

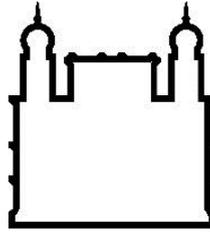
MANUAL DE MORFOMETRIA

ESPESSURA DA MEMBRANA BASAL GLOMERULAR



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Gonçalo Moniz



Instituto Gonçalo Moniz

Manual de Morfometria da Espessura da Membrana Basal Glomerular

Débora Leal Viana

Cláudio Pereira Figueira

Washington LC dos-Santos

**Salvador
2018**

EQUIPE TÉCNICA

Esta obra é resultado de um trabalho produzido durante o curso de mestrado realizado pela Bióloga Débora Viana Leal, intitulado Definição da Espessura da Membrana Basal Glomerular para o Diagnóstico de Doenças Glomerulares na Bahia: um Estudo em Biópsia, apresentado ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Instituto Gonçalo Moniz–Fiocruz/BA.

Autores:

Débora Leal Viana

Bióloga, graduada pelo Centro Universitário Jorge Amado (UNIJORGE), Mestre em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, IGM-FIOCRUZ.

Cláudio Pereira Figueira

Farmacêutico, graduado pela Universidade Federal da Bahia (UFBA), Doutor em Patologia Humana, UFBA - FIOCRUZ. Técnico do Serviço de Microscopia Eletrônica - IGM-FIOCRUZ/BA

Washington LC dos-Santos

Médico, Patologista, ambos pela UFBA, Doutor em Patologia, King's College, Univ. de Londres. Pesquisador da FIOCRUZ. Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da - UFBA

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos pacientes, à direção e aos funcionários do Hospital Ana Nery, Hospital Geral Roberto Santos e do Hospital Estadual da Criança pela disponibilização das amostras e utilizadas neste trabalho.

Ao Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular (LAPEM) e ao Serviço de Microscopia Eletrônica, ambos do IGM-FIOCRUZ/BA, pelo suporte na seleção e análise das amostras.

Agência financiadora:

Programa de Apoio ao Desenvolvimento Diagnóstico em Patologia Hepática e Renal - IGM-FIOCRUZ/BA.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB pelo apoio nos projetos com número de outorga N° 0004/2013 e N° 6163/2011

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado.

DEDICATÓRIA

Este manual é dedicado a todos os profissionais da saúde que cuidam com zelo do diagnóstico e tratamento dos pacientes com doenças renais.

Sumário

INTRODUÇÃO	7
1. ANÁLISE MORFOMÉTRICA	9
1.1 MÉTODO DIRETO	9
1.2 MÉTODO DE INTERCEPTAÇÃO ORTOGONAL	15
2. ESPESSURA NORMAL DA MBG	22
APÊNDICE 1 – Software ImageJ	24
APÊNDICE 2 – Construção da grade	29
APÊNDICE 3 – Processamento de amostra e análise em microscopia eletrônica de transmissão	35
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

INTRODUÇÃO

A avaliação da espessura da Membrana Basal Glomerular (MBG) é essencial no diagnóstico de doenças glomerulares que causam alterações em sua estrutura como a Síndrome de Alport (SA) e a Doença de Membrana Basal Fina (DMBF) (OKADA et al., 2014). Entretanto, observa-se, na literatura, variações dos valores da espessura da MBG, criando dificuldades para categorizar uma das patologias referidas acima (WU; DIKMAN, 2010). Estas variações podem ser atribuídas à técnica de processamento das amostras e variações inerentes da população observada (RAMAGE et al., 2002). Desta forma, é recomendável que cada serviço de nefropatologia avalie a espessura da MBG da população local, afim de obter valores de referência fidedignos.

Este manual descreve o passo a passo para a realização da mensuração da MBG em imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando os dois métodos morfométricos recomendados na literatura: o método direto (MD) e o método de interceptação ortogonal (MIO). Pelo MD avalia-se apenas um glomérulo, enquanto MIO avalia-se pelo menos dois glomérulos por paciente. No estudo que realizamos, não observamos diferenças significativas dos resultados obtidos utilizando os dois métodos. Por outro lado, em relação a execução, MD é um método menos complexo, mais rápido de ser executado, o que facilita de ser aplicado na rotina diagnóstica. Contudo, o MIO é recomendado em avaliações mais detalhadas da espessura da MBG de uma população, visto que, o número de glomérulos analisados, o número de eletromicrografias obtidas de cada glomérulo e, finalmente, o número de medidas realizadas são maiores.

Para as mensurações descritas neste manual, utilizamos o programa de morfometria ImageJ, o qual possui acesso livre. Apresentamos um tutorial para realizar a instalação e utilização das ferramentas do ImageJ aplicadas na mensuração da MBG. Um aspecto importante para obtenção de resultados consistentes, é garantir que as etapas de processamento das amostras de rim, incluindo fixação, inclusão e corte, sejam seguidas de forma padronizada.

O procedimento seguido neste estudo para o processamento de amostras para análise por microscopia eletrônica de transmissão está descrito no apêndice 4 e tem como referência: livros, manuais de uso corrente e na experiência adquirida do Serviço de Microscopia Eletrônica (SME) – FIOCRUZ-BA no processamento de amostras de rim e outras amostras biológicas ao longo de cerca de 30 anos de funcionamento.

Além do procedimento de mensuração, serão apresentados os resultados encontrados no nosso estudo na população submetida à biópsia renal nos hospitais de referência em Nefrologia de Salvador-BA. Para efeito de comparação, apresentaremos ainda dados correntes na literatura, sobre estimativas da espessura da MBG realizadas em outros Centros. Espera-se que este manual torne-se uma ferramenta útil no diagnóstico de glomerulopatias.

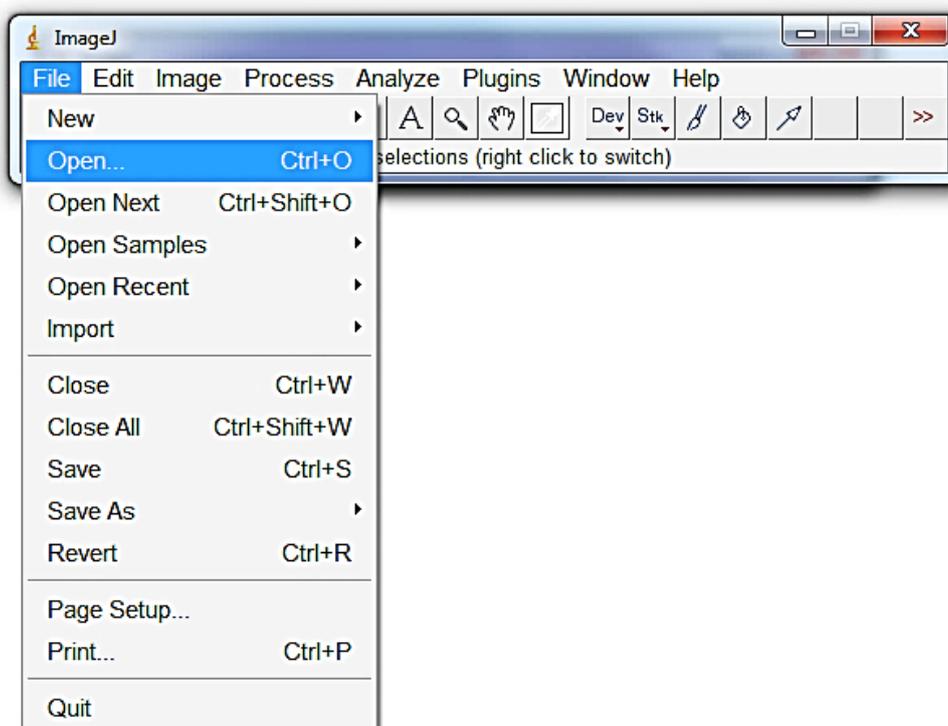
1. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

1.1 MÉTODO DIRETO

O método direto (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. No primeiro momento deverão ser fotografados no aumento de 10.000x, três a cinco campos do glomérulo. Posteriormente, deverão ser realizadas três a cinco medidas, para cada imagem, ao longo da alça glomerular com distância de três micrômetros entre elas. A partir das medidas realizadas, deverá ser calculada a média aritmética e o desvio padrão da espessura da MBG do paciente.

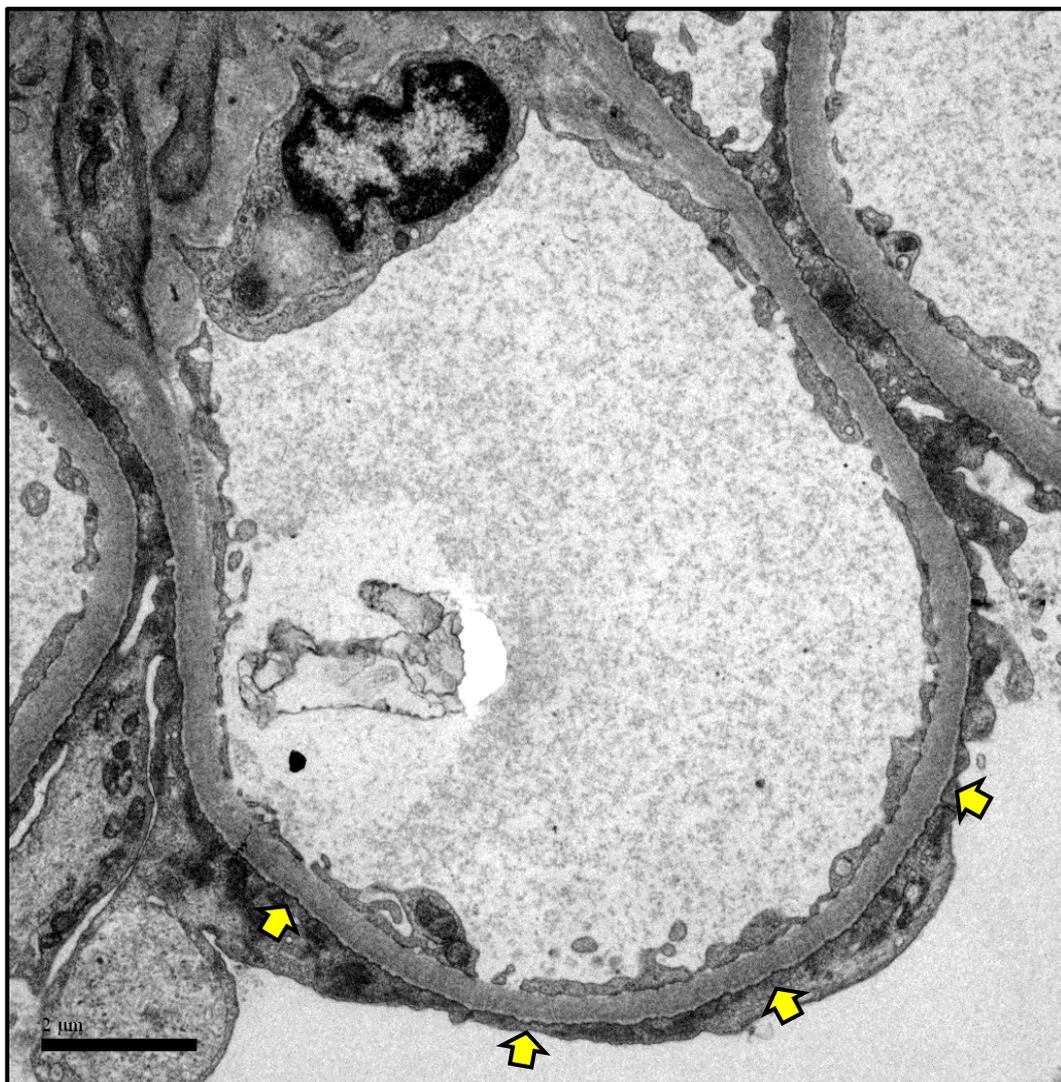
Após a aquisição das imagens no microscópio eletrônico de transmissão das áreas de interesse, seguir os passos apresentados abaixo para a mensuração da espessura da MBG utilizando o *Software ImageJ* (descrito no apêndice 1):

1° - Abrir a imagem da eletromicrografia a ser mensurada, utilizando o programa ImageJ, clicando em *File*, situado no menu de ferramentas, e depois *Open* na lista de subcomandos.

