medicina Investigativa**

**DEFINIÇÃO DA ESPESSURA DA MEMBRANA BASAL GLOMERULAR PARA O
DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS GLOMERULARES NA BAHIA – UM ESTUDO EM
BIÓPSIA**

DÉBORA LEAL VIANA

Orientador: Dr. Washington Luiz Conrado dos Santos
Co-orientador: Dr. Cláudio Pereira Figueira

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia em
Saúde e Medicina Investigativa para a
obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Viana, Débora Leal.
V614d Definição da espessura da membrana basal glomerular para o diagnóstico de
doenças glomerulares na Bahia – um estudo em biópsia. / Débora Leal Viana. -
2017.
57 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos, Laboratório
de Patologia Estrutural e Molecular.
Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2017.

1. Membrana Basal Glomerular. 2. Glomerulopatia. 3. Glomerulopatia
de lesões mínimas. 4. Nefrologia. I. Título.

CDU 616.61-002

” DEFINIÇÃO DA EXPESSURA DA MEMBRANA BASAL GLOMERULAR PARA O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS GLOMERULARES NA BAHIA – UM ESTUDO EM BIÓPSIA.”

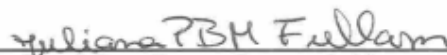
DÉBORA LEAL VIANA

FOLHA DE APROVAÇÃO

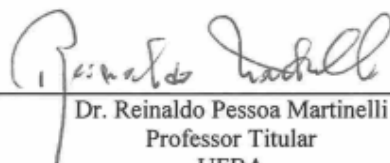
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Carolina Lara Neves
Professora Assistente
UFBA



Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullan
Pesquisadora
FIOCRUZ



Dr. Reinaldo Pessoa Martinelli
Professor Titular
UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

IGM

FAPESB

CNPq

AGRADECIMENTOS

A Jeová Deus, que por meio do seu filho Jesus Cristo, me cedeu o dom da vida.

Ao meu orientador Dr. Washington Luis Conrado dos Santos pelo apoio, ajuda e confiança.

Ao meu co-orientador Dr. Claudio Pereira Figueira pelo apoio, incentivo, amizade e disponibilidade de tempo dedicado ao meu trabalho.

A diretoria, funcionários e pacientes do HGRS em especial a Arlete, Victor Amoedo e toda equipe do SAME, HAN em especial Dr. Maurício, Leonardo e a equipe do SAME, HSA em especial Helena Souza e Dr. Sergio e ao HEC em especial a Dra. Márcia Bessa e Dra. Daniela Leal.

Ao Serviço de Microscopia Eletrônica do IGM – Dra. Adriana, Dra. Lucia, Tec. Marcio e Tec. Arlene. Por disponibilizar o espaço de SME, pela ajuda, pelos anos de amizade e pelo “*está horrível*” que serviu de incentivo COM CERTEZA, né Dra. Lucia.

A todos os integrantes do Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular – LAPEM e ao grupo de pesquisa WLCS, sem exceções.

A todos que fizeram parte direta ou indiretamente da minha vida nesses 6 anos de Fiocruz – Cláudia, Maíra, Anderson, Rafaela Assis, Sara, Rafaela Alves, Patrick, Dona Edna e Flávio, entre outro não citados, mas não menos importantes.

Ao meu grupo de amigas que ainda terá muitas histórias para contar, muitas risadas para dá e muitas lagrimas de alegrias para derramar – Ana Rafaela, Fernanda, Jessica, Roberta, Rosidete, Helena e Kercia.

A meus pais, irmãs, avós, tios e primos, que sempre estão presentes e me apoiam ao longo desse caminhar. Em especial a minha tia Maria José “Zelina” que é uma das maiores incentivadoras na luta em traçar caminhos diferentes daquelas que a vida insiste em nos dá. E a meu avô João Apostolo que nos deixou recentemente.

Ao Instituto Gonçalo Muniz, pela estrutura e ao CNPq pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

Para todas as coisas tenho forças
graças àquele que me dá poder.

Filipenses 4: 13

VIANA, Débora Leal. Definição da espessura da membrana basal glomerular para o diagnóstico de doenças glomerulares na Bahia – um estudo em biópsia. 57 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Glomerulopatias constituem a terceira causa de insuficiência renal no Brasil. Algumas dessas enfermidades estão associadas a defeitos na membrana basal glomerular (MBG), alterando sua espessura e compactação. Apesar de existirem parâmetros gerais da espessura normal da MBG, devido as variações encontradas em diferentes estudos, recomenda-se que valores normais para a MBG seja estabelecida nos diferentes serviços de diagnóstico nefropatológicos. **OBJETIVO:** Definir a espessura normal da MBG na população submetida a biópsia renal em Salvador. **METODOLOGIA:** Foi realizado um estudo de corte transversal com amostras de tecido renal de pacientes submetidos ao serviço de referência em nefrologia da Bahia e analisados no Instituto Gonçalo Moniz (IGM) - FIOCRUZ- BA. Foram incluídos pacientes com diagnóstico morfológico de alterações glomerulares mínimas, e excluídos os pacientes com *Diabetes Mellitus* ou hematúria. As amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão e em seguida foram aplicados dois métodos para mensurar a espessura da MBG, o método do direto (MD) e o método de interceptação ortogonal (MIO). **RESULTADOS:** Foram analisadas amostras de 32 pacientes, com idade que variaram de 3 a 62 anos, sendo 20 (62.5%) do sexo masculino e 12 (37.5%) do sexo feminino. Os valores encontrados da espessura normal da MBG na população de Salvador pelo MD foi de $380,4 \pm 48,71\text{nm}$ (média \pm SD) e pelo MIO foi de $373,5 \pm 48,91\text{nm}$ (média \pm SD). Observou-se correlação positiva nos valores encontrados nos dois métodos aplicados para mensurar a espessura da MBG. Não houve diferenças estatisticamente significantes da espessura da MBG com relação a idade ou ao sexo dos pacientes. **CONCLUSÕES:** Este é o primeiro trabalho apresentando estimativa da espessura normal da MBG de seres humanos realizado na Bahia, que poderá ser utilizado no auxílio diagnóstico doenças glomerulares.

Palavras-chave: Membrana Basal Glomerular; Glomerulopatias; Alterações Glomerulares Mínimas; Método Direto e Método de Interceptação Ortogonal





VIANA, Débora Leal. Definition of glomerular basic membrane thickness for the diagnosis of glomerular diseases - a study in biopsy. 57 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Glomerulopathies are the third cause of renal failure in Brazil. Some of these diseases are associated with defects in the glomerular basement membrane (GBM), changing its thickness and compaction. Although there are general parameters for normal thickness of the GBM, due to the variations found in different studies, it is recommended that normal values for the GBM be established in the different nephrology diagnostic services. **PURPOSE:** To define the normal thickness of the GBM in the population submitted to renal biopsy in Salvador. **METHODS:** A cross-sectional study was carried out with renal tissue samples from patients submitted to the nephrology reference service in Bahia and analyzed at Instituto Gonçalo Moniz (IGM) - FIOCRUZ-BA. Patients with a morphological diagnosis of minimal glomerular abnormalities were included, and patients with Diabetes Mellitus or hematuria were excluded. The samples were analyzed by transmission electron microscopy and then two methods were applied to measure the thickness of the GBM, the direct method (DM) and the orthogonal intercept method (OIM). **RESULTS:** A total of 32 patients, ranging from 3 to 62 years old, were analyzed, 20 (62.5%) were male and 12 (37.5%) were female. The normal thickness of GBM in the population of Salvador by MD was $380.4 \pm 48.71\text{nm}$ (mean \pm SD) and by MIO was $373.5 \pm 48.91\text{nm}$ (mean \pm SD). Positive correlation was observed in the values found in the two methods applied to measure the thickness of GBM. There were no statistically significant differences in GBM thickness with patient's age or sex. **CONCLUSIONS:** This is the first work presenting an estimate of the normal thickness of GBM of humans performed in Bahia, which could be used to aid diagnosis of glomerular diseases.

Keywords: Glomerular Basement Membrane; Glomerulopathies; Minimal Glomerular Changes; Direct Method and Orthogonal Intercept Method

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Membrana Basal Glomerular.** Secção de biópsia renal observada por microscopia eletrônica de transmissão, mostrando uma alça glomerular. MBG: Membrana Basal Glomerular, P: Podócito e E: Endotélio. 18
- Figura 2 Membrana basal glomerular.** Secção de biópsia renal observada por microscopia eletrônica de transmissão, mostrando afinamento da MBG (seta) sem divisão ou fragmentação da lâmina densa. E: célula endotelial, P: célula do podócito. Fonte: OKADA et al., 2014. 21
- Figura 3 Alterações na Membrana Basal Glomerular na Síndrome de Alport.** Secção de biópsia renal observado por microscopia eletrônica de transmissão. () espessamento e fragmentação da lâmina densa, adelgaçamento (), fusão dos processos podais (), E: célula endotelial. Fonte: OKADA et al., 2014. 24
- Figura 4 Lesões glomerulares em ND. (A)** Alterações leves por microscopia óptica e espessamento de MBG. **(B)** Expansão mesangial leve. **(C)** Expansão mesangial grave. **(D)** Lesão de Kimmelstiel-Wilson. Fonte: AN et al., 2015 adaptada. 27
- Figura 5** Fluxograma das etapas de análise de prontuários e/ou relatório de solicitação de biópsia renal. 32
- Figura 6** Fluxograma do total de cortes semifinos. 33
- Figura 7** Fluxograma do total de cortes ultrafinos realizados. 34
- Figura 8 Mensuração da espessura da MBG pelo método direto –** Medidas realizadas por alça glomerular com distância de 3µm entre elas. Uma reta () era tracejada entre os limites da MBG para a mensuração da espessura sua espessura. 35
- Figura 9 Mensuração da espessura da MBG pelo método de** **interceptação ortogonal –** Identificação dos pontos onde o 36

vértice da grade coincidia com a superfície endotelial da MBG (○). Uma reta era tracejada (—) até o limite da membrana do lado associado aos podócitos.

- Figura 10** Espessura da MBG avaliada pelo método direto por faixa etária. Não houve diferença entre as faixas etárias ($p=0,9379$). 40
- Figura 11** Análise de correlação da espessura da MBG, avaliada pelo método direto, e a idade dos pacientes. Não foi observado correlação entre as duas variáveis (Pearson, $r= 0.06845$; $p=0,4352$). 40
- Figura 12** Espessura da MBG por sexo, analisado pelo método direto. Não houve diferença entre gênero (Teste t, $p=0,0678$). 41
- Figura 13** Espessura da MBG avaliada pelo método de interceptação ortogonal nas faixas etárias 0-10, 11-20, 21-30 e 31-40 anos, (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p=0,77$). 42
- Figura 14** Análise de correlação entre a espessura da MBG pelo método de interceptação ortogonal e a idade dos pacientes, (Pearson, $r= 0,1855$; $p= 0,4336$). 43
- Figura 15** Média da espessura da MBG, por gênero, dos pacientes analisados pelo MIO (Teste t, $p=0,1446$). 43
- Figura 16** Correlação entre o método direto e o método de interceptação ortogonal pelo teste de estatístico de correlação de *Pearson*, $r=0,8973$. 45
- Figura 17** Distribuição dos valores da espessura da MBG pelo número de pacientes, avaliadas tanto pelo MD (A) como pelo MIO (B). 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características gerais dos pacientes incluídos nesse trabalho com diagnóstico de AGM.	38
Tabela 2	Número de pacientes distribuídos por faixa etária.	39
Tabela 3	Comparação entre as médias das duas técnicas utilizadas para mensuração.	44
Tabela 4	Comparação entre as médias das duas técnicas utilizadas para mensuração, distribuídas por gênero.	44
Tabela 5	Medida normal da espessura da MBG, por diferentes autores.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	<i>advanced glycated endproducts</i>
AGM	Alterações Glomerulares Mínimas
DCV	Doença cardiovascular
DLM	Doença de lesão mínima
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMF	Doença de membrana fina
DRC	Doença renal crônica
DRT	Doença renal terminal
ELSA-Brasil	Estudo longitudinal da saúde do adulto
GESF	Glomeruloesclerose Segmentar e Focal
HA	Hipertensão arterial
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
MBG	Membrana basal glomerular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
ND	Nefropatia Diabética
SA	Síndrome de Alport
SF	Semifinos
SME	Serviço de Microscopia Eletrônica
SUS	Sistema único de saúde
UF	Ultrafinos
MD	Método direto
MIO	Método de interceptação ortogonal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	MEMBRANA BASAL GLOMERULAR	18
2.2	DOENÇA DE MEMBRANA FINA	19
2.3	SÍNDROME DE ALPORT	21
2.4	NEFROPATIA DIABÉTICA	24
2.5	NEFROESCLEROSE HIPERTENSIVA	26
2.6	ESPESSURA NORMAL DA MEMBRANA BASAL GLOMERULAR.....	27
3	OBJETIVOS	30
3.1	GERAL.....	30
3.2	ESPECÍFICOS.....	30
4	METODOLOGIA	31
4.1	PACIENTES	31
4.2	PROCESSAMENTO DE AMOSTRA E ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	32
4.3	ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS E/OU RELATÓRIO DE SOLICITAÇÃO DE BIOPSIA RENAL.....	33
4.4	CORTES SEMIFINOS E ULTRAFINOS	34
4.5	ANÁLISE DAS ELETROMICROGRAFIAS	35
4.5.1	Método Direto	36
4.5.2	Método de Interceptação Ortogonal	37
4.6	ANÁLISES DOS RESULTADOS	38
4.7	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	39
5	RESULTADOS	40
5.1	CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES	40
5.2	MEDIDA DA ESPESSURA DA MBG PELO MÉTODO DIRETO	41
5.3	MEDIDA DA ESPESSURA DA MBG PELO MÉTODO DE INTERCEPTAÇÃO ORTOGONAL	43
5.4	COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO DIRETO E O MÉTODO DE INTERCEPTAÇÃO ORTOGONAL	45

5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS	54
	APÊNDICE 1	59

1 INTRODUÇÃO

Enfermidades renais são frequentes no Brasil. Segundo dados do Estudo Longitudinal da Saúde do Adulto (ELSA-Brasil), cerca de 1 em cada 10 adultos dos participantes inscritos neste estudo, avaliados de 2008 a 2010, tem Doença Renal Crônica (DRC), sendo a prevalência maior em indivíduos com menor nível educacional e entre pessoas negras e indígenas (BARRETO et al., 2016).

