



MARILISA FERRUDA ANDREOLI RISSO

**EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO COM DIMETILSULFÓXIDO ( $\text{Me}_2\text{SO}$ )  
(DMSO) EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS DE TECIDO  
ADIPOSO**

**CAMPINAS  
2012**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**MARILISA FERRUDA ANDREOLI RISSO**

**“EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO COM DIMETILSULFÓXIDO (Me<sub>2</sub>SO)  
(DMSO) EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS DE TECIDO  
ADIPOSO”**

**Orientador(a): Profa. Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo**

**Co-Orientador(a): Profa. Dra. Sara Terezinha Olalla Saad**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção de  
título de Mestra em Fisiopatologia Médica na área de concentração em Biologia  
Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA MARILISA FERRUDA ANDREOLI RISSO E  
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO**

Assinatura do Orientador(a)

---

**CAMPINAS  
2012**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

An25e Andreoli Risso, Marilisa Ferruda, 1981-  
Efeito da criopreservação com dimetilsulfóxido (Me<sub>2</sub>SO-) (DMSO) em células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo / Marilisa Ferruda Andreoli Risso.  
– Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Ângela Cristina Malheiros Luzo.  
Coorientador: Sara Teresinha Olalla Saad.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fibra de colágeno. 2. COL2A1. 3. Técnicas de cultura de células. I. Luzo, Ângela Cristina Malheiros. II. Saad, Sara Teresinha Olalla, 1956-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Effect of cryopreservation with dimethyl sulfoxide (Me<sub>2</sub>SO-) (DMSO) in mesenchymal stem cells from adipose tissue

**Palavras-chave em inglês:**

Collagen fiber

COL2A1

Cell culture techniques

**Área de concentração:** Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

**Titulação:** Mestre em Fisiopatologia Médica

**Banca examinadora:**

Ângela Cristina Malheiros Luzo [Orientador]

Moisés Cohen

Simone Cristina Olenscki Gilli

**Data de defesa:** 25-10-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

## Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Marilisa Ferruda Andreoli Risso

Orientador(a): Profa Dra Ângela Cristina Malheiros Luzo  
Co-Orientador(a): Profa Dra Sara Teresinha Olalla Saad

### Membros:

Professor (a) Doutor (a) Moisés Cohen

Professor (a) Doutor (a) Simone Cristina Olenscki Gilli

Professor (a) Doutor (a) Ângela Cristina Malheiros Luzo

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/10/2012



## DEDICATÓRIA

---

Aos meus pais Nair e Angelo (*sempre presentes*), e ao meu querido marido Rodrigo, pessoas mais importantes em minha vida, que amo mais que tudo e sem as quais eu jamais estaria cumprindo essa etapa.



## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço primeiramente à Deus, pela vida maravilhosa e repleta de oportunidades que me proporcionou e pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho.

Aos meus pais Nair e Angelo (*sempre presentes*) por me educarem, me ensinarem a dar valor a cada dia, e me mostrarem que a vida é curta demais para ser desperdiçada com momentos vazios.

Ao Rodrigo, meu amor, marido, melhor e maior amigo, confidente, que tem me amparado, sido meu exemplo de vida e meu norte com sua sabedoria e serenidade. Agradeço do fundo de meu coração por confiar e me apoiar, principalmente nos momentos mais difíceis, que se tornaram mais brandos por você estar por perto.

Aos meus sogros, Mara e Gilberto, Dona Maria, Sr. Eugênio, meu cunhado Leopoldo e futura cunhada Thais, minha segunda família, obrigada pelo apoio, pela paciência, agradeço por todo suporte.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Sangue/CAPES, por ter garantido os recursos deste projeto.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Terapia Gênica do Hemocentro – UNICAMP pela infraestrutura necessária à pesquisa.

À Dr<sup>a</sup>. Sara T. Olalla Saad, pesquisadora sem igual, que admiro, é quem sigo como maior exemplo de profissionalismo, que me deu essa grande oportunidade, meus mais sinceros agradecimentos.

À Dr<sup>a</sup>. Ângela C. M. Luzo, minha orientadora, pesquisadora brilhante, pessoa na qual sinto segurança para recorrer a qualquer momento, tem me dado todo apoio para o andamento do presente projeto, muito obrigada por tudo.



À Dr<sup>a</sup>. Adriana da S. S. Duarte, pesquisadora dedicada de corpo e alma, que me apoia a cada dia, a cada aperto, em todos os passos do presente projeto, muito obrigada por tudo que tem feito, você tem sido fundamental para o meu crescimento profissional.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Paulo Kharmandayan e toda a equipe da cirurgia plástica do Hospital das Clínicas da UNICAMP pelas inúmeras coletas de material para o andamento do presente projeto, meus sinceros agradecimentos.

À toda a equipe do Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Hemocentro da UNICAMP, em especial à secretária Sandra Andrade, pessoa maravilhosa e sempre disposta a ajudar, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Carlos Lens Cesar, a Dr<sup>a</sup>. Mariana Baratti e a toda equipe do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) da Universidade Estadual de Campinas por ter disponibilizado o uso de todo o aparato para a realização das análises por microscopia de Geração de Segundo Harmônico (SHG).

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Javier F. Adur pela disponibilidade de colaboração e pelo auxílio nas análises de minhas imagens de SHG.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. José Vassalo pela disponibilidade de seu laboratório e ao biólogo Dr. Paulo Latuf Filho pela grande disponibilidade e ajuda nas colorações e nos experimentos de imunohistoquímica.

À Patrícia Juliani por estar sempre disposta a resolver os problemas da forma mais rápida possível.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular e Celular que acompanharam meu trabalho desde o início. Em especial ao João Agostinho, João Kleber, Gisele, Vanessa, Rita, Luis Gustavo, Fernanda Roversi, Karla, Matheus, Rita, Anamika, Dr<sup>a</sup>. Fabíola Traina e Dr<sup>a</sup>. Mariana Lazarini e todos que me socorreram em inúmeros momentos. Obrigada pela amizade.



Aos docentes e funcionários do Hemocentro da UNICAMP, pelo apoio e estrutura na realização deste trabalho.

Às queridas Lena e Simone, por estarem ao meu lado desde minha chegada, nos primeiros passos e em toda essa caminhada, muito obrigada, amo vocês. Minha nova jornada ficará mais vazia, no entanto, sei que sempre terei o abraço apertado de vocês para me apoiar.

À Janine e Ana Claudia, amigas de longa data, fico feliz por tê-las como amigas, obrigada por tudo.

À Audrey, a pessoa mais altruísta com quem convivo, faz o ambiente de trabalho ficar mais leve, além de ser uma maravilhosa companheira de trabalho e amiga, muito obrigada por estar sempre por perto.

Aos “meninos” Pedro e Thiago, aprendi e me diverti muito com ambos, vocês são ótimos, muito obrigada por tudo.

À Arlete e ao Leonardo pelo apoio didático nas apresentações de trabalhos em congressos acadêmicos.

Às minhas queridas amigas, Lilian, Maysa, Estela, Rhea e Érica, fiéis desde minha infância, mesmo distantes vocês me dão tudo o que é preciso para manter a sanidade e o equilíbrio.

À minha coordenadora Cristina Tanikawa, meus colegas de docência, e à todos colegas do Instituto de Saúde Integrada de Campinas, meus sinceros agradecimentos pela compreensão e apoio, cobrindo minhas ausências e segurando as pontas, sempre com uma maravilhosa energia positiva.

A todos que eu não consegui citar, que são muitos, mas que foram essenciais para a realização deste projeto, direta e indiretamente.

A todos os pacientes que autorizaram a utilização de suas amostras, muito obrigado a todos.



*“Existe apenas um bem, o saber, e  
apenas um mal, a ignorância”*

**Sócrates**



## RESUMO

---

Lesões cartilaginosas raramente curam-se espontaneamente. As atuais opções terapêuticas cirúrgicas e não são limitadas ao alívio dos sintomas, mas a necessidade de futura substituição total de joelho. Terapia baseada em células-tronco adultas representa uma alternativa promissora para os procedimentos existentes. As células-tronco mesenquimais (MSC) apresentam alta plasticidade celular e podem ser obtidas de diversas fontes teciduais, opção que exige grande aporte celular expondo a necessidade de criopreservação, processo vantajoso. Contudo, protocolos convencionais estão diretamente associados a possíveis danos e mortalidade celular, sendo desencadeados por formação de cristais de gelo intracelular, toxicidade do crioprotetor adotado e desidratação celular. Este projeto tem como objetivo investigar a interferência da criopreservação com dimetilsulfóxido ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ) (DMSO) na capacidade de MSCs em diferenciação em linhagens mesodermis e arranjo de fibras de colágeno produzidas na diferenciação condrogênica. MSCs foram obtidas de tecido adiposo (ADSC). Em quarta passagem foram caracterizadas por citometria de fluxo e diferenciadas em linhagem mesodermis. Diferenciação comprovada por análise morfológica e expressão gênica por RT-PCR. Genes escolhidos *ADIPOQ*, *FABP4* e *PPARG* linhagem adipogênica, *AGCAN*, *SOX9*, *COL1A1* e *COL2A1* linhagem condrogênica e *OC*, *OPN* e *COL1A1* linhagem osteogênica. Diferenciação condrogênica realizada pela técnica de micromassa. Arquitetura das fibras colágenas observada por microscopia de Geração de Segundo Harmônico (SHG) de MSCs e imagens analisadas pelos algoritmos Fast Fourier Transform (FFT) e Gray Level Co-occurrence Matrix (GLCM). ADSCs criopreservadas em taxa controlada de congelamento com solução crioprotetora de soro fetal bovino e 10% de DMSO, mesmos ensaios realizados após descongelamento. Células descongeladas submetidas aos mesmos protocolos de caracterização. Características morfológicas obtidas por SHG expressão gênica das células

frescas e criopreservadas analisadas estatisticamente. Amostras de ADSC, fresca e criopreservadas, foram capazes de se diferenciar em linhagens mesodermiais. Perfil de expressão gênica da linhagem adipogênica foi semelhante ao esperado para tal processo de diferenciação, em ambas amostras, criopreservadas e frescas, estas últimas com maior expressão ( $p=ns$ ). Na diferenciação para linhagem osteogênica também houve o perfil de expressão esperado para os genes estudados, sendo mais expresso no grupo criopreservado ( $p=ns$ ). Apesar do fato da expressão do gene *COL2A1* de linhagem condrogênica ter sido maior no grupo criopreservado, quando o perfil de expressão gênica do grupo fresco foi analisado, este mostrou-se mais consistente com o perfil esperado normal. Análise das imagens de SHG demonstraram que a arquitetura das fibras colágenas foi mais organizada ( $p=ns$ ) e uniforme ( $p>0,0001$ ) nas amostras frescas. O grupo criopreservado demonstrou maior entropia ( $p=ns$ ) e contraste ( $p=0,0167$ ), demonstrando haver maior tendência direcional das fibras de colágeno nas amostras frescas. Os resultados de expressão gênica sugerem que a criopreservação pode interferir de forma positiva na diferenciação osteogênica e negativamente nas linhagens adipogênica e condrogênica. A arquitetura da rede tridimensional de colágeno foi modulada negativamente pelo processo de criopreservação, dados esses confirmados por análise das imagens obtidas por SHG, o que poderia interferir com as propriedades físico/mecânicas características do tecido colagenoso, importante na manutenção da cartilagem articular baseada em terapia celular. O uso das imagens de SHG tornou-se uma importante ferramenta na melhor avaliação das fibras colágenas.

## ABSTRACT

---

Cartilage defects rarely heal spontaneously. Current surgical and non-surgical therapeutic interventions are limited to symptom relief and future total knee replacement continues to be necessary. Adult stem cell based therapy could represent a promising alternative to this procedure. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) have great capacity of differentiation and can easily be obtained from various sources. Cryopreservation offers many advantages for practitioners engaged in cell-based therapies. However, conventional slow freezing, despite using cryoprotectant solution, has always been associated with damage and mortality due to intracellular ice formation, cryoprotectant toxicity, and dehydration. The aim of this work is to investigate whether the Dimethyl Sulfoxide ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ) (DMSO) cryopreservation process interferes with the MSCs capacity of differentiation to mesodermal lineages and/or with collagen fiber network architecture, produced by chondrogenic cells, comparing fresh and thawed MSCs. MSCs were obtained from adipocyte tissue (ADSCs). At the fourth passage cells were characterized as ADSCs by flow cytometry analysis and differentiation to mesodermic lineages was confirmed by morphology (light optical microscopy) and gene expression analysis (RT-PCR). The following genes were chosen *ADIPOQ*, *FABP4* and *PPARG* for adipogenic lineage, *AGCAN*, *SOX9*, *COL2A1* and *COL1A1* for chondrogenic and *OC*, *OPN* and *COL1A1* for osteogenic lineage. Chondrogenic differentiation was carried out by micromass technique. Collagen fibers architecture was observed by Second Harmonic Generation (SHG) microscopy. Images were analyzed by Fast Fourier Transform (FFT) and Gray Level Co-occurrence Matrix (GLCM) algorithms. ADSCs were cryopreserved in a controlled-rate freezing device with bovine serum fetal and 10% DMSO as cryoprotectant solution. Thawed cells were submitted to the same characterization protocols. SHG morphologic features and gene expression results from thawed and fresh cells were statistically analyzed. Both, thawed and fresh ADSCs were able to

differentiate into mesodermal lineages. Gene expression profile of adipogenic lineage was similar to that expected for the differentiation process in both, thawed and fresh cells, with greater expression in fresh ones ( $p=ns$ ). Osteogenic lineage also demonstrated the expected gene expression profile, being more expressed in the thawed group ( $p=ns$ ). Despite the fact that *COL2A1* gene expression in chondrogenic lineage was greater in the thawed group, when the gene expression profile was analyzed the fresh group was more consistent with the expected normal profile. SHG images results demonstrated that collagen fibers architecture was more organized ( $p=ns$ ) and uniform ( $p<0, 0001$ ) in fresh samples. The thawed group showed more entropy ( $p=ns$ ) and contrast ( $p=0, 0167$ ) demonstrating that a directional trend in the collagen fibers was only observed in the fresh group. Gene expression results suggested that cryopreservation could interfere in a positive manner with osteogenic differentiation, and negatively on adipogenic and chondrogenic lineages. Collagen network tridimensional architecture was negatively modulated by cryopreservation, confirmed by SHG analysis, which could interfere with the desirable collagen mechanical properties, important for the maintenance of articular cartilage in cell based therapy. SHG analysis has become an important tool for better evaluate collagen fibers.





## LISTA DE ABREVIACOES

---

|               |   |
|---------------|---|
| 3D            | Tridimensional  |
| <i>ACAN</i>   | aggrecan  |
| ACI           | Autologous chondrocyte implantation                         |
| <i>ACTB</i>   | actin, beta   |
| <i>ADIPOQ</i> | adiponectin, C1Q and collagen domain containg               |
| ADSC          | Adipose Tissue-Derived Stromal Cell                         |
| aICAM-1       | Anti-body Intercellular Adhesion Molecule-1                 |
| <i>ALP</i>    | alkaine phosphatase   |
| AOM           | Modulador acstico-tico                                    |
| ASM           | Angular Second Moment                                       |
| Banda G       | Técnica de coloração longitudinal Banda G                   |
| <i>BGLAP</i>  | bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (OC)              |
| BLAST         | Basic Local Alignment Search Tool                           |
| BLAT          | Blast Like Alignment Tool                                   |
| BSA           | Albumina srica bovina                                      |
| CAISM         | Centro de Assistencia Integrada  Saúde da Mulher           |
| CAPES         | Coordenação de Aperfeioamento de Pessoal de Nvel Superior |
| CD            | Cluster Differentiation                                     |
| CD105         | Cluster Differentiation105 (Endoglin)                       |
| CD106         | Cluster Differentiation 106                                 |
| CD11b         | Cluster Differentiation molecule 11B                        |
| CD14          | Cluster Differentiation 14                                  |
| CD166         | Cluster Differentiation 166                                 |
| CD18          | Cluster Differentiation 18                                  |
| CD19          | Cluster Differentiation 19                                  |
| CD29          | Cluster Differentiation 29 (Integrin $\beta$ 1 Chain)       |
| CD31          | Cluster Differentiation 31                                  |
| CD34          | Cluster Differentiation 34                                  |
| CD40          | Cluster Differentiation 40                                  |
| CD44          | Cluster Differentiation 44                                  |
| CD45          | Cluster Differentiation 45                                  |



|                 |  |
|-----------------|--|
| CD56            | Cluster Differentiation 56                                       |
| CD71            | Cluster Differentiation 71 (Transferrin Receptor-1)              |
| CD73            | Cluster Differentiation 73                                       |
| CD79 $\alpha$   | Cluster Differentiation 79 $\alpha$                              |
| CD80            | Cluster Differentiation 80                                       |
| CD86            | Cluster Differentiation 86                                       |
| CD90            | Cluster Differentiation 90 (Thymocyte Differentiation Antigen 1) |
| cDNA            | Complementary DNA  |
| CH              | Cartilagem Hialina   |
| CHAPS           | 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate        |
| c-Kit           | CD117 (Cluster Differentiation 117)                              |
| CNPq            | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico    |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de Carbono   |
| <i>COL10A1</i>  | collagen, type X, alpha 1  |
| <i>COL1A1</i>   | collagen, type I, alpha 1  |
| <i>COL2A1</i>   | collagen, type II, alpha 1                                       |
| Ct              | Cycle threshold  |
| CTRL            | Controle   |
| Cy5             | Cyanine 5  |
| DAPI            | 4',6-diamidino-2-phenylindole                                    |
| DESPAD          | Desvio Padrão  |
| DMEM            | Meio de Eagle Modificado por Dulbecos                            |
| DMEM LG         | Meio de Eagle Modificado por Dulbecos low glucose                |
| DMSO            | Dimetilsulfóxido   |
| EDTA            | Ácido etilenodiaminotetracético                                  |
| <i>FABP4</i>    | fatty acid binding protein 4, adipocyte                          |
| FAPESP          | Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo             |
| FBS             | Soro fetal bovino  |
| FCM             | Faculdade de Ciências Médicas                                    |
| FFT             | Fast Fourier Transform   |
| FITC            | Fluorescein isothiocyanate                                       |
| FSC             | Forward Scatter  |



|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| GAG                             | Glicosaminoglicanos  |
| <i>GAPDH</i>                    | glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase   |
| GLCM                            | Gray Level Co-occurrence Matrix  |
| HC                              | Hospital das Clínicas  |
| HLA                             | Human Leukocyte Antigen  |
| HLA-ABC                         | Human Leukocyte Antigen-ABC  |
| HLA-DR                          | Human Leukocyte Antigen-DR   |
| <i>HPRT1</i>                    | hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1   |
| IBMX                            | 3-isobutil-metilxantina  |
| ICAM-1                          | Intercellular Adhesion Molecule-1  |
| IDM                             | Inverse Different Moment   |
| IgG                             | Imunoglobulina G   |
| INCT                            | Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia   |
| INFABIC                         | Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular |
| ITS-A                           | Insulina-transferrina-selenium-A   |
| KCl                             | Cloreto de Potássio  |
| LFA-1                           | Lymphocyte Function-Associated Antigen 1   |
| LN2                             | Nitrogênio líquido   |
| MACT                            | Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Transplantation                           |
| Me <sub>2</sub> SO <sup>-</sup> | Dimetilsulfóxido   |
| MEC                             | Matriz extra celular   |
| MgCl <sub>2</sub>               | Cloreto de Magnésio  |
| <i>MMP13</i>                    | matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)  |
| MO                              | Medula Óssea   |
| MSC                             | Mesenchymal Stem Cell  |
| NCAM                            | Neural Cell Adhesion Molecule  |
| NDD                             | Detector não descaneado  |
| NIH                             | National Institutes of Health  |
| NM                              | Número de acesso de RNA mensageiro   |
| OA                              | Osteoartrite   |
| OSM                             | Organização Mundial de Saúde   |
| PBS 1X                          | Phosphate buffered saline 1X   |
| PCR                             | Polymerase Chain Reaction  |
| PE                              | Phycoerythrin  |



|                          |   |
|--------------------------|---|
| PECAM                    | Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1       |
| PE-Cy5                   | Phycoerythrin-Cyanine 5                             |
| <i>PPARG</i>             | peroxisome proliferator-activated receptor (PPARG2) |
| RA                       | Razão de Aspecto                                    |
| RNA                      | Ribonucleic acid                                    |
| ROI                      | Region of Interest                                  |
| RT-PCR                   | Real Time Polymerase Chain Reaction                 |
| SCU                      | Sangue de Cordão Umbilical                          |
| SH                       | Domain-containing                                   |
| SHG                      | Geração de Segundo Harmônico                        |
| <i>SOX9</i>              | SRY (sex determining region Y)-box 9                |
| SPIE                     | Society Photo-Optical Instrumentation Engineers     |
| <i>SPP1</i>              | secreted phosphoprotein 1 (OPN)                     |
| SSC                      | Side Scatter  |
| STRO-1                   | Antigen Identified by Simmons and Torok-Storb       |
| TA                       | Tecido Adiposo                                      |
| TGF- $\beta$ 3           | Transforming growth factor- $\beta$ 3               |
| Thy-1                    | THYmocyte differentiation antigen 1                 |
| TS                       | Oligonucleotídeo de substrato                       |
| TSK1                     | Tight skin 1  |
| U2OS                     | Linhagem celular de osteosarcoma humano             |
| UNICAMP                  | Universidade Estadual de Campinas                   |
| VCAM-1                   | Vascular Cell Adhesion Molecule-1                   |
| $\beta$ 2-microglobulina | beta-2-microglobulin                                |



## LISTA DE QUADROS

---

- Quadro 1** Lista de Anticorpos utilizados para a Caracterização das ADSCs por citometria de fluxo. .... 64
- Quadro 2** Meios de diferenciação para as linhagens: adipogênica, condrogênica e osteogênica ..... 66
- Quadro 3** Sequências e concentrações de iniciadores utilizados para a amplificação dos genes estudados por RT-PCR em tempo real ..... 70



## LISTA DE FIGURAS

---

|                  |   |     |
|------------------|---|-----|
| <b>Figura 1</b>  | Cartilagem Hialina .....  | 44  |
| <b>Figura 2</b>  | Esquema micromassa .....  | 67  |
| <b>Figura 3</b>  | Aspectos morfológicos das ADSCs .....   | 79  |
| <b>Figura 4</b>  | Avaliação fenotípica por citometria de fluxo das ADSCs .....  | 80  |
| <b>Figura 5</b>  | Análise citogenética.....   | 81  |
| <b>Figura 6</b>  | Atividade da enzima telomerase .....  | 82  |
| <b>Figura 7</b>  | Diferenciação das ADSCs em linhagens mesodermas .....   | 84  |
| <b>Figura 8</b>  | Diferenciação condrogênica pela técnica de micromassa - microscopia por <i>time lapse</i> e aspectos morfológicos – Estágio inicial ..... | 86  |
| <b>Figura 9</b>  | Diferenciação condrogênica pela técnica de micromassa - microscopia por <i>time lapse</i> e aspectos morfológicos – Estágio final.....    | 87  |
| <b>Figura 10</b> | Expressão de <i>ADIPOQ</i> (adiponectin, C1Q and collagen domain containing).....   | 90  |
| <b>Figura 11</b> | Expressão de <i>FABP4</i> (fatty acid binding protein 4, adipocyte).....  | 92  |
| <b>Figura 12</b> | Expressão de <i>PPARG</i> (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) .....  | 94  |
| <b>Figura 13</b> | Expressão de <i>COL1A1</i> (collagen, type I, alpha 1).....   | 96  |
| <b>Figura 14</b> | Expressão de <i>OC</i> ( <i>BGLAP</i> – bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein) .....  | 98  |
| <b>Figura 15</b> | Expressão de <i>OPN</i> ( <i>SSP1</i> – secreted phosphoprotein) .....  | 99  |
| <b>Figura 16</b> | Expressão de <i>SOX9</i> ( <i>SRY</i> (sex determining region Y)-box 9). .....  | 101 |
| <b>Figura 17</b> | Expressão de <i>AGCAN</i> (aggrecan).....   | 103 |
| <b>Figura 18</b> | Expressão de <i>COL2A1</i> (collagen, type II, alpha 1).....  | 105 |
| <b>Figura 19</b> | Expressão de <i>COL1A1</i> (collagen, type I, alpha 1).....   | 107 |
| <b>Figura 20</b> | Microscopia de Geração de Segundo Harmônico (SHG) .....   | 109 |
| <b>Figura 21</b> | Algoritmo FFT.....  | 111 |
| <b>Figura 22</b> | Análise pelo algoritmo FFT.....   | 113 |
| <b>Figura 23</b> | Análise pelo algoritmo GLCM.....  | 115 |
| <b>Figura 24</b> | Padronização da análise expressão gênica de <i>ADIPOQ</i> em tecido adiposo humano.....   | 157 |
| <b>Figura 25</b> | Padronização da análise expressão gênica de <i>FABP4</i> em tecido adiposo humano.....  | 158 |
| <b>Figura 26</b> | Padronização da análise expressão gênica de <i>PPARG</i> em tecido adiposo humano.....  | 159 |
| <b>Figura 27</b> | Padronização da análise expressão gênica de <i>AGCAN</i> em cartilagem hialina humana .....   | 160 |



|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 28</b> Padronização da análise expressão gênica de <i>COL1A1</i> em cartilagem hialina humana .....                          | 161 |
| <b>Figura 29</b> Padronização da análise expressão gênica de <i>COL2A1</i> em cartilagem hialina humana .....                          | 162 |
| <b>Figura 30</b> Padronização da análise expressão gênica de <i>SOX9</i> em cartilagem hialina humana .....                            | 163 |
| <b>Figura 31</b> Padronização da análise expressão gênica de <i>COL1A1</i> em linhagem U2OS .....                                      | 164 |
| <b>Figura 32</b> Padronização da análise expressão gênica de <i>OC</i> em linhagem U2OS .....  | 165 |
| <b>Figura 33</b> Padronização da análise expressão gênica de <i>OPN</i> em linhagem U2OS. ....   | 166 |
| <b>Figura 34</b> PCR para amplificação de $\beta 2$ -microglobulina – Controle de Qualidade da Extração de RNA e Síntese de cDNA ..... | 167 |