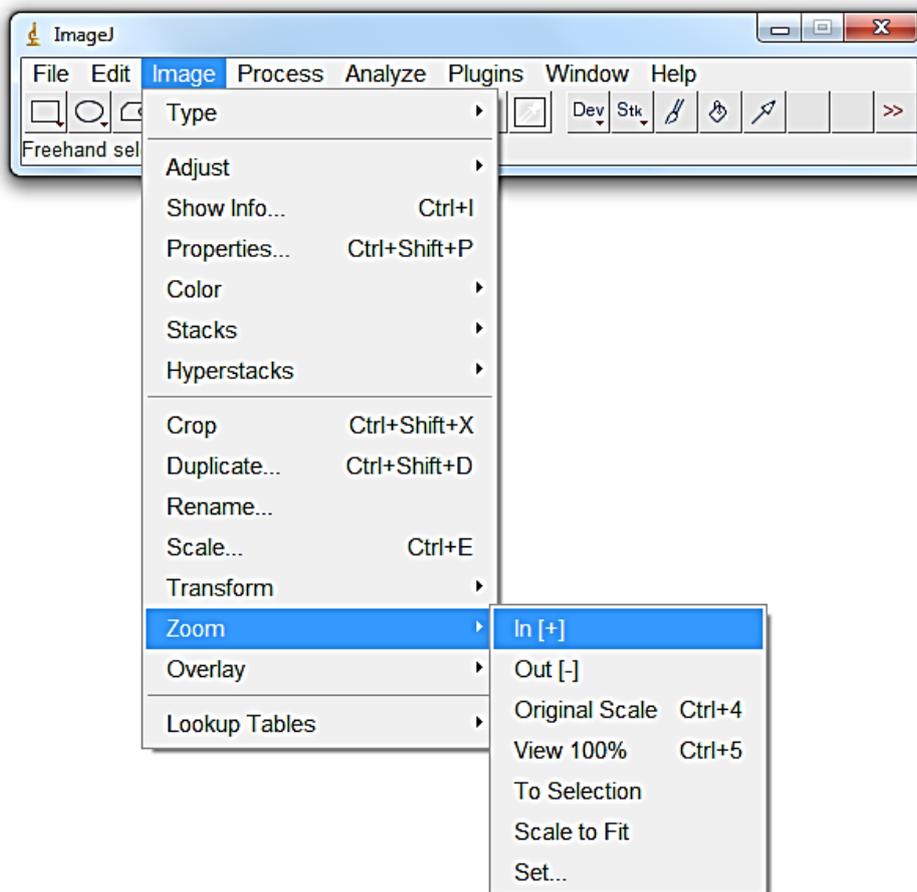


2° – Calibrar a imagem conforme descrito no apêndice 1; esta calibração será necessária apenas uma vez, a cada início da utilização do programa, sendo esta válida para imagens obtidas com o mesmo aumento;

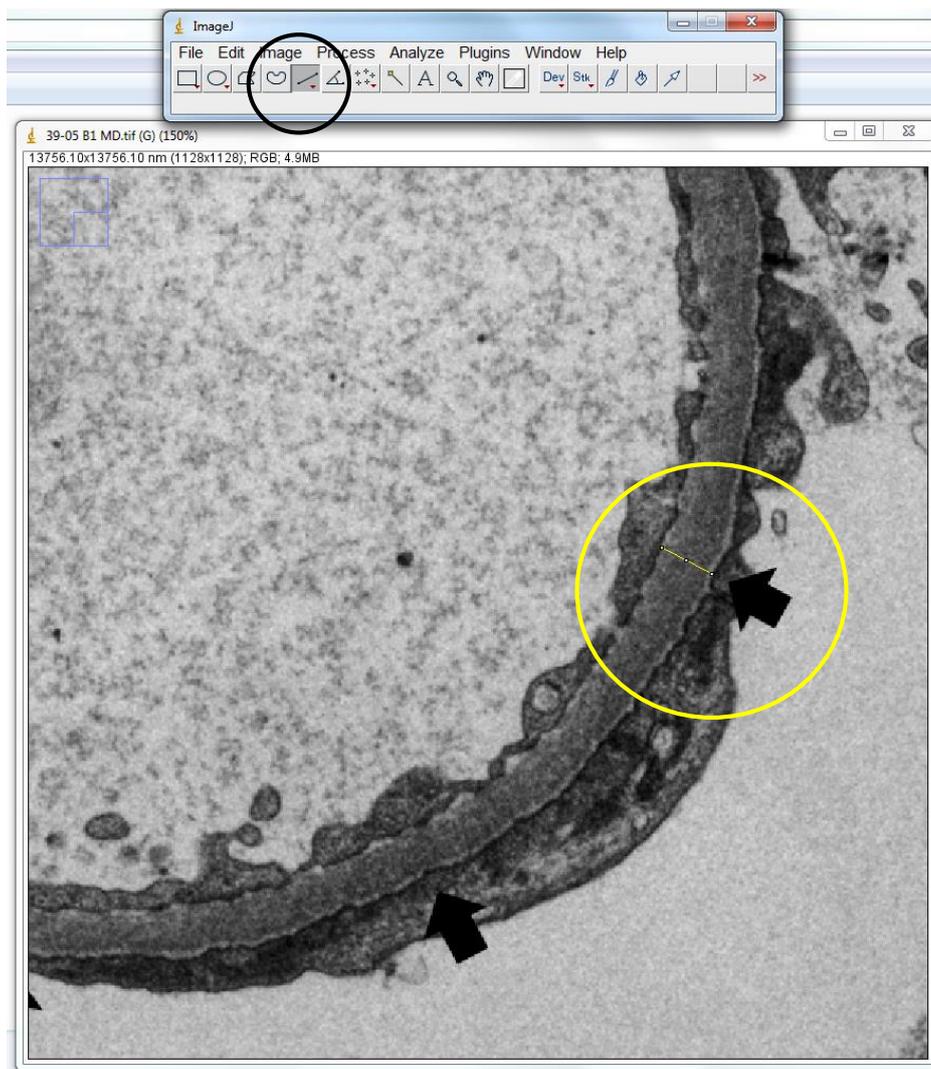
3° – Identificar regiões retilíneas da alça glomerular, onde serão realizadas as mensurações, conforme ilustrado abaixo:



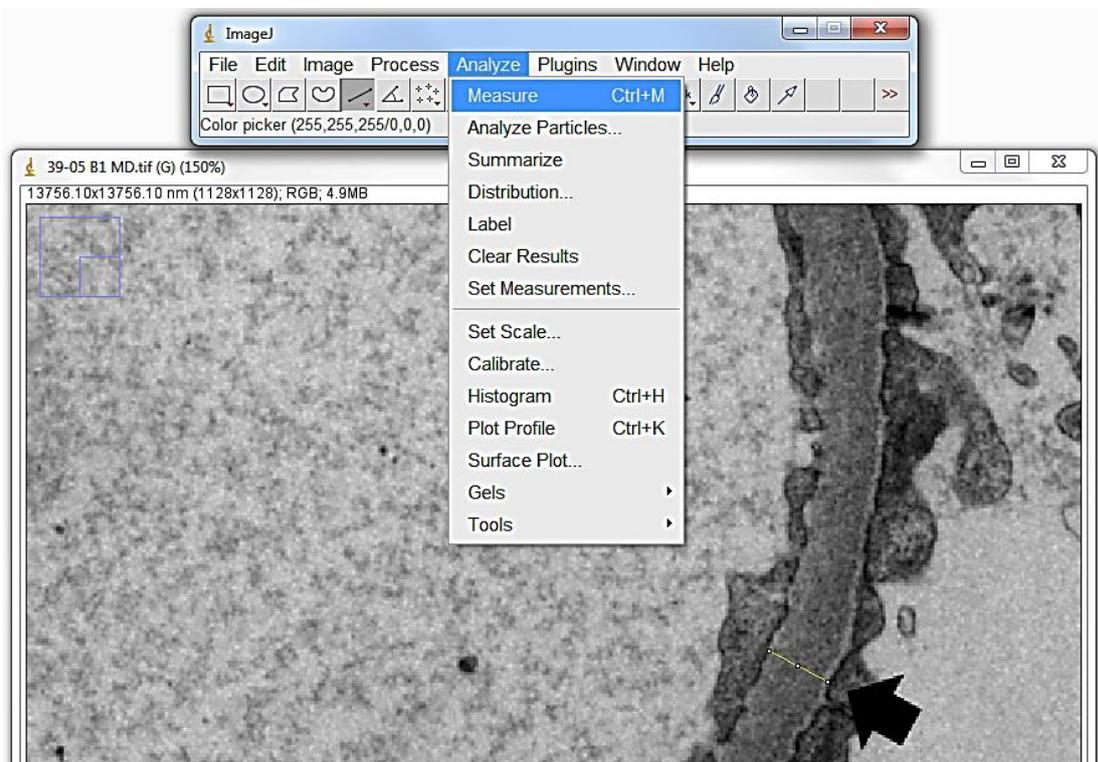
4º - Ampliar a imagem para melhor visualização das membranas das células endoteliais e dos podócitos, clicando em *Image* no menu de ferramentas e em seguida em *Zoom* na lista de subcomandos. Clicar em *In [+]* para ampliar e *Out [-]* para reduzir o tamanho da imagem.



3° – Medir a espessura da membrana usando a ferramenta *line selection tools*, no menu de ferramenta. Clicar no limites inferior da MBG, abaixo do podócito, mantendo o botão esquerdo do mouse pressionado, arrastar perpendicularmente até o limite da célula endotelial e soltar o botão do mouse, ao final uma linha amarela ficará registrada na imagem, conforme ilustrado abaixo:



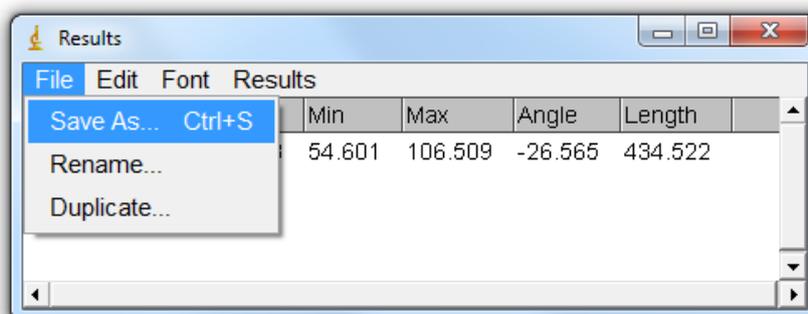
4° – Clicar em *Analyze* no menu de ferramentas, e depois selecionar o subcomando *Measure* para calcular a distância medida. Alternativamente, pressione simultaneamente *Ctrl+M* no teclado para realizar a mesma função.