A insuficiência renal crônica afeta a qualidade de vida e reduz significativamente a expectativa de vida dos indivíduos acometidos. Além disso, resulta em importantes perdas econômicas para as famílias e para o Estado Brasileiro. Estima-se que cerca de 10% dos gastos do Ministério da Saúde esteja associada ao tratamento desse grupo de doenças (SANCHO; DAIN, 2008). O Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica de 2014 mostrou que dos 48.834 pacientes em diálise nas 312 unidades que responderam ao inquérito nacional, 85% tem seus gastos reembolsados pelo sistema único de saúde (SUS) e 15% por seguros de saúde privado (SESSO et al., 2016).

Glomerulopatias constituem a terceira causa de insuficiência renal no Brasil, sendo que a hipertensão e a diabetes ocupam os primeiros lugares. Contudo, muitas glomerulopatias cursam com hipertensão, característica, muitas vezes, determinante para insuficiência renal crônica (SESSO et al., 2014). Um estudo sobre a distribuição das doenças glomerulares em Salvador, entre 2003 e 2015, identificou a GESF como a nefropatia primária mais frequente, correspondendo a 25% dos casos das 1.312 biopsias renais analisadas (DOS-SANTOS, W. L. et al., 2017).

GESF está associada a um leque de doenças causadas por vírus, drogas, fatores hemodinâmicos e mutações gênicas. Muitas das mutações associadas à GESF estão relacionadas aos podócitos. Entretanto, mutações de componentes da membrana basal glomerular (MBG) podem levar a um quadro de esclerose glomerular progressiva com proteinúria e hematúria, difícil de distinguir clínica e laboratorialmente de outros tipos de GESF (ABRANTES et al., 2005). Na realidade, o diagnóstico adequado dessas condições requer

exame ultraestrutural do glomérulo com atenção às alterações da membrana basal glomerular (MBG).

A avaliação da espessura da MBG é essencial no diagnóstico de algumas doenças glomerulares como a Doença de Membrana Fina (DMF), (SATO et al., 2010), e a Síndrome de Alport (SA), avaliadas a partir de imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), (LONGO et al., 2002). Pelas análises ultraestruturais das biópsias renais é possível observar irregularidades na MBG como espessamento e adelgaçamento da MBG e fragmentação da lâmina densa, o que levaria a mudanças nos valores da espessura da membrana.

Considerando os achados na literatura e de diferentes serviços de nefropatologia, observa-se que há variações dos valores estabelecidos como limites da espessura da MBG. A exemplo do estudo de Marquez e colaboradores (2003), o qual definiu o intervalo de 200 a 300nm a espessura normal da MBG na população estudada, para adultos e crianças. Enquanto que no estudo de Kfoury e Frçpa (2012), o intervalo foi de 190 a 375nm. Estas variações, em diferentes populações, criam incertezas que podem dificultar no diagnóstico das patologias referidas acima (WU; DIKMAN, 2010).

Sendo assim, é importante e necessário definir parâmetros de medidas e valores normais da espessura da MBG em uma população específica para que sirva, com mais exatidão, como referência para auxiliar no diagnóstico das alterações das membranas glomerulares. E reforça a recomendação, observada na literatura, que aconselha que os serviços de nefropatologias avaliem os valores normais da MBG da população de estudo, visto que podem ocorrer diferenças com relação as populações originárias de diferentes países ou decorrentes de limitações técnicas, como dificuldade em obter tecido renal normal apropriado para medições e diferenças no processamento dos fragmentos de rim para análise por MET (HALA KFOURY, 2016; RAMAGE et al., 2002).

A realização dos estudos para definir parâmetros normais da espessura da MBG, há questões éticas e técnicas limitantes. A obtenção de amostras de rim de indivíduos hígidos é inviável do ponto de vista ético, considerando que a

retirada de um fragmento do rim é um procedimento invasivo e põe em risco a saúde do indivíduo. Por outro lado, a obtenção de amostras de cadáveres submetidos a necropsias encontra limitações técnicas devido ao prolongado tempo de espera do momento da morte do indivíduo até a realização da necropsia, o que pode acarretar em alterações morfológicas importantes devido ao processo de autólise iniciado após a morte.

Uma alternativa para contornar estas limitações é a avaliação da espessura da MBG a partir de casos de pacientes com Alterações Glomerulares Mínimas (AGM). Esta categoria morfológica inclui uma variedade de condições patológicas nas quais os rins se mantêm histologicamente normais, como Doença de Lesões Mínimas. Esta doença é caracterizada clinicamente por um quadro de síndrome nefrótica e a histologia do rim apresenta glomérulos com aspectos normais à microscopia óptica e nenhum ou mínimos depósitos de imunoglobulinas e/ou fatores do complemento (IgM e C3) são detectados por imunofluorescência (BANSAL, 2014).

Quanto a metodologia aplicada para a mensuração da espessura da MBG, observa-se também variações dos métodos empregados entre os estudos. Porém, dois métodos são aplicados mais frequentemente, que são o método direto (MD) e o método de interceptação ortogonal (MIO). O MD consiste em realizar dezesseis medidas aleatórias em um único glomérulo e o MIO define o ponto da alça glomerular para realizar a medida, onde há interceptação dos vértices da grade de 200x200nm, sobreposta a imagem do glomérulo, com o limite da MBG da face endotelial em pelo menos dois glomérulos. Estes dois métodos diferenciam significativamente na complexidade de serem executados, sendo o MD mais simples e rápido, comparado com o MIO. Isto tem motivado a realização de alguns estudos para compará-los, sendo que até o momento não foi demonstrado diferenças significativas dos resultados obtidos da espessura da MBG utilizando os dois métodos. (SZETO et al, 2010; RAMAGE et al., 2002; DAS; PICKETT e TUNGEKAR, 1996; DISCHE et al., 1990; JENSEN, GUNDERSEN e MSTERBY, 1978;)

As alterações estruturais na MBG refletem na medida da sua espessura. Neste trabalho, foi avaliado a espessura da MBG de indivíduos em diferentes faixas etárias na população de Salvador, para obtenção de valores de referência. Estes valores servirão no auxílio ao diagnóstico de glomerulopatias relacionadas com alterações estruturais da membrana glomerular, como em doenças genéticas ligadas a mutações de componentes da MBG, como a SA e da DMF.

Este material será utilizado pelo serviço de nefropatologia do Instituto Gonçalo Moniz – IGM/FIOCRUZ- BA, que atende diferentes hospitais da rede SUS da Bahia. Além disso, a existência desse registro contribuirá para melhorar a consistência de registros semelhantes, a nível nacional e internacional (BARROS et al., 2012; SATO et al., 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MEMBRANA BASAL GLOMERULAR

A MBG é uma barreira seletiva de filtração atuando de acordo com a carga elétrica e o tamanho das moléculas que passam pelo glomérulo. (BARROS, et. al., 2012). É constituída por um gel polianiônico e apresenta três zonas: zona central densa, denominada lâmina densa, uma zona menos densa, denominadas lâminas rara externa em contato com os processos podais (podócitos), e uma lâmina rara interna, sobre a qual se apresentam as células endoteliais. Essas estruturas possuem elementos de constituição como o colágeno tipo IV, lamininas, proteoglicanos e fibronectinas (Figura 1) (POLLAK et al., 2014).

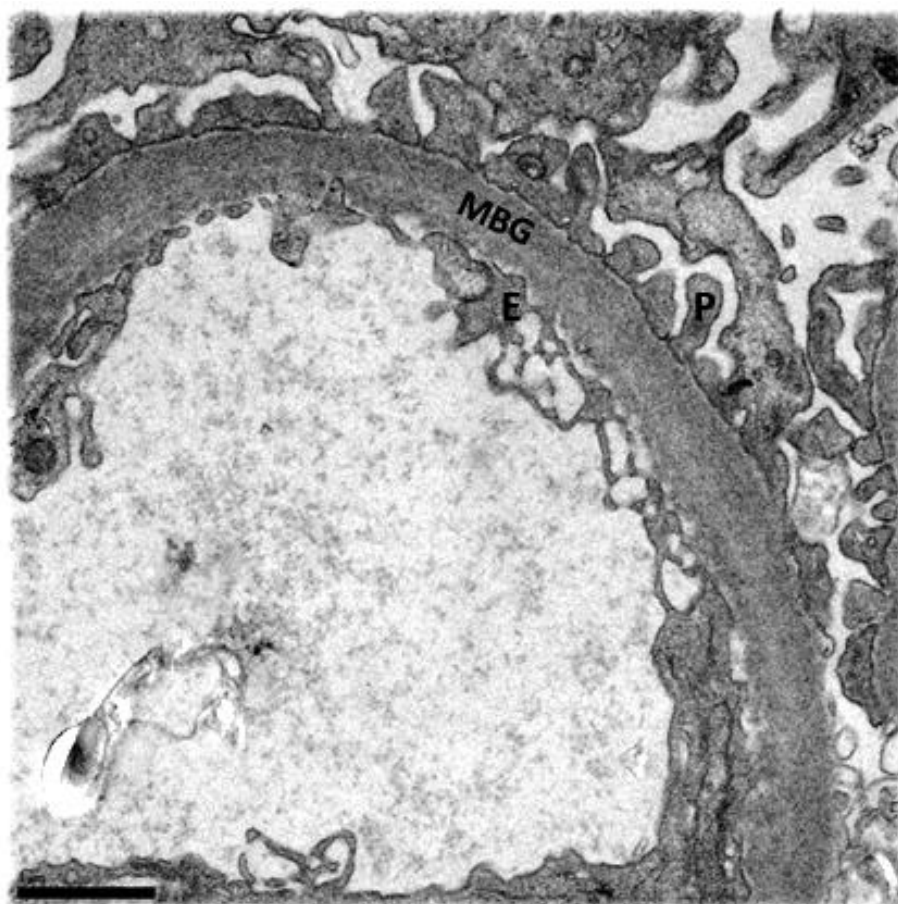


Figura 1. Estrutura normal da Membrana Basal Glomerular. Secção de biópsia renal observada por microscopia eletrônica de transmissão, mostrando uma alça glomerular. MBG: Membrana Basal Glomerular, P: Processo Podal e E: Endotélio fenestrado.

A laminina é uma molécula de matriz extracelular, constituída por uma família de isoformas diferentes. É a principal proteína não-colagênica da MBG, formada por três cadeias polipeptídicas: Cadeia A (Alfa- α), B1 (Beta- β) e B2 (Gama- γ). Cada uma dessas três cadeias pode variar criando heterodímeros diferentes, por exemplo: laminina $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ que é referido como laminina-221 ou LM-221. A função da laminina envolve, principalmente a adesão e migração celular (MINER, 2012).

A entactina (ou nidógeno) é uma glicoproteína encontrada em todas as membranas basais. Está tem a capacidade de estabelecer ligações cruzadas com as lamininas, o colágeno e ao sulfato de heparan, participando na montagem e organização dessas estruturas. Já os proteoglicanos compreendem vários tipos de proteínas encontradas em membranas basais, como o sulfato de heparan que é o mais abundante na MBG e tem papel importante na seletividade de carga (BARROS et al., 2012).

O colágeno tipo IV representa o principal constituinte da membrana basal. Sua molécula, de aspecto helicoidal, forma-se pela união de três cadeias alfa. São conhecidos seis tipos de cadeias alfas, individualizadas pela composição molecular e que podem variar conforme a localização na membrana basal. Na lâmina densa, predomina as cadeias alfa-3, alfa-4 e alfa-5, nas lâminas raras predominam as cadeias alfa-1 e alfa-2 (BARROS et al., 2012). Anormalidades em quaisquer uma dessas cadeias, impede a formação do trímero que constitui molécula do colágeno tipo IV, podendo levar ao surgimento de alterações estruturais na MBG, presentes em glomerulopatias como a SA a DMF (PESCUCCI et al., 2004). Estas alterações repercutem na morfologia da membrana glomerular, levando a irregularidade na espessura ao longo das alças glomerulares, no caso da SA, ou redução na espessura da MBG, no caso da DMF.

2.2 DOENÇA DE MEMBRANA FINA

A DMF é também conhecida como: hematúria familiar benigna, hematúria benigna persistente ou hematúria benigna essencial. É uma doença hereditária, possivelmente de caráter autossômica dominante, caracterizada por hematúria com evolução benigna, que raramente evolui para a perda de

função renal (BARROS et al., 2012). A DMF é resultado de mutações nos genes *COL4A3* e *COL4A4* que codificam a cadeia alfa-3 e alfa-4 do colágeno IV da MBG. Alterações morfológicas da MBG são as principais características da DMF, observada por MET, que mostra afinamento da membrana praticamente em toda sua totalidade, sem, porém, a presença de fragmentação da lâmina densa ou alterações dos processos podais (Figura 2) (OKADA et al., 2014).