## SUMÁRIO

---

|  |           |
|--|-----------|
| RESUMO .....   | XVII      |
| ABSTRACT .....   | XIX       |
| LISTA DE ABREVIACÕES .....   | 23        |
| LISTA DE QUADROS .....   | 31        |
| LISTA DE FIGURAS.....  | 33        |
| SUMÁRIO .....  | 37        |
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>41</b> |
| <i>Tecido Cartilaginoso .....</i>  | <i>43</i> |
| <i>Lesões cartilaginosas e possibilidades de reparo.....</i>                       | <i>45</i> |
| <i>Células-tronco mesenquimais.....</i>  | <i>47</i> |
| <i>Célula-tronco mesenquimal de tecido adiposo (ADSC) .....</i>                    | <i>49</i> |
| <i>Células-tronco mesenquimais: diferenciação condrogênica tridimensional ....</i> | <i>50</i> |
| <i>Criopreservação .....</i>   | <i>52</i> |
| <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>55</b> |
| <i>Objetivo Geral.....</i>   | <i>57</i> |
| Objetivos Específicos .....  | 57        |
| <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>   | <b>59</b> |
| <i>Obtenção de tecido adiposo .....</i>  | <i>61</i> |
| <i>Separação do tecido adiposo .....</i>   | <i>61</i> |
| <i>Expansão e cultura das ADSCs.....</i>   | <i>62</i> |
| <i>Caracterização das ADSCs .....</i>  | <i>63</i> |
| Avaliação fenotípica por citometria de fluxo .....                                 | 63        |
| Diferenciação para linhagem mesodérmica <i>in vitro</i> .....                      | 64        |
| Diferenciação adipogênica .....  | 64        |
| Diferenciação osteogênica .....  | 65        |
| Diferenciação condrogênica .....   | 65        |
| <i>Diferenciação condrogênica tridimensional .....</i>                             | <i>66</i> |
| <i>Citogenética.....</i>   | <i>67</i> |
| <i>Atividade da enzima telomerase.....</i>   | <i>68</i> |
| <i>Criopreservação e descongelamento celular.....</i>                              | <i>69</i> |
| <i>Análise de expressão gênica.....</i>  | <i>69</i> |
| Escolha dos genes.....   | 69        |
| Extração de RNA .....  | 71        |
| Transcrição de cDNA .....  | 71        |
| PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR) .....                                      | 71        |



|  |            |
|--|------------|
| <i>Microscopia de Geração de Segundo Harmônico (SHG)</i> .....                   | 71         |
| Aquisição de imagens .....   | 71         |
| Quantificação das imagens de SHG.....  | 72         |
| <i>Análise estatística</i> .....   | 73         |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>77</b>  |
| <i>Caracterização das ADSCs</i> .....  | 79         |
| Aspecto Morfológico.....   | 79         |
| Avaliação fenotípica por citometria de fluxo .....                               | 79         |
| <i>Citogenética</i> .....  | 81         |
| <i>Atividade da enzima telomerase</i> .....                                      | 81         |
| <i>Diferenciação das ADSCs em linhagens mesodermis</i> .....                     | 83         |
| <i>Diferenciação condrogênica tridimensional</i> .....                           | 85         |
| <i>Análise da expressão gênica - PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)</i> ... | 88         |
| Diferenciação adipogênica .....  | 88         |
| Diferenciação osteogênica .....  | 95         |
| Diferenciação condrogênica .....   | 100        |
| <i>Geração de Segundo Harmônico</i> .....  | 108        |
| <i>Quantificação das imagens de SHG</i> .....                                    | 110        |
| Análise pelo algoritmo FFT.....  | 110        |
| Análise pelo algoritmo GLCM.....   | 114        |
| <b>DISCUSSÃO</b> .....   | <b>117</b> |
| <b>CONCLUSÃO</b> .....   | <b>129</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | <b>133</b> |
| <b>ANEXOS</b> .....  | <b>143</b> |
| <b>APÊNDICES</b> .....   | <b>151</b> |



## ***Introdução***



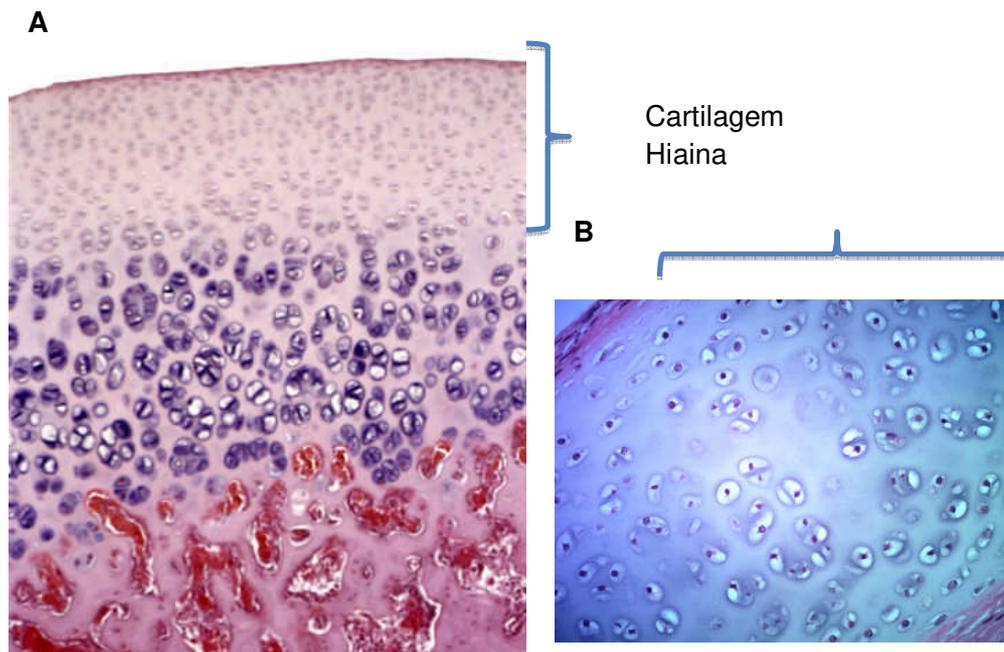


## **Tecido Cartilaginoso**

O tecido cartilaginoso é caracterizado por propriedades viscoelásticas derivadas de uma organização complexa e de interações entre seus constituintes, fornecendo resistência à pressão, e dissipação de energia e atrito. A cartilagem articular é constituída de cartilagem hialina, que recobre as superfícies dos ossos longos e ossos sesamóides.

A cartilagem hialina (CH) é um tecido conectivo composto de um pequeno número de células, os condrócitos, distribuídos em um emaranhado de fibras que estruturam a matriz extracelular (MEC), formada de três principais constituintes: água, fibras de diversos tipos de colágeno e proteoglicanos [1].

O volume de moléculas de água intersticial é proporcional à concentração de íons e demais compostos proteicos, presentes na MEC da CH. Como componente de maior predominância destaca-se o colágeno do tipo II (Collagen alpha-1(II) chain) e, em menor grau, encontram-se dispersas nessa matriz fibras de colágeno dos tipos I, III, V, VI, IX, XI, XII e XV (Collagen alpha-1(I) chain, (III), (V), (VI), IX), (XI), (XII) e (XV)) [2], que juntamente com os proteoglicanos (compostos moleculares de glicosaminoglicanos (GAG) em combinação com ácido hialurônico) e outras proteínas, interagem uns com os outros dando a esse tecido cartilaginoso a característica de um tecido conectivo altamente especializado, forte, de aspecto liso e macio que proporciona movimento suave e sem atrito nas articulações [1, 3, 4], (Figura 1).



**Figura 1. Cartilagem Hialina.** (A) Cartilagem hialina recobrendo tecido ósseo; (B) Cartilagem hialina de traquéia<sup>1</sup>.

Os condrócitos presentes na MEC produzem e mantêm naturalmente o complexo de fibras que compõe a cartilagem articular humana, delimitando uma singular organização estrutural que proporciona atributos físicos específicos, necessários para o cumprimento de suas funções nas articulações sinoviais [5]. Por outro lado, definem a este tecido baixa capacidade de auto renovação celular, dificultando o reparo de ocasionais lesões [2].

<sup>1</sup> Adaptado de <http://www.sciencephotlibrary.com> e <http://morfologia5biomedicinauff.blogspot.com.br>

## **Lesões cartilagosas e possibilidades de reparo**

Trauma, desvios de eixo anatômico, obesidade e degenerações articulares, relacionadas com o envelhecimento podem desencadear uma enorme gama de lesões cartilagosas [6-8], integrantes de um conjunto de doenças reumáticas ou músculo-esqueléticas que compreendem mais de 150 doenças e síndromes (OMS, 2012)<sup>2</sup> geralmente progressivas e associadas à dor.

A osteoartrite (OA) é atualmente considerada uma das condições de maior impacto na sociedade por ser uma doença articular degenerativa que afeta principalmente a cartilagem articular, incluindo joelhos, quadris, dedos e região inferior da coluna [7, 8]. Segundo a Organização Mundial de Saúde a OA é uma das dez doenças mais incapacitantes nos países desenvolvidos. Estima-se que em todo o mundo 9,6% dos homens e 18,0% das mulheres acima de 60 anos têm osteoartrite sintomática, onde 80% das pessoas acometidas apresentam limitações no movimento e 25% não podem realizar suas principais atividades diárias da vida.

A quebra das fibras de colágeno é considerada como sendo um crítico, ou talvez irreversível, passo a caminho do progresso da osteoartrite [2], de tal forma que mesmo as pequenas lesões podem influenciar a estrutura da cartilagem articular [9]. Evolui em quadros clínicos de dores crônicas com diminuição de função e conseqüente diminuição da qualidade de vida do paciente.

Nas últimas décadas a evolução do tratamento de lesões cartilagosas envolveu uma gama de possibilidades distribuídas desde o simples tratamento para o alívio momentâneo das dores crônicas até avançadas técnicas de terapia celular [6].

Em busca desse reparo algumas tentativas foram desenvolvidas ao longo dos anos, como transplante alogênico de cartilagem [10], transplantes autólogos

---

<sup>2</sup> Chronic diseases and health promotion. Chronic rheumatic conditions. Osteoarthritis. Disponível em: <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>

de condrócitos (Autologous chondrocyte implantation – ACI) de primeira geração e suas variáveis [11, 12], mosaicoplastia [13], debridamento [14], condroplastia abrasiva [15], técnica de microfratura [16], entre outras, apresentando taxas de sucesso altamente variáveis [17].

Uma segunda geração de transplantes autólogos de condrócitos (ACI) procurou aprimorar a técnica inicialmente descrita por Brittberg e colaboradores em 1994. O chamado transplante autólogo de condrócitos associados à matriz (MACT - Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Transplantation) consiste em fazer uso de condrócitos isolados por solução de colagenase, expandidas por diversas passagens sem perder o fenótipo condrogênico, e fixados com o auxílio de cola de fibrina [18], posteriormente evoluindo para o uso de membranas de colágeno [19].

Tal técnica é considerada uma razoável alternativa para reparar lesões não degenerativas de cartilagem, principalmente em pacientes que não obtiveram sucesso em outros tratamentos. Porém, envolve custos elevados, possibilidade de aumento da lesão devido à necessidade de retirada de tecido saudável para obtenção de condrócitos, desenvolvimento de fibrocartilagem no local de reparo e hipertrofia de periósteo [4, 6, 20-22].

Em busca de novas opções para superar as desvantagens apresentadas pelas metodologias anteriores, surgiu um inovador estágio nas técnicas da regeneração cartilaginosa, a utilização de moldes de biomateriais (scaffolds), produzidos a partir de compostos existentes na matriz extracelular, como moldes derivados de colágeno tipo I / III (Chondro-Gide™), ácido hialurônico (Hyalograft® C, Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy), gel de colágeno tipo I (CaReS®, Ars Arthro, Krems, Australia), matriz de colágeno (Novocart® 3d, TeTeC, Reutlingen, Germany) entre uma variedade de outros materiais existentes no mercado. Adotados como andaimes, têm sido aplicados largamente em estudos clínicos [6], contudo, muito ainda é necessário descobrir quando se trata dos aspectos morfológicos dos processos regenerativos a partir desses produtos [23].

Na vanguarda das possibilidades de reparo de lesões cartilaginosa uma série de trabalhos têm sido publicados adotando células-tronco, de diversos tipos e tecidos de origem, como uma potencial opção para síntese de matriz cartilaginosa tanto *in vivo* como *in vitro* [6, 24-27].

### **Células-tronco mesenquimais**

Ao longo das últimas décadas, ensaios laboratoriais, estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado o avanço das pesquisas da medicina regenerativa, particularmente com células-tronco, levando pesquisadores a investigar de modo detalhado o uso de células-tronco como alvos promissores para terapia celular, permitindo melhor compreensão desses grupos celulares que apresentam características tão particulares.

Definidas em termos gerais como células dotadas de plena capacidade de auto-geração, capazes de dar origem a mais de 200 tipos celulares, as células-tronco embrionárias estão no topo da hierarquia das linhagens celulares, no entanto sua aplicação clínica envolve considerações éticas e legais.

Células-tronco com base em sua origem podem ser classificadas em embrionárias ou adultas, apresentando graus variados de capacidade de diferenciação [28]. Células-tronco adultas, presentes em órgãos e tecidos diferenciados veem sendo consideradas agentes primordiais no reparo, remodelação e na manutenção da integridade dos tecidos [29].

Em 1970, Friedenstein e colaboradores, estudando estroma medular de cobaias, distinguiram um grupo singular de células aderentes com aspecto fibroblastóide e que sob indução de meio osteogênico foram capazes de se diferenciar em osteócitos [30].

As células referidas como unidades fibroblastóides formadoras de colônias, após duas décadas de estudos, se mostram capazes de diferenciação em vários tecidos mesenquimais, recebendo a denominação Células-Tronco Mesenquimais (MSC - Mesenchymal Stem Cells) [31, 32].

Diante da necessidade de uniformizar a nomenclatura e definição das MSC o Comitê de Células-tronco Teciduais e Mesenquimais da Sociedade Internacional de Terapia Celular (Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of The International Society for Cellular Therapy) estipulou um conjunto mínimo de quatro critérios considerados essenciais, como serem plástico-aderentes em condições padronizadas de cultura celular, ter a capacidade de se diferenciar em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica, expressarem os marcadores moleculares CD73, CD90 e CD105 e não expressarem marcadores de linhagem hematopoética c-kit, CD-14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 $\alpha$  e antígeno humano leucocitário (HLA)-DR [33].

Outros estudos apontam para uma variedade fenotípica desse grupo de células multipotentes, com expressão de outros marcadores de superfície além dos descritos acima, como CD44, CD71 e STRO-1, inclusive, moléculas de adesão como CD106 (VCAM-1), CD166 (aICAM-1), ICAM-1 e CD29. No entanto, é característico deste grupo celular não apresentar marcadores de superfície hematopoéticos, tais como os já descritos, inclusive os marcadores para moléculas co-estimulatórias, CD80, CD86 ou CD40, tanto quanto para os de moléculas de adesão CD31 (PECAM-1), CD18 (LFA-1) ou CD56 (NCAM) [34].

As últimas duas décadas mostraram-se ricas em estudos que apontam a existência de células-tronco mesenquimais presentes em uma variedade de tecidos adultos [35], entre eles tecido músculo esquelético [36], tecido ósseo [37], tecido vascular [38], cartilagem [39], tendão [40], tecido pulmonar, baço [41], tecido cardíaco [42], derme [43], tecido hepático [44], líquido amniótico [45], cordão umbilical [46], sangue de cordão umbilical [47], polpa dentária [48] e tecido adiposo [26, 49].

Esse peculiar conjunto de células inicialmente apontadas como um grupo de células-tronco adultas, consideradas comprometidas com os tecidos das quais se originavam, após estudos aprofundados superaram as expectativas quanto a seu potencial de diferenciação [50], ocupando o posto do mais promissor grupo de células-tronco adultas frente sua flexibilidade em aplicações clínicas [51, 52].

Ainda a seu favor, as MSC apresentam um baixo potencial imunogênico além de propriedades imunomodulatórias, anti-inflamatórias, angiogênicas e antiapoptóticas fazendo dessa categoria de células-tronco adultas o grupo mais atrativo para aplicabilidade em terapia e transplante celular [48, 53-59].

### **Célula-tronco mesenquimal de tecido adiposo (ADSC)**

Dentre as fontes de origem de MSCs a medula óssea (MO) é considerada a principal fonte e adotada como referência, as MSC podem ser obtidas também de sangue de cordão umbilical e de tecido adiposo [60]. A imaturidade da linhagem linfóide do SCU permite sua utilização em transplantes sem a total compatibilidade ao sistema de histocompatibilidade (HLA) e o advento dos bancos públicos de SCU facilitam sua utilização como fonte das MSC nos estudos de diferenciação. Porém, a lipoaspiração, procedimento realizado em grande escala na medicina estética, permite a obtenção autóloga destas células. Em se tratando da obtenção das MSCs o tecido adiposo apresenta-se como uma fonte generosa, podendo-se obter cerca de 100.000 células-tronco mesenquimais por grama de material lipoaspirado [49].

As MSCs apresentam como característica fundamental ampla plasticidade celular [50]. Em estudo para comprovar a pluripotência das células-tronco mesenquimais obtidas a partir de tecido adiposo (ADSC – Adipose Tissue-Derived Stromal Cell) ZUK e colaboradores [61] obtiveram, através de meios de cultura suplementados com os respectivos fatores de crescimento, adipócitos,

condrócitos, osteócitos e células musculares, e conseguiram também observar marcadores de superfície de célula neuronal madura em cultura com fatores neurogênicos [26, 61]. Tais estudos apontam o tecido adiposo como uma fonte ideal para obtenção de MSCs em grandes quantidades, além de indicar as ADSCs como alvos promissores para desenvolvimento de futuros estudos de terapia celular.

Com a identificação da plasticidade apresentada pelas células-tronco mesenquimais há alguns anos, um grande número de publicações tem apontado para o reparo tecidual através de transplante de MSC como um futuro bem próximo [51].

Considerando a plasticidade celular e sua capacidade de interagir com o microambiente na qual são inseridas, é possível aferir que as células-tronco mesenquimais desempenham um papel fundamental no processo natural de renovação e manutenção celular em organismos adultos. Apresentam também efeitos imunorregulatórios em inúmeros ensaios clínicos [55, 56, 62], isso as torna alvos atrativos de um número cada dia maior de estudos na busca de um futuro próximo, de possíveis abordagens terapêuticas.

### **Células-tronco mesenquimais: diferenciação condrogênica tridimensional**

A autoregeneração do tecido cartilaginoso é pouco provável, uma vez que ausência de vascularização contribui na limitação dos processos naturais de reparo possíveis na maioria os tecidos [3]. Assim sendo, a busca por terapias celulares para o tratamento de lesões cartilaginosas é o objetivo de muitos pesquisadores.

Um padrão-ouro de regeneração da cartilagem, no entanto, ainda não foi encontrado [6], havendo estudos utilizando MSCs em lesões apontando para a contribuição na migração, proliferação, diferenciação e síntese da matriz extra

celular [63], porém dando origem a um tecido cartilaginoso fibroso, rígido e com baixa resistência [64].

A organização tridimensional das fibras de colágeno existentes na matriz extra celular do tecido cartilaginoso é apontado com sendo um fator decisivo na determinação das qualidades físico-mecânicas apresentadas pelos diversos tipos de cartilagem existentes no organismo [65]. Deste modo estudos que visam o reparo de lesões cartilaginosas necessitam levar em consideração a efetividade e eficácia do processo de remodelamento tecidual [66].

A utilização de técnicas tridimensionais vem sendo apontadas como um conveniente sistema no estudo da diferenciação condrogênica, representando uma boa oportunidade de promover e estudar o efeito do contato célula-célula que não é possibilitado em estudo de cultura em monocamada (*monolayer*) [66], uma vez que a condensação celular promove um processo de diferenciação condrogênica *in vitro* mais próximo do que ocorre *in vivo*, pois as células nestas condições buscam um rearranjo espacial mais natural resultando na formação de uma matriz cartilaginosa mais eficiente [67, 68].

Métodos não invasivos de caracterização em 3D da distribuição das fibras de colágeno são ferramentas essenciais no estudo da qualidade da matriz extracelular produzida por técnicas de diferenciação condrogênica tridimensional. Com base em tais necessidades a microscopia de Geração de Segundo Harmônico (SHG), se enquadra como um método de quantificação do direcionamento tridimensional da biologia estrutural do tecido cartilaginoso.

A microscopia de SHG é um sistema ótico não linear resultante da excitação de fótons de laser, que não são absorvidos, mas sim, se espalham por estruturas moleculares específicas [69, 70]. O colágeno é considerado um modelo biológico gerador de SHG, devido a sua arquitetura ser derivada de um arranjo de moléculas quirais, ausentes de simetria de inversão. Tais moléculas, que são constituídas por tripas hélices que se alinham umas com as outras, além de preencher os requisitos para o potencial SHG, por constituição tridimensional potencializam seu sinal [71].

## **Criopreservação**

O processo de criopreservação, descoberto em 1948 por Polge e colaboradores, adotando o uso de glicerol no congelamento de espermatozoides a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  [72], ao longo dos anos foi aprimorado com a utilização de nitrogênio líquido ( $\text{LN}_2$ ). A evolução do processo de criopreservação de células e tecidos pode ser dividido em criopreservação lenta, que consiste no declínio gradual da temperatura até  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  seguido de armazenamento em  $\text{LN}_2$ . Uma segunda metodologia chamada vitrificação, na qual células ou tecidos são imerso diretamente em  $\text{LN}_2$  a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , técnica essa em que o material é convertido em massa sólida amorfa, se formação de gelo [73, 74].

Procurando atender o grande aporte de células necessárias para realização de estudos que envolvam terapia celular, a prática de criopreservação, que consiste em manter vivos e estruturalmente intactos células e tecidos sob baixas temperaturas, vem sendo cada vez mais a opção de muitos trabalhos [75-80].

A criopreservação, considerada importante por permitir a obtenção de células em momentos variáveis por longos períodos e proporcionar proteção contra contaminação por fungos e bactérias, envelhecimento e aparecimento de danos genéticos inerentes ao processo de multiplicação celular [81], por outro lado envolve uma série de riscos à integridade do material a ser criopreservado [82].

O congelamento de água intracelular considerado letal ao formar cristais, comprometendo a integridade da membrana celular, alterando a fase líquida e a concentração natural de solutos intracelulares [82-84], pode ter seus efeitos deletérios contornados com a utilização de um agente crioprotetor [73]. Para que haja uma razão de criopreservação eficiente é necessária a utilização de crioprotetores em concentrações ideais, uma vez que estes agentes são

considerados tóxicos quando em altas concentrações e a temperaturas acima do 4 °C.

A escolha do composto dimetilsulfóxido ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ) (DMSO), como agente crioprotetor, é considerada usual na criopreservação de MSCs obtidas de medula óssea e sangue de cordão umbilical [85-87]. Porém, mesmo sendo considerado o mais comum dentre os crioprotetores [88], o DMSO pode ser considerado tóxico, comprometendo as características funcionais de células-tronco, podendo desempenhar papel de indutor de diferenciação, e interferir na aplicabilidade clínica em pacientes [78, 79, 89].

Este projeto teve como objetivo avaliar se o processo de criopreservação com uso de DMSO, pode interferir na capacidade das ADSCs em se diferenciarem em linhagens mesodermais, bem como se ocorreram alterações no arranjo tridimensional do arcabouço de fibras de colágeno produzidas durante o processo de diferenciação condrogênica pela técnica tridimensional de micromassa.



## ***Objetivos***





## **Objetivo Geral**

Analisar o impacto da criopreservação com dimetilsulfóxido ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ) (DMSO) em células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo (ADSC).

## **Objetivos Específicos**

1. Avaliar se o processo de criopreservação interfere na caracterização das ADSCs, sob os aspectos morfológicos, fenotípicos e na capacidade de diferenciação em linhagens mesodermas.
2. Avaliar o perfil de expressão gênica das ADSCs diferenciadas em linhagens mesodermas antes e após o processo de criopreservação.
3. Avaliar através de microscopia de geração de segundo harmônico as fibras de colágeno de ADSCs diferenciadas para linhagem condrogênica a partir da técnica de micromassa.