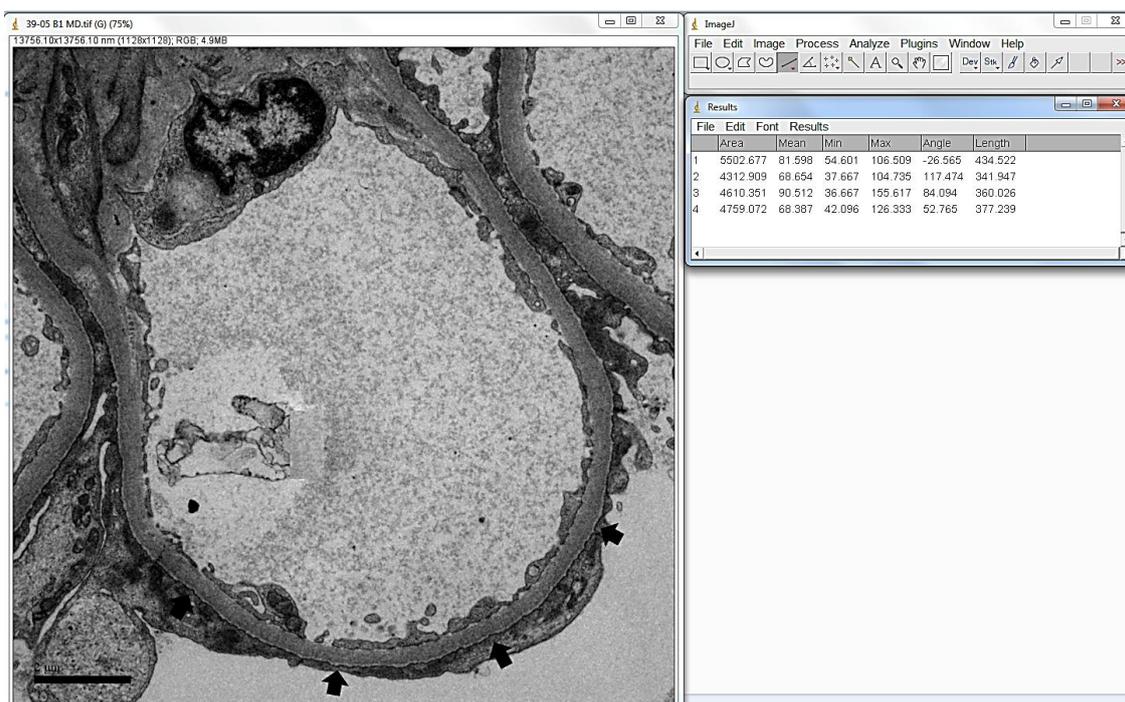
Após acionar a função *Measure* abrirá uma janela “*Results*” com o valor da medida realizada, dado em nm. Mantenha essa janela aberta até a conclusão das medidas na imagem avaliada, onde os valores serão acumulados a cada medida.

	Area	Mean	Min	Max	Angle	Length
1	5502.677	81.598	54.601	106.509	-26.565	434.522

5º- Ao final da realização das medidas, elas podem ser transferidas automaticamente para uma tabela do Excel. Para isso, clique em *File* no menu de ferramentas e depois selecione o subcomando *Save*. Alternativamente, pressione simultaneamente *Ctrl+S* no teclado para realizar a mesma função.



Exemplo: Quatro medidas em uma alça do capilar glomerular, pelo MD.



1.2 MÉTODO DE INTERCEPTAÇÃO ORTOGONAL

O método de interceptação ortogonal (MIO) consiste na medida da espessura da MBG em pelo menos dois glomérulos em regiões retilíneas e uniformes de uma alça glomerular, excluindo áreas oblíquas e de mesângio. Inicialmente deverão ser fotografados em torno de nove áreas de cada glomérulo observados por paciente. Posteriormente uma grade 200×200nm deverá ser sobreposta às eletromicrografias, para identificar os pontos onde há interceptação dos vértices da grade com o limite da MBG da face endotelial que deverão ser mensurados. Deverá ser calculada a média harmônica e o desvio padrão de todas as medidas realizadas por paciente, utilizado o programa Excel.

Após a aquisição das imagens no microscópio eletrônico de transmissão das áreas de interesse, seguir três etapas apresentados abaixo:

1° ETAPA: Construção da grade

Construir uma grade com distância entre as linhas de 200nm, conforme descrito no apêndice 2.

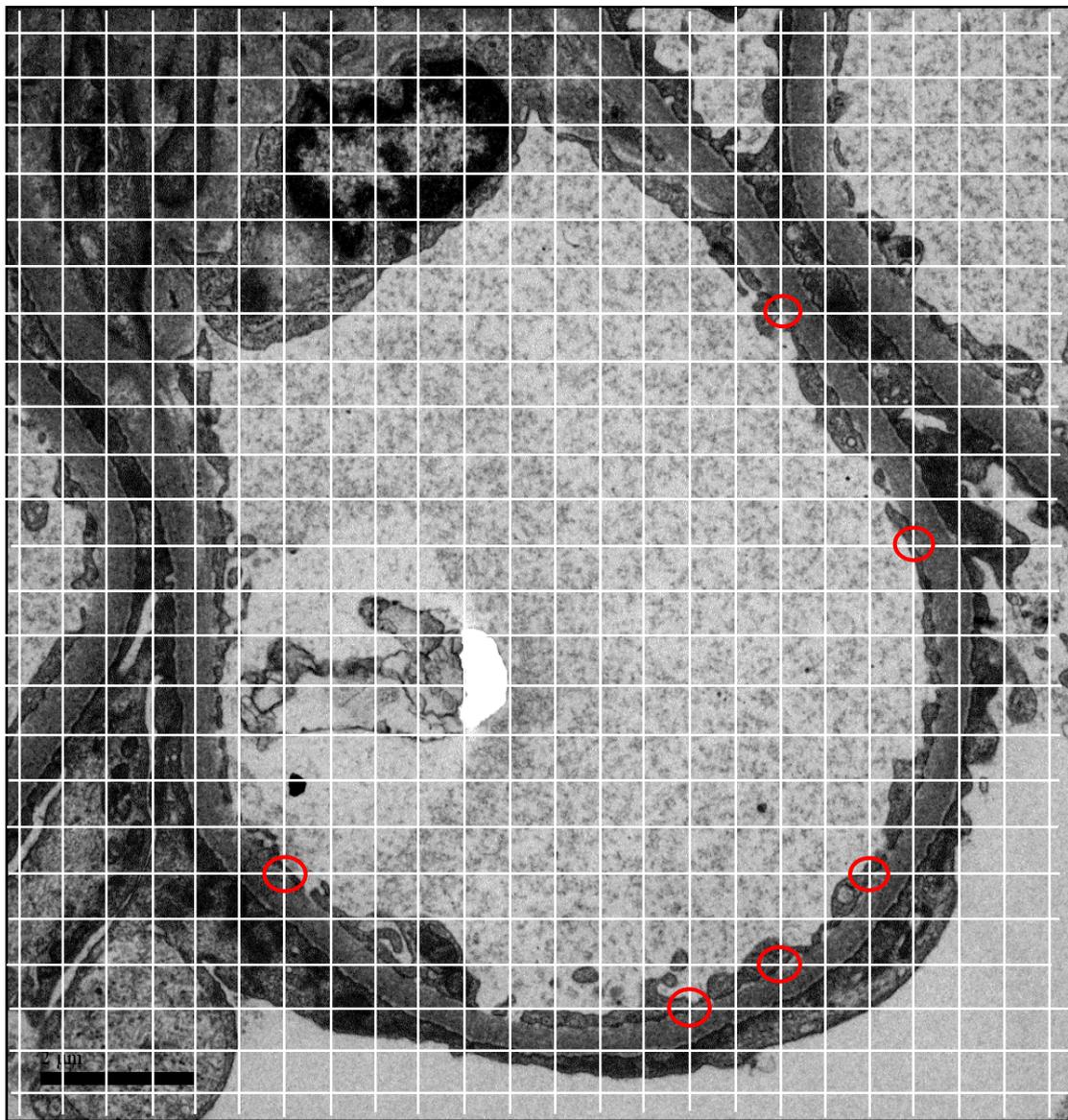
2° ETAPA: Sobreposição da grade

Sobrepor a grade à imagem e identificar os pontos onde o vértice da grade coincide com o limite da MBG da face endotelial, seguindo os passos descritos abaixo:

1° Abrir a eletromicrografia e a imagem da grade obtida na etapa anterior no programa *PowerPoint*.

2° Sobrepor a grade a imagem e identificar os pontos onde o vértice da grade coincide com a superfície endotelial da MBG com um círculo ou uma seta.

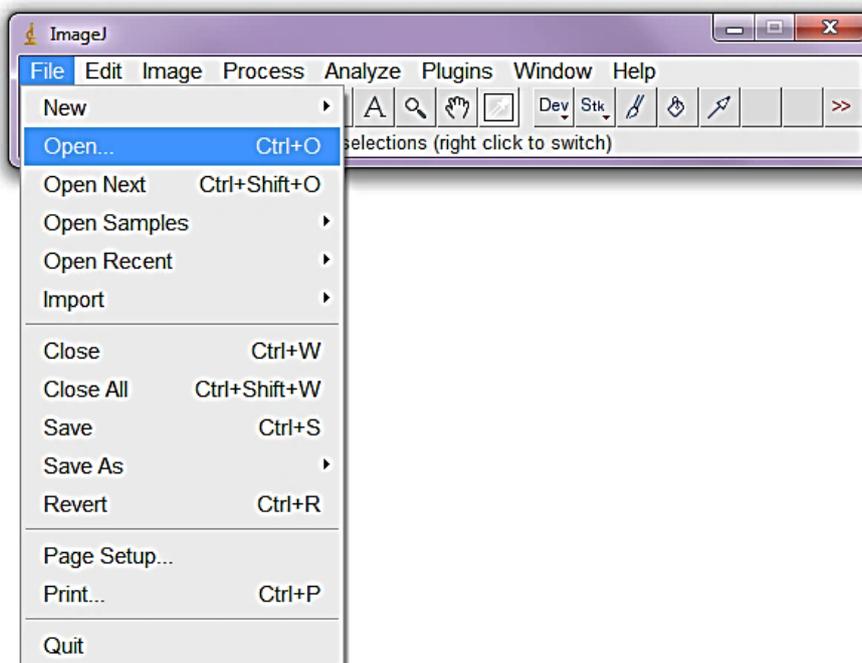
3° Selecionar todas as figuras, agrupar e salvar em formato TIFF.



3º ETAPA: Mensuração.