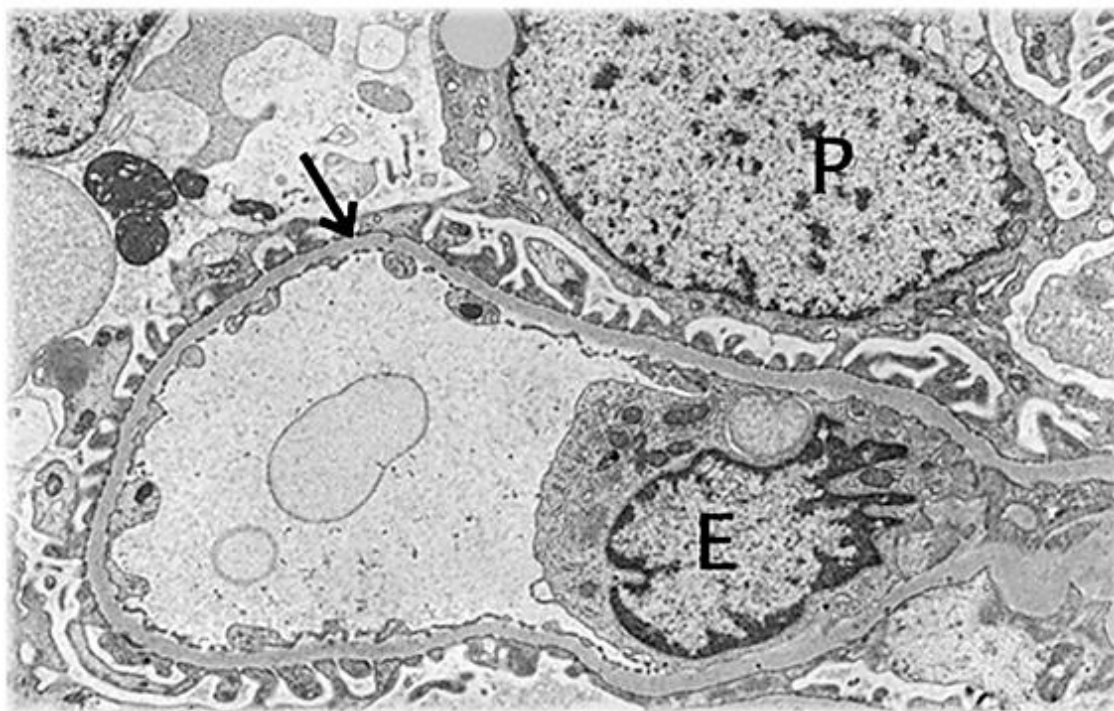


Figura 2. Alteração na membrana basal glomerular na doença de membrana fina. Secção de biópsia renal observada por microscopia eletrônica de transmissão, mostrando afinamento da MBG (seta) sem divisão ou fragmentação da lâmina densa. E: célula endotelial, P: célula do podócito. Fonte: OKADA et al., 2014.

A DMF caracteriza-se clinicamente por hematúria microscópica persistente e afeta em média 1% da população. É uma das condições mais comuns que afetam os rins após infecções, hipertensão e cálculos renais. O quadro de hematúria geralmente é assintomático e pode ser diagnosticada por exames de rotina (SAVIGE et al., 2003). A hematúria é também descrita como “isolada”, já que os indivíduos acometidos geralmente não têm proteinúria ou apresentam uma proteinúria discreta, indicando que a fenda de filtração raramente é afetada. A proteinúria desenvolve normalmente depois de hematúria, e raramente é visto em crianças, no entanto uma proporção

significativa de pacientes adultos apresentam proteinúria discreta (TRYGGVASON; PATRAKKA, 2006).

As amostras de biópsias renais de pacientes com DMF, observadas ao microscópio óptico, mostram histologia glomerular quase normal com a expansão leve do mesângio e proliferação celular. Com o envelhecimento é possível encontrar, em aproximadamente, 5 a 25% dos casos, um quadro de esclerose glomerular focal e fibrose tubular. No entanto, as alterações histopatológicas, observadas na avaliação feita ao microscópio óptico, não são específicas. (TRYGGVASON; PATRAKKA, 2006). O adelgaçamento da MBG observado pela MET, também pode ser encontrada em pacientes portadores de SA em estágio inicial. Nesse contexto, é imprescindível fazer um diagnóstico diferencial com outras doenças hematóricas assintomáticas, como a Nefropatia por IgA e SA (BRASILEIRO, 2011). SZETO e colaboradores (2010) utilizando o MIO por meio do estudo morfométrico de imagens de MET, considerou DMF os pacientes com espessura da MBG inferior a 250nm.

A imunofluorescência para cadeias alfa do colágeno tipo IV é sugerida como diagnóstico diferencial, visto que em mutações ligadas à cadeia alfa-5 em pacientes do sexo masculino (ligada ao cromossomo X), não haveria positividade para a SA, porém, estaria presente em pacientes com diagnóstico de DMF (BARROS et. al. 2012). Portanto, é necessário um estudo familiar preciso, exame de urina dos familiares e identificação dos diferentes padrões de herança dos membros da família que pode resultar em diferenças no aconselhamento genético, permitindo o diagnóstico diferencial e promovendo uma melhor compreensão do processo da doença. A presença de homens com insuficiência renal é altamente sugestiva de SA (ENDREFFY et al., 2011).

2.3 SÍNDROME DE ALPORT

A síndrome de Alport (SA) é a mais frequente das doenças glomerulares hereditárias que evoluem para DRC, correspondendo a aproximadamente 1% das biópsias analisadas em Salvador entre 2003 e 2015 (DOS-SANTOS, W. L. et al., 2017). Atribui-se a Guthrie, em 1927, a descrição inicial de uma família com hematuria recorrente. Entretanto, Arthur Cecil Alport relatou a ocorrência de surdez associada à hematuria e desenvolvimento de uremia nos homens

afetados. Contrariamente, as mulheres afetadas sobrevivem até a velhice e desenvolvem a forma mais leve da doença (BARROS et. al. 2012; APPEL, 2012).

A SA é caracterizada por anormalidades nos genes *COL4A3* ou *COL4A4*, e *COL4A5* das cadeias alfa-3, alfa-4 e alfa-5 do colágeno IV (OKADA et al., 2014). Pode ser transmitida por três formas de herança genética. Uma das formas está ligada ao cromossomo X, que corresponde à maioria dos casos e na qual os homens são mais afetados, devido às mutações no gene *COL4A5*. A forma autossômica dominante ocorre com menor frequência, sendo menos de 10% dos casos. A transmissão pode ser autossômica recessiva que se caracteriza por mutações nos genes *COL4A3* ou *COL4A4*. Nesta forma mais rara, ambos os sexos podem ser gravemente afetados (PESCUCCI et al., 2004).

A doença geralmente se manifesta em crianças ou adultos jovens e se caracteriza nos homens pela presença de hematúria (microscópica ou macroscópica) e proteinúria inicialmente leve, mas que aumenta progressivamente com a idade, podendo evoluir para DRT. Na maioria das mulheres, a doença é leve ou parcialmente expressa, poucas chegam a apresentar características graves da doença (NACHMAN, 2012).

Um estudo realizado com quatro famílias de portadores de SA, com transmissão autossômica dominante e mutações nos genes *COL4A3* (duas famílias) e *COL4A4* (duas famílias), mostrou a presença de hematúria microscópica na maioria dos casos. Todos os quatro portadores estudados foram submetidos à biópsia renal e observadas por MET. Dois deles tinham espessamento e fragmentação da MBG (com idades entre 30 e 37 anos, respectivamente), enquanto um mostrou apenas adelgaçamento da MBG (idade 51 anos) e o outro mostrou apenas fragmentação da lâmina densa (idade 36 anos) (PESCUCCI et al., 2004).

Os glomérulos na fase inicial da doença podem apresentar aspectos normais e o diagnóstico realizado por imunofluorescência pode produzir, em alguns casos, resultados falso-negativos para as portadoras de SA (TRYGGVASON; PATRAKKA, 2006). Por outro lado, a análise por microscopia

eletrônica de transmissão permite um diagnóstico consistente, permitindo detectar lesões como irregularidade na espessura da MBG, com regiões de extenso adelgaçamento, podendo atingir 128 a 178nm de espessura (SANTOS et al., 2017). Além de regiões de espessamento da membrana, e fragmentação da lâmina densa, como observadas na Figura 3 (OKADA et al., 2014).

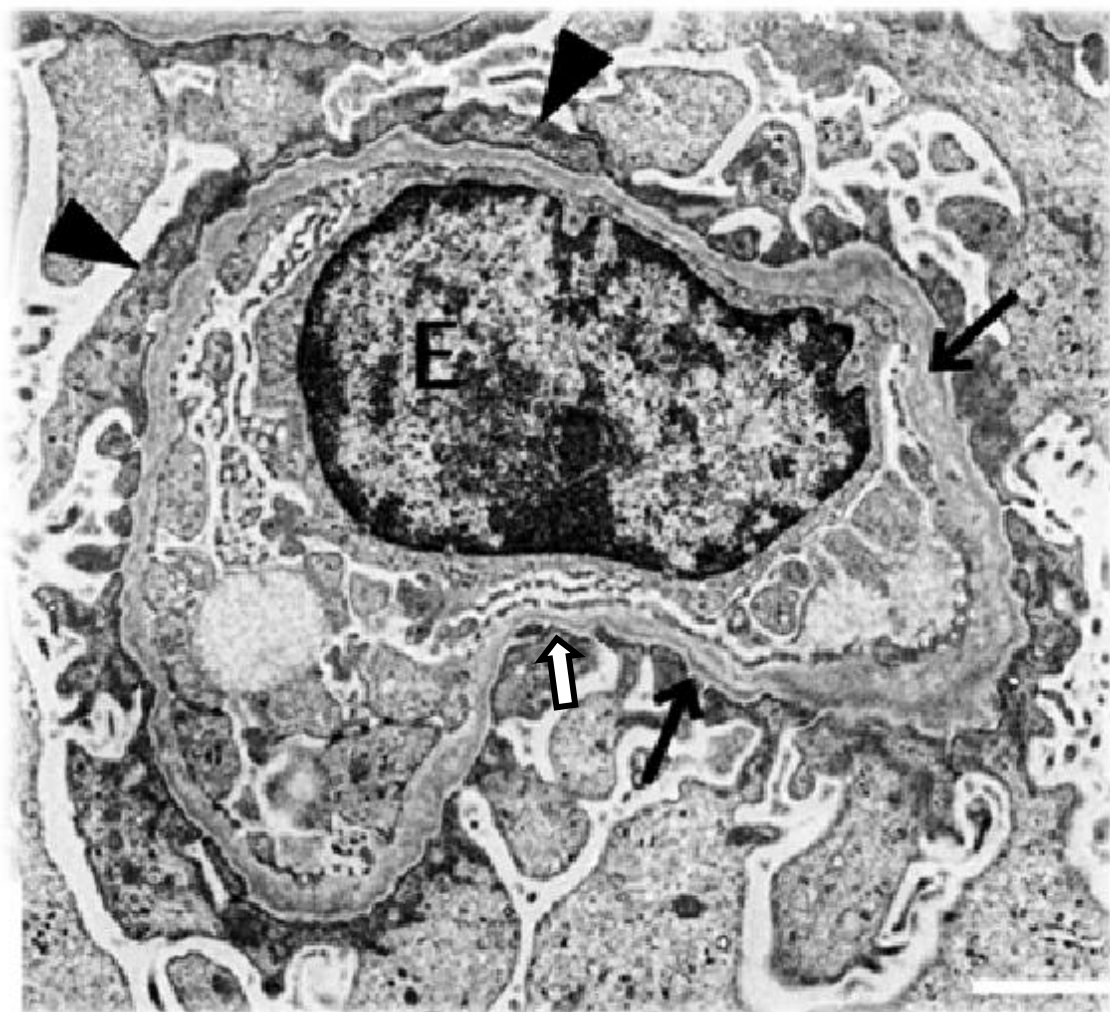


Figura 3. Alterações na Membrana Basal Glomerular na Síndrome de Alport. Secção de biópsia renal observado por microscopia eletrônica de transmissão. (↗) espessamento e fragmentação da lâmina densa, adelgaçamento (↗), fusão dos processos podais (▲), E: célula endotelial. Fonte: OKADA et al., 2014.

2.4 NEFROPATIA DIABÉTICA

Nefropatia diabética (ND) é caracterizada pela presença de proteínas plasmáticas na urina, superior a 0,5g/24h em pacientes portadores de *Diabetes mellitus* (DM). Afeta aproximadamente 40% dos pacientes diabéticos tipo 1 e tipo 2. A ND está associada ao aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares e é a principal causa de doença renal crônica (GROSS et al., 2005). É classificada de acordo com o nível de excreção urinária de albumina, nos estágios de microalbuminúria ou nefropatia incipiente ($\geq 30\text{mg}/24\text{h}$ ou $20\mu\text{g}/\text{min}$), macroalbuminúria ou nefropatia clínica ($\geq 300\text{mg}/24\text{h}$ ou $\geq 200\text{g}/\text{min}$) e diminuição da taxa de filtração glomerular (MARK, 2004).

A ND raramente se desenvolve antes dos 10 anos de diagnóstico de DM tipo 1, com pico de incidência entre os 10 a 20 anos de diabetes. Outros fatores de risco associados ao desenvolvimento da ND são a duração da doença, gênero, fatores raciais e étnicos, fatores genéticos e o grau de controle metabólico (TYAGI et al., 2008). Pacientes com DM e proteinúria apresentam um risco 100 vezes maior de morte prematura em comparação a população não-diabética. Em contrapartida, pacientes diabéticos sem nefropatia apresentam taxa de mortalidade duas vezes superior aquelas observadas em indivíduos não-diabéticos (SALGADO, 2004).

As principais alterações patológicas que ocorrem nos rins de pacientes com ND estão localizadas nos glomérulos e apresentam características morfológicas semelhantes no pacientes com DM tipo 1 e tipo 2, embora as lesões sejam mais precoces e de evolução mais rápida na DM tipo 1 (BRASILEIRO, 2011).

Na diabetes, os volumes renais e glomerulares estão aumentados e continua a crescer com a evolução da doença. Essa característica pode estar relacionada ao espessamento da MBG, aumento difuso da matriz e discreta hiperplasia mesangial (SALGADO, 2004). A expansão mesangial acontece, provavelmente, devido à maior produção de matriz extracelular que está relacionada à glicosilação não-enzimática das proteínas, em condições hiperglicêmicas. A glicose liga-se aos grupos amino das proteínas e forma compostos que, por ligação covalente com grupos amino de outras proteínas,

resultam em complexo proteína-proteína (AGE, de *advanced glycated endproducts*) (MOHSEN, 2015).

Os AGEs interagem com o colágeno induzindo a síntese de matriz e colágeno tipo IV pelas células mesangiais que proliferam. Contribuindo para alterar a função dos macrófagos, para a expansão mesangial e oclusão glomerular. Além da redução na síntese de glicosaminoglicanos, especialmente o sulfato de heparano, que modifica a estrutura da MBG e sua permeabilidade às macromoléculas, o que facilita a passagem de albumina (SALGADO, 2004; BRASILEIRO, 2011).