## ***Materiais e Métodos***





## **Obtenção de tecido adiposo**

As células-tronco mesenquimais adotadas como casuística de estudo foram obtidas de tecido adiposo humano e com o objetivo de padronização de nomenclatura no presente projeto, serão referenciadas como células-tronco de tecido adiposo - ADSC (Adipose Tissue-Derived Stromal Cell).

A presente dissertação decorreu durante o período de agosto/2009 a julho de 2012 com um período de trancamento de matrícula de 6 meses.

O tecido adiposo foi obtido de 12 pacientes submetidos à cirurgia de lipoaspiração sob anestesia geral no centro cirúrgico do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas – São Paulo, Brasil. Os procedimentos foram avaliados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp e aprovados pelo parecer N° 997/2008 e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi aplicado a todos os pacientes submetidos à lipoaspiração que tenham concordado com a doação. Como critérios de inclusão foram selecionados pacientes com idade entre 25 e 50 anos e excluídos pacientes diabéticos e hipertensos.

O material coletado em centro cirúrgico estéril foi devidamente condicionado em tubos cônicos estéreis contendo 20ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) Low Glucose (Bio-fluid, Rockville, MD - USA). Transportados em suporte vertical dentro de caixas térmica para transporte, devidamente fechada, sendo aberto somente em ambiente controlado (sala de cultura celular).

## **Separação do tecido adiposo**

O tecido lipoaspirado foi lavado exaustivamente com tampão PBS 1X (phosphate-buffered saline) em tubo cônico de 50 ml (Sarstedt, Inc, Newton - NC – USA) para remover através de tecido conjuntivo e hemácias. Para cada 10 g de

tecido, a proporção das substâncias para o tampão de digestão, que foi adicionado a seguir consiste em 20mg de colagenase tipo 1 (Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island - New York – USA), 200 mg de albumina sérica bovina (BSA) (UBS Corporation, Cleveland - OH - USA), 20ml de DMEM Low Glucose e 10 µl de gentamicina (Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island - New York – USA). A mistura foi tratada em banho-maria à 37 °C por 30 min, agitando o recipiente a cada 5 min. Após a digestão completa do tecido, a reação foi interrompida com 10 ml de soro fetal bovino (FBS) (VitroCell Embriolife, Campinas – SP - Brasil). A seguir, foi centrifugada por 15 min a 1500 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Eppendorf AG, 22331 Hamburg – Germany). O sobrenadante foi desprezado e o botão celular, rico em ADSCs, foi ressuspenso em 10 ml de DMEM Low Glucose com 10% do volume de FBS, semeado em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Inc, Newton - NC – USA) e acondicionados em incubadora a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>.

### **Expansão e cultura das ADSCs**

Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por 3 dias consecutivos e depois a cada 2 dias até que as células aderidas ao plástico atingissem a confluência de 70 a 80% da superfície da garrafa de cultura. As células foram retiradas da garrafa por adição de uma solução de tripsina a 0,05% (Gibco BRL, Grand Island – NY - USA) e 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Merck, Darmstadt, Germany) e expandidas até a 4<sup>a</sup> passagem da cultura.

## **Caracterização das ADSCs**

### **Avaliação fenotípica por citometria de fluxo**

Após a purificação e expansão celular, as ADSCs foram caracterizadas fenotipicamente por meio de citometria de fluxo empregando um conjunto de anticorpos monoclonais específicos (BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ USA). Foram utilizados os anticorpos CD90 (Thy-1), CD105 (SH-2/endogлина), CD73 (SH3/SH4) e CD29 que correspondem aos antígenos de superfície expressos pelas ADSCs, além de HLA-ABC, e os não expressos, como CD34, CD45 e HLA-DR também foram utilizados, ver Quadro 1.

Foram utilizadas  $1 \times 10^5$  células diluídas em 100  $\mu$ l de PBS e 5  $\mu$ l de anticorpo específico em cada reação de marcação. Esta mistura foi mantida a 4 °C por 30 min e protegida da luz. As células marcadas foram lavadas duas vezes com PBS por meio de centrifugação a 1500 rpm por 5 min e fixadas em 500  $\mu$ l de paraformaldeído 1% (Sigma-Aldrich Co, St. Louis - MO - USA). Foram mantidas em geladeira até o momento da aquisição.

Os controles foram realizados a partir de amostras de células sem marcação para verificação de auto-fluorescência e células marcadas com isotipos controles correspondentes para verificação de marcação inespecífica. Foram adquiridos 10.000 eventos no citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ USA) e a análise dos dados foi realizada utilizando o programa CellQuest™ (BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes - NJ - USA).

**Quadro 1.** Lista de Anticorpos utilizados para a Caracterização das ADSCs por citometria de fluxo.

| AMOSTRAS        | FITROS         |              |             |
|-----------------|----------------|--------------|-------------|
|                 | FLH-1          | FLH-2        | FLH-3       |
| <b>Controle</b> | IgG-FITC       | IgG-PE       | IgG-PE-Cy5  |
| <b>1</b>        | CD45-FITC      | HLA ABC - PE | CD90-PE-Cy5 |
| <b>2</b>        | HLA DR FITC    | CD34-PE      |             |
| <b>3</b>        | CD29-FITC      | CD105-PE     |             |
| <b>5</b>        | CD73+Alexa 488 |              |             |

### **Diferenciação para linhagem mesodérmica *in vitro***

Para comprovar obtenção de ADSCs, as células obtidas pelos procedimentos acima foram diferenciadas em tecido ósseo, adiposo e cartilaginoso, utilizando protocolos e meios específicos, baseados ao descrito em literatura [90] (Quadro 2). As amostras de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica tiveram pontos de coleta nos dias 7, 14 e 21 de culturas para extração de RNA total e análise de expressão de genes específicos. Ao término as amostras diferenciadas e os controles foram submetidos a colorações específicas e registrados sob microscopia ótica pelo equipamento Olympus IX81 com as lentes objetivas 4x, 10x e 20x, usando a câmera digital DP 72 3.0, acoplada ao microscópio (Olympus Biosystems GMBH, D-82152 Planegg – Germany). As imagens foram processadas e analisadas usando Cell<sup>F</sup> 3.3 software (Olympus Biosystems GMBH, D-82152 Planegg – Germany).

### **Diferenciação adipogênica**

Para a diferenciação em adipócitos, cerca de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> na 4<sup>a</sup> passagem de expansão, foram colocadas em placas de cultura contendo meio indutor constituído de meio DMEM baixa glicose suplementado com 10% de FBS,

suplementado com 1 mM de dexametasona (CNbiosciences, INC, La Jolla – CA – USA), 10 mg/ml de insulina, 0,45 mM de 3-isobutil-metilxantina (IBMX) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis - MO - USA) e 100 mM de indometacina (Sigma-Aldrich Co, St. Louis - MO - USA). A suplementação feita a cada três dias, com tempo necessário para a diferenciação adipogênica de 14 dias, ficando em cultura até o 21º dia. Foi realizada coloração de Oil-Red (Sigma-Aldrich Co, St. Louis - MO - USA) e contra-corado com solução de hematoxilina (Sigma-Aldrich Co, St. Louis - MO - USA) e observada sob microscopia ótica.

### **Diferenciação osteogênica**

Para a diferenciação em osteócitos, cerca de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> na 4ª passagem de expansão, foram colocadas em placas de cultura contendo meio indutor constituído de meio DMEM baixa glicose suplementado com 10% de FBS, suplementado com 0,1 mM de dexametasona, 200 mM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO - USA) e 10mM de β-glicerolfosfato (ICN Biomedical, Aurora - OH - USA). A suplementação feita a cada três dias, com tempo necessário para a diferenciação osteogênica de 21 dias. Foi realizada a coloração de Alizarina Red S (Sigma-Aldrich Co, St. Louis - MO - USA) e observada sob microscopia ótica.

### **Diferenciação condrogênica**

O meio indutor da diferenciação condrogênica consiste em meio DMEM baixa glicose sem FBS, suplementado com 100 ng/ml de transforming growth factor-β3 (TGF-β3) (Peprotech, Rocky Hill – NJ - USA), 0,4mM de l-prolina (Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island - New York - USA), 1mM de dexametasona, 50nM de ácido ascórbico, 0,5X insulina-transferrina-selenium A (ITS-A) (Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island - New York - USA) e 0,2% de albumina

humana. A cada três dias metade do meio de cultivo foi trocado. O tempo necessário para a diferenciação condrogênica leva 21 dias.

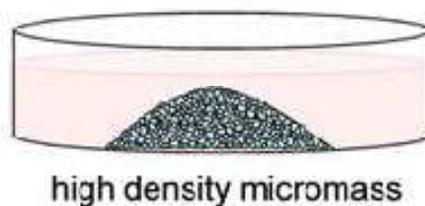
**Quadro 2.** Meios de diferenciação para as linhagens: adipogênica, condrogênica e osteogênica.

| <b>Diferenciação</b> | <b>Meio</b>                    | <b>Suplementos</b>  | <b>Período</b> |
|----------------------|--------------------------------|---|----------------|
| <b>Adipogênese</b>   | DMEM<br>High glucose<br>10%FSB | Dexametasona – $1 \times 10^{-6}$ M<br>3-isobutil- metilxantina – $4,5 \times 10^{-4}$ mM<br>Insulina – 10mg/ml<br>Indometacina – $3 \times 10^{-4}$ mM           | 14 a 21 dias   |
| <b>Osteogênese</b>   | DMEM<br>Low glucose<br>10%FSB  | Dexametasona – $1 \times 10^{-6}$ M<br>Ácido Ascórbico – $2,0 \times 10^{-4}$ M<br>$\beta$ -glicerol-fosfato – $10^{-2}$ M  | 21 dias        |
| <b>Condrogênese</b>  | DMEM<br>Low glucose            | Ácido Ascórbico – 50 nM<br>TGF- $\beta$ 3 – 100 ng/ml<br>Dexametasona – 1mM<br>Albumina Humana – 2%<br>L-prolina 0,4mM<br>Insulina-transferrina-selenium A - 0,5X | 21 dias        |

### **Diferenciação condrogênica tridimensional**

Para a diferenciação condrogênica foi adotado o sistema de micromassa descrito por Zhang e colaboradores [91]. A primeira parte (Etapa A) consistiu em

separar cerca de  $2,5 \times 10^5$  células mesenquimais, na 4ª passagem de expansão, que foram ressuspensas em 12,5  $\mu\text{L}$  de meio indutor condrogênico e pingadas em 1 poço de placa de 24 poços (Corning Inc., Corning – NY - USA) e mantidas em incubadora de  $\text{CO}_2$  por 2 horas para adesão na placa e adesão celular (Figura 2). Na segunda parte (Etapa B), 500  $\mu\text{L}$  de meio indutor foram adicionados cuidadosamente e mantidas em incubadora de  $\text{CO}_2$  por cerca de 12-18 horas (overnight) para permitir a formação da micromassa celular.



**Figura 2. Esquema micromassa.** Representação esquemática do sistema de micromassa de alta densidade celular [66, 91].

Para verificar o processo de formação da micromassa foi utilizado sistema de *time lapse*, no qual as células em cultura são acondicionadas em uma incubadora de  $\text{CO}_2$  acoplada ao equipamento Olympus IX81, usando a câmera digital DP 72 3.0. As células foram então fotografadas a cada 30 segundos pelo período definido nas etapas A e B. As imagens foram processadas e analisadas usando Cell<sup>F</sup> 3.3 software (Olympus Biosystems GMBH, D-82152 Planegg – Germany).

## Citogenética

A obtenção das metáfases cromossômicas foi obtida através de células em ativo processo de divisão celular, em culturas de ADSCs, as quais em cerca de

70% a 80% confluentes. Tratadas com colchicina (10 µg/mL) em concentração de 100 µL/mL, adicionado diretamente à cultura e incubadas overnight a 37 °C. As células foram removidas da placa com uso de solução de tripsina/EDTA por 3 min a 37 °C, lavado com tampão PBS 1X, coletado em tubos cônicos de 15mL e agrupadas por centrifugação a 1200 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o botão celular ressuspenso em 5 mL de solução de KCl 0,075 mol/L a 37 °C por 12 min. As células foram fixadas com em solução de ácido metanol/ácido acético (3:1) e analisadas pela técnica de bandeamento G [92, 93].

As lâminas foram analisadas sob um microscópio ótico em objetivas de 10x e 100x. Imagens das metáfases individuais foram capturadas e cariotipadas utilizando um sistema automatizado de imagem de citogenética ASI (Applied Spectraltral Imaging, Printed - Israel), através do Software BAND VIEW<sup>®</sup> 5.5.

### **Atividade da enzima telomerase**

A verificação da atividade da enzima telomerase foi realizada com células em 3 passagens distintas, 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup>. A metodologia adotada seguiu protocolo do kit TRAPeze<sup>®</sup> Telomerase Detection Kit, S7700 (Chemicon International, USA). O procedimento consiste em dois sistemas enzimáticos utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). Na primeira etapa da reação, a telomerase adiciona um número de repetições teloméricas (GGTTAG) para a 3' final de um oligonucleotídeo de substrato (TS). Na segunda etapa, o material é amplificado por PCR usando o TS e (*primer* reverso) RP, gerando uma escada de produtos com base de 6 incrementos a partir de 50 nucleotídeos: 50, 56, 62, 68, etc. Utiliza-se um modelo (TSK1) para amplificação de um padrão interno de 36 pb positivo, o que torna possível quantificar atividade da telomerase com mais precisão e identificar amostras falso-negativos que contêm inibidores de Taq polimerase.

## **Criopreservação e descongelamento celular**

O processo de criopreservação e descongelamento das ADSCs baseou-se em protocolo previamente descrito por Ock e Rho [88], no qual as células foram retiradas da garrafa por adição de uma solução de tripsina a 0,05% e 1mM de EDTA, lavadas com solução de PBS 1X, ajustadas na densidade de  $2 \times 10^6$  células/mL em 1000  $\mu$ L de solução de FBS e 10% de dimetilsulfóxido ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ) (Baxter, Bioniche Teoranta Co, Galway – Ireland) e transferido para crio-tubos de 1,8 mL (Sarstedt, Inc, Newton - NC – USA), acondicionados em caçapa de criopreservação (Nalgene™ Cryo 1 °C freezing container) com isopropanol (Merck, Darmstadt, Germany) e levados imediatamente ao freezer -80 °C por aproximadamente 12-18 horas (*overnight*). Após o período de queda de temperatura gradativa as amostras, já congelada foram transferidas rapidamente para o nitrogênio líquido ( $\text{LN}_2$ ) onde permaneceram a cerca de -196 °C até o momento de descongelamento.

As ADSCs criopreservadas foram descongeladas, por imersão em banho-maria 37 °C por 1 min, lavadas duas vezes em DMEM suplementado com 10% FBS e centrifugadas a 300 g. Foram ressuspensas com mesmo meio de cultura e semeadas em placas de 25  $\text{cm}^2$ , mantidas em incubadora a 37 °C e 5%  $\text{CO}_2$  por 24 horas onde o meio de cultura foi substituído com a finalidade de remoção das células não aderidas.

## **Análise de expressão gênica**

### **Escolha dos genes**

O processo de padronização da técnica de PCR em tempo Real (RT-PCR) está devidamente detalhado no Apêndice – 1. Os genes selecionados para a

diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica estão descritos abaixo no Quadro 3.

**Quadro 3.** Sequências e concentrações de iniciadores utilizados para a amplificação dos genes estudados por RT-PCR em tempo real.

| LINHAGEM     | GENE              | SEQUÊNCIA INICIADORA   | NÚMERO DE ACESSO | Concentração Utilizada |
|--------------|-------------------|--|------------------|------------------------|
| Adipogênica  | <i>ADIPOQ</i>     | F 5' - TCT CTT TCC CAC CTC ACC TGA - 3'<br>R 5' - CAC GAC GTC ATC ATA GAA CCA CTT - 3' | NM_004797        | 300 nM                 |
|              | <i>FABP4</i>      | F 5' - TAG ATG GGG GTG TCC TGG TA - 3'<br>R 5' - GTG GAA GTG ACG CCT TTC AT - 3'       | NM_001442        | 300 nM                 |
|              | <i>PPARG</i>      | F 5' - TCA GGT TTG GGC GGA TGC - 3'<br>R 5' - TCA GCG GGA AGG ACT TTA TGT ATG - 3'     | NM_005037        | 300 nM                 |
| Condrogênica | <i>AGCAN</i>      | F 5' - TCG AGG ACA GCG AGG CC - 3'<br>R 5' - TCG AGG GTG TAG CGT CTA GAG A - 3'        | NM_001135        | 150 nM                 |
|              | <i>COL1A1</i>     | F 5' - GAG AGC ATG ACC GAT GG - 3'<br>R 5' - GTG ACG CTG TAG GTG AA - 3'               | NM_000088        | 150 nM                 |
|              | <i>COL2A1</i>     | F 5' - GGC AAT AGC TTC ACG TAC A - 3'<br>R 5' - CGA TAA CAG TCT TGC CCC ACT - 3'       | NM_001844        | 150 nM                 |
|              | <i>SOX9</i>       | F 5' - AGC GAA CGC ACA TCA AGA C - 3'<br>R 5' - GCT GTA GTG TGG GAG GTT GAA - 3'       | NM_000346        | 150 nM                 |
| Osteogênica  | <i>COL1A1</i>     | F 5' - GAG AGC ATG ACC GAT GG - 3'<br>R 5' - GTG ACG CTG TAG GTG AA - 3'               | NM_000088        | 150 nM                 |
|              | <i>OC (BGLAP)</i> | F 5' - GAA GCC CAG CGG TGC A - 3'<br>R 5' - CAC TAC CTC GCT GCCCTC C - 3'              | NM_199173        | 300 nM                 |
|              | <i>OPN (SSP1)</i> | F 5' - TCT CCT AGC CCC ACA GAA TG - 3'<br>R 5' - GAGTCA ATG GAG TCC TGG CT - 3'        | NM_000582        | 300 nM                 |
| Endógenos    | <i>ACTB</i>       | F 5' - CAT CGA GCA CGG CAT CGT CA - 3'<br>R 5' - TAG CAC AGC CTG GAT AGC AAC - 3'      | NM_001101        | 150 nM                 |
|              | <i>HPRT1</i>      | F 5' - GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTG A - 3'<br>R 5' - TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT - 3'   | NM_0000194       | 150 nM                 |
|              | <i>GAPDH</i>      | F 5' - ACC CAC TCC TCC ACC TTT GA - 3'<br>R 5' - CTG TTG CTG TAG CCA AAT TCG T - 3'    | NM_002046        | 150 nM                 |

### **Extração de RNA**

Devido ao pequeno volume celular, o RNA foi extraído pelo Mini RNA Isolation Kit da GE Healthcare™ (GE Healthcare UK limited, Buckinghamshire – UK). Utilizando Nano Drop Spectrophotometer (ND-1000®).

### **Transcrição de cDNA**

O RNA extraído foi submetido à reação de transcrição reversa utilizando o kit 100 U RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, Life Sciences, Thermo Fisher Scientific Inc.) obtendo os cDNAs. Realizou-se quantificação do cDNA obtido.

### **PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)**

Após a padronização, definiu-se a utilização de 10 ng de cDNA por amostra para realização da reação de RT-PCR (StepOnePlus™ Real-Time PCR - Applied Biosystems) com SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) normalizando a expressão a partir dos controles endógenos *ACTB* (actin, beta), *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) e *GAPDH* (glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase).

### **Microscopia de Geração de Segundo Harmônico (SHG)**

#### **Aquisição de imagens**

Agregação, orientação e intensidade das fibras de colágeno presentes na micromassa foram examinadas usando Geração de Segundo Harmônico (SHG). As imagens foram adquiridas em colaboração com Instituto Nacional de Ciência e

Tecnologia em Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, utilizando um microscópio confocal LSM 780-NLO Zeiss no microscópio Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss AG - Germany), usando objetiva em óleo de imersão EC Plan-Neofluar 40x/1.30. Os dois fótons de excitação do SHG foram excitados com um Ti: Sapphire Mai Tai HP Spectra-Physics (Irvine - USA) que proveu 100 fs pulsos de 690 a 1040 nm com razão de repetição de 80 MHz e força de 1 a 3,5 W. Foi equipado com grupo DeepSee para compensação da velocidade de dispersão, e a velocidade do modulador acústico-ótico (AOM) regulada por alternância ON/OFF do laser.

Todos os sinais, transmitido e refletido de SHG foram detectados simultaneamente por detector não descaneado (NDD). Os SHGs foram coletados usando filtros 490 LP dioico e 485 SP. Foi decidido que todas as imagens seriam adquiridas com 940 nm de excitação, gerando um SHG de 470 nm. O formato da imagem de 1024x1024, usando utilizando um pixel dwell time de 5 ms, com um tempo médio de escaneamento de 1 min. O Z-stacks foram adquiridos em um intervalo de 40  $\mu\text{M}$ , com 1  $\mu\text{M}$  por imagem gerando 40 imagens. A profundidade escolhida para a análise foi de 12  $\mu\text{M}$ .

O INFABIC é co-financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo: 08/57906-3) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo: 573913/2008-0).

### **Quantificação das imagens de SHG**

Nesta etapa imagens não lineares foram utilizadas para as análises quantitativas e qualitativas. Identificadas pelo sinal de SGH, as fibras de colágeno presentes nas micromassas foram quantificadas quanto orientação e estrutura utilizando dois diferentes métodos de análise de imagens: Transformada de Fourier Rápida (Fast Fourier Transform – FFT) algoritmo muito adotado para o processamento digital de sinais e o algoritmo Matrix de Co-ocorrência de Níveis de

Cinza (Gray Level Co-occurrence Matrix – GLCM), ambos realizados em módulos do software ImageJ v1.38 do National Institutes of Health (NIH)<sup>3</sup>.

Primeiro, a orientação dos agrupamentos de fibras de colágeno foram analisadas no domínio Fourier, por análise da razão de aspecto (RA) da intensidade de distribuição bidimensional de FFT da imagem. Tal método permite a caracterização das imagens de SHG da micromassa baseada em sua anisotropia, ou seja, diferença de valores em obtidos com base na direção em que a análise é feita com relação ao alinhamento das fibras dos feixes de colágeno.

O segundo método é baseado no cálculo da Matriz de Co-ocorrência de Níveis de Cinza (GLCM) da imagem. Com este método somos capazes de caracterizar a homogeneidade (Inverse Different Moment – IDM), uniformidade (Angular Second Moment – ASM), entropia (complexidade) e contraste da arquitetura das redes de fibras de colágeno dos condrócitos gerados a partir da diferenciação condrogênica das ADCSs. Com o algoritmo GLCM foram calculadas as variáveis para textura nas quatro orientações (0°, 90°, 180° e 270°) e em três distâncias entre pixels (d=1, 5 e 10 pixels) (Apêndice – 3). Os procedimentos de cálculo destas variáveis podem ser encontrados em maior riqueza de detalhes na literatura [94].

## **Análise estatística**

Devido o número de amostras criopreservadas e levando em consideração que os resultados gerados por RT-PCR foram concebidos de amostras dispostas de modo pareado, inclusive nos controles das diferenciações condrogênicas e osteogênicas, os dados de expressão gênica foram analisados estatisticamente pelo teste Wilcoxon pareado. Sendo adotado o teste de Mann-Whitney não

---

<sup>3</sup> National Institutes of Health (NIH), disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>

pareado somente para as amostras de diferenciação adipogênica, quando comparadas com os controles de células de tecido adiposo.

Os dados gerando nas análises da anisotropia pelo algoritmo FFT e de textura pelo algoritmo GLCM nas amostras de diferenciação condrogênica por micromassa foram avaliados estatisticamente pelo teste t pareado comparando os dois grupos, fresco x criopreservado.

As análises estatísticas descritas foram obtidas através do software GraphPad Prism<sup>®</sup>, Prism 5 para plataforma Microsoft Windows<sup>®</sup>, version 5.00, empregando o nível de significância de  $p < 0,05$ . Os valores estatísticos foram expressos em gráficos de dispersão, com as representações das respectivas médias  $\pm$  desvio padrão.





## ***Resultados***

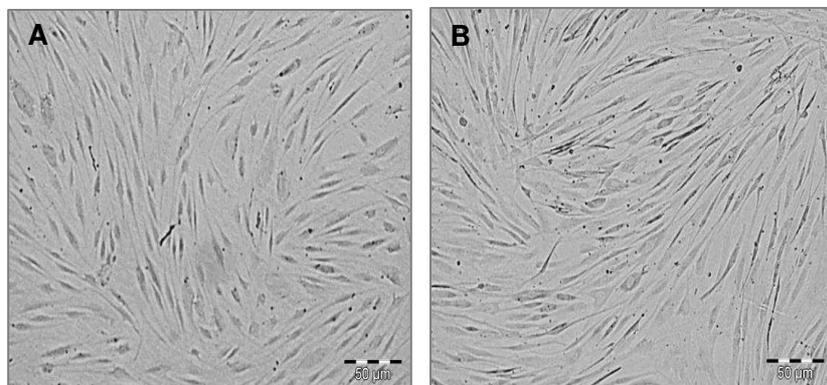




## Caracterização das ADSCs

### Aspecto Morfológico

As células aderentes obtidas de tecido adiposo antes e após o processo de criopreservação apresentaram morfologia semelhante a fibroblastos, compatível com células mesenquimais (Figura 3 A e B), o que indica que o processo de criopreservação não afetou suas características morfológicas destas células quando indiferenciadas.