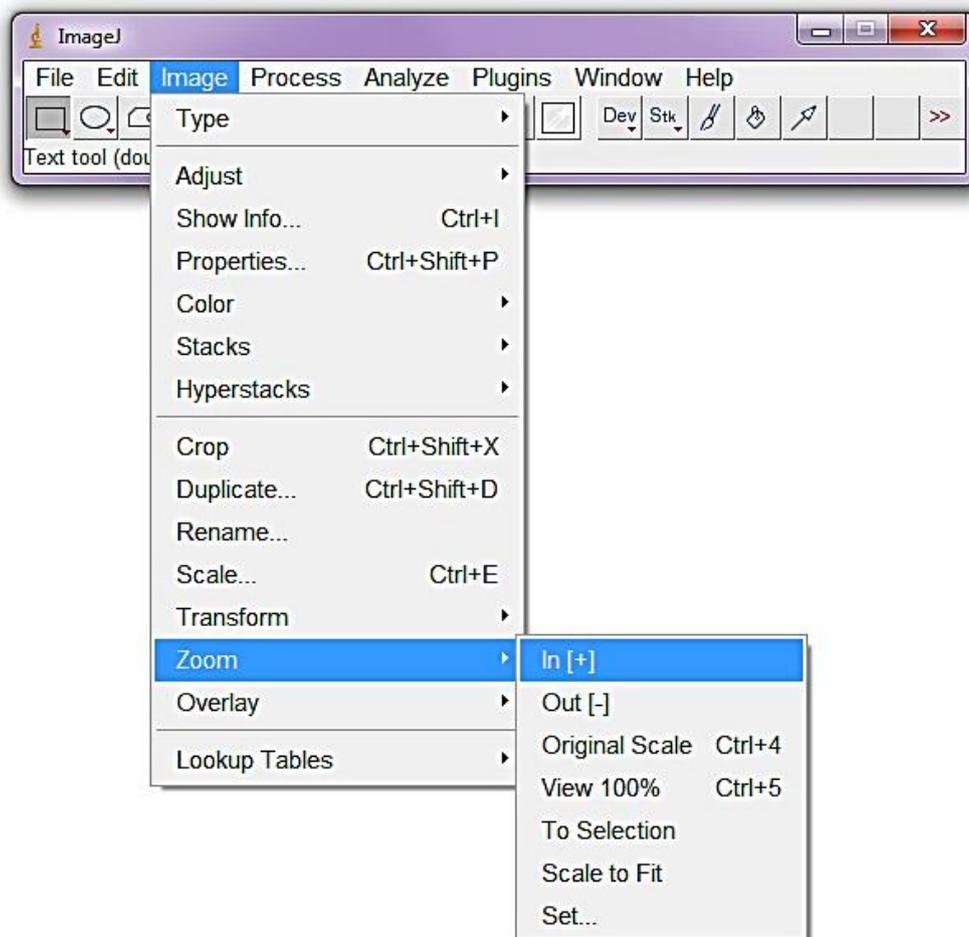
Mensurar a espessura da MBG, seguindo os passos descritos abaixo:

1º - Abrir a imagem obtida na etapa anterior, utilizando o programa ImageJ, clicando em *File*, situado no menu de ferramentas, e depois *Open* na lista de subcomandos.

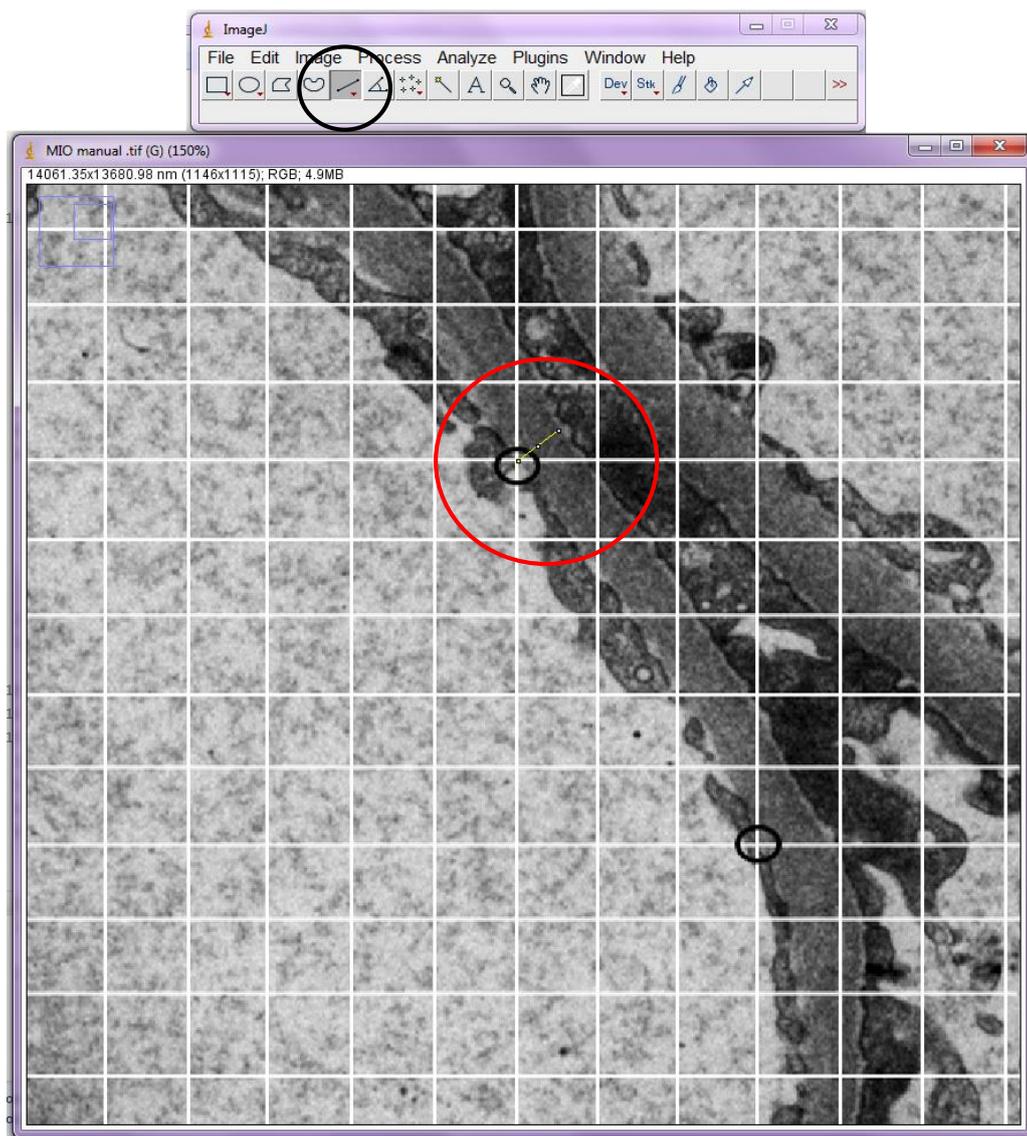


2º – Calibrar a imagem conforme descrito no apêndice 1; esta calibração será necessária apenas uma vez, a cada início da utilização do programa, sendo esta válida para imagens obtidas no mesmo aumento;

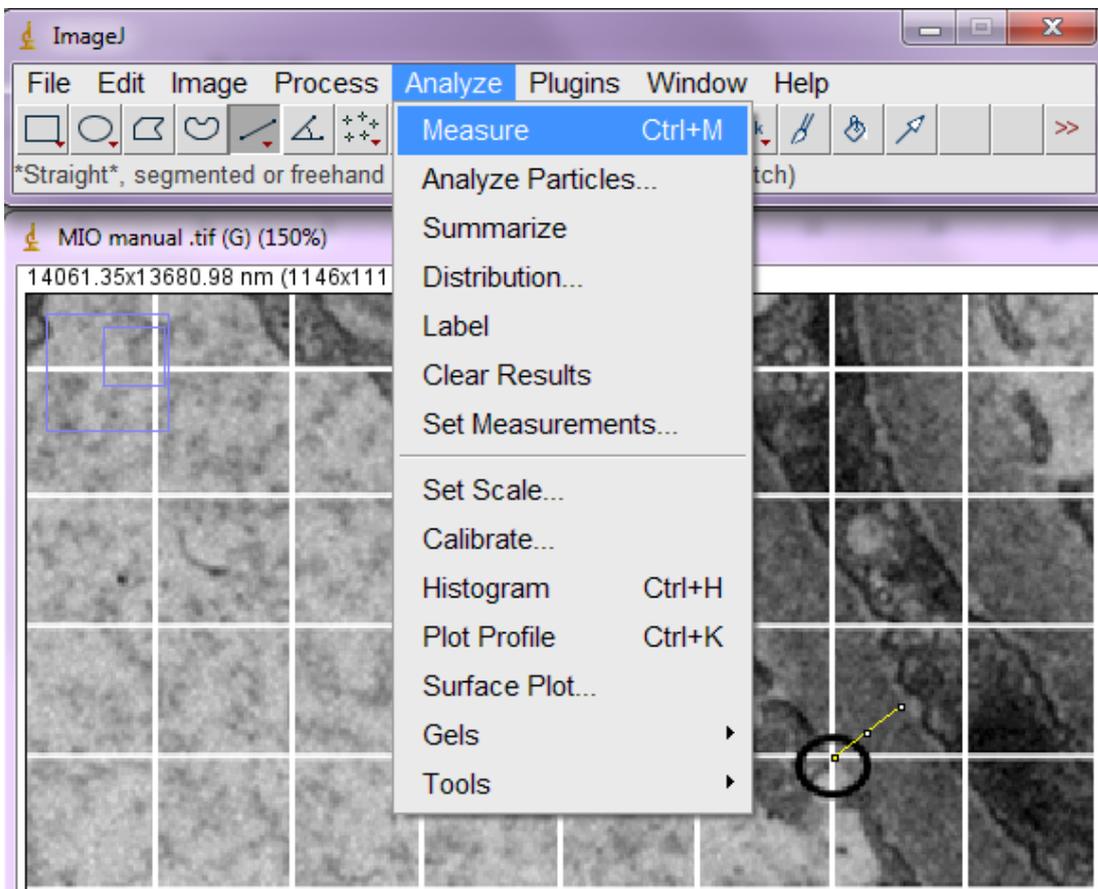
3º - Ampliar a imagem para melhor visualização das membranas das células endoteliais e dos podócitos, clicando em *Image* no menu de ferramentas e em seguida em *Zoom* na lista de subcomandos. Clicar em *In [+]* para ampliar e *Out [-]* para reduzir o tamanho da imagem.