O espessamento da MBG é uma alteração característica da DM. Um estudo realizado com 396 pacientes com DM2 e ND comprovada por biópsia renal, que foram acompanhados durante pelo menos 1 ano, mostrou que o espessamento da MBG estava presente em 53 pacientes, o que correspondeu a 13,4% das biopsias analisadas. Além disso, 87 (22%) pacientes apresentaram expansão mesangial leve e 32 (8,1%) com expansão mesangial grave (AN et al., 2015) (FIGURA 4). Quase todos os casos de DM tipo 1, há espessamento difuso da membrana basal dos glomérulos, túbulos e capilares, inclusive em outros órgãos (BRASILEIRO, 2011).

Tyagi e colaboradores (2008) compararam a espessura da MBG em pacientes na fase pré-clínicos e clínicos da DM, além de avaliarem um grupo controle. O grupo clínico mostrou valores médios da espessura da MBG significativamente maior ($578,37 \pm 192,29$ nm) em comparação com os grupos pré-clínicos ($464,66 \pm 95,9$ nm; $P < 0,005$) e o grupo controle ($309,00 \pm 40,48$ nm; $P < 0,005$). Essas observações sugerem que a espessura do MBG pode estar relacionada ao progresso do estágio pré-clínico ao clínico da doença.

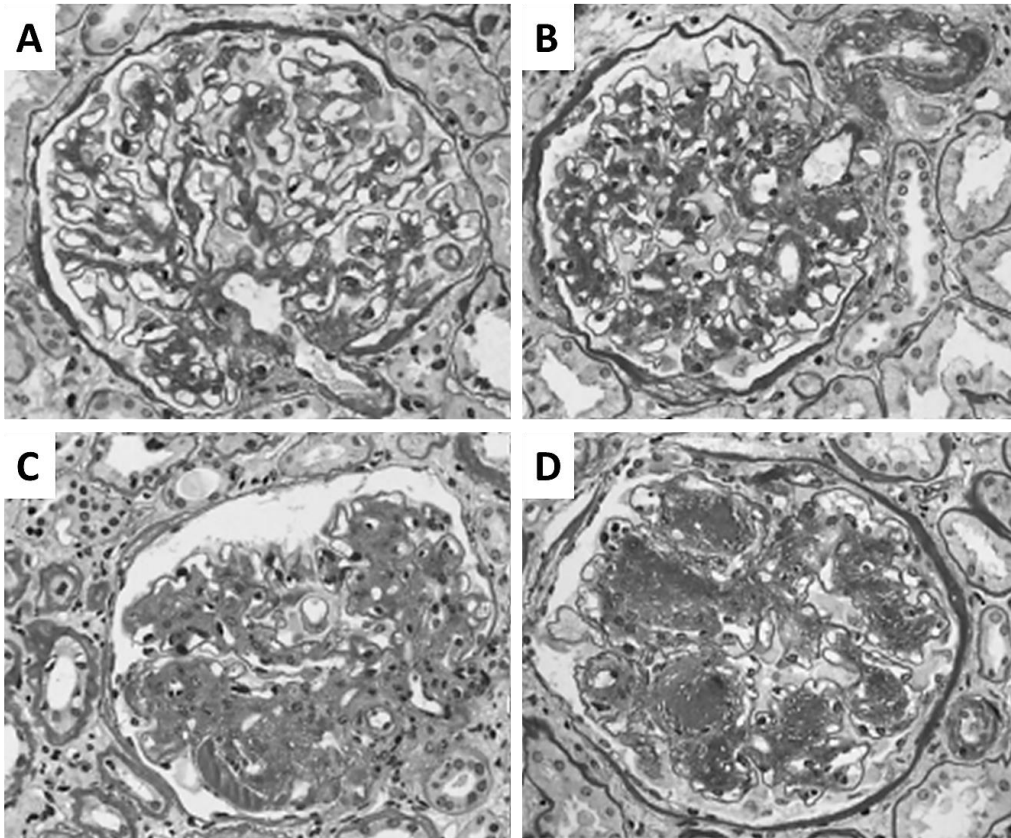


Figura 4: Lesões glomerulares em ND. (A) Alterações leves por microscopia óptica e espessamento de MBG. (B) Expansão mesangial leve. (C) Expansão mesangial grave. (D) Lesão de Kimmelstiel-Wilson. Fonte: AN et al., 2015 adaptada.

2.5 NEFROESCLEROSE HIPERTENSIVA

A Hipertensão arterial (HA) é uma condição clínica caracterizada por elevação sustentada dos níveis pressóricos ≥ 140 e/ou 90 mmHg. Ela pode estar associada a distúrbios metabólicos, alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo. No Brasil, HA atinge 32,5% de indivíduos adultos (36 milhões) e mais de 60% dos idosos, o que contribui direta ou indiretamente para 50% das mortes por doença cardiovascular (DCV) (SBC, 2016).

A hipertensão é classificada em benigna e maligna. O dano renal desses tipos de hipertensão é categorizado como nefroesclerose benigna e nefroesclerose maligna, respectivamente (LIANG et al., 2016). O termo "nefroesclerose" ("endurecimento do rim") foi introduzido em 1918, pelos clínicos e patologistas alemães Franz Volhard e Theodor Fahr, que sugerem o

surgimento de uma fibrose tecidual e pode aplicar-se a maioria das doenças renais crônicas (MEYRIER, 2015).

Na fase inicial da nefroesclerose benigna, os rins podem apresentar volume normal ou discretamente reduzido, no entanto, com a evolução da doença, há grande redução no seu tamanho, que pode chegar a menos da metade do volume inicial, constituindo o chamado “rim contraído primário”. As alterações mais características da nefroesclerose benigna são a presença de depósitos hialinos e esclerose de arteríolas aferentes e de artérias interlobulares (MALHEIROS, 1998).

Dois tipos de lesões relacionadas à nefroesclerose benigna podem comprometer os glomérulos, muitas vezes de forma concomitante: a GESF e a glomerulopatia isquêmica. Os glomérulos isquêmicos sofrem retração de tufo, dobramento da MBG e espessamento da cápsula de Bowman (MEYRIER, 1998; MALHEIROS, 1998).

As implicações renais a longo prazo são muito piores em pacientes com nefroesclerose maligna (LIANG et al., 2016). Nessa fase os glomérulos podem ainda apresentar alças capilares dilatadas e repletas de hemácias, com perda de células endoteliais. Outro aspecto bastante frequente é o de colapso isquêmico, com enrugamento e espessamento da MBG, devido à obstrução dos vasos pré-glomerulares. Todas essas lesões podem evoluir para fibrose global do glomérulo (MALHEIROS, 1998).

2.6 ESPESSURA NORMAL DA MEMBRANA BASAL GLOMERULAR

A avaliação da espessura da MBG é um parâmetro que auxilia no diagnóstico de doenças renais associadas a malformação e/ou a mutações das cadeias constituintes do colágeno (BARROS et al., 2012). Entretanto, alguns estudos mostram que há variações da espessura considerada normal da MBG de acordo com as populações ou faixa etária. Sato e colaboradores (2010) analisaram a espessura da MBG de 19 pacientes (10 homens e 9 mulheres) e 1 autopsia de um bebê de nove meses, de descendência japonesa com DLM.

Foram analisados dois glomérulos para cada amostra de biópsia, calculada a média aritmética e o DP de 10 a 15 pontos uniformemente distribuídos pela alça glomerular e não observaram diferença significativa entre os sexos. Na infância, de 3 a 11 anos (n:7), a média foi de $243 \pm 12\text{nm}$, com aumento discreto na fase adulta de 12 a 57 anos (n:8), com $353 \pm 20\text{nm}$ e com leve redução na velhice 60 a 70 anos (n:4) com média de $287 \pm 25\text{nm}$.

Para Kfoury e Frcpa (2012) que avaliaram a espessura da MBG em pacientes Sauditas com DLM, com idade entre 2 a 70 anos. Foram avaliados três glomérulos por paciente, no total de 200 mensurações para cada eletromicrografia. A espessura da MBG para os pacientes com idade entre 0 a 5 anos (n:5) foi de $211 \pm 7,4\text{nm}$. Para a faixa etária de 6-10 anos a média foi correspondente a $276,1 \pm 40,9\text{nm}$, os pacientes da faixa etária de 11-17 (n:13) a média foi de $326,9 \pm 18,9\text{nm}$, para os pacientes com idade entre 18 a 60 anos (n:26) foi de $352,7 \pm 16,6\text{nm}$, para os pacientes com idade superior a 60 anos (n:2) a média da espessura da MBG correspondeu a $372,5 \pm 3,5\text{nm}$

Um estudo baseado em biópsia mensurou a espessura da MBG em 20 pacientes com idade entre 4 a 69 anos, utilizando dois métodos. O método simplificado que consistiu em realizar 5 mensurações, distribuídos uniformemente, ao longo da MBG e o método detalhado que consistiu em realizar o número máximo de medidas ao longo da MBG, com distância de 4mm e determinaram a espessura da MBG de adultos entre 300 a 400nm. Os pacientes foram subdivididos em três grupos, com relação a espessura da MBG: (A) normal, (B) fino, e (C) espesso. Foi considerado espessura normal da MBG os pacientes adultos (n:8) que tiverem espessura entre 300 a 400nm e crianças (n:1) com espessura de 200 a 300nm. A média de espessura da MBG da criança foi $251 \pm 40\text{nm}$ (média \pm desvio padrão) pelo método simplificado e $246 \pm 44\text{nm}$ pelo método detalhado. A média para os pacientes adultos pelo método simplificado foi de $362 \pm 92\text{nm}$ e $358 \pm 90\text{nm}$ pelo método detalhado. (MARQUEZ et al., 2003).

Utilizando o MD e o MIO, Ramage e colaboradores (2002), avaliaram a espessura da MBG de 212 crianças, com idade variando 1,3 a 20,8 anos que nasceram no Reino Unido e observaram que a espessura da MBG aumentou ao longo da infância, de $194 \pm 6,5\text{nm}$ (média \pm SE) em um ano para 297 ± 6 nm aos 11 anos, com uma taxa de aumento reduzida após os 11 anos de idade.

No entanto, não há critérios definidos ou concordância uniformes dos limites da espessura considerada normal da MBG provavelmente por causa da dificuldade na obtenção de tecido renal normal adequada para medições de controle. Outra questão é a não padronização de métodos utilizados para a mensuração (HALA KFOURY, 2016). O MD e o MIO são os métodos mais utilizados para mensurar a espessura da MBG, segundo a literatura (SZETO et al, 2010; RAMAGE et al., 2002; DAS; PICKETT e TUNGEKAR, 1996; JENSEN, GUNDERSEN e MSTERBY, 1978; DISCHE et al., 1990). Desta forma é recomendável que cada serviço de nefropatologia realize a sua padronização com a população de estudo (BARROS, et al., 2012; SATO et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Definir a espessura normal da membrana basal glomerular na população submetida a biópsia renal em Salvador como parâmetro para o diagnóstico de alterações glomerulares.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Comparar dois métodos de histomorfometria para mensurar a espessura da membrana basal glomerular;
2. Definir os valores da espessura normal da membrana basal glomerular em diferentes faixas etárias: 0-10, 11-20, 21-30, 31-40 e > 60 anos;
3. Elaborar um manual de referência como apoio ao diagnóstico das doenças renais glomerulares.

4 METODOLOGIA

4.1 PACIENTES

Trata-se de um estudo de corte transversal, avaliando-se biópsias de rim, armazenadas no Serviço de Microscopia Eletrônica (SME) do Instituto Gonçalo Moniz (IGM) - FIOCRUZ- BA. As biópsias foram processadas para fins de diagnóstico, provenientes de pacientes dos principais serviços de referência em nefrologia do estado da Bahia (Hospital Roberto Santos, Hospital Ana Neri, Hospital Santo Antônio e Hospital Estadual da Criança-Feira de Santana). Inicialmente seriam avaliados dez indivíduos por faixa etária, distribuídas em sete grupos: 0 a 10, 11 a 20, 21 a 30, 31 a 40, 41 a 50, 51 a 60 e >60 anos. No entanto, devido ao número pequeno de pacientes incluídos na pesquisa, obteve-se um total de cinco grupos: 8 indivíduos na faixa etária de 0 a 10 anos, 7 com idade entre 11 a 20 anos, 9 indivíduos na faixa etária de 21 a 30 anos, 7 com idade entre 31 a 40 anos e 1 paciente com idade superior a 60 anos.

Para realização desse estudo nós utilizamos os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

- Critérios de inclusão:
 - ✓ Biópsias de pacientes com alterações glomerulares mínimas
 - ✓ Presença de pelo menos um glomérulo nos cortes semifinos (preparatório para microscopia eletrônica).

- Critério de exclusão:
 - ✓ Pacientes com diagnóstico de *Diabetes Mellitus* ou glicemia elevada e/ou em uso de hipoglicemiantes.
 - ✓ Pacientes que apresentavam hematúria (≥ 3 por campo) no período da biópsia.
 - ✓ Ausência de glomérulo nos cortes semifinos

4.2 PROCESSAMENTO DE AMOSTRA E ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os fragmentos de tecido renal dos pacientes foram obtidos por meio de biópsia do rim, realizada pelo médico nefrologista na unidade hospitalar. Após a coleta, os fragmentos foram imediatamente mergulhados em uma solução fixadora contendo 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao SME onde foram processadas, seguindo as seguintes etapas: os fragmentos renais fixados, quando necessário, são seccionados com uma navalha de bisturi ou lâmina de aço inoxidável, subdividindo-os em sub-fragmentos de aproximadamente 1 x 1 mm; em seguida foram lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós-fixados com a mistura de tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M, por uma hora, protegido da luz; em seguida foram desidratados em série crescente de acetona na concentração de 30 a 100%; e por fim foram incluídos em resina epóxi tipo PolyBed 812® e polimerizadas por 72 horas em estufa a 60°C.

Foram feitos cortes semifinos (SF) dos blocos, com espessura de aproximadamente 1µm, utilizando o ultramicrotomo Leica EM UC7, em navalha de vidro, previamente confeccionada. Os cortes obtidos foram aderidos em lâmina de vidro e corados com a solução de Azul II e Azul de metileno. Em seguida, os cortes foram analisados em microscópio de campo claro, para identificar os blocos que apresentavam glomérulo em evidência.