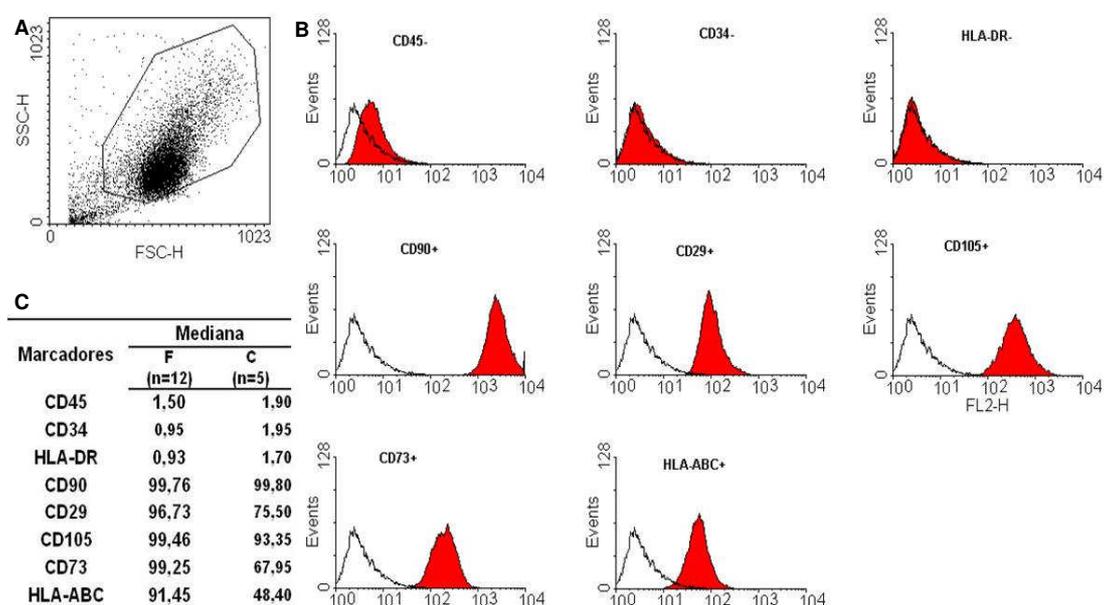


**Figura 3. Aspectos morfológicos das ADSCs.** (A) e (B) células aderentes obtidas de tecido adiposo na quarta passagem de expansão, apresentando a morfologia fibroblastóide esperada, ADSCs frescas e criopreservadas, respectivamente. Aumento de 4X, (Escala: 500 µm).

### Avaliação fenotípica por citometria de fluxo

Os resultados da imunofenotipagem por citometria de fluxo foram obtidos através da análise de 10.000 eventos, realizada em aparelho FACScan, utilizando o programa CELLQuest<sup>®</sup>. Tanto as células frescas, quanto as submetidas ao processo de criopreservação, na quarta passagem demonstraram positividade

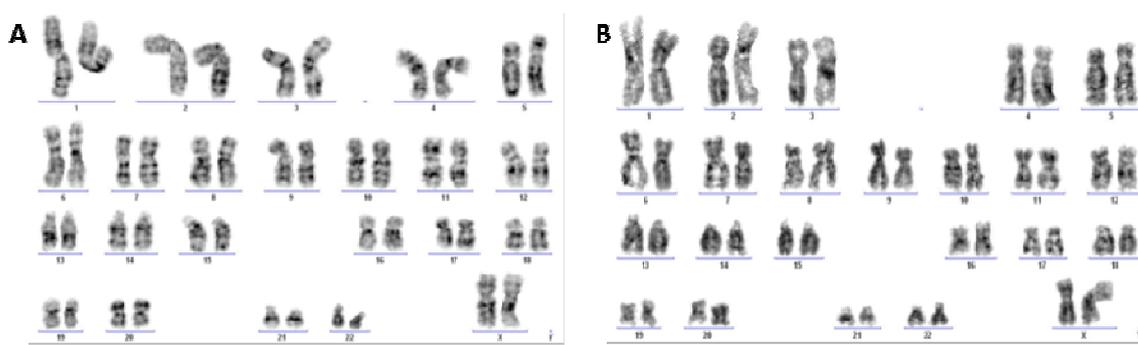
para os marcadores CD 90, CD105, CD73, CD29 e HLA-ABC. Os marcadores de linhagem hematopoética, HLA-DR, CD45 e CD34 demonstraram positividade inferior que 2% (Figura 4 B e C). Todas as células apresentaram homogeneidade quanto ao tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), conforme se observa na região (GATE) da Figura 4 A. Os resultados obtidos foram característicos de células mesenquimais (Figura 4 A, B e C), definição utilizada para essas células nos demais experimentos.



**Figura 4. Avaliação fenotípica por citometria de fluxo das ADSCs.** (A) Dot-Plot das células e a região na qual as ADSCs se encontram, mostrando característica homogênea dessa população. (B) Painel de histogramas dos marcadores positivos (CD105, CD90, Cd29, CD73 e HLA-ABC) e de marcadores negativos (HLA-DR, CD45 e CD34) em vermelho indica o marcador específico e em branco está representado o controle (IgG com fluoro cromo). (C) Tabela com as medias das porcentagens dos marcadores positivos e negativos das ADCSs frescas e criopreservadas respectivamente.

## Citogenética

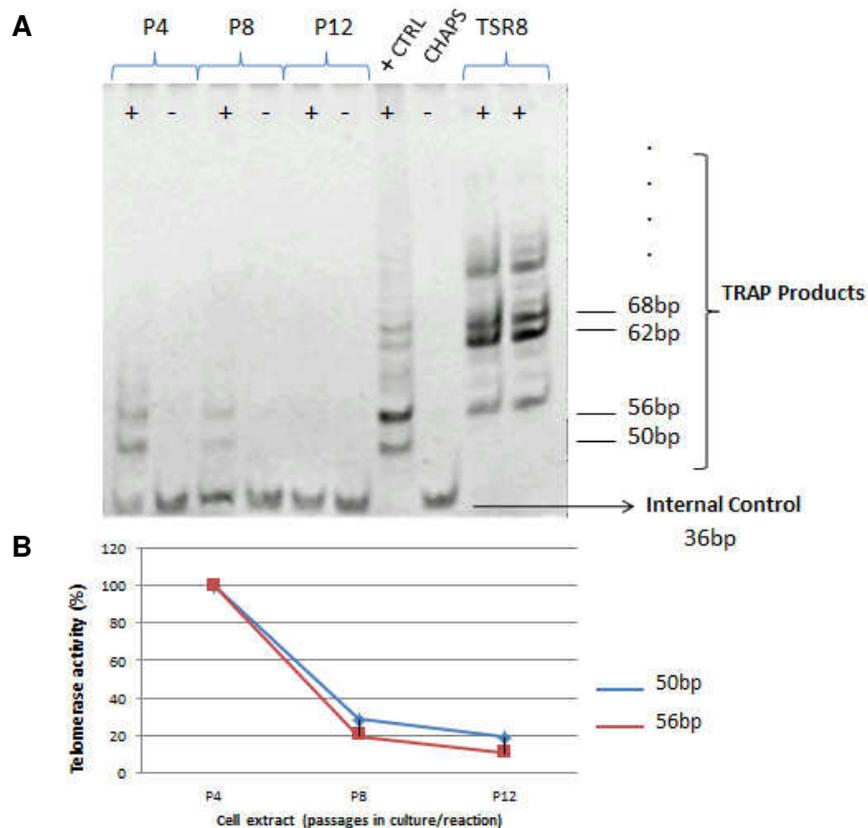
A verificação da estabilidade cromossômica das ADSCs derivadas de tecido adiposo foi avaliada por análise do cariótipo, pela técnica de coloração longitudinal Banda G, analisando em 10 metáfases com ADSCs da oitava e da décima passagens das amostras antes do processo de criopreservação. Não foram encontradas anormalidades, os cromossomas se mantiveram estáveis (Figura 5 A e B).



**Figura 5. Análise citogenética.** Cariótipo das ADSCs em 8ª passagem (A) e em 10ª passagem (B), as análises não demonstraram anomalias cromossômicas.

## Atividade da enzima telomerase

Na verificação da atividade da enzima telomerase realizada das ADSCs, antes do processo de criopreservação, foi possível observar o padrão de normalidade com 100% de atividade da telomerase em P4 e o decréscimo de atividade nas passagens mais tardias, P8 e P12 (Figura 6 A e B). Estes resultados corroboram com os dados encontrados nas análises cromossômicas por bandeamento G, demonstrando que as MSC utilizadas no presente projeto não apresentaram potencial tumorgênico (Figura 6 A e B).



**Figura 6. Atividade da enzima telomerase.** (A) ADSCs foram testadas em três diferentes passagens, “*in vitro*” (P4, P8 e P12) em relação à expressão da atividade da enzima telomerase através de “TRAP assay”. A atividade de telomerase foi detectada utilizando duas bandas de concentrações diferentes. O ensaio tem como controles positivos internos TSR8 e uma linhagem celular como CTRL +. O controle negativo foi realizado com amostras do mesmo período a ser analisado, aquecidas 85°C, no intuito de negativar a enzima telomerase. O tampão de lise CHAPS também foi utilizado como controle negativo. As ADSCs na P4 demonstraram a presença de bandas com 56 bp e 50 bp que se relacionaram com uma atividade de 100%. Houve diminuição das bandas no decorrer das passagens, P8 e P12, com respectiva diminuição na atividade de telomerase.

## **Diferenciação das ADSCs em linhagens mesodermiais**

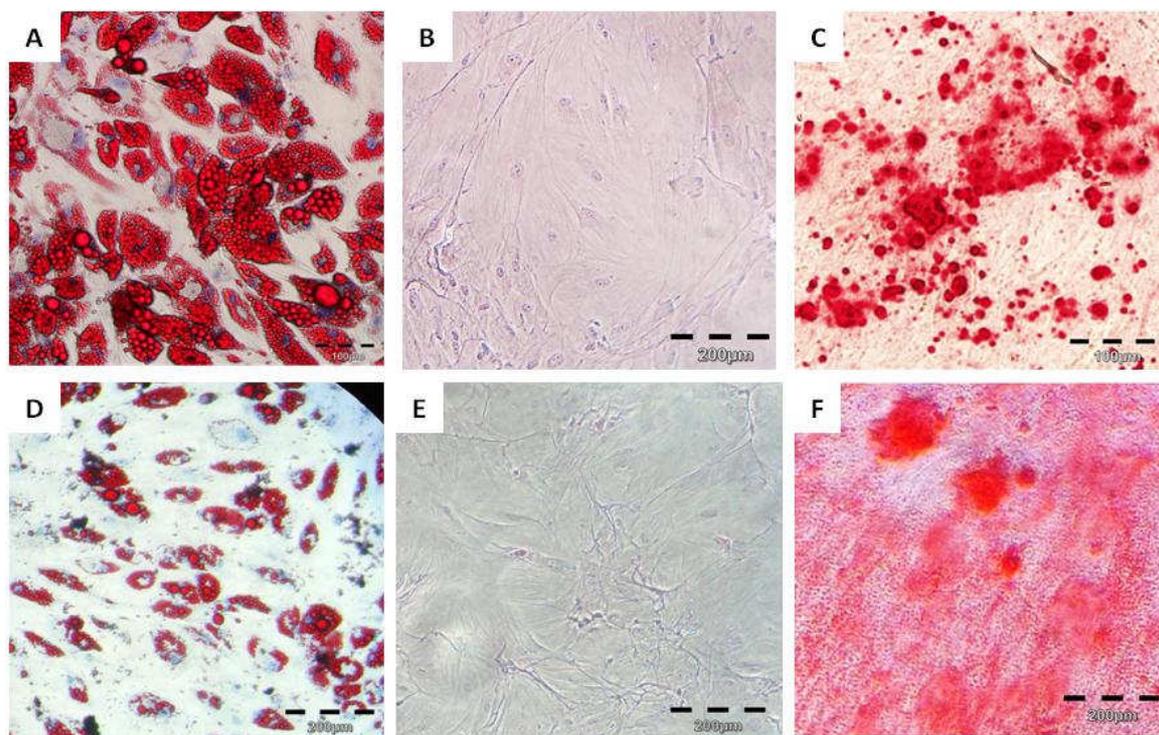
Após a expansão celular e caracterização em 4<sup>a</sup> passagem por citometria de fluxo, as ADSCs foram submetidas aos protocolos de diferenciação com meios específicos. Evidenciou-se tanto nas ADSCs frescas, quanto submetidas ao processo de criopreservação a capacidade de se diferenciarem em adipócitos, osteócitos e condrócitos (linhagens mesodérmicas), (Figura 7 A e D, B e E, C e F respectivamente).

Na linhagem adipogênica, as ADSCs frescas (Figura 7 A) e criopreservadas (Figura 7 D), apresentaram coloração vermelha citoplasmática em pequenas vesículas quando submetidas à coloração com Oil Red. A propriedade desse corante de interagir com lipídeos e triglicérides neutros mostra uma coloração vermelha que evidencia o acúmulo dessas substâncias em vesículas citoplasmáticas das células diferenciadas.

No processo de diferenciação osteogênica as ADSCs frescas (Figura 7 C) e criopreservadas (Figura 7 F) apresentaram em volta das células diferenciadas regiões avermelhadas, o que evidencia a formação de depósitos de minerais provenientes da formação de uma matriz extracelular mineralizada, semelhante a do tecido ósseo. Deve-se considerar a marcante característica da mudança de morfologia apresentada por essas células, as quais anteriormente reconhecidas pelo aspecto fibroblastóide alteram seu formato para células alongadas e alinhadas, recobrando toda placa de cultura e em alguns lugares, formando aglomerados celulares.

Após a diferenciação em linhagem condrogênica ADSCs frescas (Figura 7 B) e criopreservadas (Figura 7 E) as células apresentaram expansão no tamanho celular com significativo aumento no citoplasma, tornando-se arredondadas e achatadas, com núcleo evidente. Devido à coloração com Resorcina & Fucsina é

possível observar uma coloração celular rosácea, com destaque das fibras de colágeno expressas durante a diferenciação, devido à interação do corante.



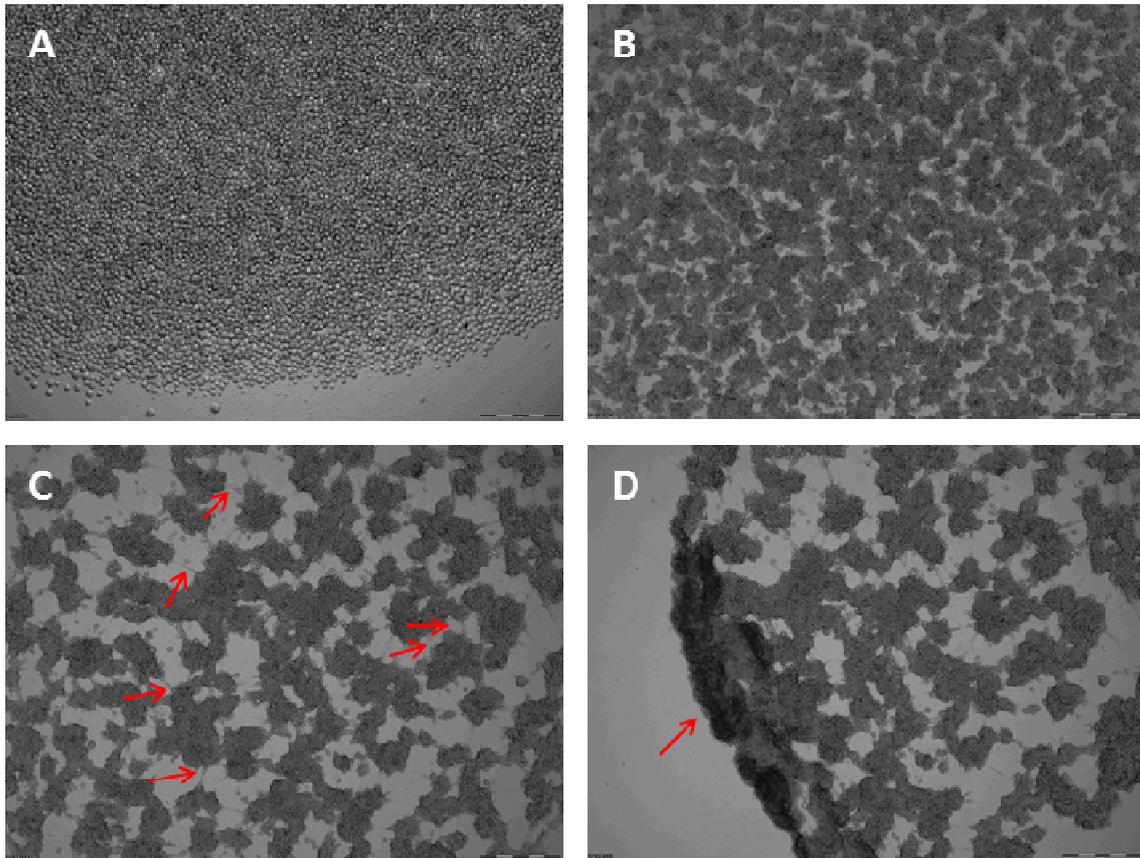
**Figura 7. Diferenciação das ADSCs em linhagens mesodermas.** Diferenciadas em linhagem adipogênica, 21<sup>o</sup> dia da cultura, coradas com Oil Red O, corante lipofílico, evidenciando vesículas de lipídios (em vermelho), (A) ADSCs frescas, aumento 20X, (Escala: 100  $\mu$ m) e (D) ADSCs após o processo de criopreservação aumento 10X, (Escala: 200  $\mu$ m). Diferenciadas em linhagem condrogênica, 21<sup>o</sup> dia da cultura, coradas com Resorcina & Fucsina, (B) ADSCs frescas e (E) ADSCs criopreservadas, aumento 10X, (Escala: 200  $\mu$ m). Diferenciadas em linhagem osteogênica, 21<sup>o</sup> dia da cultura, coradas com Alizarin Red S, evidenciando depósitos de cálcio. (C) ADSCs frescas, aumento 20X, (Escala: 100  $\mu$ m) e (F) ADSCs após o processo de criopreservação, aumento 10X, (Escala: 200  $\mu$ m).

## Diferenciação condrogênica tridimensional

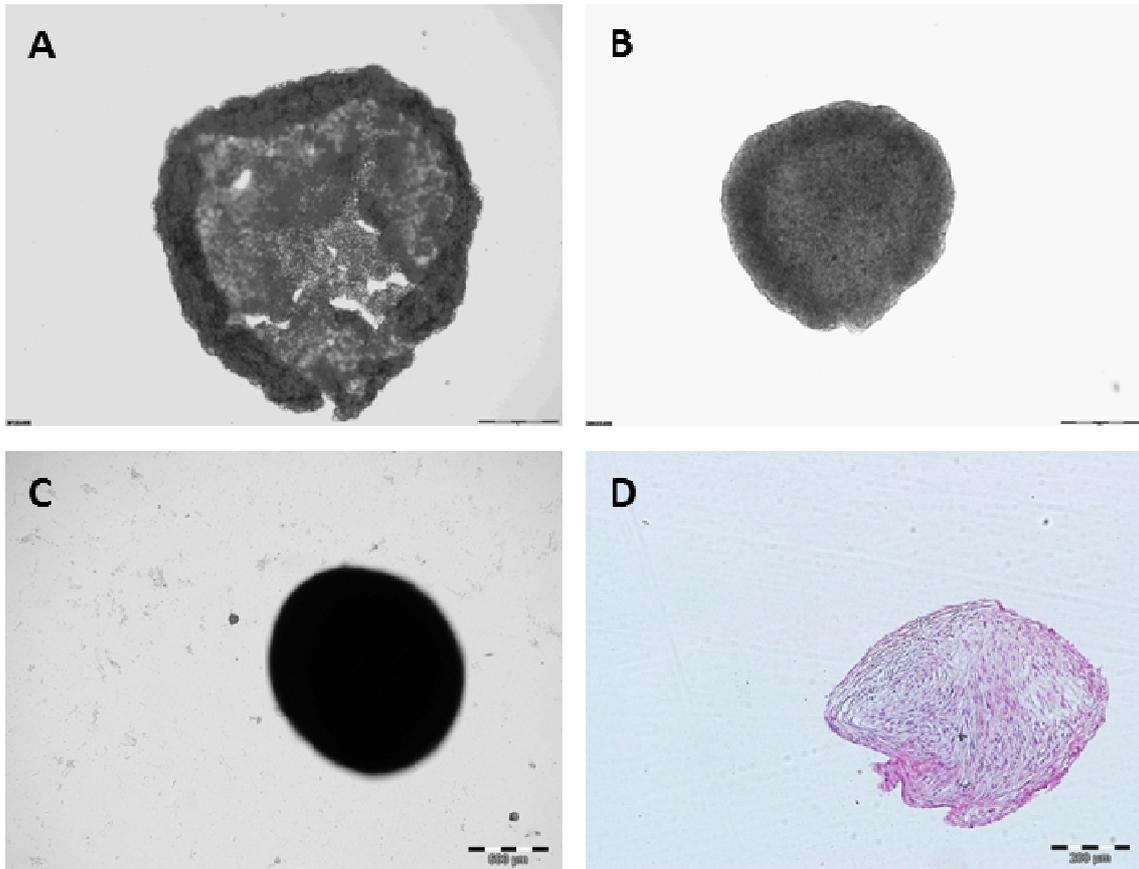
A cartilagem é um tecido avascular com matriz proteica extracelular reforçada com fibras de colágeno dispostas tridimensionalmente. Procurando mimetizar essa singular organização, estudos na área de engenharia tecidual buscam desenvolver métodos de cultura em sistema tridimensional (3D) para o processo de diferenciação condrogênica, com a finalidade de tornar mais eficazes os estudos das células sob tais condições [68, 95, 96].

No presente trabalho utilizamos o sistema de cultura de ADSCs em micromassa de alta densidade celular (Figura 8 A-H). Considerado um conveniente método de cultura 3D *in vitro*, mostra-se como ferramenta na investigação dos mecanismos da diferenciação condrogênica, possibilitando uma boa oportunidade estudar microambiente proporcionado pelo contato célula-célula [66].

Com o uso da técnica de microscopia de *time lapse* é possível acompanhar cada etapa da formação natural da micromassa, desde o plaqueamento em alta densidade celular pelo período de 2 horas para a adesão das células na placa de cultura e entre si (Etapa A) (Figura 8 A). Dando sequencia nota-se o agrupamento natural das ADSCs (Etapa B) (Figura 8 B), sendo possível visualizar as finas ligações intercelulares entre tais agrupamentos (Figura 8 C, setas vermelhas). Essas ligações mostram-se mais fortes que as existentes com a superfície plástica da placa de cultura, de tal modo, que a um dado momento as células que estão nas bordas sucumbem à força tensional dos agrupamentos da região interna da massa celular e se desprendem, dando início ao que se pode considerar a formação da micromassa (Figura 8 D, seta vermelha). Nos momentos que se seguem ocorre o fechamento desse aglomerado celular (Figura 9 A-B) formando uma esfera celular (Figura 9 C) com interior totalmente preenchido (Figura 9 D).



**Figura 8. Diferenciação condrogênica pela técnica de micromassa - microscopia por *time lapse* e aspectos morfológicos – Estágio inicial.** (A) Microscopia de *time lapse* possibilitando a visualização do plaqueamento em alta densidade celular para a adesão das células na placa de cultura e entre si (Etapa A). (B) Agrupamento natural das ADSCs (Etapa B). (C) Visualização das finas ligações intercelulares (setas vermelhas) entre os agrupamentos de ADSCs. (D) Início da formação da micromassa (seta vermelha), devido as fortes ligações célula-célula.



**Figura 9. Diferenciação condrogênica pela técnica de micromassa - microscopia por *time lapse* e aspectos morfológicos – Estágio final.** (A) e (B) Fechamento gradativo do aglomerado de ADSCs (C) Aspecto macroscópico sob microscopia ótica da micromassa de ADSCs após 24 dias de sua formação em cultura celular com meio indutor condrogênico em placa de 24 poços, mostrando-se como uma esfera de alta densidade. Aumento de 4X. (Escala: 500  $\mu\text{m}$ ). (D) Corte histológico da micromassa após 24 dias de cultura em meio indutor condrogênico, corado com hematoxilina e eosina visualizado sob microscopia ótica mostrando-se uma massa, com interior totalmente preenchido. Aumento de 10X. (Escala: 200  $\mu\text{m}$ ).

## **Análise da expressão gênica - PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)**

No presente estudo as análises das expressões gênicas, por PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR), realizadas a partir do RNA de células-tronco mesenquimais frescas e após processo de criopreservação e descongelamento.