4° – Medir a espessura da membrana usando a ferramenta *line selection tools*, no menu de ferramenta. Clicar no limites inferior da MBG, abaixo do podócito, mantendo o botão esquerdo do mouse pressionado, arrastar perpendicularmente até o limite da célula endotelial e soltar o botão do mouse, ao final uma linha amarela ficará registrada na imagem, conforme ilustrado abaixo:



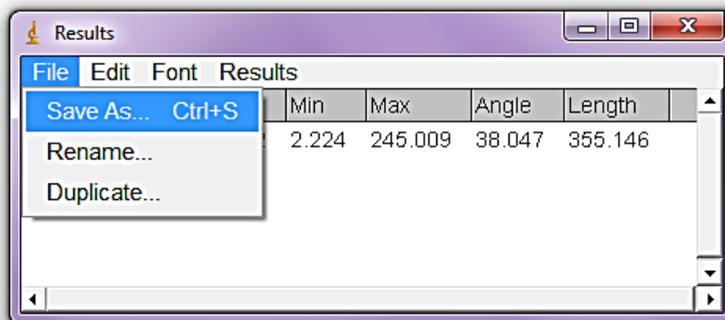
5° – Clicar em *Analyze* no menu de ferramentas, e depois selecionar o subcomando *Measure* para calcular a distância medida. Alternativamente, pressione simultaneamente *Ctrl+M* no teclado para realizar a mesma função.



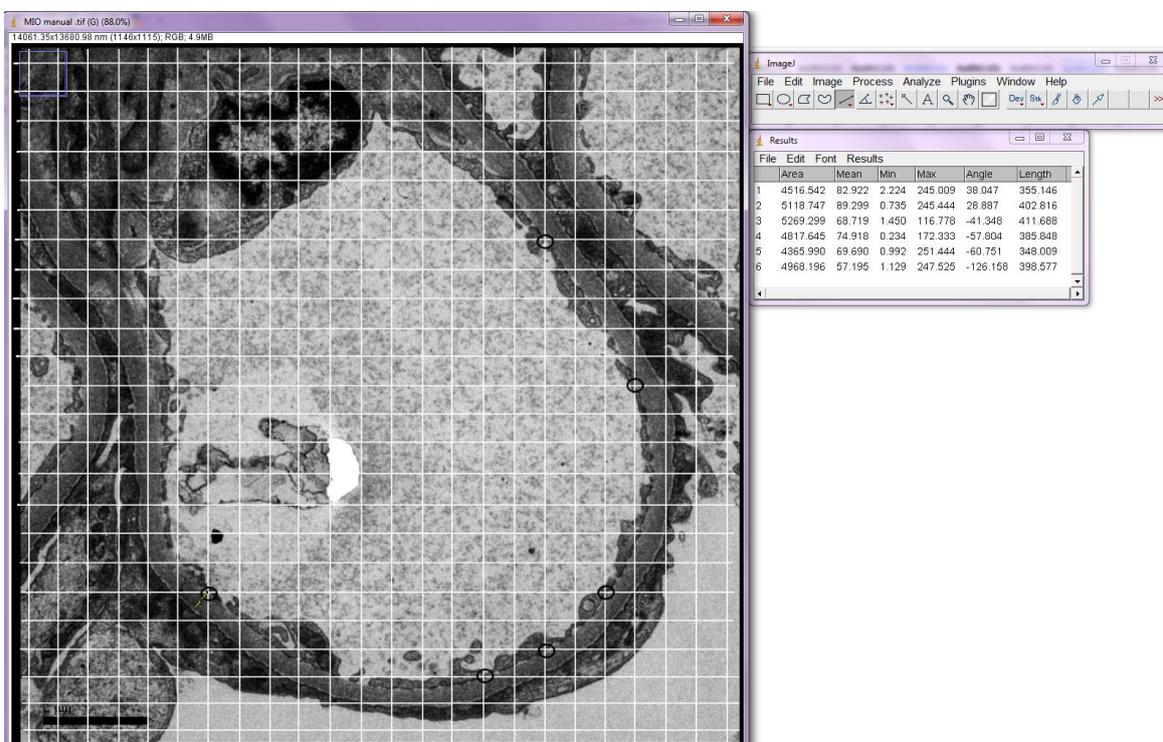
Após acionar a função *Measure* abrirá uma janela “*Results*” com o valor da medida realizada, dado em nm. Mantenha essa janela aberta até a conclusão das medidas na imagem avaliada, onde os valores serão acumulados a cada medida.

File	Edit	Font	Results			
	Area	Mean	Min	Max	Angle	Length
1	4516.542	82.922	2.224	245.009	38.047	355.146

6° - Ao final da realização das medidas, elas podem ser transferidas automaticamente para uma tabela do Excel. Para isso, clique em *File* no menu de ferramentas e depois selecione o subcomando *Save*. Alternativamente, pressione simultaneamente *Ctrl+S* no teclado para realizar a mesma função.



Exemplo: Medidas de uma alça do capilar glomerular, pelo MIO.



2. ESPESSURA NORMAL DA MBG

Em nosso estudo avaliamos a espessura da MBG de pacientes com diagnóstico histológico de Alterações glomerulares mínimas (AGM), que tiveram biópsias renais processadas e arquivadas no SME do IGM - FIOCRUZ- BA, entre os anos de 1998 a maio de 2017, procedentes de hospitais 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).

A mensuração da espessura da MBG foi realizada utilizando o MD (N:32) e o MIO (N:20). Usando o MD estimamos a espessura normal das membranas basais glomerulares em $380,4 \pm 48,71\text{nm}$ (média \pm DP). Utilizando o MIO o valor obtido foi de $373,5 \pm 48,91\text{nm}$ (média \pm DP). A tabela 1 apresenta as médias da espessura da MBG obtidas pelo os dois métodos, nas diferentes faixas etárias 0-10, 11-20, 21-30, 31-40e > 60 anos.

Tabela 1: Comparação entre as médias das duas técnicas utilizadas para mensuração.

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

A tabela 3 descreve a médias e desvios padrões da espessura da MBG obtidas em diferentes estudos. Entretanto, existem poucos trabalhos na literatura reportando estimativas da espessura da MBG normal.

Tabela 2: Valores da espessura normal da MBG estimadas em diferentes estudos.

Autores (Ano)	País	Medida da espessura da MBG	
		Faixa etária (n)	média ± DP
HALA KFOURY (2016)	Arábia Saudita	0-5 anos (5)	211.0 ± 7.4 nm
		6-10 anos (7)	276.1 ± 40.9nm
		11-17 (13)	326.9 ± 18.9nm
		18-60 (26)	352.7 ± 16.6nm
		>60 (2)	372.5 ± 3.5nm
SATO et al. (2010)	Japão	3 meses de idade (1)	115 ± 36nm
		3 a 11 anos (7)	243 ± 12nm
		12 a 57 anos (8)	353 ± 20nm
		60 a 70 anos (4)	287 ± 25nm
RANGAYYAN et al. (2010)	Canada	31 e 86 (2)	348 ± 135nm
RAYAT, C.S. et al. (2005)	Índia	18-58 anos (25)	321 ± 28nm
MARQUEZ et al. (2003)	Nicósia	4 a 69 anos	
		4 anos (1)	246 ± 44nm
		>4 (8)	362 ± 92nm
RAMAGE et al. (2002)	Reino unido	1 – 20 anos (212)	
		1 ano	194 ± 6,5nm
		>1	297 ± 6,0nm
DISCHE, F. et al. (1990)	Inglaterra	15-57 anos (20)	396 ± 31-7nm
MORITA M. et al. (1988)	Caucasiano e Asiático	Caucasiano (24)	281± 33nm
		Asiático (11)	273± 38nm
		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	

APÊNDICE 1

SOFTWARE ImageJ

ImageJ é um programa de processamento de imagem baseado em Java, o que permite que ele seja executado em Linux, Mac OS X e Windows. É um programa de domínio público para análise de imagens científicas produzido pelo National Institute of Health (NIH, EUA). O ImageJ pode ser usado para exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8-bits, 16-bits e 32-bits e 64 bits. Tem a capacidade de ler diversos formatos de imagem como TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS, Dm3. Além de calcular áreas e estatísticas, valores em pixel, com as seleções definidas pelo usuário. As possibilidades de processamento de imagens permitidas pelo ImageJ incluem alterações do contraste, da nitidez, suavização, detecção de bordas e filtros.

Sites para *Download*:

<https://imagej.softonic.com.br/download>

<http://www.baixaki.com.br/download/imagej.htm>

<https://imagej.net/Downloads>

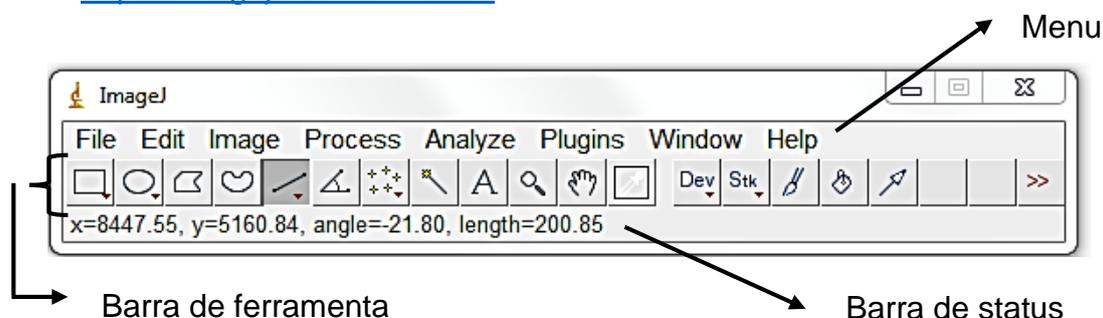


Figura 1. Janela de ferramentas do programa ImageJ

Nome	Função
File	Operações básicas de arquivos (abertura, gravação, criação de novas imagens).
Edit	Operações de edição e desenho (recortar, cópia e seleção de imagens).

Image	Ajusta as propriedades da imagem, por exemplo: cores, camadas e aproximação.
Process	Processamento de imagem, incluindo operações pontuais, filtros e operações aritméticas.
Analyze	Medições estatísticas, perfis de perfil e histograma e outras operações relacionadas para análise de imagens.
Plugins	Comandos com opções para desenvolvedores (criação de macros, por exemplo) e alguns filtros de efeitos 3D.
Window	Seleção e gerenciamento de janelas abertas.
Help	Atualizações, recursos de documentação e informações de versão.

As ferramentas usadas com maior frequência neste manual estão apresentadas por números na barra de ferramentas abaixo:



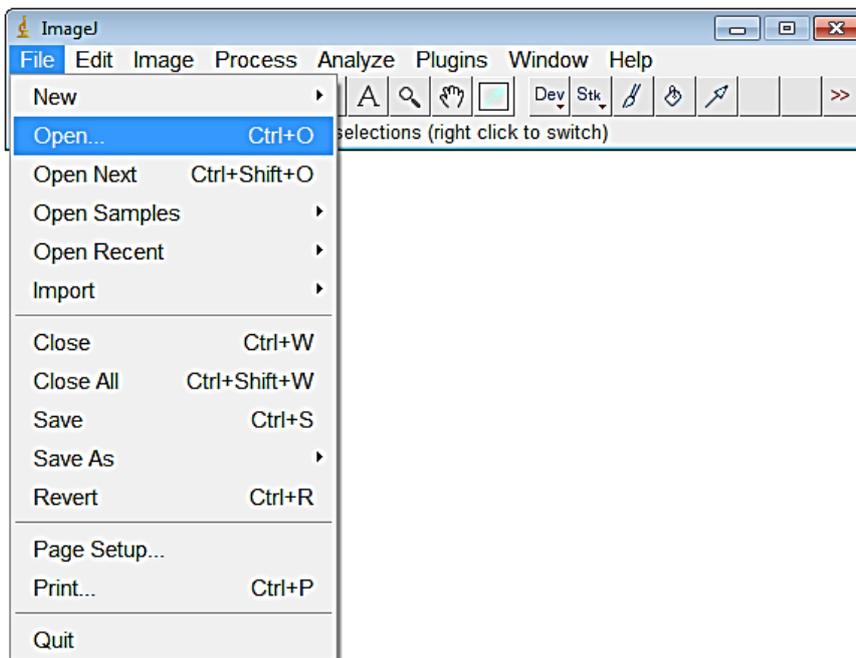
Figura 2. Barra de Ferramentas ImageJ

1 - *Straight Line Selection Tool* - Ferramenta de seleção de linha reta. O comprimento e o ângulo da linha são exibidos na barra de status.