Depois de selecionados, foram feitos cortes ultrafinos (UF), com espessura de aproximadamente 70nm, dos blocos selecionados com glomérulo em evidência, utilizando o mesmo ultramicrotomo citado anteriormente, em navalha de diamante. Os cortes foram coletados em grades de cobre de 200MESH e contrastados na solução de acetato de uranila a 6% e na solução de citrato de chumbo. Posteriormente, os cortes foram observados no MET JEOL 1230, a 80Kv, e regiões das alças glomerulares foram eletromicrografadas em aumento de 10.000x.

4.3 ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS E/OU RELATÓRIO DE SOLICITAÇÃO DE BIÓPSIA RENAL

O serviço de nefropatologia do IGM registrou entre os anos de 1998 a maio de 2017 um total de 1.422 biópsias renais processadas para MET. Dentre estas biópsias, 127 pacientes tiveram o diagnóstico de AGM. Os dados clínicos e laboratoriais desses pacientes foram analisados nos relatórios de solicitação de biópsia renal, ou, quando não localizadas as informações nestes relatórios, foram avaliados os prontuários médicos nos respectivos hospitais (HGRS, HAN, HEC e HSA). As variáveis analisadas foram: diagnóstico de Alteração Glomerular Mínima, gênero, idade, níveis séricos de creatinina, diagnóstico de *Diabetes Mellitus* ou glicemia elevada e/ou em uso de hipoglicemiantes e a presença de hematúria no período da biópsia.

Foram excluídos os casos em que havia a descrição de diagnóstico de diabetes ou glicemia elevada e/ou em uso de hipoglicemiantes. Os casos com registro de número de hemácias por campo na urina maior ou igual a três também foram excluídos do estudo. Foram localizados os relatórios de solicitação de biópsia renal dos 127 pacientes com diagnóstico de AGM. Destes, 32 foram excluídos, um com diabetes e 31 por apresentar hematúria, e 14 pacientes foram incluídos. Em 81 solicitações não foram localizadas as informações pesquisadas, passando estes casos a serem pesquisados nos prontuários médicos.

Vinte e um paciente não tiveram os prontuários localizados para análise. Dos 60 prontuários disponíveis, 25 pacientes foram excluídos - dois pacientes com diabetes e 23 por apresentarem hematúria no período da biópsia. Após análise dos relatórios e dos prontuários, um total de 49 pacientes estavam dentro dos critérios de inclusão para participar no estudo (Figura 5).

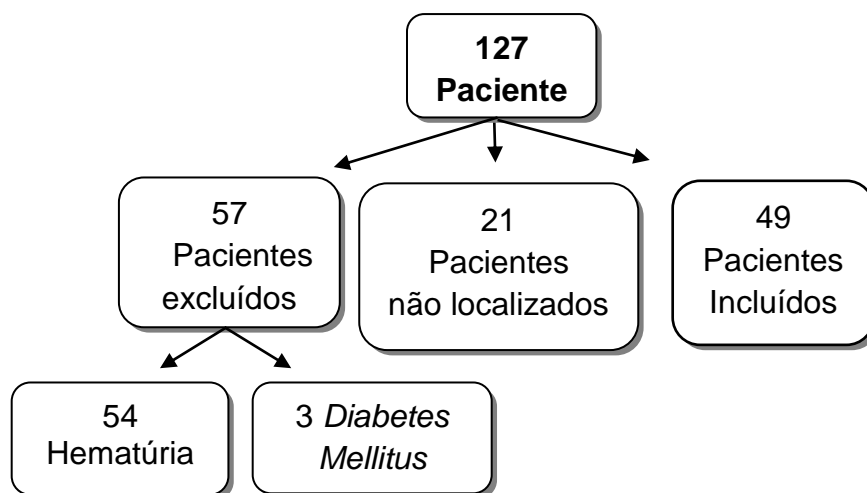


Figura 5: Fluxograma das etapas de análise de prontuários e/ou relatório de solicitação de biópsia renal.

4.4 CORTES SEMIFINOS E ULTRAFINOS

Foram localizados os blocos das biópsias dos 49 pacientes identificados, correspondendo a 296 blocos no total (em média seis blocos/paciente). Foram realizados cortes SF de todos os blocos e pesquisado a presença de glomérulo. Quatorze pacientes não apresentaram glomérulo em nenhum dos blocos, impossibilitando a participação na pesquisa. (Figura 6).

Após a triagem na observação dos cortes semifinos, trinta e cinco pacientes apresentaram um ou mais glomérulos em evidência, um paciente possuía duas biópsias, sendo avaliada apenas uma. Foram encaminhados para a realização de corte UF 70 blocos (34 pacientes). Foram obtidos cortes UF das biópsias de 32 pacientes, correspondendo a 57 blocos. Os blocos de dois pacientes apresentaram problemas na infiltração da resina PolyBed, impossibilitando a obtenção de cortes UF. Ao final foram observadas e fotografadas no MET amostras de 32 pacientes (Figura 7).

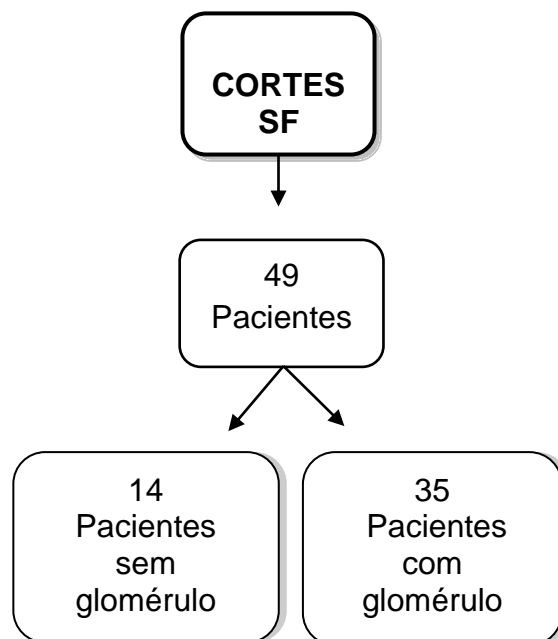


Figura 6: Fluxograma do total de cortes semifinos.

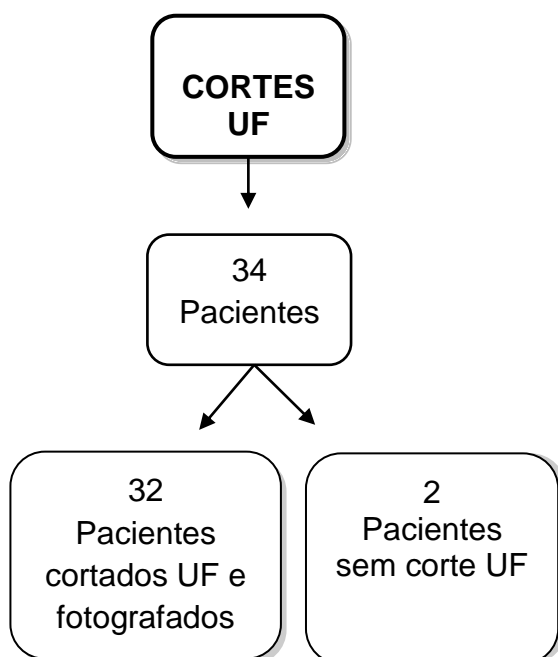


Figura 7: Fluxograma do total de cortes ultrafinos realizados.

4.5 ANÁLISE DAS ELETROMICROGRAFIAS

A espessura da MBG foi mensurada utilizando o *Software ImageJ*, um programa de processamento e análise de imagem de acesso livre. Para realização desse trabalho foram aplicadas duas técnicas de medidas: método

direto (MD) e o método de interceptação ortogonal (MIO), por serem os métodos mais utilizados na literatura. Passo a passo da realização da mensuração da espessura da MBG está descrito no manual em apêndice. Os parâmetros para realização da mensuração foram estabelecidos segundo os artigos (SZETO et al, 2010; RAMAGE et al., 2002; DAS; PICKETT e TUNGEKAR, 1996; JENSEN, GUNDERSEN e MSTERBY, 1978; DISCHE et al., 1990)

4.5.1 Método Direto

O MD consiste na medida da espessura da MBG em apenas um glomérulo, em regiões retilíneas e uniformes de uma alça glomerular, excluindo áreas oblíquas e de mesângio. Três a cinco campos do glomérulo com estas características foram fotografados no aumento de 10.000x. Em cada imagem, foram realizadas três a cinco medidas ao longo da alça glomerular com distância de três micrômetros entre elas, conforme ilustrado na Figura 8. A partir das medidas realizadas, foi calculada a média aritmética e o desvio padrão por paciente.

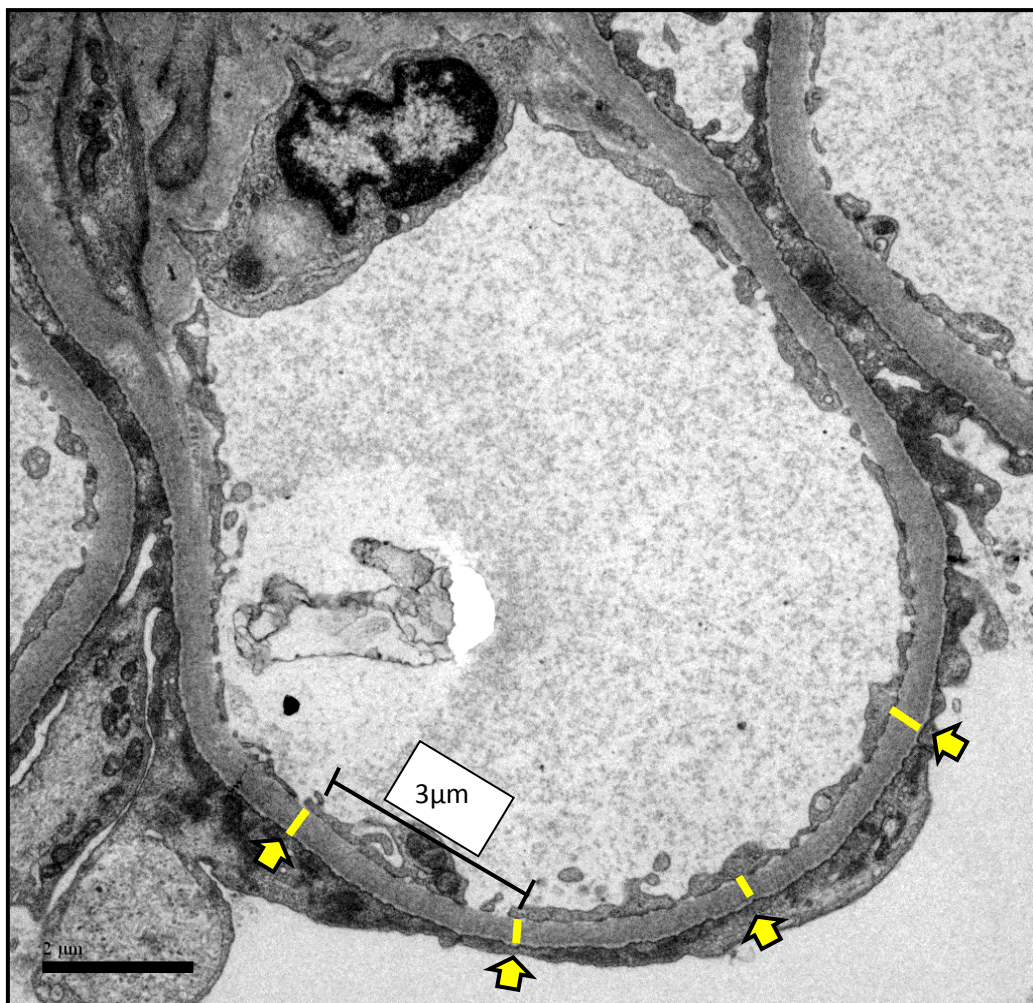



Figura 8: Mensuração da espessura da MBG pelo método direto – Medidas realizadas por alça glomerular com distância de $3\mu\text{m}$ entre elas. Uma reta () era tracejada entre os limites da MBG para a mensuração da espessura sua espessura.

4.5.2 Método de Intercepção Ortogonal

O MIO consiste na medida da espessura da MBG em pelo menos dois glomérulos em regiões retílineas e uniformes de uma alça glomerular, excluindo áreas oblíquas e de mesângio. Em torno de nove áreas foram fotografadas dos glomérulos observados por paciente. Para a realização das medidas, uma grade $200\times 200\text{nm}$ foi sobreposta às eletromicrografias, para identificar os pontos para a realização das mensurações. Apenas nos pontos de intercepção dos vértices da grade com o limite da MBG da face endotelial

foram realizadas as medidas, conforme ilustrado na figura 9. Foi calculada a média harmônica de todas as medidas realizadas por paciente.