As células em estudo tiveram seu material coletado em três momentos (7<sup>º</sup>, 14<sup>º</sup> e 21<sup>º</sup> dias) das culturas de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica, as quais foram avaliadas quanto à expressão dos genes relacionadas ao processo natural de diferenciação. Todas as amostras em estudo, incluindo os agentes calibradores, o controle endógeno foi utilizado *HPRT1* com a finalidade de normalizar as expressões gênicas.

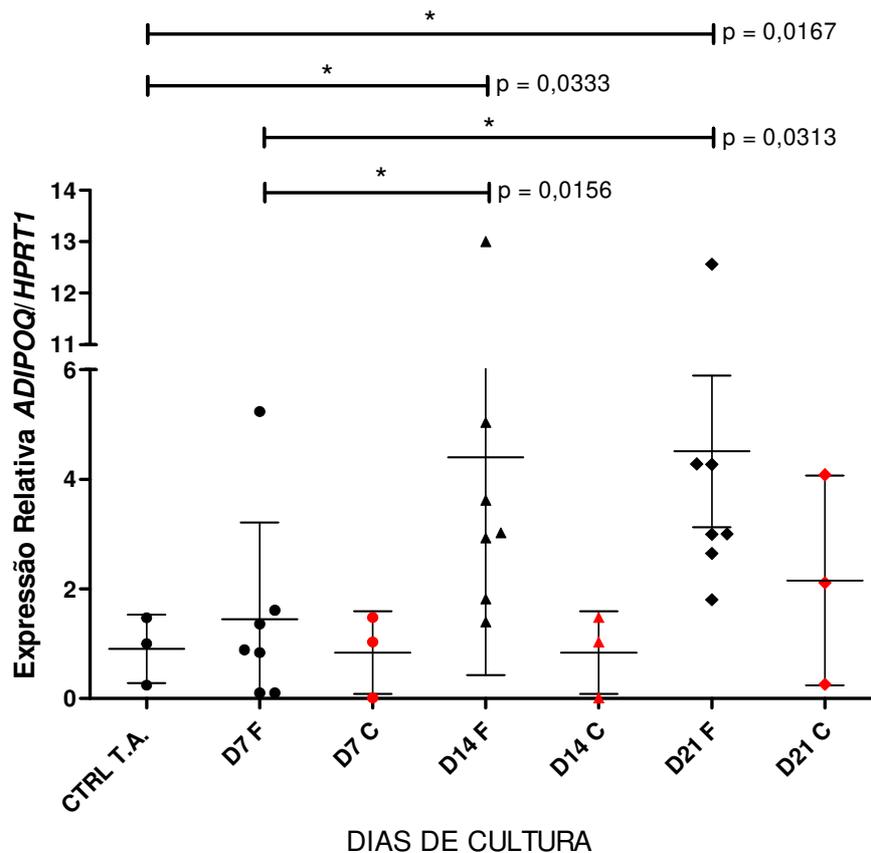
### **Diferenciação adipogênica**

Amostras de cDNA de adipócitos obtidos de tecido adiposo humano foram utilizadas como agente calibrador para as análises de expressão gênica do processo de diferenciação para adipogênico das ADSCs.

O gene codificante de adiponectina (*ADIPOQ* – adiponectin, C1Q and collagendomain conataining) foi um dos genes selecionados para este estudo por se apresentar atuante no processo de maturação de pré-adipócitos, como responsável pela codificação da adiponectina, uma proteína plasmática derivada de tecido adiposo [97, 98].

A expressão gênica de *ADIPOQ* apresentou aumento gradativo ao longo dos dias de cultura superando a expressão gênica da amostra controle ( $0,90 \pm 0,62$ ). Nas amostras frescas, houve diferença estatisticamente significativa entre os dias 7 ( $1,44 \pm 1,76$ ) e 14 ( $4,40 \pm 3,97$ ) ( $p=0,0156$ ), ocorrendo o mesmo com o 21<sup>º</sup> dia ( $4,51 \pm 3,65$ ) ( $p=0,0313$ ). Tal diferença também foi observada quando o 14<sup>º</sup> ( $p= 0,0333$ ) e 21<sup>º</sup> ( $p=0,0167$ ) dias são comparados com a amostra controle.

No 7<sup>o</sup> ( $0,84 \pm 0,75$ ), 14<sup>o</sup> ( $0,84 \pm 0,75$ ) e 21<sup>o</sup> ( $2,15 \pm 1,91$ ) dias de cultura, as amostras criopreservadas mantiveram um padrão de expressão gênica, próximo ao apresentado nas amostras frescas. Porém, com valores inferiores e sem apresentar diferenças significativas quando comparadas entre si e entre o controle de células de tecido adiposo (Figura 10).

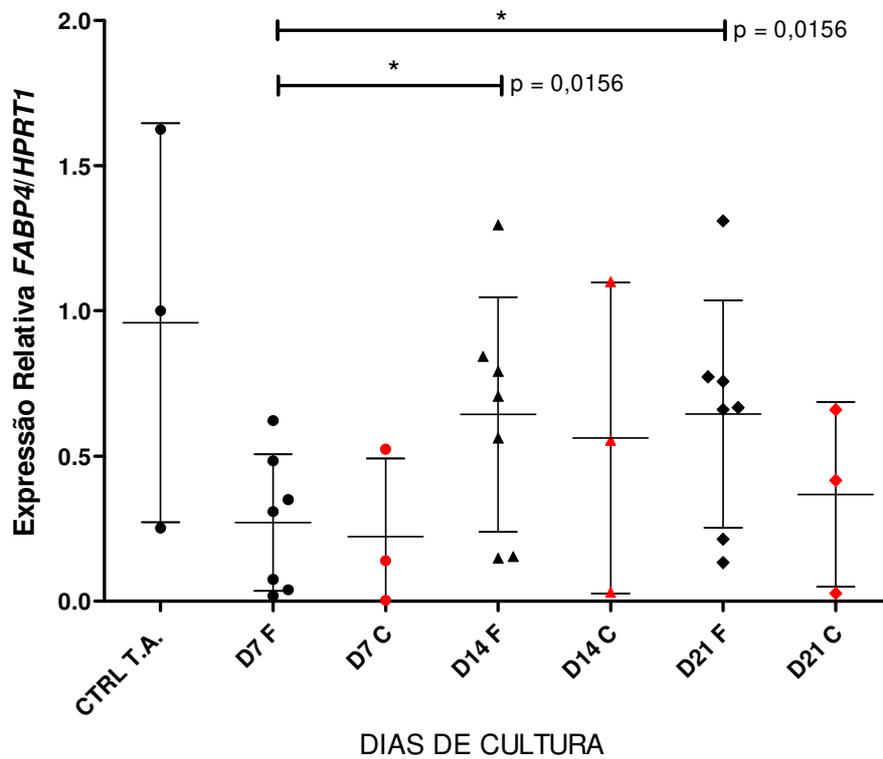


**Figura 10. Expressão de *ADIPOQ* (adiponectin, C1Q and collagen domain containing).** O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão em que células de tecido adiposo foram utilizadas como amostra calibradora. Note o aumento de expressão deste gene testado nas amostras frescas e criopreservadas de ADSCs submetidas à diferenciação adipogênica em comparação com o controle. Análise apontou diferença significativa somente no grupo de amostras frescas nos dias 14<sup>o</sup> ( $p=0,0156$ )/( $p= 0,0333$ ) e 21<sup>o</sup> ( $p=0,0313$ )/( $p=0,0167$ ) quando comparadas com o 7<sup>o</sup> dia e com a amostra controle, respectivamente.

O gene de codificação da proteína de ligação com ácidos graxos-4 (*FABP4* - fatty acid binding protein 4, adipocyte) que apresenta um papel chave na regulação da produção de lipídeos em mamíferos, além de atuar de modo crítico na

absorção e metabolismo desses ácidos graxos [99] apresentou seus níveis de expressão com aumento gradativo entre os dias 7 ( $0,27 \pm 0,23$ )/( $0,22 \pm 0,26$ ), 14 ( $0,64 \pm 0,40$ )/( $0,56 \pm 0,53$ ) de ambas as amostras. No entanto nas amostras frescas houve estabilidade e criopreservadas declínio no 21<sup>o</sup> ( $0,64 \pm 0,39$ )/( $0,36 \pm 0,31$ ), respectivamente.

No entanto em ambos os grupos estudados os níveis de expressão do gene *FABP4* não ultrapassaram o apresentado pelas amostras controles ( $0,95 \pm 0,68$ ), porém o 7<sup>o</sup> dia de cultura das amostras frescas mostrou-se significativamente inferior ( $p= 0,0156$ ) quando comparado entre o 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias (Figura 11).

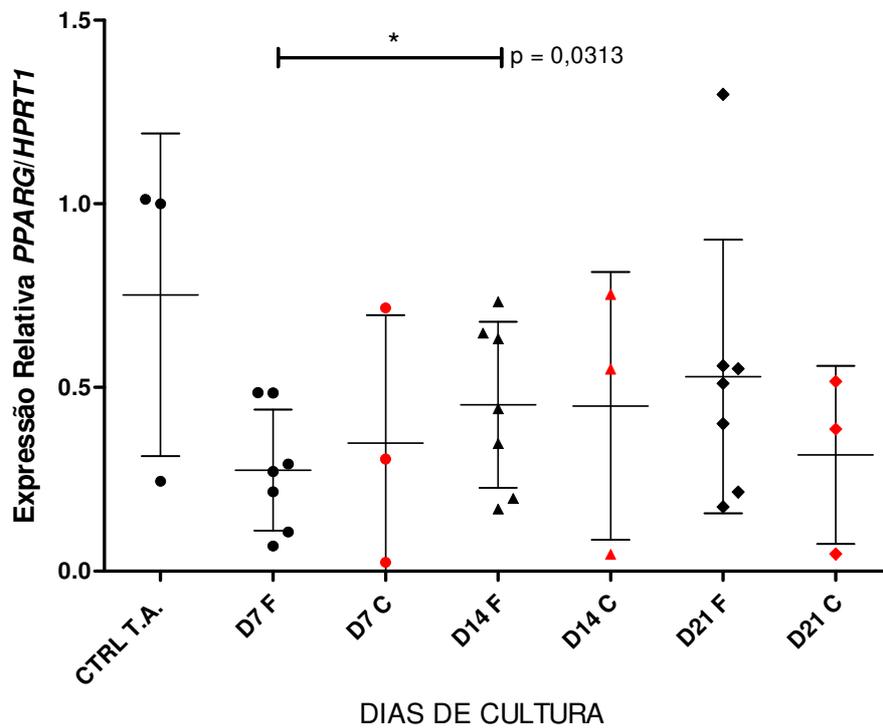


**Figura 11. Expressão de *FABP4* (fatty acid binding protein 4, adipocyte).** O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão em que células de tecido adiposo foram utilizadas como amostra calibradora. Note nos dias 7, 14 o aumento gradual e estabilidade de expressão no 21º dia de cultura da expressão deste gene testado nas amostras frescas de ADSCs submetidas à diferenciação adipogênica. Nas amostras criopreservadas esse perfil se manteve até o 14º dia com declínio no 21º. Em ambas as amostras os valores mostraram-se abaixo dos apresentados pelas células de tecido adiposo (controle). A análise apontou diferença significativa ( $p = 0,0156$ ) entre o 7º e 14º / 7º e 21º dias de cultura das amostras frescas.

O gene do receptor  $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissomo-2 (*PPARG* - peroxisome proliferator-activated receptor gamma), terceiro gene estudado foi selecionado por constituir um fator de transcrição que apresenta um papel regulatório no processo de adipogênese.

Nas amostras frescas onde nota-se um aumento gradual ao longo do processo de diferenciação no 7<sup>o</sup> ( $0,27 \pm 0,16$ ) e 14<sup>o</sup> ( $0,45 \pm 0,22$ ), com diferença significativa ( $p=0,0313$ ) e 21<sup>o</sup> ( $0,53 \pm 0,37$ ), porém, seus valores apresentaram-se abaixo do encontrado no controle ( $0,75 \pm 0,43$ ).

No entanto, as amostras criopreservadas que também mantiveram seus níveis abaixo do encontrado no controle, indicaram um aumento entre o 7<sup>o</sup> ( $0,34 \pm 0,34$ ), 14<sup>o</sup> ( $0,45 \pm 0,36$ ) com ligeiro declínio no 21<sup>o</sup> ( $0,31 \pm 0,24$ ) (Figura 12).



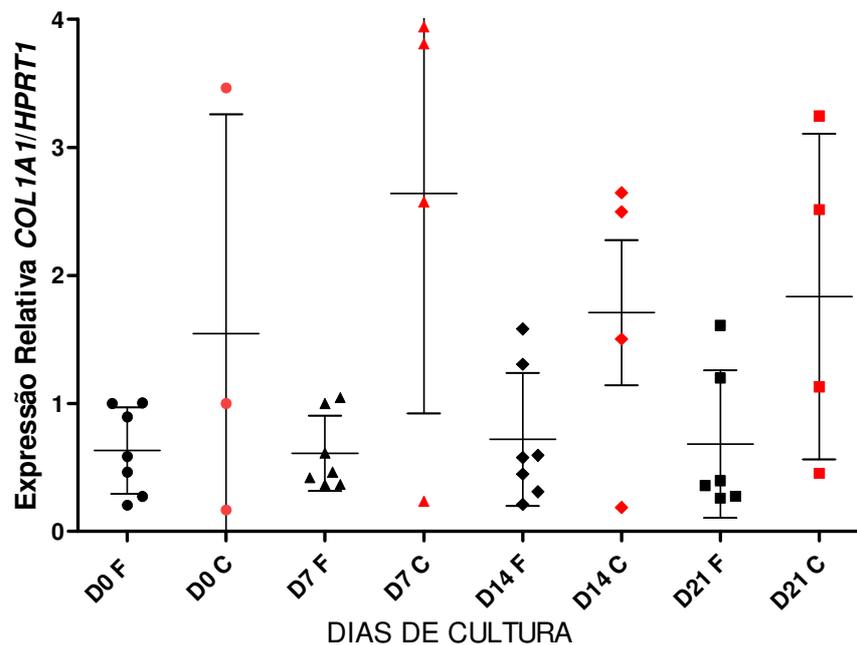
**Figura 12. Expressão de *PPARG* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma).** O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão em que células de tecido adiposo foram utilizadas como amostra calibradora. Ambos os grupos estudados apresentaram níveis de expressão abaixo do encontrado nas amostras controles, observando-se aumento gradativo em todos os pontos de análise nas amostras frescas e aumento entre o 7º e 14º dias das amostras criopreservadas com declínio entre o 14º e 21º dias. Foi observada diferença significativa ( $p=0,0313$ ) entre o 7º e 14º dias das amostras frescas.

## Diferenciação osteogênica

Com a finalidade de calibrar a reação na diferenciação osteogênica utilizou-se ADSCs indiferenciadas frescas e após passarem pelo processo de criopreservação, acompanhando as mesmas condições dos grupos de estudo.

Para a diferenciação osteogênica foi selecionado o gene colágeno do tipo I (*COL1A1* – collagen, type I, alpha 1), proteína expressa na matriz extracelular principalmente de tecido ósseo [100]. Quando comparamos as amostras frescas no 7<sup>o</sup> ( $0,61 \pm 0,29$ ) e 14<sup>o</sup> ( $0,71 \pm 0,52$ ) dias de cultura da diferenciação osteogênica fresca, nota-se um perfil de expressão gênica com sutil e gradativo aumento, seguido de discreto declínio no 21<sup>o</sup> ( $0,68 \pm 0,57$ ) dia quando comparadas ao seu respectivo controle ( $0,63 \pm 0,33$ ).

Característica que não se observou na expressão de *COL1A1* analisada nas amostras criopreservadas, as quais no 7<sup>o</sup> dia ( $2,64 \pm 1,71$ ) de diferenciação osteogênica apresentaram-se em destaque frente ao observado tanto nas amostras controle ( $1,54 \pm 1,71$ ) quanto no 14<sup>o</sup> dia ( $1,70 \pm 1,13$ ), seguido de aumento no 21<sup>o</sup> dia ( $1,83 \pm 1,27$ ) (Figura 13).



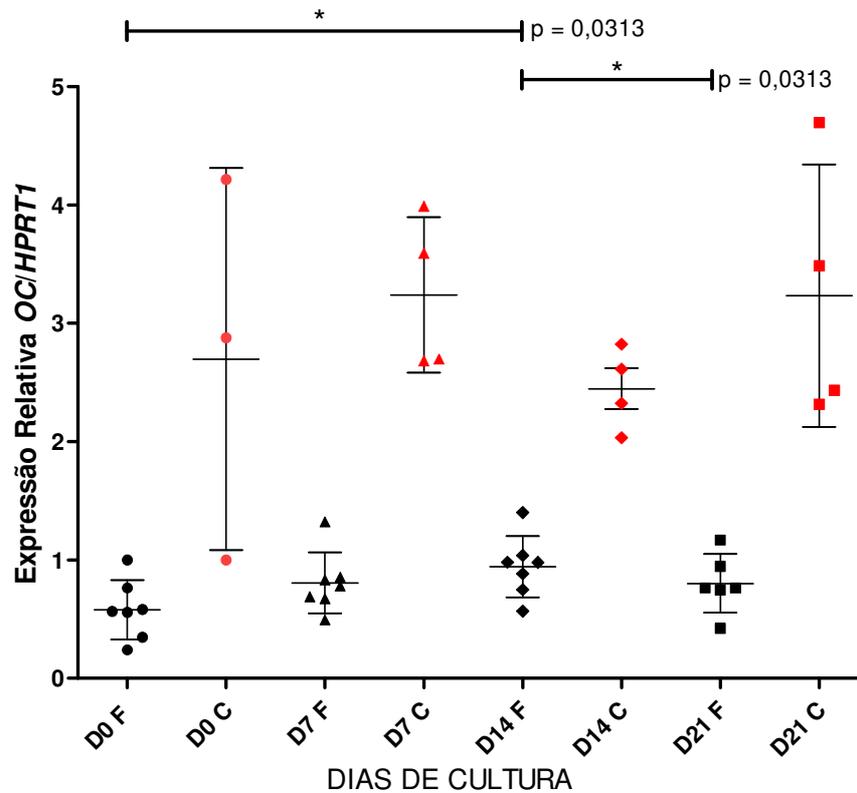
**Figura 13. Expressão de *COL1A1* (collagen, type I, alpha 1).** O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão em que ADSCs indiferenciadas foram utilizadas como amostra calibradora. Um sutil aumento foi observado entre as amostras do 7º e 14º dias de diferenciação no grupo fresco e com leve queda 21º dia de cultura. Nas amostras criopreservadas observa-se aumento nos níveis de expressão do *COL1A1* entre o 7º dia de diferenciação osteogênica e seu respectivo controle, com queda na expressão no 14º e ligeiro aumento o 21º dia.

Durante o processo de diferenciação osteogênica, um conhecido como biomarcador deste processo, o gene da osteocalcina (*BGLAP* – bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein) (também representado por *OC*) [101-103], teve seus níveis de expressão investigados em ambos os grupos de estudo.

Nas culturas de diferenciação osteogênica é notável que os níveis de expressão de *OC* nos dias 7 ( $0,80 \pm 0,25$ )/( $3,24 \pm 0,65$ ), 14 ( $0,94 \pm 0,25$ )/( $2,44 \pm$

0,34), 21 ( $0,80 \pm 0,24$ )/( $3,23 \pm 1,10$ ), assim como nas amostras controles ( $0,57 \pm 0,25$ )/( $2,69 \pm 1,61$ ) frescas são inferiores em relação as amostras criopreservadas, respectivamente.

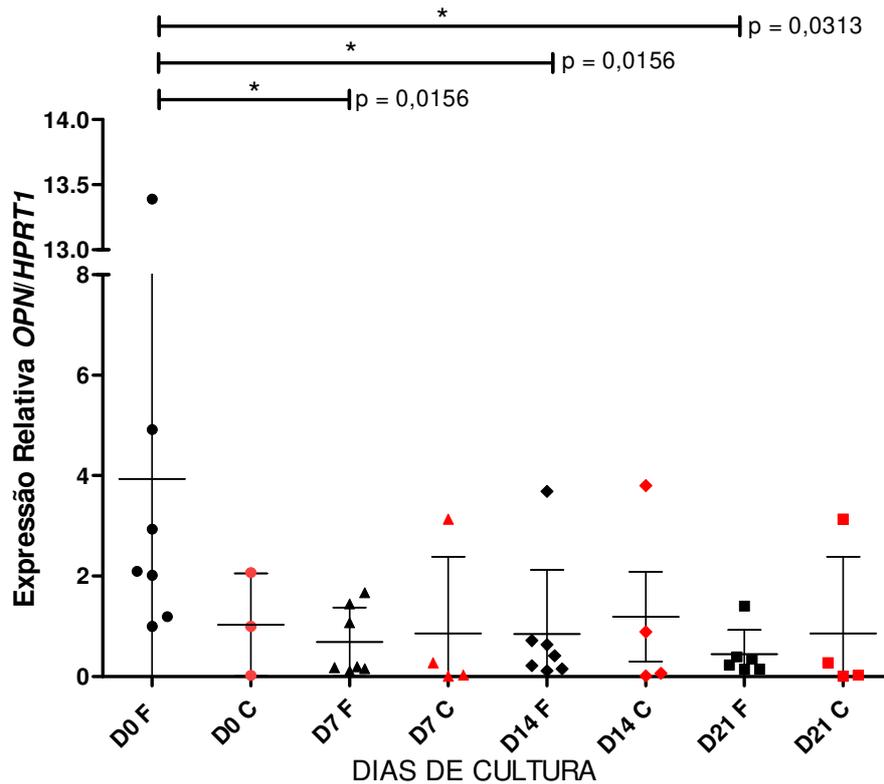
No entanto, na cultura das amostras frescas os níveis de expressão entre os dias variaram sutilmente alcançando seu maior nível no 14<sup>o</sup> dia, aumento este que se mostrou significativo ( $p=0,0313$ ) se comparado com 21<sup>o</sup> dias e as amostras controle (Figura 14). Inversamente ao observado nas amostras frescas, as que foram submetidas ao processo de criopreservação tiveram no 14<sup>o</sup> dias de cultura osteogênica os menores níveis de expressão.



**Figura 14. Expressão de OC (BGLAP – bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein).** O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão em que ADSCs indiferenciadas foram utilizadas como amostra calibradora. Observa-se que os níveis de expressão das culturas de diferenciação osteogênica nas amostras frescas são inferiores em relação às amostras criopreservadas. O 14º dia da cultura fresca teve aumento significativo ( $p=0,0313$ ) se comparado com 21º dias e as amostras controle, sendo o inverso observado nas amostras criopreservadas, onde o 14º dias de cultura osteogênica apresentou os menores níveis de expressão.

A osteopontina (*SPP1* – secreted phosphoprotein 1) (também representada por *OPN*), gene conhecido por estar presente durante o processo de osteogênese [101-103], teve seus níveis com maior expressão nas amostras criopreservadas, tanto no controle ( $1,03 \pm 1,02$ ) quanto nos demais dias, contando com aumento

nos dias 7 ( $0,86 \pm 1,52$ ) e 14 ( $1,19 \pm 1,78$ ) de cultura e queda no dia 21 ( $0,86 \pm 1,52$ ). O grupo de amostras frescas apresentou uma queda significativa nos níveis de expressão de *OPN* no 7º ( $0,69 \pm 0,68$ )/( $p=0,0156$ ), 14º ( $0,84 \pm 1,27$ )/( $p=0,0156$ ) e 21º dia ( $0,44 \pm 0,48$ )/( $p=0,0313$ ) de cultura, quando comparado com as amostras controles ( $3,93 \pm 4,37$ ) (Figura 15).

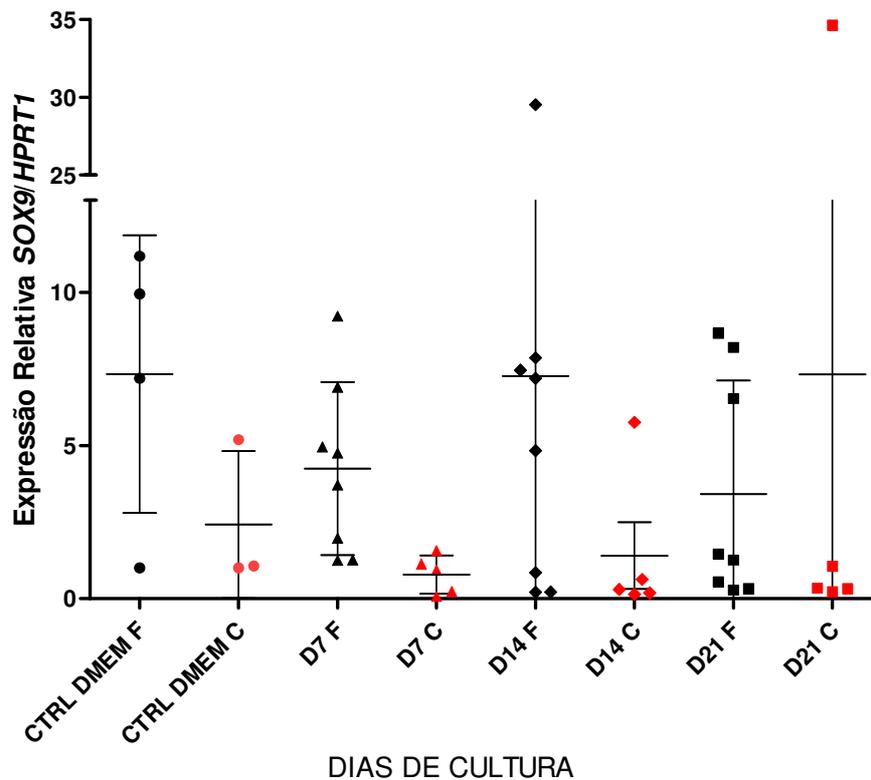


**Figura 15. Expressão de *OPN* (*SSP1* – secreted phosphoprotein).** O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão em que ADSCs indiferenciadas foram utilizadas como amostra calibradora. O grupo de amostras frescas apresentou uma queda significativa nos níveis de expressão de *OPN* no 7º ( $p=0,0156$ ), 14º ( $p=0,0156$ ) e 21º dia ( $p=0,0313$ ) de cultura, quando comparado com as amostras controles. Observa-se o aumento nos níveis de expressão nos 7º e 14º dias de cultura, seguido de queda no 21º dia nas amostras criopreservadas em comparação com as amostras controle.