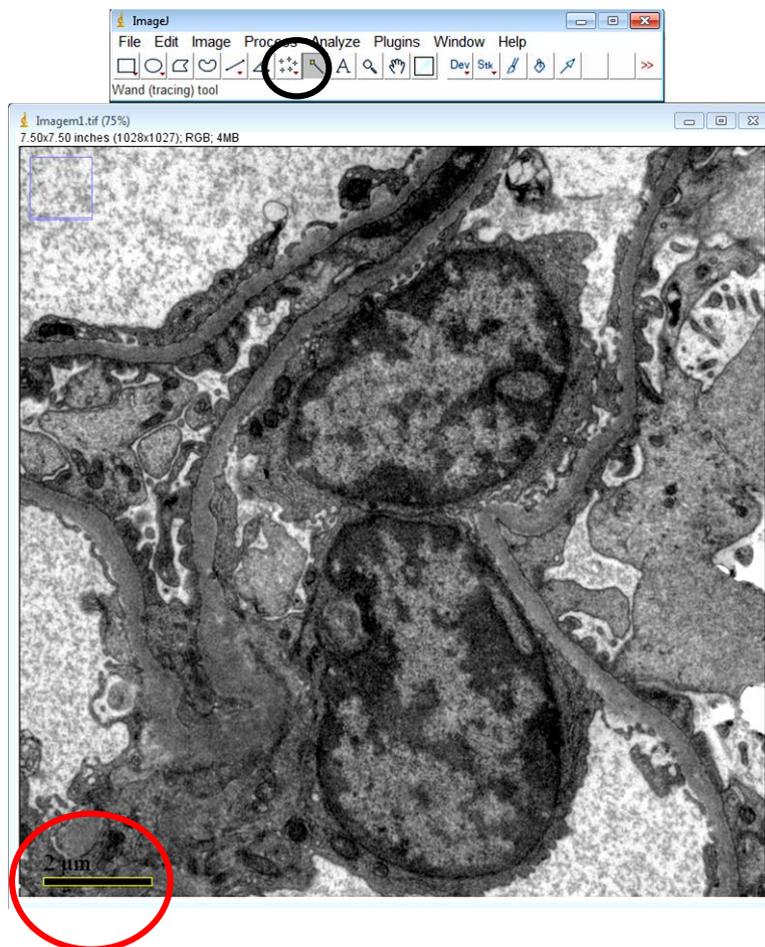
2 - *Wand Tool* – Ferramenta Varinha. Cria uma seleção na imagem

As imagens analisadas nesse manual foram gravadas no formato TIFF (*TaggedImage File Format*). A calibração foi realizada para que os resultados fossem expressos em nm, como demonstrado no passo a passo a seguir:

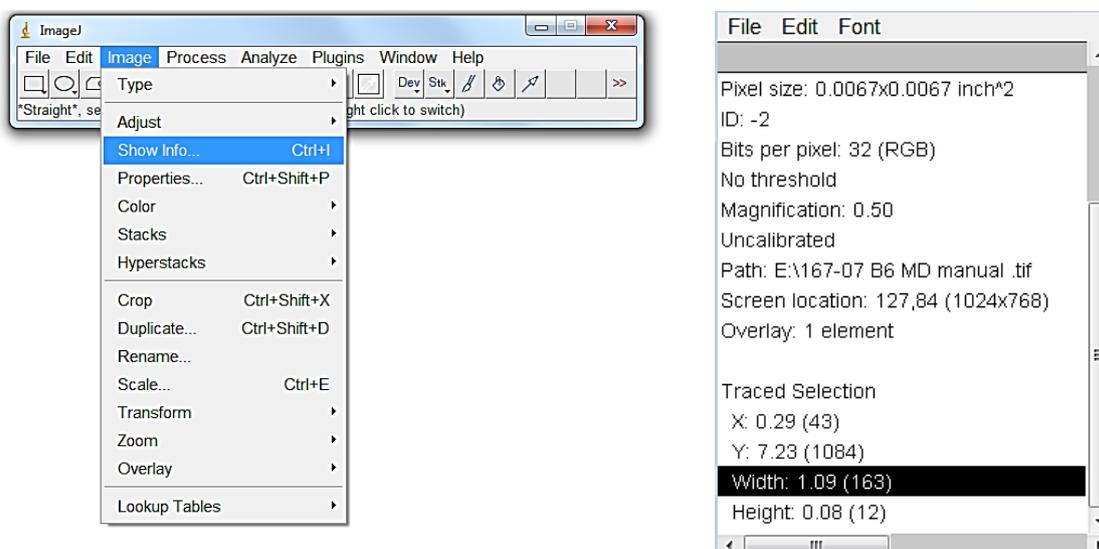
1° - Abrir uma eletromicrografia contendo escala no programa ImageJ. Para isto, clicar no comando *File*, que fica situado no menu de ferramentas do programa, em seguida em *Open* na lista de subcomandos e por fim selecionar o arquivo desejado;



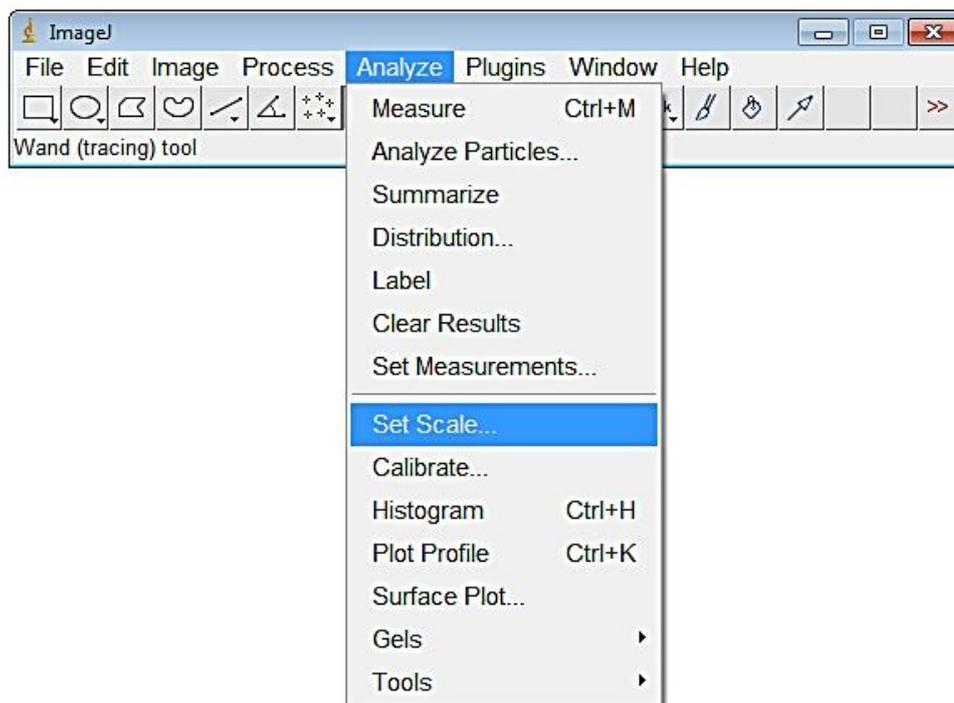
2° – Clicar no ícone da ferramenta *wand tool* situado no menu de ferramenta do programa e em seguida selecionar a escala da imagem.



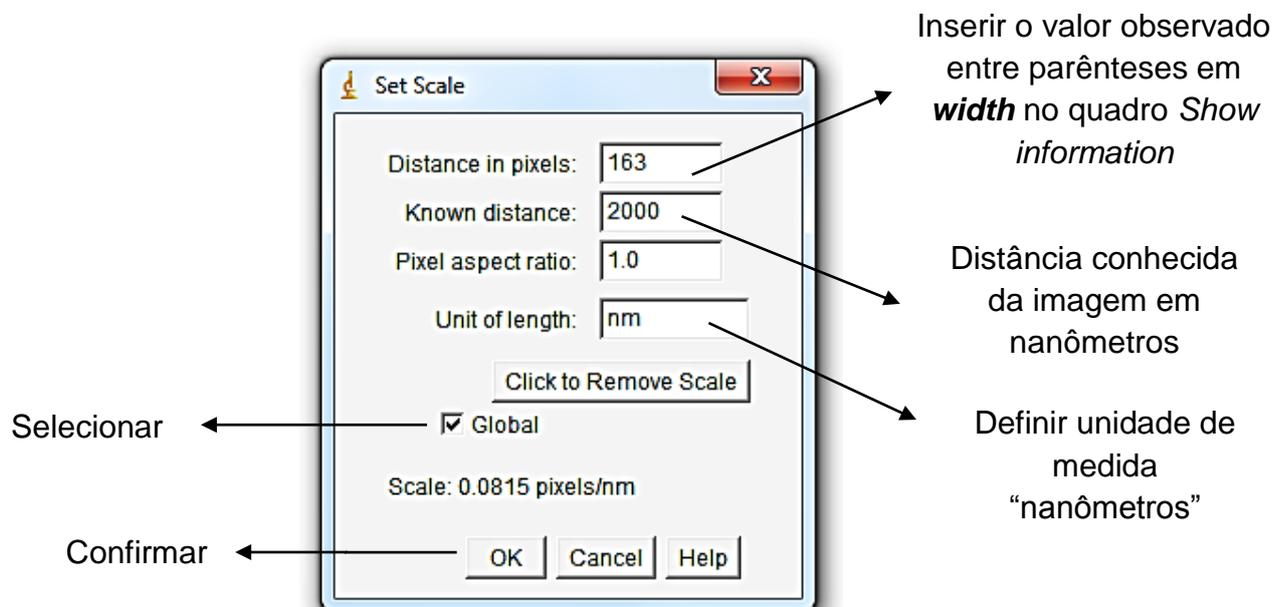
3° – Clicar em *Image* no menu de ferramenta e depois *Show Information* na lista de subcomandos, então abrirá uma nova janela. Nesta janela, em *Traced Selection* copie o valor apresentado entre parênteses no campo *Width*, que corresponde a distância em pixel.



4° – Clicar em *Analyze* no menu de ferramenta e selecionar *Set Scale* na lista de subcomandos.



5° – Ao selecionar a função *Set Scale*, abrirá uma nova janela. Inserir no *campo Distance in pixels* o valor copiado na etapa anterior.