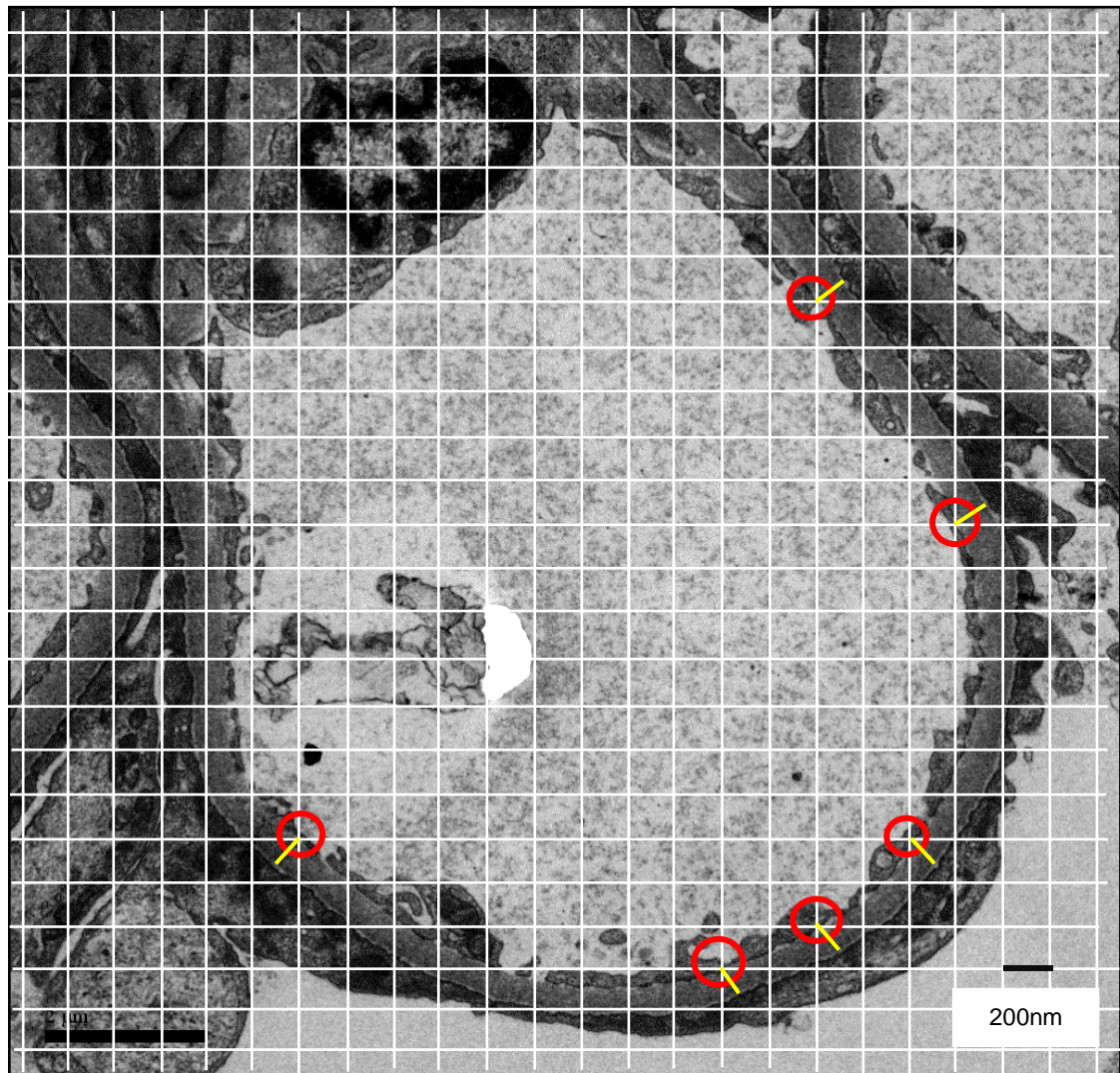


Figura 9: Mensuração da espessura da MBG pelo método de interceptação ortogonal – Identificação dos pontos onde o vértice da grade coincidia com a superfície endotelial da MBG (○). Uma reta era tracejada (▤) até o limite da membrana do lado associado aos podócitos.

4.6 ANÁLISES DOS RESULTADOS

Os dados foram analisados utilizando o *software* GraphPad Prism® Versão 5.01, os resultados foram apresentados em forma de tabelas e gráficos, expressos por média \pm desvio padrão. Para calcular a média aritmética e a média harmônica foi utilizado o programa Microsoft Office Excel 2013. O teste

Análise de Variância (ANOVA) e o pós teste de Tukey's, foram aplicados para as faixas etárias analisadas e para análise por gênero dos pacientes, considerando os resultados significativamente somente quando $p < 0,05$. Os testes de normalidade D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov foram aplicados para avaliar se os valores da espessura da MBG apresentaram distribuição normal. Para avaliar se havia correlação entre os valores encontrados da espessura da MBG utilizando o método direto e método de interceptação ortogonal e/ou a idade e a espessura da MBG, foi realizado o teste de correlação de *Pearson*.

A partir dos resultados obtidos, foi elaborado um manual de apoio ao diagnóstico das doenças renais glomerulares para o IGM- FIOCRUZ/BA e disponibilizado para os demais serviços de nefrologia interessados.

4.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho foi conduzido de acordo com resoluções N°. 196/96 Conselho Nacional de Saúde (http://conselho.saude.gov.br/Web_comissoes/conep/aquivos/resolucoes/23_ou_t_versao_final_196_ENCEP2012.pdf) e No. 039/2011 (http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/carta_circular/Usos_de_dados_de_prontuarios_para_fins_de_Pesquisa.pdf) e os procedimentos foram aprovados pela Comitê de ética do Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz-BA, e conduzido de acordo com o parecer n° 1.579.664.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Dentre os 32 pacientes incluídos, 62.5% (20) eram indivíduos do sexo masculino e 37.5% (12) do sexo feminino. As idades variaram de 3 a 62 anos com média de 20,3 anos. 63,6% (21) se caracterizavam clinicamente por síndrome nefrótica com perda de proteína na urina e creatinina variando de 0.2 a 1.40 mg/dL, conforme Tabela 1.

Tabela 1: Características gerais dos pacientes submetidos a biópsias renais com diagnóstico de AGM, incluídos nesse trabalho.

PARÂMETRO	% (VALOR ABSOLUTO)	
Amostra (n)	32	
Idade	20,3 [#]	
Amplitude	3 - 62	
Sexo		
Masculino	62,5%	(20)
Feminino	37,5%	(12)
Síndrome Nefrótica	63,6%	(21)
Creatinina	0,60 mg/dL [#]	
Amplitude	0,25 - 1,40*	

[#] Média

* Total de 25 pacientes analisados

Quanto a faixa etária, a maioria dos pacientes incluídos no nosso estudo (N:31/98,9%) tinha idade entre 0 a 40 anos e apenas um paciente com idade superior a 60 anos. Nenhum paciente na faixa etária de 41 a 60 anos foi incluído (Tabela 2).

Tabela 2: Número de pacientes distribuídos por faixa etária.

FAIXA ETÁRIA	VALOR ABSOLUTO (%)	
0-10	8	(25)
11-20	7	(21,9)
21-30	9	(28,1)
31-40	7	(21,9)
41-50	-	-
51-60	-	-
>60	1	(3,1)
TOTAL	32	(100)

5.2 MEDIDA DA ESPESSURA DA MBG PELO MÉTODO DIRETO

A mensuração da espessura MBG dos trinta e dois pacientes com diagnósticos de AGM, foi avaliada pelo MD. Dezesesseis medidas de um glomérulo foram realizadas por paciente, totalizando 512 medidas.

As médias da espessura da MBG em diferentes faixas etárias de todos os pacientes estão representadas na figura 10. Na faixa etária de 0-10 anos (N:8) a média, o desvio padrão, o primeiro e o terceiro quartis foram $370,4 \pm 43,56\text{nm}$, $356,5\text{nm}$, $374,4\text{nm}$. Na faixa etária de 11 a 20 anos (N:7), $377,6 \pm 55,49\text{nm}$, $330,5\text{nm}$, $431,2\text{nm}$. Na faixa etária de 21-30 anos (N:9), $381,8 \pm 52,68\text{nm}$, $336,3\text{nm}$, $422,8\text{nm}$. Na faixa etária de 31-40 anos (N:7), $388,6 \pm 52,84\text{nm}$, $350,1\text{nm}$, 448nm . Não foi observado diferença estatística significativa entre as médias da espessura da MBG nas diferentes faixas etárias analisadas ($P < 0,05$). A medida da espessura da MBG de um paciente com idade superior a 60 anos (63 anos) foi calculada pelo método direto e apresentou média de $333 \pm 74,28\text{nm}$ (média \pm DP), dado não representado no gráfico.

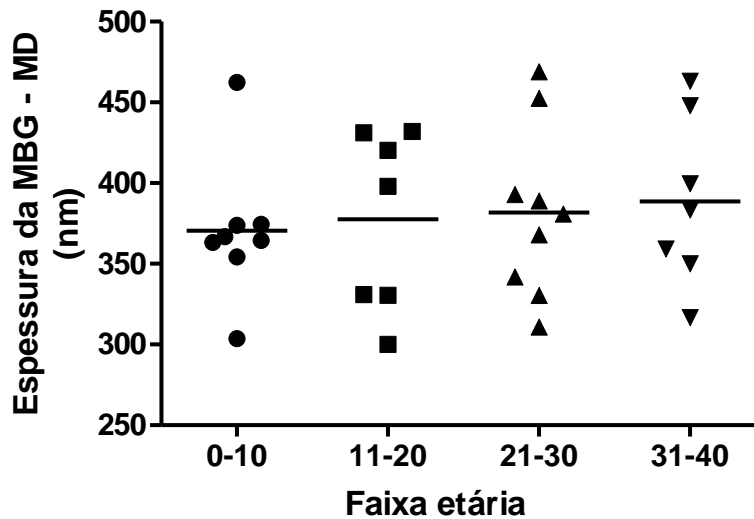


Figura 10: Espessura da MBG avaliada pelo método direto por faixa etária. Não houve diferença entre as faixas etárias ($p = 0,9379$).

Para análise de correlação entre os valores da média da espessura da MBG e a idade dos pacientes analisados individualmente, foi aplicado o teste estatístico de correlação de *Pearson* e observou-se ausência de correlação com $r = 0,068$ e $p = 0,4352$ (Figura 11). Avaliando todos os pacientes, independente de faixa etária, as médias variaram de 300 - 469nm, e a média geral foi de 380,4nm com desvio padrão de 48,71nm.

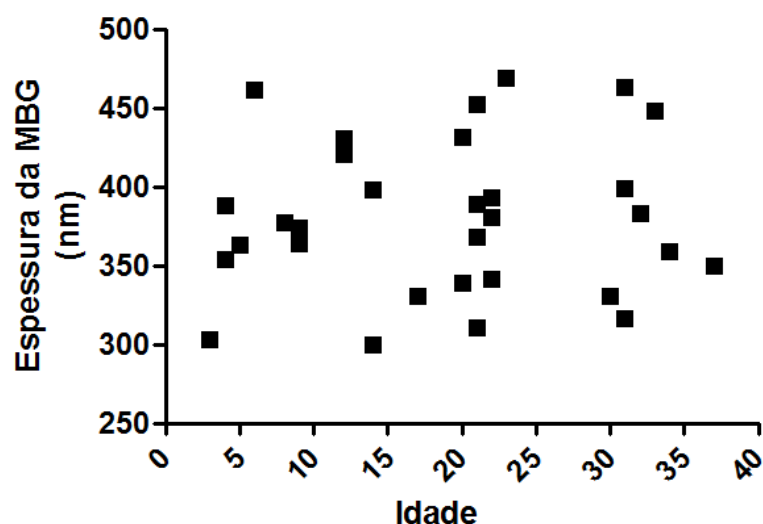


Figura 11: Análise de correlação da espessura da MBG, avaliada pelo método direto, e a idade dos pacientes. Não foi observado correlação entre as duas variáveis (Pearson, $r = 0,06845$; $p = 0,4352$).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes do sexo masculino (N:19) com média \pm DP de $392,2 \pm 52,55\text{nm}$ (Q1 359nm e Q3 448nm) e feminino (N:12) com $359,3 \pm 35,84\text{nm}$ (Q1 331nm e Q3 388nm) (Figura 12).

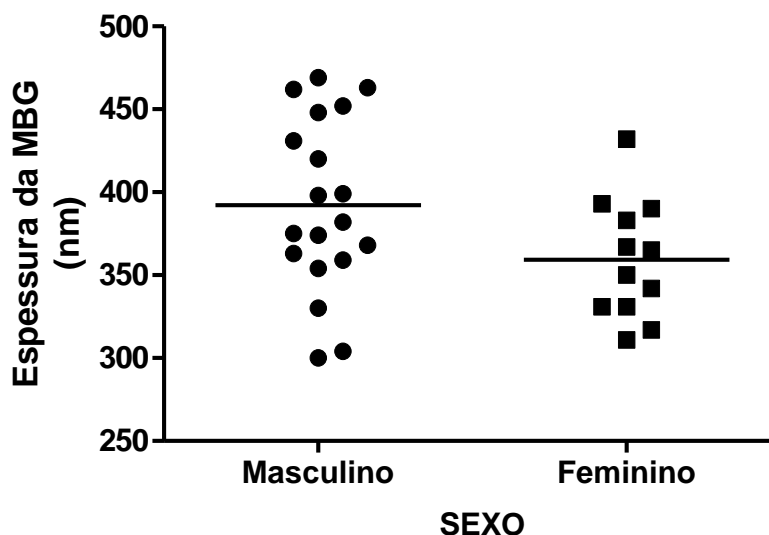


Figura 12: Espessura da MBG por sexo, analisado pelo método direto. Não houve diferença entre gênero (Teste t, $p=0,0678$).

5.3 MEDIDA DA ESPESSURA DA MBG PELO MÉTODO DE INTERCEPTAÇÃO ORTOGONAL

Dos trinta e dois casos incluídos no estudo, apenas vinte pacientes foram avaliados pelo MIO, pois estes apresentavam pelo menos dois glomérulos para serem avaliados. Os que só apresentavam um glomérulo em evidência não poderiam ser avaliados por este método. Quarenta e seis glomérulos foram avaliados de todos os pacientes incluídos, sendo que foram realizadas em média 24 medidas por glomérulo, totalizando 1.091 medidas.

A média, o desvio padrão, o primeiro e o terceiro quartis da espessura da MBG dos pacientes com idade de 0-10 anos (N:7) foi de $375,8 \pm 57,60\text{nm}$, 329,7nm, 399,9nm. Na faixa etária de 11 a 20 anos (N:5) $392,2 \pm 36,14\text{nm}$, 362,7nm, 418,7nm. Na faixa etária de 21-30 anos (N:4) $361,7 \pm 60,24\text{nm}$, 326nm, 423,3nm. Na faixa etária de 31-40 anos (N:4) $359,8 \pm 50,03\text{nm}$, 318,6 e 410,1nm. Não houve diferença significativa entre as faixas etárias analisadas ($P < 0,05$) (Figura 13).