### **Diferenciação condrogênica**

Em busca de um calibrador ideal para a análise da expressão gênica do processo de diferenciação condrogênica optou-se por utilizar ADSCs frescas e criopreservadas submetidas à formação de micromassa sem o uso de meio indutor condrogênico, sendo a cultura dos controles suplementada por meio convencional (DMEM suplementado de 10% de FBS).

O gene *SOX9* foi um dos selecionados para avaliar diferenciação condrogênica foram selecionados, por ser fator de transcrição um envolvido na diferenciação condrogênica, sendo que a sua deficiência leva a uma malformação óssea e cartilaginosa [104]. Observou-se que as amostras criopreservadas apresentaram queda nos níveis de expressão do 7<sup>º</sup> ( $0,78 \pm 0,62$ ) ao 14<sup>º</sup> dia ( $1,40 \pm 2,44$ ), seguido de aumento no 21<sup>º</sup> ( $7,31 \pm 15,28$ ) em comparação com as amostras controles ( $2,41 \pm 2,39$ ). Nas amostras frescas o 7<sup>º</sup> dia indicou redução da expressão gênica ( $4,25 \pm 2,82$ ), com aumento no 14<sup>º</sup> dia ( $7,26 \pm 9,58$ ), alcançando níveis próximos das amostras controles ( $7,32 \pm 4,53$ ) e em sequência queda no 21<sup>º</sup> dia ( $3,40 \pm 3,71$ ) (Figura 16).

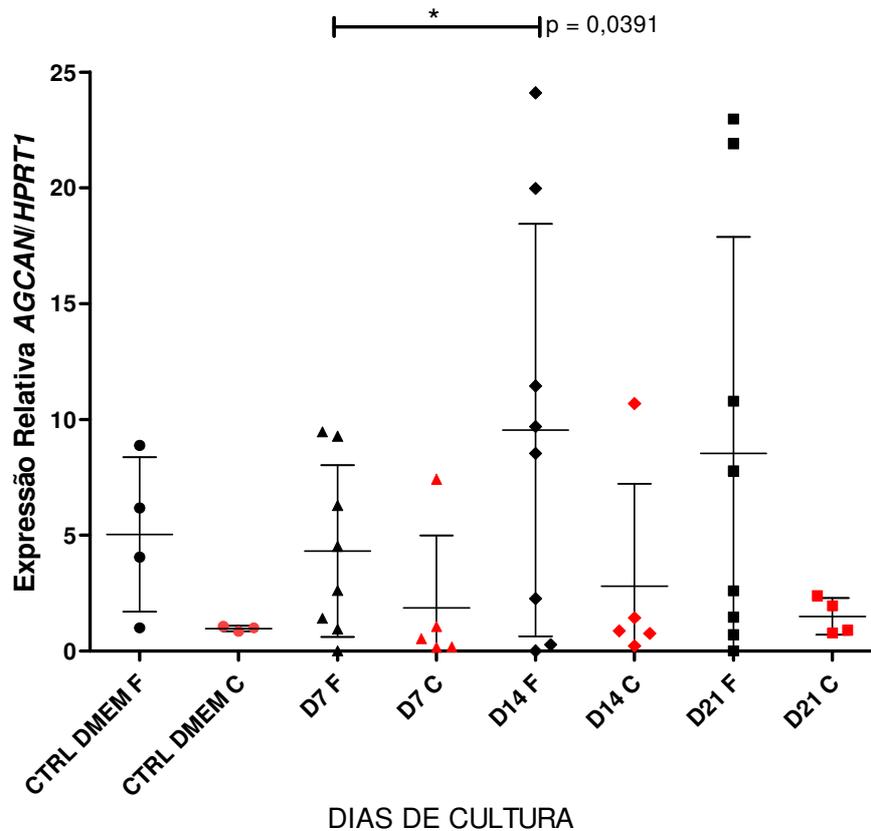


**Figura 16. Expressão de SOX9 (SRY (sex determining region Y)-box 9).** O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão em que ADSCs indiferenciadas e submetidas à técnica de micromassa foram utilizadas como amostra calibradora. Nas amostras frescas o 7º dia indicou redução da expressão gênica, com aumento no 14º dia, alcançando níveis próximos das amostras controles e sequencia de queda no 21º dia. As amostras criopreservadas apresentaram queda nos níveis de expressão do 7º ao 14º dia, seguido de aumento no 21º em comparação com as amostras controles.

O gene Angrecan (*ACAN* – aggrecan) (também representado por *AGCAN*) codifica a proteína de mesmo nome que se liga às estruturas de colágeno do tipo II e formam a matriz extracelular dando as características físico/mecânicas de uma cartilagem articular [105].

Quanto à expressão deste gene nas amostras criopreservadas notou-se um aumento gradativo a partir do controle ( $0,97 \pm 0,11$ ), 7<sup>º</sup> ( $1,86 \pm 3,12$ ) e 14<sup>º</sup> ( $2,79 \pm 4,42$ ) dias de cultura com ligeira queda no 21<sup>º</sup> ( $1,50 \pm 0,79$ ) dia (Figura 17).

Nas amostras frescas o 7<sup>º</sup> dia ( $4,31 \pm 3,71$ ) é menos expressivo que a amostra controle ( $5,02 \pm 3,33$ ), aumentando no 14<sup>º</sup> ( $9,53 \pm 8,90$ ), com queda no 21<sup>º</sup> ( $8,52 \pm 9,35$ ) dia (Figura 17). Nota-se diferença significativa ( $p= 0,0391$ ) entre o 7<sup>º</sup> e 14<sup>º</sup> dias de diferenciação nas amostras frescas.

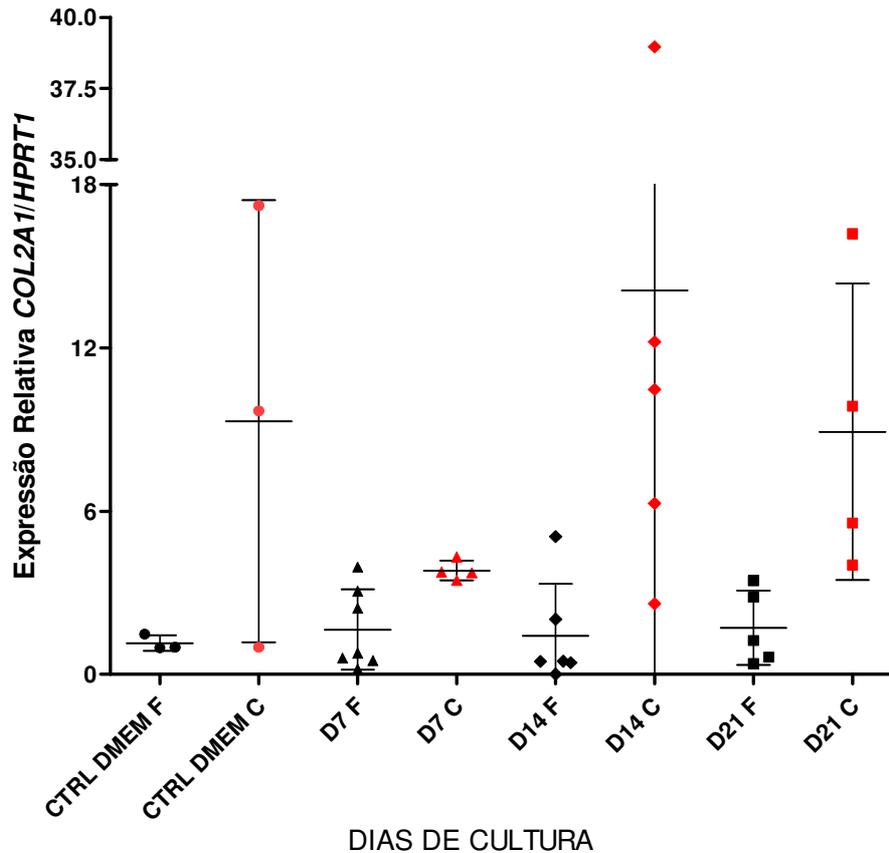


**Figura 17. Expressão de AGCAN (aggrecan).** O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão em que ADSCs indiferenciadas e submetidas à técnica de micromassa foram utilizadas como amostra calibradora. Nota-se diferença significativa ( $p=0,0391$ ) entre o 7º e 14º dias de diferenciação nas amostras frescas. Nas amostras frescas o 7º dia ( $4,31 \pm 3,71$ ) é menos expressivo que a amostra controle ( $5,02 \pm 3,33$ ), aumentando no 14º ( $9,53 \pm 8,90$ ), com queda no 21º ( $8,52 \pm 9,35$ ) dia. Observou-se um aumento gradativo a partir da amostra controle, 7º e 14º dias de cultura com ligeira queda no 21º dia nas amostras criopreservadas.

O colágeno do tipo II, considerada a mais expressa na matriz extracelular do tecido cartilaginoso articular [106], teve a expressão seu gene *COL2A1*

(collagen, type II, alpha 1) maior nas amostras criopreservadas, onde em comparação com as amostras controles ( $9,30 \pm 8,12$ ) houve menor expressão no 7º dia ( $3,18 \pm 0,36$ ), com aumento no 14º ( $14,11 \pm 14,39$ ) e queda no 21º ( $8,91 \pm 5,45$ ) dias de cultura.

As amostras frescas apresentaram pequena variação diante das amostras controles ( $1,15 \pm 0,28$ ), com discreto aumento no 7º dia ( $1,64 \pm 1,48$ ), pequena queda no 14º ( $1,41 \pm 1,91$ ), ligeiro aumento no 21º dia ( $1,71 \pm 1,36$ ) de cultura (Figura 18).

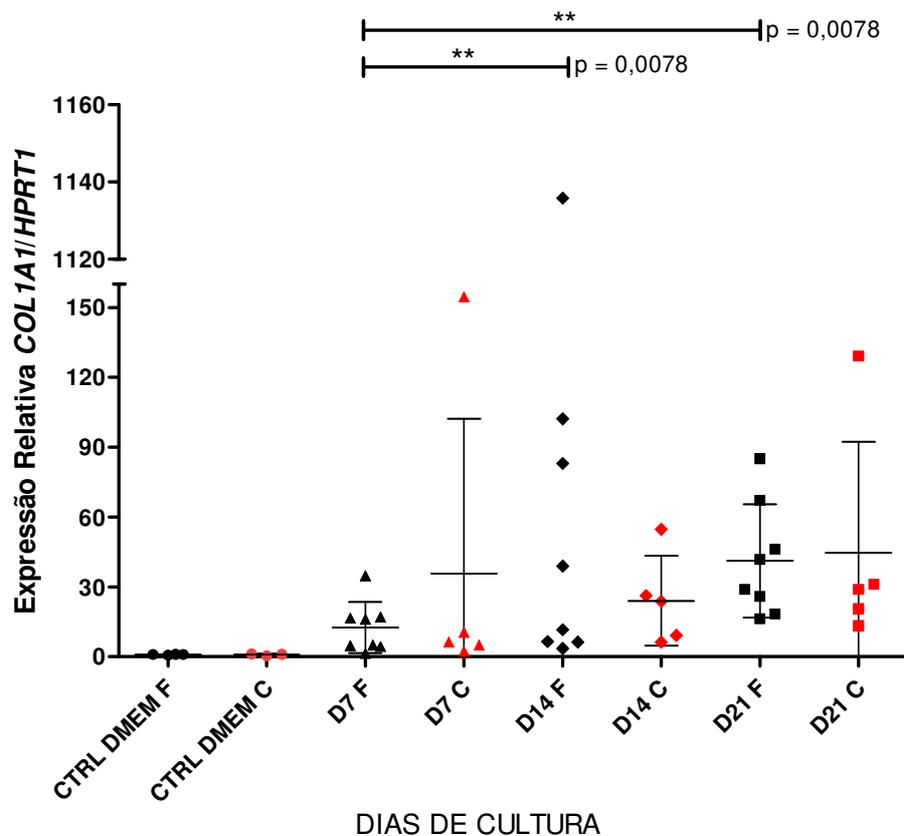


**Figura 18. Expressão de *COL2A1* (collagen, type II, alpha 1).** O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão em que ADSCs indiferenciadas e submetidas à técnica de micromassa foram utilizadas como amostra calibradora. O gene em estudo apresentou-se mais expresso nas amostras criopreservadas, onde em comparação com as amostras controles houve menor expressão no 7º dia, com aumento no 14º e novamente queda no 21º dias de cultura. As amostras frescas apresentaram pequena variação diante das amostras controles, com aumento no 7º dia, pequena queda no 14º, ligeiro aumento no 21º dia de cultura.

Colágeno do tipo 1 é outra proteína expressa na matriz extracelular de tecidos cartilagosos. O gene *COL1A1* apresentou aumento gradativo de expressão ao longo dos dias do processo de diferenciação condrogênica.

O perfil de expressão gênica nas amostras frescas foi marcado pelo aumento nos valores obtidos nos dias 7 ( $12,50 \pm 11,01$ ), 14 ( $173,5 \pm 390,7$ ) e queda no 21<sup>o</sup> ( $41,19 \pm 24,33$ ) dias de cultura fresca em relação às amostras controles ( $0,87 \pm 0,14$ ) (Figura 19). Houve diferença significativa ( $p=0,0078$ ) do 7<sup>o</sup> dia quando compara com o 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de cultura fresca.

Nas amostras criopreservadas houve aumento no 7<sup>o</sup> ( $35,71 \pm 66,51$ ), queda no 14<sup>o</sup> ( $24,03 \pm 19,29$ ) e novo aumento no 21<sup>o</sup> ( $44,61 \pm 47,80$ ) dias de cultura.

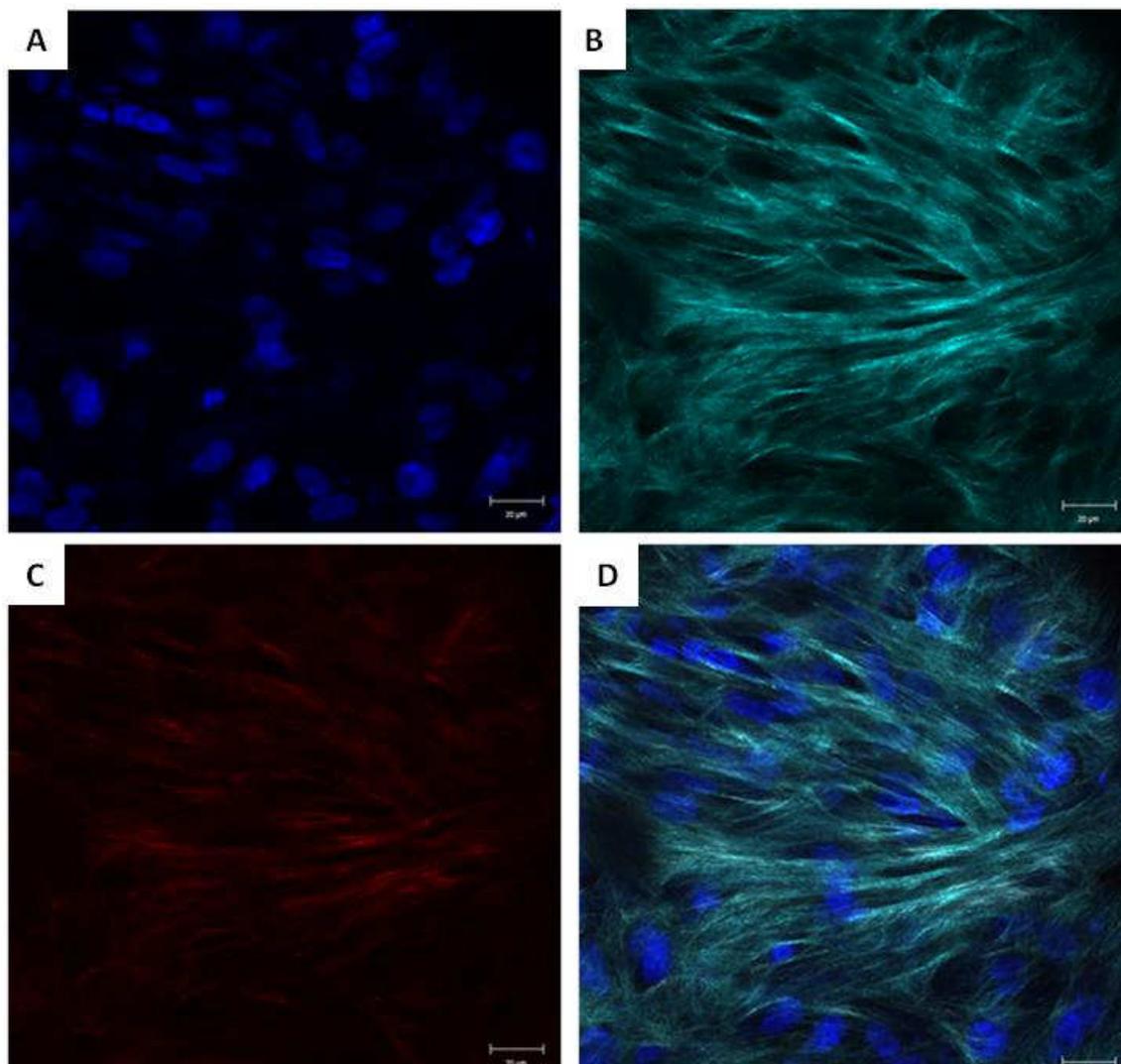


**Figura 19. Expressão de COL1A1 (collagen, type I, alpha 1).** O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão em que ADSCs indiferenciadas e submetidas à técnica de micromassa foram utilizadas como amostra calibradora. Nota-se aumento da expressão gênica, relação às amostras controles, dos valores no 7º, 14º e queda no 21º dia de cultura fresca. Houve diferença significativa ( $p=0,0078$ ) do 7º quanto comparado com o 14º e 21º dias de cultura fresca. Nas amostras criopreservadas houve aumento no 7º ( $35,71 \pm 66,51$ ), queda no 14º ( $24,03 \pm 19,29$ ) e novo aumento no 21º ( $44,61 \pm 47,80$ ) dias de cultura.

## **Geração de Segundo Harmônico**

A microscopia de Geração de Segundo Harmônico (SHG) foi adotada no presente projeto, com a finalidade de identificar a presença, distribuição e orientação das fibras de colágeno formadas naturalmente durante o processo de diferenciação condrogênica, pela técnica de micromassa. O colágeno é considerado um modelo biológico gerador de SHG, apresentando uma constituição tridimensional que potencializam seu sinal [71, 107, 108].

A microscopia de SHG permitiu a visualização da presença de fibras de colágeno pelo modo refletido (Figura 20 B), assim como, pelo transmitido (Figura 20 C), juntamente com as imagens microscopia de fluorescência. A presença dos núcleos celulares marcados com DAPI ficou evidenciada (Figura 20 A), tais imagens quando sobrepostas possibilitam a visualização da distribuição das fibras de colágenos no arranjo celular tridimensional originado no processo de diferenciação condrogênica pela técnica de micromassa (Figura 20 D).



**Figura 20. Microscopia de Geração de Segundo Harmônico (SHG).** (A) Microscopia de fluorescência indicando a presença dos núcleos dos condrócitos, derivados de ADSCs, marcados com DAPI (Azul). (B) Sinal refletido de SHG (Verde Cian) evidenciando os feixes de fibras de colágeno. (C) Sinal transmitido de SHG (Vermelho) também apontando a presença dos feixes de fibras de colágeno. (D) Sobreposição (*Merge*) das imagens (A), (B) e (C) possibilitando a visualização da distribuição das fibras de colágeno ao redor dos núcleos dos condrócitos. (Escala: 20  $\mu\text{m}$ ).

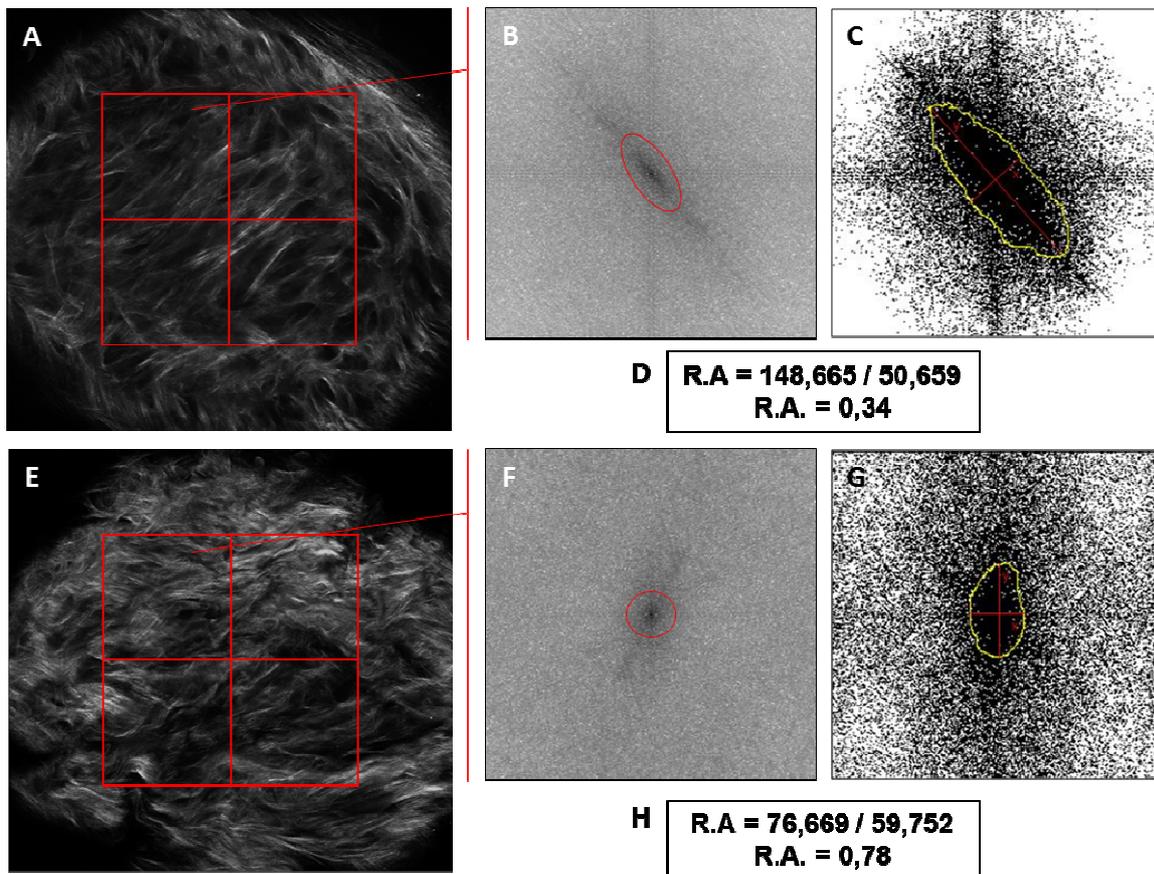
## Quantificação das imagens de SHG

As imagens obtidas da microscopia de SHG foram transformadas em um padrão de 8 bits, apresentado 256 níveis de cinza e 512 x 512 pixels de resolução espacial, sob estas condições foi possível aplicar às imagens os algoritmos Transformada de Fourier Rápida (Fast Fourier Transform – FFT) (Figura 22) e algoritmo Matrix de Co-ocorrência de Níveis de Cinza (Gray Level Co-occurrence Matrix – GLCM) (Figura 23), ambos *plugins* disponibilizados no software ImageJ (NIH).