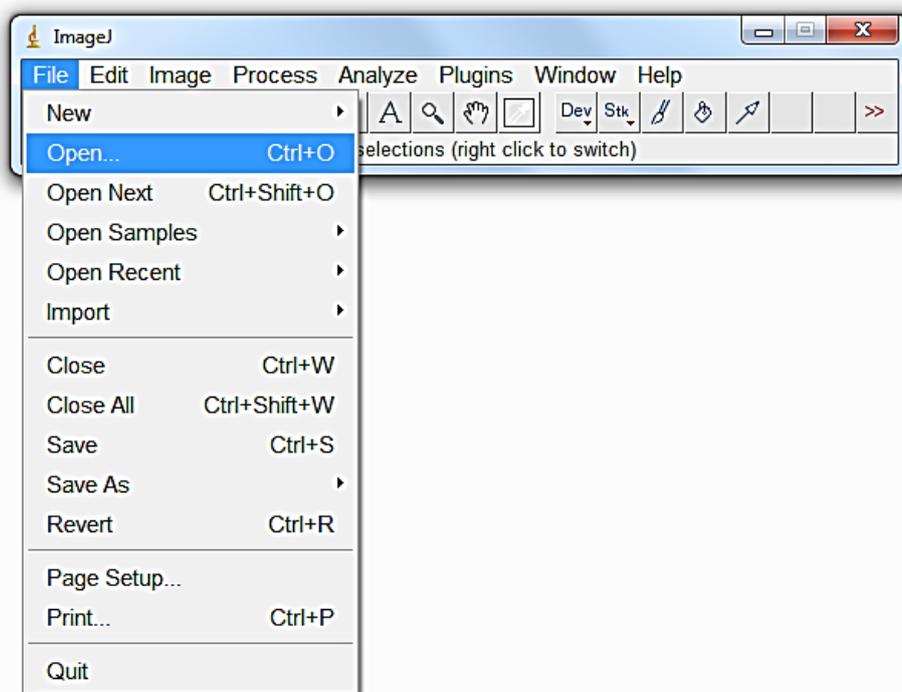


APÊNDICE 2

CONSTRUÇÃO DA GRADE

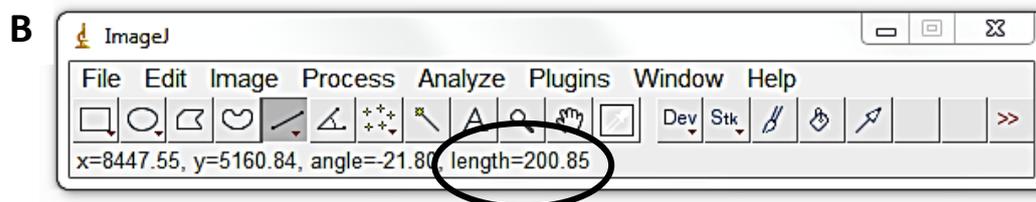
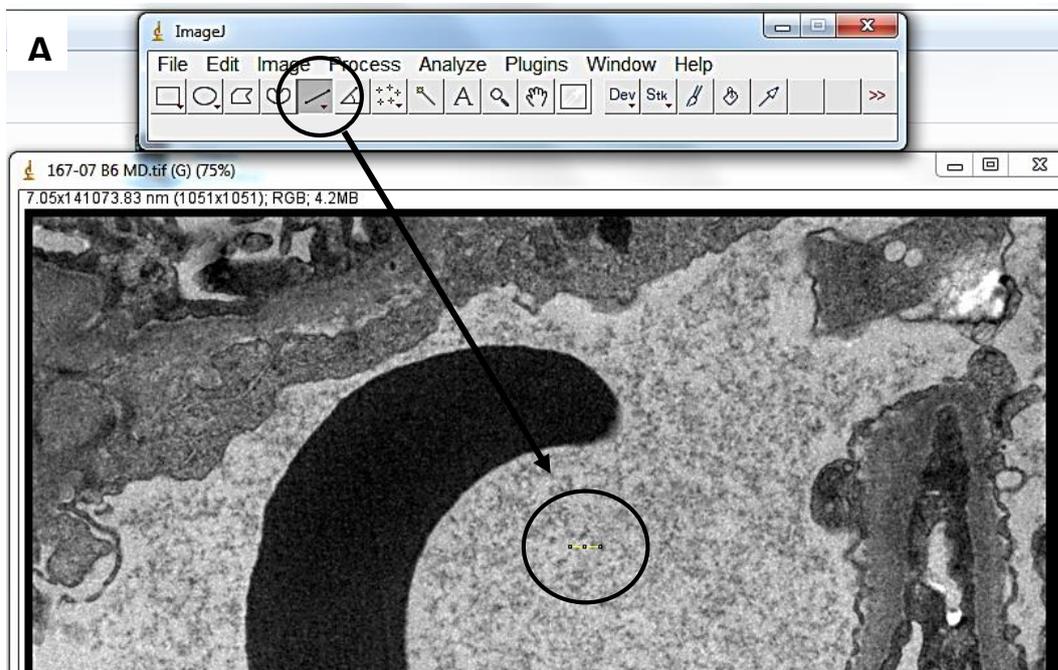
Para mensurar a espessura da MBG pelo MIO deve-se construir uma grade com distância entre as linhas de 200nm, para posteriormente sobrepor às eletromicrografias, seguindo os passos apresentados abaixo.

1° Abrir uma eletromicrografia no mesmo aumento das imagens que serão analisadas, no caso 10.000x, no programa ImageJ. Clicar em *File*, situado no menu de ferramentas, depois *Open* na lista de subcomandos e selecionar o arquivo desejado.

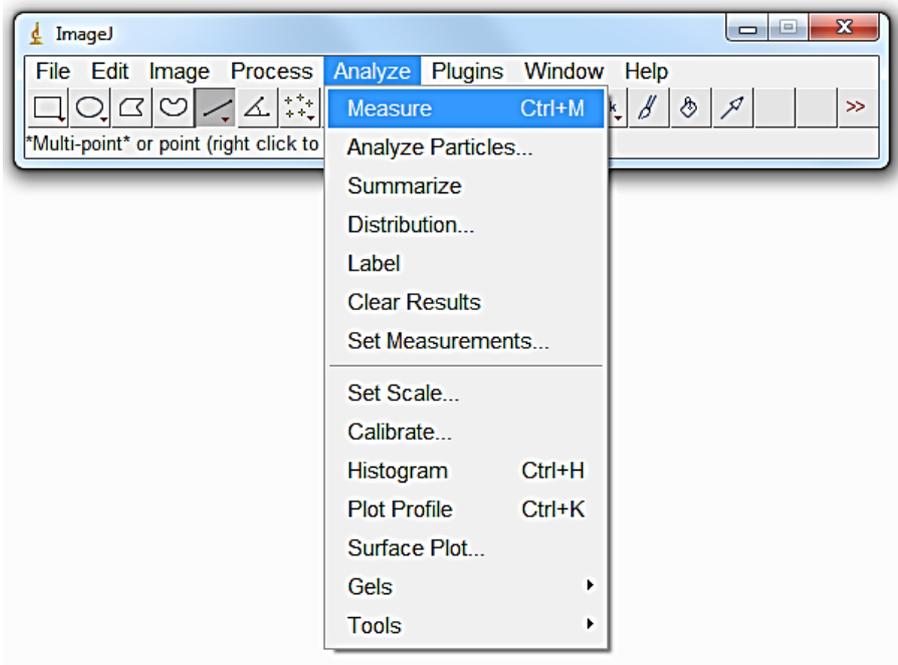


2° – Calibrar a imagem conforme descrito no apêndice 1.

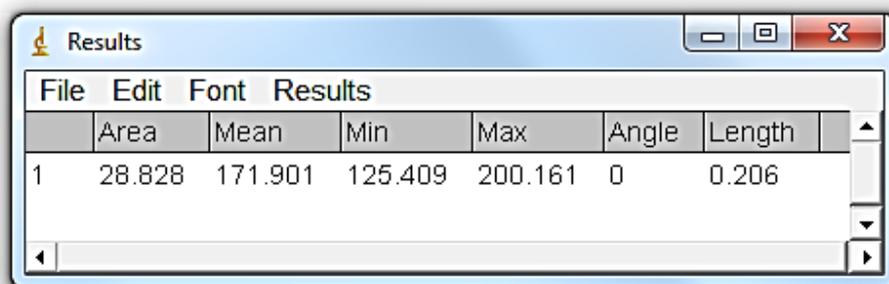
3° Selecionar a ferramenta *line selection tools*, no menu de ferramentas. Traçar uma reta, pressionando o botão direito do mouse sobre a imagem (Figura A), arrastar até observar a medida de 200nm, observando na barra de status em *length*, e soltar o botão (Figura B).



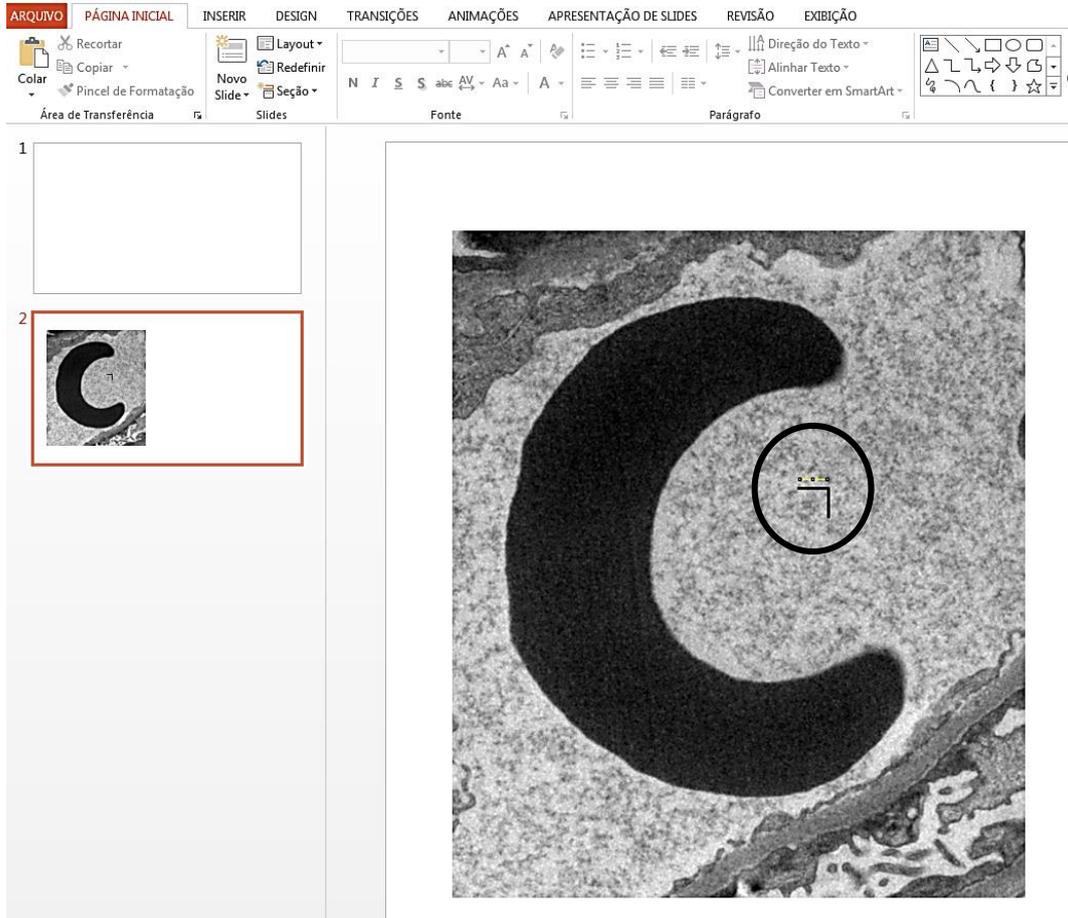
Caso necessário, poderá mensurar o valor da reta clicando em *Analyze* no menu de ferramentas, e depois selecionar o subcomando *Measure* para calcular. Alternativamente, pressione simultaneamente *Ctrl+M* no teclado para realizar a mesma função.