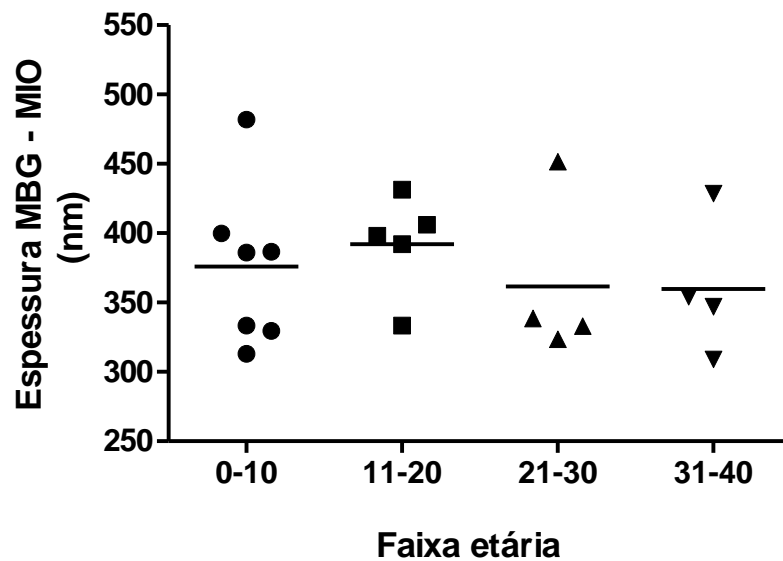


Figura 13: Espessura da MBG avaliada pelo método de interceptação ortogonal nas faixas etárias 0-10, 11-20, 21-30 e 31-40 anos, (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p=0,77$).

Foi avaliada a correlação entre os valores da média da espessura da MBG pelo MIO e a idade dos pacientes analisados individualmente, para isso foi aplicado o teste estatístico de correlação de *Pearson* e observou-se que não houve associação estatisticamente significativa com $r=-0,1855$ (Figura 14). Avaliando os pacientes, independente de faixa etária, as médias variaram de 309 – 482nm, e a média geral de 373,5nm com desvio padrão de 48,91nm.

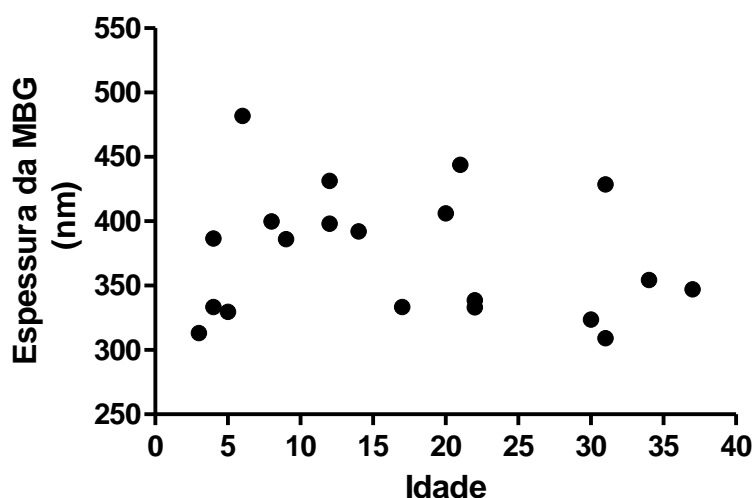


Figura 14: Análise de correlação entre a espessura da MBG pelo método de interceptação ortogonal e a idade dos pacientes, (Pearson, $r= 0,1855$; $p= 0,4336$).

Para o sexo masculino (N=12) analisado pelo MIO a média \pm desvio padrão foi de $387.3 \pm 54,70\text{nm}$ (Q1 333nm e Q3 430,5nm). Para o sexo feminino (N=8) os valores foram de $353,9 \pm 34,76\text{nm}$ (Q1 326,3nm e Q3 386,8nm). (Figura 15). Também não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os sexos, avaliando pelo MIO.

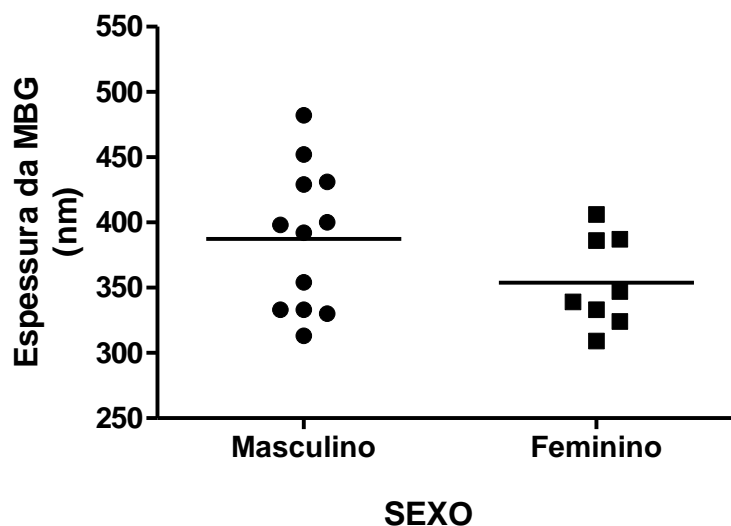


Figura 15: Média da espessura da MBG, por sexo, dos pacientes analisados pelo MIO (Teste t, $p=0,1446$).

5.4 COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO DIRETO E O MÉTODO DE INTERCEPTAÇÃO ORTOGONAL

A tabela 3 apresenta as médias da espessura da MBG obtidas pelo os dois métodos utilizados, método direto e de interceptação ortogonal, nas diferentes faixas etárias avaliadas. Observa-se um discreto aumento na faixa etária de 11 a 20 anos pelo método de interceptação ortogonal. No entanto, para as outras faixas etárias (0-10, 21-30 e 31-40 anos) o método direto mostrou valores mais elevados, essa diferença pode ser justificada pelo número de pacientes analisados terem sido maiores nesse método.

Tabela 3: Comparação entre as médias das duas técnicas utilizadas para mensuração.

Faixas etárias	Método direto		Interceptação ortogonal	
	N	Média ± DP	N	Média ± DP
0- 10 anos	8	370,4 ± 43,56nm	7	375,8 ± 57,60nm
11- 20 anos	7	377,6 ± 55,49nm	5	392,2 ± 36,14nm
21- 30 anos	9	381,8 ± 52,68nm	4	361,7 ± 60,24nm
31- 40 anos	7	388,6 ± 52,84nm	4	359,8 ± 50,03nm
>60 anos	1	333 ± 74,28nm	_____	_____

Não houve diferença estatisticamente significativa da espessura da MBG entre os gêneros analisados ($P < 0.05$), independentemente do método utilizado. A tabela 4 compara as médias e DP dos dois métodos de análise.

Tabela 4: Comparação entre as médias das duas técnicas utilizadas para mensuração, distribuídas por gênero.

Sexo	Método direto		Interceptação ortogonal	
	N	Média ± DP	N	Média ± DP
Masculino	19	392,2 ± 52,55nm	12	387.3 ± 54,70nm
Feminino	12	359,3 ± 35,84nm	8	353,9 ± 34,76nm

Para análise de correlação entre os valores das médias dos pacientes analisados individualmente e os métodos de mensuração utilizados para medir a espessura da MBG, foi aplicado o teste estatístico de correlação de *Pearson* e observou-se uma associação positiva com $r=0,8973$ ($p<0,0001$) (Figura 16).

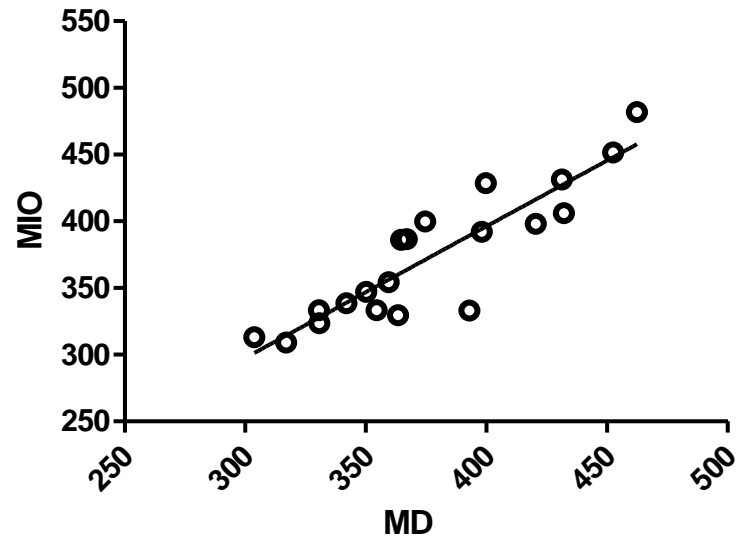


Figura 16: Correlação entre o método direto e o método de interceptação ortogonal pelo teste de estatístico de correlação de *Pearson*, $r=0,8973$.

A Distribuição dos valores da espessura da MBG pelo número de pacientes, avaliadas tanto pelo MD como pelo MIO, apresentou distribuição normal, analisados pelos métodos estatísticos de D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. No método direto, o intervalo de espessura da MBG que apresentou maior Distribuição foi de 370 a 404nm, enquanto que pelo MIO foi de 310 a 344 (Figura 17 A e B).

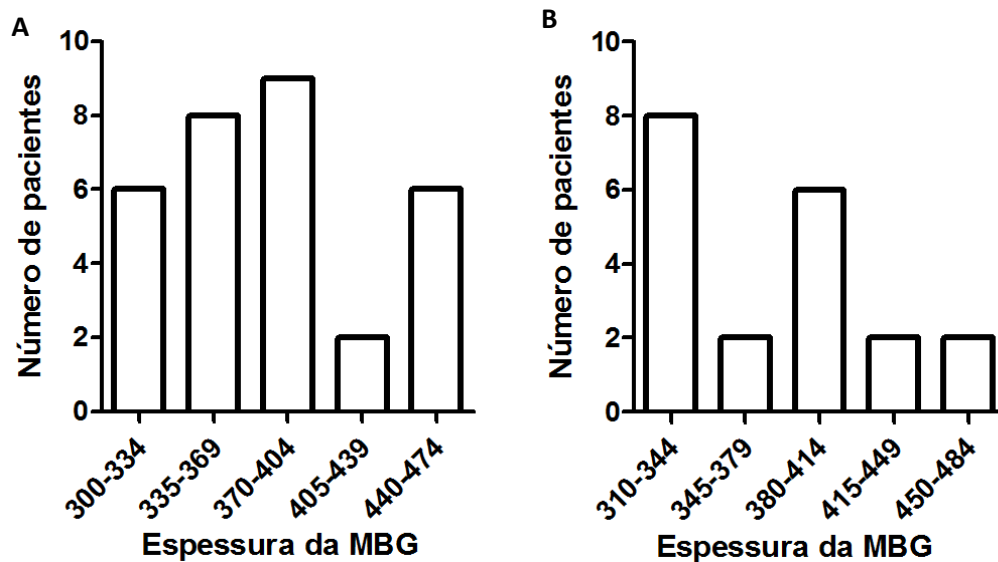


Figura 17: Distribuição dos valores da espessura da MBG pelo número de pacientes, avaliadas tanto pelo MD (A) como pelo MIO (B).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo mensuramos a espessura da MBG em uma população de pacientes submetidos a biópsia renal em Salvador para definir os valores de referência que servirão no auxílio do diagnóstico de doenças glomerulares. A mensuração da espessura da MBG foi realizada utilizando dois métodos, o MD e o MIO, a partir dos quais estimamos o valor da espessura normal da MBG em $380,4 \pm 48,71\text{nm}$ (média \pm DP) e $373,5 \pm 48,91\text{nm}$, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores encontrados usando os dois métodos. Esses valores estão de acordo com os publicados por Marquez e colaboradores (2003), que estimaram a espessura normal da MBG, de adultos entre 300 a 400nm.

Foi observado em alguns estudos, que há um aumento da espessura da MBG de acordo com a idade, principalmente na passagem da infância para a fase adulta (HALA KFOURY, 2016; RAMAGE et al., 2002). Entretanto, no presente trabalho não observamos diferenças significativas entre as diferentes faixas etárias analisadas. Uma das razões para essa diferença entre nosso trabalho e o de outros autores pode ser a utilização mais restritiva de critérios de exclusão em nosso estudo. Com revisão de prontuários e medicações usadas pelos pacientes para excluir casos de DM e hematúria. Não podemos, contudo, descartar a possibilidade de que não tenhamos observado diferenças devido ao pequeno número de pacientes que tivemos oportunidade de estudar em algumas faixas etárias. Está em pauta a continuidade deste estudo com melhoria na amostragem de pacientes nas diferentes faixas etárias.

Comparando a espessura da MBG de acordo com sexo dos pacientes, a espessura da MBG no sexo masculino foi ligeiramente maior que no sexo feminino, utilizando-se ambos os métodos de mensuração, entretanto, a diferença não foi estatisticamente significativa. Esse achado está de acordo com a literatura, na qual estudos mostram que, não tem diferença da espessura da MBG com relação ao sexo (MORITA M. et al., 1988; SATO et al., 2010; RAYAT et al., 2005).

O MIO tem sido o método de escolha nos trabalhos estudados, tendo em vista que são analisados mais glomérulos e são realizados um maior número

de medidas por glomérulo, melhorando a acurácia da estimativa. Por outro lado, o MIO é laborioso e consome muito tempo. O MD tem a vantagem de ser mais simples e rápido apresentar resultados semelhantes aos encontrados com o MIO. Contudo, DAS; PICKETT e TUNGEKAR, (1996) verificaram uma tendência de obtenção de estimativas mais baixas para a espessura da MBG usando o MD. As estimativas com o MD foram em média 80nm menores que as obtidas pelo com o MIO, mas a diferença não foi estatisticamente significativa. Da mesma forma, Ramage e colaboradores (2002), observaram que os valores da espessura da MBG obtidos pelo MD eram menores do que os obtidos pelo MIO e além disso apresentaram maior variação. No nosso estudo, os resultados obtidos utilizando os dois métodos, não tiveram diferenças significativas. A tendência de obtenção de resultados menores com MD não foi confirmada em nosso estudo. Além disso, foi verificada uma correlação direta entre os dois métodos. Desta forma, devido ao menor tempo e simplicidade de execução e de não ter detectado diferenças significativas entre os métodos, que o MD seja mais adequado para uso na rotina diagnóstica.