### Análise pelo algoritmo FFT

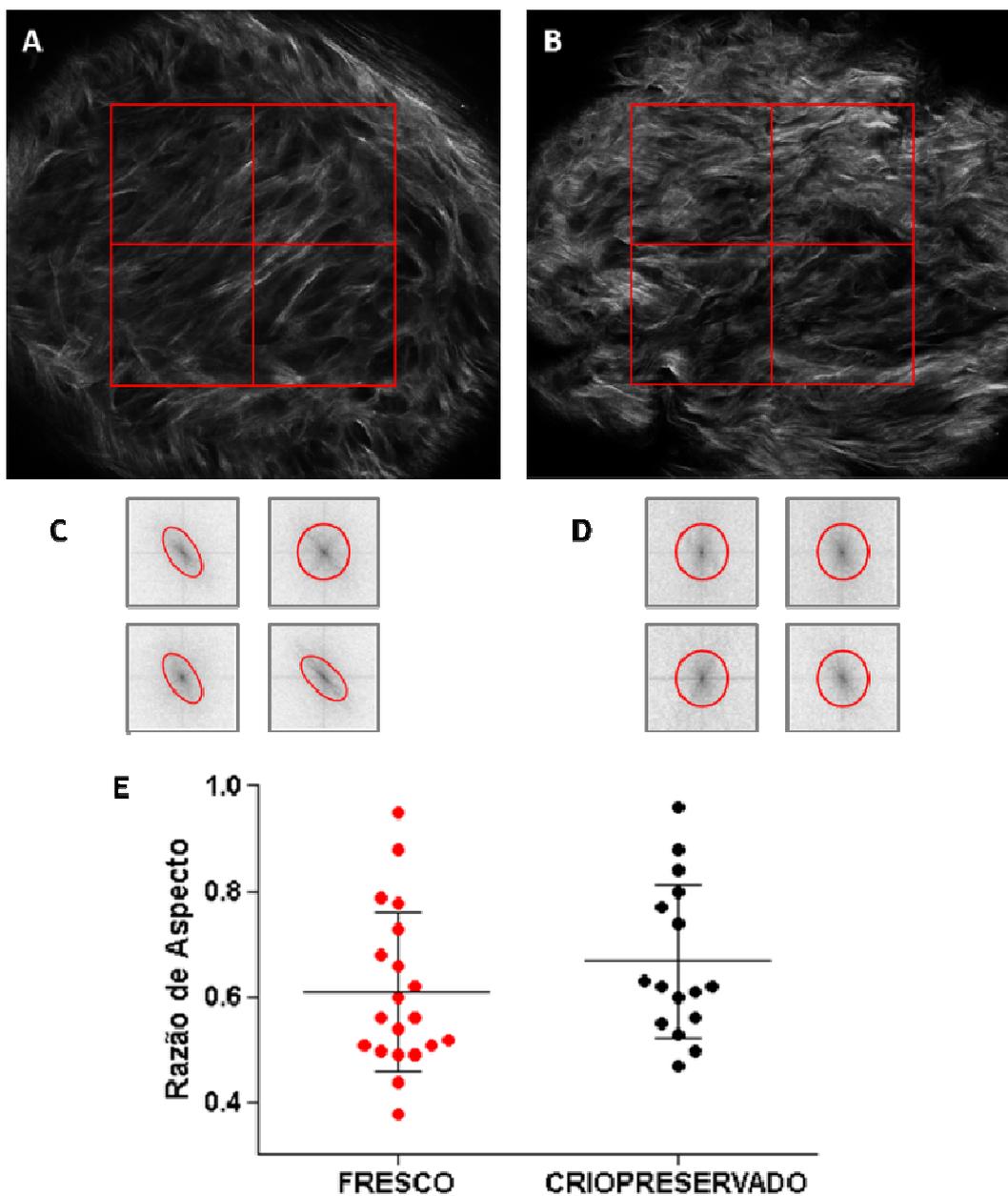
O algoritmo FFT é uma eficiente ferramenta para quantificar a orientação dos feixes de fibras de colágeno. Quanto mais alinhadas forem as fibras de colágeno, pelo SHG ao serem analisadas por FFT uma imagem mais próxima de uma elipse se originada (Figura 21 B e C), de forma que quanto mais perpendicular for o eixo y (longo) desta elipse com relação às fibras de colágeno, mais próximo de 0 (zero) será o valor da razão de aspecto da imagem analisada (Figura 21 D). A razão de aspecto é o valor obtido da imagem gerada pelo algoritmo FFT e considera a razão entre o eixo longo e curto da elipse obtida tendo como produto valores entre 0 a 1 (Equação 1). Desta forma imagens com constituição aleatória das fibras dos feixes de colágeno geram imagens de FFT de aspecto circular (Figura 21 F e G), interpretadas com valores mais próximos de 1 (um) (Figura 21 H).

$$(1) \quad \text{Razão de Aspecto (R.A.)} = \text{Eixo X} / \text{Eixo Y}$$



**Figura 21. Algoritmo FFT.** (A) e (E) imagens geradas por microscopia de SHG transformados em 8 bits, com delimitação de ROI de 200 x 200 pixels (quadrados em vermelho), fresca e criopreservada, respectivamente. (B) Imagem transformada por FFT, indicando o formato elíptico (C) Imagem de formato elíptico, transformada em branco e preto puro, possibilitando o delineamento para posterior análise de R.A. (D) Valores dos eixos x (curto) e y (longo) e da R.A., com valor próximo de 0 (zero). (F) Imagem transformada por FFT, indicando o formato circular. (G) Imagem de formato circular, transformada em branco e preto puro, possibilitando o delineamento para posterior análise de R.A. (H) Valores dos eixos x (curto) e y (longo) e da R.A., com valor próximo de 1 (um).

As imagens das amostras frescas (Figura 22 A) e criopreservadas (Figura 22 B) tiveram 4 regiões de interesse (Region of Interest – ROI) delimitadas para a análise (200 x 200 pixels), representados pelos quadrantes em vermelho. As elipses ou círculos gerados a partir da análise de FFT (Figura 22 C e D) serviram de base para estimar a anisotropia nas amostras frescas ( $0,60 \pm 0,15$ ) e criopreservadas ( $0,67 \pm 0,16$ ), respectivamente. Não houve diferença estatística significativa entre os dados obtidos (Figura 22 E).



**Figura 22. Análise pelo algoritmo FFT.** (A) e (B) imagens geradas por microscopia de SHG transformados em 8 bits, com delimitação de ROI de 200 x 200 pixels (quadrados em vermelho). (C) e (D) Imagens geradas a partir da análise de FFT que serviram de base para estimar a anisotropia nas amostras frescas e criopreservadas, respectivamente, (E) Razão de aspecto sem apresentar diferença estatística significativa.

## **Análise pelo algoritmo GLCM**

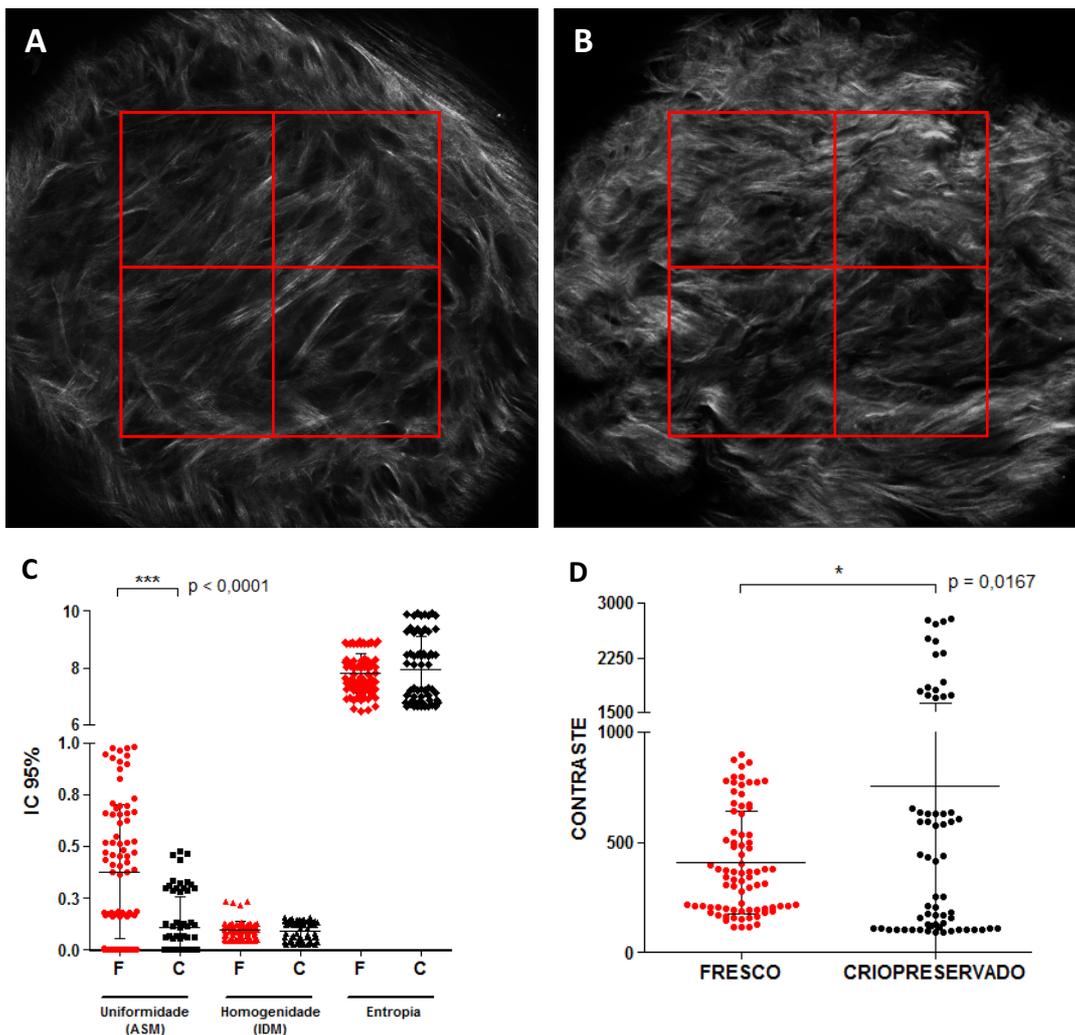
O algoritmo GLCM é uma metodologia que permite a classificação de diferentes tecidos baseada na avaliação do arranjo geométrico da distribuição dos pixels na imagem analisada.

Com este método somos capazes de caracterizar a homogeneidade (IDM), uniformidade (ASM), entropia (complexidade) e contraste da arquitetura das redes de fibras de colágeno dos condrócitos gerados a partir da diferenciação condrogênica das ADCSs após SGH.

No presente estudo o algoritmo GLCM foi aplicado para calcular as variáveis para textura nas quatro orientações ( $0^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $180^\circ$  e  $270^\circ$ ) e em três distâncias entre pixels ( $d=1$ , 5 e 10 pixels) (Apêndice 3), sendo adotada para análise estatística a distância de 10 pixels nas quatro orientações acima descritas. O ROI delimitado para as análises foi de 201 x 201 pixels (Figura 23 A e B).

Quando avaliadas pelos critérios estabelecidos as amostras frescas ( $0,37 \pm 0,32$ ) e criopreservadas ( $0,11 \pm 0,14$ ) apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação à uniformidade das amostras ( $p < 0,0001$ ) (Figura 23 C). Os valores de contraste foram outros dados que apontaram dados significativos ( $p=0,0167$ ) na comparação entre as amostras frescas ( $407,3 \pm 233,6$ ) e criopreservadas ( $755,2 \pm 875,4$ ) (Figura 23 D).

Quanto à homogeneidade das amostras, não houve diferença entre os grupos em estudo ( $0,09 \pm 0,04$ ). As amostras criopreservadas ( $7,95 \pm 1,16$ ) mostraram maior entropia que as frescas ( $7,81 \pm 0,70$ ), porém sem valor estatístico.



**Figura 23. Análise pelo algoritmo GLCM.** (A) e (B) imagens geradas por microscopia de SHG transformados em 8 bits, com delimitação de ROI de 201 x 201 pixels (quadrados em vermelho). (C) As amostras frescas e criopreservadas apresentaram diferença significativa com relação à uniformidade ( $p < 0,0001$ ). Quanto à homogeneidade das amostras, não houve diferença entre os grupos em estudo. Houve maior entropia nas amostras criopreservadas frente as frescas, porém sem valor estatístico. (D) Os valores de contraste foram outros dados que apontaram dados significativos ( $p=0,0167$ ) na comparação entre as amostras frescas e criopreservadas.



## ***Discussão***





A busca por opções terapêuticas para lesões cartilaginosas, conhecidas por serem de difícil reparo, ao longo dos últimos anos, alavancaram estudos com o uso de células-tronco, sendo as células-tronco mesenquimais uma importante fonte celular para o reparo de tais tecidos [6, 109].

A utilização de técnicas tridimensionais vem sendo apontadas como um conveniente sistema no estudo da diferenciação condrogênica, representando uma boa oportunidade de promover e estudar o efeito do contato célula-célula que não é possibilitado em estudo de cultura em monocamada [66]. No entanto a aplicabilidade prática de estudos de terapia celular implica em grande aporte celular, que pode favorecer inconveniências tais como envelhecimento, contaminação celular, comprometimento das características pluripotentes apresentada por estas células ou simplesmente aumento na taxa de morte celular [81].

A utilização de técnicas de criopreservação mostra-se como opção. Por outro lado, esse procedimento pode desencadear riscos celulares, principalmente no que se trata do congelamento intracelular. Buscando evitar os possíveis danos gerados pela criopreservação, o uso de crioprotetores é fundamental, porém seus efeitos sobre as células ainda não são totalmente esclarecidos.

Este projeto teve como objetivo, avaliar se o processo de criopreservação com uso de DMSO pode interferir na capacidade das ADSCs em se diferenciarem em linhagens mesodermis, bem como se ocorreram alterações no arranjo tridimensional do arcabouço de fibras de colágeno produzidas durante o processo de diferenciação condrogênica, pela técnica tridimensional de micromassa.

No presente trabalho, os dados de caracterização das células aderentes presentes no tecido adiposo que foram submetidas ao processo de criopreservação corroboram informação existentes em literatura [110], uma vez que morfológicamente as células em estudo, na quarta passagem, antes e após o processo de criopreservação, apresentaram o formato fibroblastóide característico

do esperado para células-tronco mesenquimais [31, 32]. A imunofenotipagem por citometria de fluxo após o isolamento das células aderentes apresentou similaridade ao existente em literatura, com positividade para marcadores característicos de linhagem mesenquimal e ausência dos marcadores de linhagem hematopoética [33, 34, 110]. A demonstrada capacidade de se diferenciarem em célula de linhagem mesodérmica, tais como adipogênica, condrogênica e osteogênica atinge o intuito de comprovar se as células obtidas de tecido adiposo eram de fato células mesenquimais.

Os estudos de atividade da enzima telomerase e a análise de citogenética demonstraram que as células nas passagens, analisadas não apresentaram potencial tumorigênico. A atividade da enzima telomerase que era de 10% na quarta passagem decresceu no decorrer das passagens, P8 e P12, com respectiva diminuição na atividade da enzima. O cariótipo estas células não apresentou anormalidades cromossômicas.

Tais características somadas à maior disponibilidade de obtenção do tecido adiposo frente a outras fontes faz do tecido adiposo uma atraente opção como fonte de obtenção de células-tronco mesenquimais [26, 61].

Um importante aspecto avaliado no presente foram os níveis de expressão gênica das amostras frescas e criopreservadas submetidas à diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica, linhagens mesodérmicas, com destaque aos genes atuantes nos processos de diferenciação e maturação.

Na diferenciação para linhagem adipogênica o gene *ADIPOQ* teve seus níveis de expressão tanto nas amostras frescas quando nas submetidas ao processo de criopreservação em aumento até 21<sup>o</sup> dias de cultura, com valores mais expressos nas amostras frescas, tais resultados coincidem com o perfil de expressão gênica esperado, uma vez que desse gene foi selecionados para este estudo por se apresentar atuante no processo de maturação de pré-adipócitos, como responsável pela codificação da adiponectina, uma proteína plasmática

derivada de tecido adiposo [97, 98], sua expressão é exclusiva de adipócitos diferenciados [111].

O gene *FABP4* que apresenta um papel chave na regulação da produção de lipídeos em mamíferos, além de atuar de modo crítico na absorção e metabolismo desses ácidos graxos [99] apresentou seus níveis de expressão com aumento gradativo entre os dias 7 e 14 de ambas as amostras. No entanto nas frescas houve estabilidade enquanto que nas criopreservadas notou-se declínio no 21º dia de cultura.

O gene *PPARG*, um fator de transcrição que apresenta um papel regulatório no processo de adipogênese [112-114]. Sua expressão nas amostras frescas apresentou aumento gradual ao longo do processo de diferenciação enquanto que as criopreservadas indicaram um aumento entre o 7º e 14º com ligeiro declínio no 21º.

Os níveis de expressão dos genes *FABP4* e *PPARG* em ambos os grupos de estudo mostraram-se maiores e mais próximos ao esperado nas amostras frescas, contudo, não ultrapassaram o apresentado pelas amostras controles, o que pode ser considerado compreensivo uma vez que as imagens das diferenciações adipogênicas coloradas com Oil Red (Figura 7 A – D) indicaram a presença de múltiplos vacúolos lipídicos que é característico que adipócitos jovens [115], o que difere das amostras controle que consistiram de adipócitos maduros obtidos diretamente de tecido adiposo.

Para a diferenciação osteogênica foi selecionado o gene *COL1A1*, que codifica a proteína colágeno do tipo 1, expressa na matriz extracelular principalmente de tecido ósseo [100, 116]. Quando comparamos as amostras frescas no 7º e 14º dias de cultura da diferenciação osteogênica fresca, nota-se um perfil de expressão gênica com sutil e gradativo aumento, seguido de discreto declínio no 21º dia quando comparadas ao seu respectivo controle. Característica que não se observou na expressão de *COL1A1* analisada nas amostras

criopreservadas, as quais no 7º dia de diferenciação osteogênica apresentaram-se em destaque frente ao observado tanto nas amostras controle quanto no 14º dia, seguido de aumento no 21º dia. O perfil de expressão gênica do *COL1A1* em ambas as amostras, apesar das variações de expressão mostrou-se aumentando, porém é possível observar que nas células criopreservadas os níveis encontrados são superiores que nas amostras frescas.

O aumento da expressão de *COL1A1* sugere uma inclinação efetiva no processo de diferenciação osteogênica, uma vez que a produção de colágeno do tipo I representa grande parte da matriz orgânica óssea. Além de desempenhar um papel significativo na diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas em linhagem osteogênica, atuando na promoção adesão celular e mineralização óssea [116-119].

Outro gene que teve seus níveis investigados na diferenciação osteogênica foi *OC*, um conhecido como biomarcador da osteogênese, sendo comumente encontrado em osteoblastos nas proximidades da superfície óssea [101-103]. Na cultura das amostras frescas a expressão gênica de *OC* entre os dias de cultura variaram sutilmente alcançando seu maior valor no 14º dia, aumento este que se mostrou significativo se comparado com 21º dia e as amostras controle. Inversamente ao observado nas amostras frescas, as criopreservadas obtiveram no 14º dias de cultura osteogênica os menores níveis de expressão, se comparado com os demais dias deste grupo.

A *OC*, importante componente orgânico não-colágeno, da matriz extra celular com seus níveis de expressão aumentados corrobora os resultados obtidos com a investigação do gene *COL1A1*, indicando efetiva diferenciação osteogênica em ambas as amostras, com resultados mais expressivos nas amostras criopreservadas em detrimento às frescas.

A *OPN*, gene conhecido por estar presente durante o processo de osteogênese [101-103], também mostrou maiores níveis de expressão nas

amostras criopreservadas, tanto no controle quanto nos demais dias, contando com aumento nos dias 7 e 14 de cultura e queda no dia 21. O grupo de amostras frescas apresentou uma queda significativa nos níveis de expressão do gene *OPN* no 7º, 14º e 21º dia de cultura, quando comparado com as amostras controles.

Os resultados obtidos por nosso trabalho divergem de Weireb e colaboradores, que em 1990 [102] que encontraram maior presença de *OPN* em relação à *OC* em estudo da diferenciação osteoblástica durante a formação óssea.

No entanto, os níveis de expressão gênica de *COL1A1* e *OC*, somados com os evidentes depósitos de cálcio apresentados nas colorações de Alizarina Red S nos permitem inferir que as ADSCs foram capazes de se diferenciar em linhagem osteogênica, com maiores níveis de expressão gênica em amostras submetidas ao processo de criopreservação.

O processo de condrogênese e conseqüente formação de MEC são considerados uma cadeia de eventos que dão origem a um construto tridimensional no qual as moléculas de colágeno do tipo II, em maior quantidade, juntamente com as fibras de colágeno tipo I, III, V, VI, IX, XI, XII e XV [2], proteoglicanas, outras proteínas presentes em menos quantidade e moléculas de água, interagem entre si, proporcionando características físicas e mecânicas singulares ao tecido cartilaginoso [120]. Tais características organizacionais fazem com que este tecido tenha ausência de irrigação sanguínea direta e drenagem por vasos linfáticos por conseqüência não existam células de reparo, caracterizando este, como um tecido de baixa resposta a injúrias, de difícil reparo, cujas lesões facilmente se cronificam. Com a finalidade de responder a parte das perguntas propostas nos objetivos do presente trabalho avaliamos a expressão de genes envolvidos com o processo de diferenciação condrogênica e formação de matriz extra celular em ADSCs submetidas a técnica de cultura tridimensional de micromassa em amostras frescas e criopreservadas.

Os genes *COL1A1*, *COL2A1*, *AGCAN* e do fator de transcrição *SOX9* foram estudados e tiveram suas expressões calibradas por ADSCs frescas e criopreservadas submetidas à formação de micromassa sem o uso de meio indutor condrogênico, controle este que deu maior segurança nos resultados analisados.

O fator de transcrição *SOX9* desempenha um papel chave no processo de condrogênese [121, 122], uma vez que atua como regulador positivo na produção de colágeno do tipo 2 e proteínas agreganas, conhecidas por se ligarem às estruturas de colágeno do tipo 2 e formarem a MEC com propriedades físico/mecânicas típicas da cartilagem articular [105].

Além disso, estudos indicam que *SOX9* desempenha um papel como agente regulatório negativo da hipertrofia condrocítica, um dos passos iniciais na de formação de tecido ósseo, influenciando de modo inibitório genes relacionados a esse processo de osteogênese, *COL1A1*, *COL10A1*, *ALP*, *MMP13* e *OPN* [122]. Sendo que a sua deficiência é associada a uma malformação óssea e cartilaginosa [104]

Deste modo, o perfil de expressão de *SOX9* consiste em aumento gradativo ao longo da diferenciação condrogênica, o que ocorreu até o 14º dia nas frescas e somente foi possível verificar aumento no 21º dia em uma das amostras criopreservadas (*out layer*), notando-se nas demais, níveis bem abaixo dos verificados nas amostras frescas.

Em ambos os grupos estudados os níveis obtidos do gene *AGCAN* corresponderam coerentemente ao provável estímulo de *SOX9*, tendo seu perfil de expressão gênica muito similar ao do referido fator de transcrição.

Responsável pela codificação da proteína mais expressa na matriz extracelular do tecido cartilaginoso articular [106], *COL2A1* apresentou-se nas amostras frescas com o mesmo perfil encontrado nos genes *SOX9*, fazendo

desses resultados, coerentes, robustos e dentro do esperado, ou seja, apresentando-se maiores que as amostras controles, mesmo com valores descaídos no 21<sup>o</sup> dia de cultura e abaixo dos valores expressos nas amostras criopreservadas. Estas últimas mostraram-se mais expressas e em comparação com as amostras controles houve menor expressão no 7<sup>o</sup> dia, com aumento no 14<sup>o</sup> sem sustentação ao término do período de cultura. Apesar da aparência positiva destes resultados é possível verificar que não há respaldo dos demais genes “parceiros” do processo de diferenciação, como *SOX9* e *AGCAN*, o que levanta questionamento sobre a necessidade de um maior número de amostras para melhor avaliar a modulação gênica no processo de criopreservação.

O gene *COL1A1*, codificador da proteína colágeno do tipo 1 expressa na matriz extracelular de tecidos cartilagosos e de tecido ósseo, apresentou aumento gradativo de expressão ao longo dos dias do processo de diferenciação condrogênica em ambas amostras. Esse aumento de expressão não é desejado, no entanto é um dado que indica a dificuldade da produção de tecido cartilaginoso de alta qualidade, evidenciado o possível caminho para a produção de uma cartilagem com característica fibrosa [123-125], com propriedades incompatíveis com as existentes na cartilagem articular articulações [1, 3, 4].

O aumento da expressão deste gene provavelmente está diretamente relacionado com a queda dos níveis de expressão dos genes *SOX9* e *AGCAN* em ambas as amostras estudadas, o que se assemelha a resultados obtidos em literatura que indicam o declínio dos níveis de expressão gênica de *SOX9* em consequente aumento dos níveis de expressão de *COL1A1* e *COL10A1*, associados ao processo de hipertrofia de condrócitos [122].

A microscopia de SHG mostrou-se uma ferramenta diferencial no presente projeto, uma vez que possibilitou a análise do perfil das fibras de colágeno formadas durante a diferenciação condrogênica pela técnica de micromassa. A razão de aspecto do direcionamento das fibras de colágeno, verificados através da

anisotropia as imagens, mostrou maior alinhamento nas amostras frescas quando comparadas com as amostras criopresevadas, porém sem apresentar significância estatística. Esses dados são confirmados com a análise de contraste das imagens apontando diferença significativa na comparação entre as amostras frescas e criopresevadas, isso se explica considerando que quanto mais desarranjado for o alinhamento das fibras na imagem analisada maior será o contraste entre os pixels desta imagem.