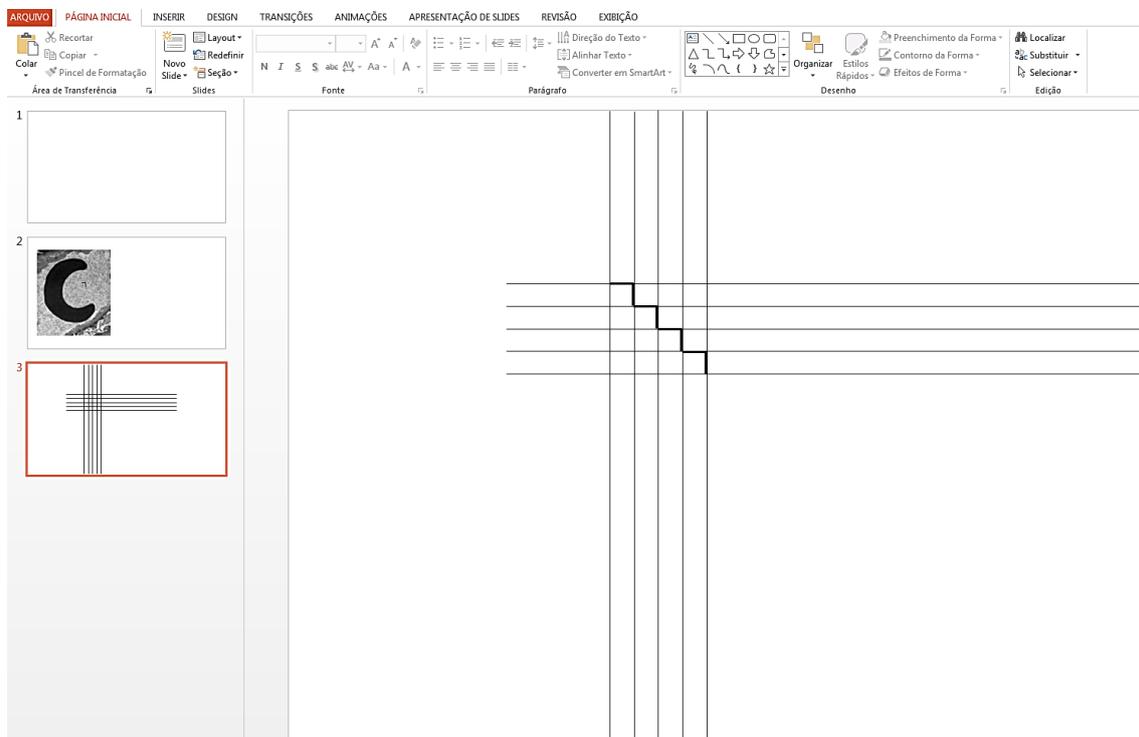
Após acionar a função *Measure* abrirá uma janela “*Results*” com o valor da medida realizada, dado em nm.



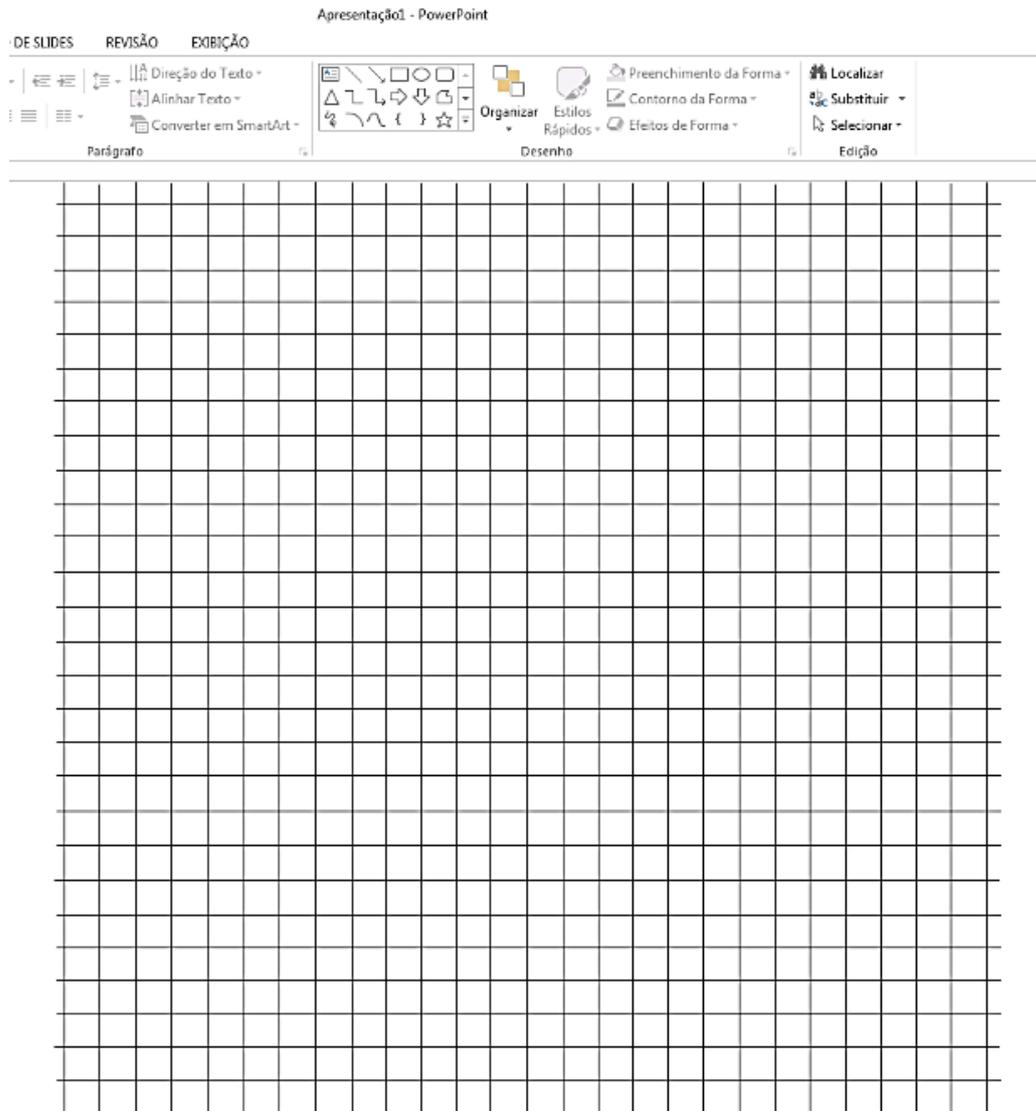
5° Faça um *Print scrn* da tela e cole no *PowerPoint* recorte a foto até o tamanho desejado sem alterar o tamanho da imagem. Desenhe uma reta na vertical e na horizontal com o mesmo comprimento da linha amarela deixada pelo ImageJ:



6° Desenhar uma grade com a ferramenta de linhas do *PowerPoint*, obedecendo as distâncias das retas confeccionadas e o tamanho da eletromicrografia, conforme ilustrado abaixo:



7º Agrupe todas as linhas e salve a grade como imagem.



APÊNDICE 3

PROCESSAMENTO DE AMOSTRA E ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

1. Fixação

A fixação deve ser iniciada imediatamente após a retirada do fragmento renal do paciente, utilizando solução de glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, no período de no mínimo duas horas em temperatura ambiente (TA). O fragmento da biopsia deverá ser subdividido com uma navalha de bisturi ou lâmina de aço inoxidável em pedaços de 1mmx1mm.

Caso necessário, após o intervalo de fixação por duas horas a temperatura ambiente, a biopsia poderá ser armazenada na geladeira imersa no mesmo fixador, por no máximo uma semana, para prosseguimento do processamento.

2. Lavagem

Os fragmentos são lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1M em intervalo de 10 minutos por 3 vezes em TA.

3. Pós-fixação

Substituir o tampão de lavagem por uma mistura de tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M e incubar por 1 hora a temperatura ambiente protegido da luz.

Após este intervalo, lavar os fragmentos em tampão cacodilato de sódio 0,1M em intervalo de 10 minutos por 3 vezes em TA.

4. Desidratação

Desidratar os fragmentos em banhos sucessivos de acetona em concentrações crescentes de 30, 50, 70, 90 e 100%, sendo que na concentração de 100% o banho deverá ser repetido três vezes. Todos os banhos deverão ser realizados em temperatura ambiente com duração de 10 minutos cada.

5. Substituição

Substituir a acetona por resina Epoxi tipo PolyBed 812[®] seguindo a seguinte sequência de banhos com as misturas indicadas abaixo:

- Resina: Acetona – 1:2 – 18h
- Resina: Acetona – 1:1 – 18h
- Resina: Acetona – 2:1 – 18h
- Resina pura – 18h

Durante os banhos os fragmentos deverão ser submetidos a constante agitação, para garantir uma boa substituição.

6. Inclusão

Posicionar cada sub-fragmento em um molde específico e preencher com resina epóxi pura. Em seguida levá-lo a uma estufa a 60°C para polimerização da resina, por 72h.

7. Cortes

1° Cortes semifinos (SF) – Após a polimerização os blocos são trimados e cortados em navalha de vidro em ultramicrótomo em seções de 1µm. Os cortes obtidos são aderidos em lâmina histológica e corados com uma solução de Azul II e Azul de metileno. Em seguida, os cortes são analisados no microscópio de luz, para identificar os blocos que apresentam glomérulo em evidência.

2° Cortes ultrafinos (UF) - Os blocos com glomérulo em evidência são cortados em navalha de diamante em secções de 60 a 70nm e coletados em grades de cobre de 200MESH;

8. Contrastação

As grades são contrastadas com banho em solução de acetato de uranila a 6% por cinco minutos seguida de lavagem com álcool metílico, e por fim banho em solução de citrato de chumbo por cinco minutos seguida de lavagem em água destilada;

9. Observação

Os cortes são observados no Microscópio Eletrônico de Transmissão a 80Kv no aumento de 10.000x.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE SOUZA, W. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. 3 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007, 37-50 p.

DISCHE, F. E. et al. Incidence of thin membrane nephropathy: morphometric investigation of a populationsample. **J ClinPathol** 43: p. 457-460, 1990.

KFOURY, H. Glomerular basement membrane thickness among the saudi population. **UltrastructPathol**, v., n., p. 1-4, 2016.

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

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

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.

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. **Indian J PatholMicrobiol**, v. 48, n. 4, p. 453-458, 2005.

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.

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