A tabela 5 resume os valores encontrados em alguns estudos da estimativa da espessura normal da MBG. Como enfatizado em livros de texto de Nefropatologia (CHURG et al., 1995), observam-se nesses dados ampla variação de valores. Essas variações podem refletir diferenças existentes nas populações originárias de diferentes países ou decorrentes de limitações técnicas como dificuldade em obter tecido renal normal apropriado para medições e diferenças no processamento dos fragmentos de rim para análise por MET (HALA KFOURY, 2016; RAMAGE et al., 2002). Essa observação reforça a importância deste estudo centrado na amostra processada em um laboratório de referência de Salvador, BA, Brasil, como ferramenta para o diagnóstico de doenças glomerulares que comprometem a MBG.

Uma das limitações desse trabalho foi a ausência de indivíduos na faixa etária de 41- 60 e a ocorrência de apenas uma amostra de paciente acima de 60 anos. Entretanto, em outros trabalhos não foi observado diferenças na espessura da MBG entre indivíduos na faixa etária de 41- 60, e foi verificado uma tendência a redução da espessura da MBG em indivíduos acima de 60

anos (SATO et al., 2010). Esta limitação motiva a continuidade do estudo para ampliar o número de indivíduos analisados e localizar indivíduos nas faixas etárias não encontradas neste estudo, tornando desta forma os valores mais representativos.

Na literatura, há uma escassez de estudos que avaliam a espessura normal da MBG. Sendo o presente trabalho, provavelmente, o primeiro que avalia indivíduos da população brasileira. Desta forma, os nossos resultados poderão auxiliar no diagnóstico de glomerulopatias com alterações da espessura da MBG com valores mais próximos da população local, tanto em nosso setor de nefropatologia como em outros serviços. Além da divulgação dos resultados obtidos em artigo científico, elaboramos um manual contendo os procedimentos detalhados para uso dos dois métodos de mensuração da espessura da MBG e uma tabela dos valores de referencia obtidos neste estudo, como instrumento de apoio diagnóstico de glomerulopatias.

Tabela 5: Valores da espessura normal da MBG estimadas em diferentes estudos.

Autores (Ano)	País	Medida da espessura da MBG	
		Faixa etária (n)	média ± DP
Neste estudo	Brasil	MD	
		0- 10 anos (n:8)	370,4 ± 43,56nm
		11- 20 anos (n:7)	377,6 ± 55,49nm
		21- 30 anos (n:9)	381,8 ± 52,68nm
		31- 40 anos (n:7)	388,6 ± 52,84nm
		>60 anos (n:1)	333 ± 74,28nm
		MIO	
		0- 10 anos (n:7)	375,8 ± 57,60nm
		11- 20 anos (n:5)	392,2 ± 36,14nm
		21- 30 anos (n:4)	361,7 ± 60,24nm
31- 40 anos (n:4)	359,8 ± 50,03nm		
HALA KFOURY (2016)	Arábia Saudita	0-5 anos (n:5)	211.0 ± 7.4 nm
		6–10 anos (n:7)	276.1 ± 40.9nm
		11–17 (n:13)	326.9 ± 18.9nm
		18–60 (n:26)	352.7 ± 16.6nm
		>60 (n:2)	372.5 ± 3.5nm
SATO et al. (2010)	Japão	3 meses de idade (n:1)	115 ± 36nm
		3 a 11 anos (n:7)	243 ± 12nm
		12 a 57 anos (n:8)	353 ± 20nm
		60 a 70 anos (n:4)	287 ± 25nm
RANGAYYAN et al. (2010)	Canada	31 e 86 (n:2)	348 ± 135nm
RAYAT, C.S. et al. (2005)	Índia	18-58 anos (n:25)	321 ± 28nm
MARQUEZ et al. (2003)	Nicósia	4 a 69 anos	
		4 anos (n:1)	246 ± 44nm
		>4 (n:8)	362 ± 92nm
RAMAGE et al. (2002)	Reino unido	1 – 20 anos (n:212)	
		1 ano	194 ± 6,5nm
		>1	297 ± 6,0nm
DISCHE, F. et al. (1990)	Inglaterra	15-57 anos (n: 20)	396 ± 31-7nm

MORITA M. et al. (1988)	Caucasiano e	Caucasiano (24)	281± 33nm
		Asiático (11)	273± 38nm
	Asiático		Intervalo
		1 ano	220 100-340
		3 anos	260 130-380
		5 anos	280 160-410
		7 anos	300 180-430
9-13 anos	310 190-440		

6 CONCLUSÃO

1. O valor da espessura normal da MBG na população de Salvador pelo método direto correspondeu a $380,4 \pm 48,71\text{nm}$ (média \pm DP).
2. O valor da espessura normal da MBG na população de Salvador pelo método interceptação ortogonal foi de $373,5 \pm 48,91\text{nm}$ (média \pm DP);
3. Existe correlação positiva entre as duas técnicas aplicadas para mensurar a espessura da MBG. Este resultado permite recomendar a utilização do método direto na rotina de análise para diagnóstico, pois se trata de um método mais simples e rápido para execução, comparado com o método de interceptação ortogonal;
4. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias analisadas, independentemente do método de mensuração;
5. Não foi encontrada correlação entre a idade e a espessura da MBG;
6. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os sexos.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSON, D. R. et al. Laminin compensation in collagen alpha3(iv) knockout (alport) glomeruli contributes to permeability defects. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 18, n. 9, p. 2465-2472, 2007.

ABRANTES, M. M. et al. Avanços, controvérsias e consenso no tratamento da glomeruloesclerose segmental e focal primária. **J. Bras. Nefrol.** v., n., p. 22-33, 2005.

AN, Y. et al. Renal histologic changes and the outcome in patients with diabetic nephropathy. **Nephrol. Dial. Transplant**, v. 30, n. 2, p. 257-266, 2015.

BANSAL, S. B. Minimal change disease. **Clin. Queries: Nephrol.**, v. 3, n. 2-4, p. 114-123, 2014.

BARROS et al. **Glomerulopatias: patologia, clínica e tratamento.** 3. ed. São Paulo: SAVIER, 2012.

BARRETO, S. M. et al. Chronic kidney disease among adult participants of the elsa-brasil cohort: Association with race and socioeconomic position. **J. Epidemiol. Commun. Health**, v. 70, n. 4, p. 380-389, 2016.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo., Patologia.** 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

CHURG, J.; BERNSTEIN, J.; RICHARD, J. **Glassock. Renal disease : classification and atlas of glomerular diseases.** 2nd. New York : Igaku-Shoin, c1995.

DAS A. K., PICKETT T. TUNGEKAR M. M. F. Glomerular basement membrane thickness — a comparison of two methods of measurement in patients with unexplained haematuria. **Nephrol. Dial. Transplant**, v. 11, p. 1256-1260, 1996.

DISCHE, F. E. et al. Incidence of thin membrane nephropathy: morphometric investigation of a population sample. **J. Clin. Pathol.**, v. 43, p. 457-460, 1990.

DIRETRIZ BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**. v. 107, n. 3, Supl. 3, set. 2016.

DOS-SANTOS, W. L. et al. Current distribution pattern of biopsy-proven glomerular disease in Salvador, Brazil, 40 years after an initial assessment. **J. Bras. Nefrol.** v. 39, n.4, oct./dec. 2017.

ENDREFFY, E. et al. Collagen type iv nephropathy: Genetic heterogeneity examinations in affected hungarian families. **Mol. Cell Probes**, v. 25, n. 1, p. 28-34, 2011.

GERALD, B. A.; JAI, R.; VIVETTE, D. D. Primary Glomerular Disease. In: BRENNER, B. M. (Ed.). **Brenner and Rector's The Kidney. Primary Glomerular Disease**, 2004. v.1. p.1237.

GROSS, J. L. et al. Diabetic nephropathy: Diagnosis, prevention, and treatment. **Diabetes Care**, v. 28, n. 1, p. 164-176, 2005.

HALA, K.; FRCPA, M. Glomerular basement membrane thickness among the saudi population. **Ultrastruct Pathol.**, p. 1-4, 2016.

LIANG, S. et al. Clinico-pathological characteristics and outcomes of patients with biopsy-proven hypertensive nephrosclerosis: A retrospective cohort study. **BMC Nephrol.**, v. 17, n., p. 42, 2016.

LONGO, I. et al. Col4a3/col4a4 mutations: From familial hematuria to autosomal-dominant or recessive alport syndrome. **Kidney Int**, v. 61, n. 6, p. 1947-1956, 2002.

L. HEIDET, M.-C. GUBLER. **Síndrome de Alport o nefropatía hereditaria hematúrica progresiva con sordera. Pediatría**. Elsevier Masson SAS, 2011.

MARQUEZ, B. et al. A simplified method for measuring the thickness of glomerular basement membranes. **Ultrastruct. Pathol.**, v. 27, n. 6, p. 409-416, 2003.

MALHEIROS, D. M. A. C.; SALDANHA L. B. Nefroesclerose hipertensiva — visão do patologista **HiperAtivo**, v. 5, n. 4, out./dez. 1998.

MARK, 2004 American Diabetes Association: Nephropathy in diabetes (Position Statement). **Diabetes Care**, v. 27, Suppl.1, p. S79–S83, 2004.

MEYRIER, A.; GARY S, H.; PIERRE, S. Ischemic renal diseases: New insights into old entities. **Kidney Internat.**, v. 54, p. 2–13, 1998.

MORITA, M. et al. Glomerular basement membrane thickness in children. A morphometric study. **Pediatr. Nephrol.**, v. 2, n. 2, p. 190-195, 1988.

MEYRIER, A. Nephrosclerosis: A term in quest of a disease. **Nephron**, v. 129, n. 4, p. 276-282, 2015.

MINER, J. H. The glomerular basement membrane. **Exp. Cell Res.**, v. 318, n. 9, p. 973-978, 2012.

MOHSEN, P. H.S.; ZAHRA, B. Histological changes of kidney in diabetic nephropathy. **Caspian J. Int. Med.**, p. 120-127, 2015.

NACHMAN, P.H.; JENNETTE, J.C.; FALK, R.J. Primary glomerular disease. In: BRENNER, B.M. (Ed.). **Brenner and Rector's The Kidney**. 9th ed. Philadelphia: Saunders, 2012.

OKADA, S. et al. Morphological diagnosis of alport syndrome and thin basement membrane nephropathy by low vacuum scanning electron microscopy. **Biomed. Res.**, v. 35, n. 5, p. 345-350, 2014.

PESCUCCI, C. et al. Autosomal-dominant alport syndrome: Natural history of a disease due to col4a3 or col4a4 gene. **Kidney Int.**, v. 65, n. 5, p. 1598-1603, 2004.

POLITO, M. G.; DE MOURA, L. A.; KIRSZTAJN, G. M. An overview on frequency of renal biopsy diagnosis in brazil: Clinical and pathological patterns based on 9,617 native kidney biopsies. **Nephrol. Dial Transplant.**, v. 25, n. 2, p. 490-496, 2010.

POLLAK, M. R. et al. The glomerulus: The sphere of influence. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 9, n. 8, p. 1461-1469, 2014.

RAMAGE, I. J. et al. Glomerular Basement Membrane Thickness In Children: A stereologic assessment. **Kidney Int.**, v. 62, n. 3, p. 895-900, 2002.

RANGAYYAN, R. M.; KAMENETSKY, I.; BENEDIKTSSON, H. Segmentation and analysis of the glomerular basement membrane in renal biopsy samples using active contours: A pilot study. **J. Digit. Imaging**, v. 23, n. 3, p. 323-331, 2010.

RAYAT, C. S. et al. Glomerular basement membrane thickness in normal adults and its application to the diagnosis of thin basement membrane disease: An indian study. **Ind. J. Pathol. Microbiol.**, v. 48, n. 4, p. 453-458, 2005.

RONALDO, J.; FALK, C. J.; PATRICK, H. N. Primary Glomerular Disease. In: BRENNER, B. M. (Ed.). **Brenner and Rector's The Kidney**. 2004. v.1, p.1103.

SATO, S. et al. Validation of glomerular basement membrane thickness changes with aging in minimal change disease. **Pathobiology**, v. 77, n. 6, p. 315-319, 2010.

SANTOS, S. et al. Thin glomerular basement membrane in a kidney transplant of an alport's syndrome patient: a case report. **Transplant. Proce.**, v. 49, n. 10, p. 2384-2387, dec. 2017,

SAVIGE, J. et al. Thin basement membrane nephropathy. **Kidney Int.**, v. 64, n. 4, p. 1169-1178, 2003.

SANCHO, L.G.; DAIN, S. Análise de custo-efetividade em relação às terapias renais substitutivas: como pensar estudos em relação a essas intervenções no Brasil. **Cad. Saude Públ.**, v. 24, p.1279-1290, 2008.

SALGADO, P. et al. Fisiopatologia da Nefropatia Diabética. **Rev. Med. Minas Gerais**, v. 14, n. 3, p. 180-185, 2004.

SESSO, R. C. et al. Brazilian chronic dialysis census 2014. **J. Bras. Nefrol.**, v. 38, n. 1, p. 54-61, 2016.

SESSO, R. C. et al. Report of the Brazilian chronic dialysis Census 2012. **J. Bras. Nefrol.**, v. 36, n. 1, p. 48-53, 2014.

SZETO, C. C. et al. The width of the basement membrane does not influence clinical presentation or outcome of thin glomerular basement membrane disease with persistent hematuria. **Kidney Int.**, v. 78, n. 10, p. 1041-1046, 2010.

TRYGGVASON, K.; PATRAKKA, J. Thin basement membrane nephropathy. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 17, n. 3, p. 813-822, 2006.

TYAGI, I. et al. Thickness of glomerular and tubular basement membranes in preclinical and clinical stages of diabetic nephropathy. **Ind. J. Nephrol.**, v. 18, n. 2, p. 64-69, 2008.

WU, H. S.; DIKMAN, S. Segmentation and thickness measurement of glomerular basement membranes from electron microscopy images. **J. Electron Microsc.**, v. 59, n. 5, p. 409-418, 2010.