Tais resultados sugerem que o processo de criopresevação teve uma influencia negativa no arranjo tridimensional das fibras de colágeno produzidas pelas ADSC através da técnica de micromassa, uma vez que o reparo de lesões cartilaginosas necessita levar em consideração a efetividade e eficácia do processo de remodelamento tecidual [66], que só possível quando as fibras de colágeno obtidas atendem as necessidades exclusivas do tecido cartilaginoso [65]. A maior entropia das amostras criopresevadas frente às amostras frescas, mesmo sem valor estatístico significativo tende a corroborar os resultados descritos.

Na mesma linha e concluindo as análises de textura, a uniformidade das fibras de colágeno nas amostras frescas foi significativamente maior que nas criopresevadas, não restando dúvida quanto ao efeito negativo do processo de criopresevação das ADSC quanto na produção de fibras de colágeno. Esses achados são de grande importância uma vez que a organização tridimensional das fibras de colágeno existentes na matriz extra celular do tecido cartilaginoso é apontado com sendo um fator decisivo na determinação das qualidades físico-mecânicas apresentadas pelos diversos tipos de cartilagem existentes no organismo [65].

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o processo de criopresevação, com o uso do criopresevante dimetilsulfóxido, não altera os

dados de caracterização das células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo.

Dados macroscópicos não apontam alteração no processo de formação da micromassa durante a diferenciação condrogênica, porém a modulação gênica nesta linhagem aponta para um comprometimento na qualidade do processo de diferenciação, resultados que foram corroborados pela análise das fibras de colágeno obtidas pela técnica de microscopia de geração de segundo harmônico.

Os achados aqui descritos neste trabalho são muito promissores, uma vez que não existem em literatura dados comparando o perfil da expressão gênica de ADSCs quando submetidas ao processo de criopreservação, sendo inédita também a minuciosa análise da qualidade das fibras de colágeno obtidas de amostras frescas e criopreservadas produzidas através da técnica de cultivo em alta densidade. Esse estudo abre caminho para novas investigações quanto aos efeitos da criopreservação de ADSCs no reparo cartilaginoso *in vivo*, gerando informações necessárias para a evolução eficiente e segura da aplicabilidade clínica da terapia celular.



***Conclusão***





O conjunto de experimentos e resultados apresentados neste trabalho com células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo criopreservadas com dimetilsulfóxido (DMSO) possibilitam as seguintes conclusões:

1. Quando indiferenciadas não sofreram alterações nas características morfológicas e fenotípicas.
2. Mantem a capacidade de diferenciação em linhagens mesodermais, ao serem avaliadas por aspectos histológicos.
3. Macroscopicamente não houve diferença na capacidade de diferenciação condrogênica pela técnica de micromassa.
4. A análise dos níveis de expressão gênica da diferenciação em linhagem adipogênica não apontou diferença frente ao perfil apresentando, porém havendo maiores nível de expressão nas amostras frescas.
5. A criopreservação modulou positivamente os níveis de expressão dos genes relacionados com a diferenciação osteogênica.
6. A criopreservação influenciou negativamente a expressão dos genes *SOX9* e *AGCAN* nas amostras diferenciadas para linhagem condrogênica pela técnica tridimensional de micromassa.
7. O gene *COL2A1* mostrou seus maiores valores nas amostras criopreservadas, porém foram as amostras frescas que tiveram maior harmonia no perfil de expressão dos genes relacionados à diferenciação condrogênica.
8. A expressão do gene *COL1A1* mostrou-se modulada positivamente em ambos os grupos estudados. Dados que apontam a dificuldade da produção de tecido cartilaginoso com as características esperadas para a cartilagem hialina constituinte da cartilagem articular.
9. Análise detalhada das fibras de colágeno através da microscopia de Geração de Segundo Harmônico indicou alterações negativas nas fibras de colágeno produzidas pelas amostras criopreservadas.



## ***Referências Bibliográficas***





1. Little, C.J., N.K. Bawolin, and X. Chen, *Mechanical properties of natural cartilage and tissue-engineered constructs*. *Tissue Eng Part B Rev.* **17**(4): p. 213-27.
2. Eyre, D., *Collagen of articular cartilage*. *Arthritis Res*, 2002. **4**(1): p. 30-5.
3. Mankin, H.J., *The response of articular cartilage to mechanical injury*. *J Bone Joint Surg Am*, 1982. **64**(3): p. 460-6.
4. Marlovits, S., et al., *Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation*. *Eur J Radiol*, 2006. **57**(1): p. 24-31.
5. Hunziker, E.B., T.M. Quinn, and H.J. Hauselmann, *Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. **10**(7): p. 564-72.
6. Hildner, F., et al., *State of the art and future perspectives of articular cartilage regeneration: a focus on adipose-derived stem cells and platelet-derived products*. *J Tissue Eng Regen Med.* **5**(4): p. e36-51.
7. Rousseau, J. and P. Garnero, *Biological markers in osteoarthritis*. *Bone.* **51**(2): p. 265-77.
8. Suri, P., D.C. Morgenroth, and D.J. Hunter, *Epidemiology of osteoarthritis and associated comorbidities*. *Pm R.* **4**(5 Suppl): p. S10-9.
9. Alford, J.W. and B.J. Cole, *Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options*. *Am J Sports Med*, 2005. **33**(2): p. 295-306.
10. Czitrom, A.A., et al., *Bone and cartilage allotransplantation. A review of 14 years of research and clinical studies*. *Clin Orthop Relat Res*, 1986(208): p. 141-5.
11. Brittberg, M., et al., *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(14): p. 889-95.
12. Hangody, L., et al., *Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report*. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 1997. **5**(4): p. 262-7.
13. Szerb, I., et al., *Mosaicplasty: long-term follow-up*. *Bull Hosp Jt Dis*, 2005. **63**(1-2): p. 54-62.
14. McLaren, A.C., et al., *Arthroscopic debridement of the knee for osteoarthrosis*. *Can J Surg*, 1991. **34**(6): p. 595-8.
15. Bert, J.M., *Role of abrasion arthroplasty and debridement in the management of osteoarthritis of the knee*. *Rheum Dis Clin North Am*, 1993. **19**(3): p. 725-39.
16. Sledge, S.L., *Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries*. *Clin Sports Med*, 2001. **20**(2): p. 365-77.
17. Hunziker, E.B., *Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. **10**(6): p. 432-63.
18. Peterson, L., et al., *Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years*. *J Bone Joint Surg Am*, 2003. **85-A Suppl 2**: p. 17-24.
19. Haddo, O., et al., *The use of chondroglide membrane in autologous chondrocyte implantation*. *Knee*, 2004. **11**(1): p. 51-5.
20. Nicoll, S.B., et al., *Modulation of proteoglycan and collagen profiles in human dermal fibroblasts by high density micromass culture and treatment with lactic acid suggests change to a chondrogenic phenotype*. *Connect Tissue Res*, 2001. **42**(1): p. 59-69.

21. Resinger, C., V. Vecsei, and S. Marlovits, [*Therapeutic options in the treatment of cartilage defects. Techniques and indications*]. Radiologe, 2004. **44**(8): p. 756-62.
22. Trattng, S., et al., *Matrix-based autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: noninvasive monitoring by high-resolution magnetic resonance imaging*. Magn Reson Imaging, 2005. **23**(7): p. 779-87.
23. Nuernberger, S., et al., *The influence of scaffold architecture on chondrocyte distribution and behavior in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts*. Biomaterials. **32**(4): p. 1032-40.
24. Johnstone, B., et al., *In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. Exp Cell Res, 1998. **238**(1): p. 265-72.
25. Mackay, A.M., et al., *Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow*. Tissue Eng, 1998. **4**(4): p. 415-28.
26. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 211-28.
27. Hildner, F., et al., *State of the art and future perspectives of articular cartilage regeneration: a focus on adipose-derived stem cells and platelet-derived products*. J Tissue Eng Regen Med.
28. van der Kooy, D. and S. Weiss, *Why stem cells?* Science, 2000. **287**(5457): p. 1439-41.
29. Barry, F.P. and J.M. Murphy, *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): p. 568-84.
30. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970. **3**(4): p. 393-403.
31. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
32. Caplan, A.I., *The mesengenic process*. Clin Plast Surg, 1994. **21**(3): p. 429-35.
33. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
34. Chamberlain, G., et al., *Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing*. Stem Cells, 2007. **25**(11): p. 2739-49.
35. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
36. Williams, J.T., et al., *Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes*. Am Surg, 1999. **65**(1): p. 22-6.
37. Nuttall, M.E., et al., *Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(3): p. 371-82.
38. Hellstrom, M., et al., *Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse*. Development, 1999. **126**(14): p. 3047-55.
39. Caplan, A.I., et al., *Principles of cartilage repair and regeneration*. Clin Orthop Relat Res, 1997(342): p. 254-69.
40. Bernard-Beaubois, K., et al., *Culture and characterization of juvenile rabbit tenocytes*. Cell Biol Toxicol, 1997. **13**(2): p. 103-13.

41. in 't Anker, P.S., et al., *Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential*. *Haematologica*, 2003. **88**(8): p. 845-52.
42. Young, H.E., et al., *Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs*. *Dev Dyn*, 1995. **202**(2): p. 137-44.
43. Toma, J.G., et al., *Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(9): p. 778-84.
44. Campagnoli, C., et al., *Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow*. *Blood*, 2001. **98**(8): p. 2396-402.
45. In 't Anker, P.S., et al., *Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation*. *Blood*, 2003. **102**(4): p. 1548-9.
46. Secco, M., et al., *Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood!* *Stem Cells*, 2008. **26**(1): p. 146-50.
47. Erices, A., P. Conget, and J.J. Minguell, *Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood*. *Br J Haematol*, 2000. **109**(1): p. 235-42.
48. Egusa, H., et al., *Stem cells in dentistry - Part I: Stem cell sources*. *J Prosthodont Res*. **56**(3): p. 151-65.
49. Daher, S.R., et al., *Adipose stromal/stem cells: basic and translational advances: the IFATS collection*. *Stem Cells*, 2008. **26**(10): p. 2664-5.
50. Minguell, J.J., A. Erices, and P. Conget, *Mesenchymal stem cells*. *Exp Biol Med* (Maywood), 2001. **226**(6): p. 507-20.
51. Kashofer, K. and D. Bonnet, *Gene therapy progress and prospects: stem cell plasticity*. *Gene Ther*, 2005. **12**(16): p. 1229-34.
52. Ding, D.C., W.C. Shyu, and S.Z. Lin, *Mesenchymal stem cells*. *Cell Transplant*. **20**(1): p. 5-14.
53. Nauta, A.J. and W.E. Fibbe, *Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells*. *Blood*, 2007. **110**(10): p. 3499-506.
54. Banas, A., et al., *Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **24**(1): p. 70-7.
55. Wan, C.D., et al., *Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model*. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2008. **7**(1): p. 29-33.
56. Wei, X., et al., *IFATS Series: The Conditioned Media of Adipose Stromal Cells Protect Against Hypoxia-Ischemia-Induced Brain Damage in Neonatal Rats*. *Stem Cells*, 2008.
57. Caplan, A.I., *Why are MSCs therapeutic? New data: new insight*. *J Pathol*, 2009. **217**(2): p. 318-24.
58. Rasmusson, I., et al., *Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes*. *J Leukoc Biol*, 2007. **82**(4): p. 887-93.
59. Pierdomenico, L., et al., *Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp*. *Transplantation*, 2005. **80**(6): p. 836-42.
60. Chivu, M., et al., *In vitro hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells under differential exposure to liver-specific factors*. *Transl Res*, 2009. **154**(3): p. 122-32.

61. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
62. Banas, A., et al., *IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury*. Stem Cells, 2008. **26**(10): p. 2705-12.
63. Furukawa, T., et al., *Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee*. J Bone Joint Surg Am, 1980. **62**(1): p. 79-89.
64. Nehrer, S., M. Spector, and T. Minas, *Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures*. Clin Orthop Relat Res, 1999(365): p. 149-62.
65. Altendorf, H., et al., *Imaging and 3D morphological analysis of collagen fibrils*. J Microsc. **247**(2): p. 161-175.
66. Wescoe, K.E., et al., *The role of the biochemical and biophysical environment in chondrogenic stem cell differentiation assays and cartilage tissue engineering*. Cell Biochem Biophys, 2008. **52**(2): p. 85-102.
67. Mello, M.A. and R.S. Tuan, *High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999. **35**(5): p. 262-9.
68. Mello, M.A. and R.S. Tuan, *Effects of TGF-beta1 and triiodothyronine on cartilage maturation: in vitro analysis using long-term high-density micromass cultures of chick embryonic limb mesenchymal cells*. J Orthop Res, 2006. **24**(11): p. 2095-105.
69. Dumas, D., et al., *SHG as a new modality for large field of view imaging to monitor tissue collagen network*. Biomed Mater Eng. **22**(1): p. 159-62.
70. Campagnola, P.J., et al., *Second-harmonic imaging microscopy of living cells*. J Biomed Opt, 2001. **6**(3): p. 277-86.
71. Campagnola, P.J., et al., *High-resolution nonlinear optical imaging of live cells by second harmonic generation*. Biophys J, 1999. **77**(6): p. 3341-9.
72. Polge, C., A.U. Smith, and A.S. Parkes, *Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures*. Nature, 1949. **164**(4172): p. 666.
73. Armitage, W.J., *Cryopreservation of animal cells*. Symp Soc Exp Biol, 1987. **41**: p. 379-93.
74. Li, T., et al., *Bulk vitrification of human embryonic stem cells*. Hum Reprod, 2008. **23**(2): p. 358-64.
75. Carvalho, K.A., et al., *Evaluation of bone marrow mesenchymal stem cell standard cryopreservation procedure efficiency*. Transplant Proc, 2008. **40**(3): p. 839-41.
76. Costa, P.F., et al., *Cryopreservation of Cell/Scaffold Tissue-Engineered Constructs*. Tissue Eng Part C Methods.
77. Feng, Z., et al., *Fresh and cryopreserved, uncultured adipose tissue-derived stem and regenerative cells ameliorate ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury*. Nephrol Dial Transplant. **25**(12): p. 3874-84.
78. Fleming, K.K. and A. Hubel, *Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells*. Transfus Apher Sci, 2006. **34**(3): p. 309-15.
79. Freimark, D., et al., *Systematic parameter optimization of a Me(2)SO- and serum-free cryopreservation protocol for human mesenchymal stem cells*. Cryobiology. **63**(2): p. 67-75.
80. Lee, S.Y., et al., *Magnetic cryopreservation for dental pulp stem cells*. Cells Tissues Organs. **196**(1): p. 23-33.

81. Xiang, Y., et al., *Ex vivo expansion, adipogenesis and neurogenesis of cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells*. Cell Biol Int, 2007. **31**(5): p. 444-50.
82. Heng, B.C., et al., *Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis*. J Biomed Sci, 2006. **13**(3): p. 433-45.
83. Pegg, D.E., *Principles of cryopreservation*. Methods Mol Biol, 2007. **368**: p. 39-57.
84. Pegg, D.E., *The history and principles of cryopreservation*. Semin Reprod Med, 2002. **20**(1): p. 5-13.
85. Kotobuki, N., et al., *Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells*. Tissue Eng, 2005. **11**(5-6): p. 663-73.
86. Lee, R.H., et al., *Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue*. Cell Physiol Biochem, 2004. **14**(4-6): p. 311-24.
87. Lee, M.W., et al., *Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **320**(1): p. 273-8.
88. Ock, S.A. and G.J. Rho, *Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cryopreservation of porcine mesenchymal stem cells (pMSCs)*. Cell Transplant, 2011. **20**(8): p. 1231-9.
89. Buchanan, S.S., et al., *Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line*. Stem Cells Dev, 2004. **13**(3): p. 295-305.
90. Chang, C.F., et al., *Fibronectin and pellet suspension culture promote differentiation of human mesenchymal stem cells into insulin producing cells*. J Biomed Mater Res A, 2008. **86**(4): p. 1097-105.
91. Zhang, L., et al., *Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems*. Biotechnol Lett. **32**(9): p. 1339-46.
92. Izadpanah, R., et al., *Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells*. Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4229-38.
93. Seabright, M., *A rapid banding technique for human chromosomes*. Lancet, 1971. **2**(7731): p. 971-2.
94. Cicchi, R., et al., *Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy*. J Biophotonics, 2010. **3**(1-2): p. 34-43.
95. Honorati, M.C., L. Cattini, and A. Facchini, *VEGF production by osteoarthritic chondrocytes cultured in micromass and stimulated by IL-17 and TNF-alpha*. Connect Tissue Res, 2007. **48**(5): p. 239-45.
96. Gruber, H.E., et al., *Micromass culture of human anulus cells: morphology and extracellular matrix production*. Spine (Phila Pa 1976), 2010. **35**(10): p. 1033-8.
97. Vasseur, F., et al., *The genetics of adiponectin*. Curr Diab Rep, 2003. **3**(2): p. 151-8.
98. Yang, W.S. and L.M. Chuang, *Human genetics of adiponectin in the metabolic syndrome*. J Mol Med, 2006. **84**(2): p. 112-21.
99. Ojeda, A., et al., *Unexpected high polymorphism at the FABP4 gene unveils a complex history for pig populations*. Genetics, 2006. **174**(4): p. 2119-27.
100. Adams, J.C. and F.M. Watt, *Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix*. Development, 1993. **117**(4): p. 1183-98.

101. Wen, Y., et al., *Superior osteogenic capacity of different mesenchymal stem cells for bone tissue engineering*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.
102. Weinreb, M., D. Shinar, and G.A. Rodan, *Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization*. J Bone Miner Res, 1990. **5**(8): p. 831-42.
103. Mason, D.J., R.A. Hillam, and T.M. Skerry, *Constitutive in vivo mRNA expression by osteocytes of beta-actin, osteocalcin, connexin-43, IGF-I, c-fos and c-jun, but not TNF-alpha nor tartrate-resistant acid phosphatase*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(3): p. 350-7.
104. de Crombrughe, B., V. Lefebvre, and K. Nakashima, *Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(6): p. 721-7.
105. Watanabe, H., *[Cartilage proteoglycan aggregate: structure and function]*. Clin Calcium, 2004. **14**(7): p. 9-14.
106. von der Mark, K., et al., *Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture*. Nature, 1977. **267**(5611): p. 531-2.
107. Lutz, V., et al., *Characterization of fibrillar collagen types using multi-dimensional multiphoton laser scanning microscopy*. Int J Cosmet Sci. **34**(2): p. 209-15.
108. Lutz, V., et al., *Impact of collagen crosslinking on the second harmonic generation signal and the fluorescence lifetime of collagen autofluorescence*. Skin Res Technol. **18**(2): p. 168-79.
109. Richter, W., *Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration*. J Intern Med, 2009. **266**(4): p. 390-405.
110. Zhao, Z.G., et al., *Hematopoiesis capacity, immunomodulatory effect and ex vivo expansion potential of mesenchymal stem cells are not impaired by cryopreservation*. Cancer Invest, 2008. **26**(4): p. 391-400.
111. Berg, A.H., T.P. Combs, and P.E. Scherer, *ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(2): p. 84-9.
112. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma*. Curr Opin Genet Dev, 1995. **5**(5): p. 571-6.
113. Fajas, L., J.C. Fruchart, and J. Auwerx, *Transcriptional control of adipogenesis*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(2): p. 165-73.
114. Brun, R.P., et al., *Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(6): p. 826-32.
115. Gregoire, F.M., C.M. Smas, and H.S. Sul, *Understanding adipocyte differentiation*. Physiol Rev, 1998. **78**(3): p. 783-809.
116. Mathews, S., et al., *A novel tripolymer coating demonstrating the synergistic effect of chitosan, collagen type 1 and hyaluronic acid on osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun. **414**(1): p. 270-6.
117. Salaszyk, R.M., et al., *Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells*. J Biomed Biotechnol, 2004. **2004**(1): p. 24-34.

118. Mizuno, M. and Y. Kuboki, *Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen*. J Biochem, 2001. **129**(1): p. 133-8.
119. Mizuno, M., R. Fujisawa, and Y. Kuboki, *Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen-alpha2beta1 integrin interaction*. J Cell Physiol, 2000. **184**(2): p. 207-13.
120. Aigner, T. and J. Stove, *Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(12): p. 1569-93.
121. Lefebvre, V., et al., *SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(4): p. 2336-46.
122. Venkatesan, J.K., et al., *SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells*. Stem Cell Res Ther. **3**(3): p. 22.
123. Danisovic, L., I. Varga, and S. Polak, *Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. Tissue Cell. **44**(2): p. 69-73.
124. Galois, L., et al., *[Cartilage tissue engineering: state-of-the-art and future approaches]*. Pathol Biol (Paris), 2005. **53**(10): p. 590-8.
125. Kaul, G., et al., *Failed cartilage repair for early osteoarthritis defects: a biochemical, histological and immunohistochemical analysis of the repair tissue after treatment with marrow-stimulation techniques*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.
126. Kong, C. and M.F. Hansen, *Biomarkers in Osteosarcoma*. Expert Opin Med Diagn, 2009. **3**(1): p. 13-23.
127. Niforou, K.M., et al., *The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line*. Cancer Genomics Proteomics, 2008. **5**(1): p. 63-78.
128. Meijerink, E., et al., *Picogram cloning and direct in situ sequencing of DNA from gel pieces*. Biotechniques, 2001. **31**(4): p. 802-4, 806, 808, 810.



***Anexos***





## **ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Coleta de Tecido Adiposo por Cirurgia de Lipoaspiração**

Caro paciente, gostaríamos de lhe convidar para participar do projeto **“Análise comparativa do efeito da criopreservação com dimetilsulfoxido (DMSO) em células-tronco mesenquimais obtidas de Tecido Adiposo”**. A sua participação seria na forma de doação de 20ml da gordura aspirada durante o procedimento de lipoaspiração, ao qual você irá se submeter no dia \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_. Normalmente a gordura aspirada é desprezada, vai para o lixo. A gordura é uma fonte de células tronco mesenquimais que serão utilizadas no projeto acima citado.

Este projeto consiste na comparação do efeito do congelamento a baixas temperaturas de células tronco mesenquimais obtidas de gordura. Para isso em analisaremos as células-tronco obtidas de gordura antes e após o congelamento, realizaremos a diferenciação dessas células em adipócitos (células de gordura), osteócitos (células de osso) e condrócitos (células de cartilagem). Após esse processo realizaremos a comparação dos resultados encontrados. A realização de estudos com esse grupo celular pode ter maior conhecimento do que acontece com as células-tronco congeladas e se elas ainda mantem as mesmas características. As possíveis intercorrências são as já descritas no termo de consentimento que você já assinou para realizar esta cirurgia, pela disciplina de cirurgia plástica deste hospital. Apesar da doação da gordura já lipoaspirada não apresentar dano ou risco ao doador, se houver, o doador será indenizado. Se não quiser autorizar esta doação, não haverá nenhum prejuízo ao seu atendimento no Complexo Hospitalar HC, CAISM, Hemocentro da UNICAMP.

Portanto, não há riscos ou perigo algum decorrente da doação deste material (gordura). Os dados da pesquisa serão publicados independentemente se positivos ou negativos. Será assegurada a privacidade e confidencialidade dos dados do doador no momento da divulgação dos resultados.

Para que a doação ocorra é necessário ler atentamente, esclarecer suas dúvidas e assinar o termo de consentimento abaixo:

Eu, \_\_\_\_\_,  
registro hospitalar: \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_,  
Fui convidado e concordei em participar do estudo “**Análise comparativa do efeito da criopreservação com Dimetilsulfóxido (Me<sub>2</sub>SO<sup>o</sup>) (DMSO) em células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo**”. Autorizo a doação de 20 ml de tecido adiposo, coletados durante a cirurgia de lipoaspiração a que serei submetida em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_. Este material será utilizado no projeto de pesquisa acima citado. Informo que fui devidamente esclarecido (a) sobre todas as possíveis intercorrências que possam decorrer deste procedimento, já descritas no termo de consentimento livre esclarecido de autorização para cirurgia. Fui informado (a) que se não entender o que acabei de ler, devo pedir aos médicos que estão envolvidos neste projeto, Dra. Ângela Luzo e Dra. Sara T. Olalla Saad, ambas do Hemocentro da Unicamp (F: 19 3521-7003) à bióloga Marilisa Ferruda Andreoli Riso (F: 19 3521-8611), que me expliquem novamente para que não fique com dúvida. Se tiver reclamações sobre o procedimento, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM da UNICAMP através do telefone 19 3521-8936.

Todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas e minhas dúvidas esclarecidas. A opção de doação foi tomada de modo consciente, livre e voluntário.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do doador, RG:

\_\_\_\_\_  
Assinaturas e CRM do médico aplicador do termo de consentimento

Campinas, ...../...../.....

## ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética

  
UNICAMP

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 25/08/09.  
(PARECER CEP: Nº 997/2008)

**PARECER**

**I - IDENTIFICAÇÃO:**

PROJETO: "AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE CÉLULAS MESENQUIMAIS OBTIDAS DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E DE TECIDO ADIPOSEO HUMANOS NA DIFERENCIAÇÃO PARA HEPATÓCITOS".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marília Iracema Leonardi

**II - PARECER DO CEP.**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui o projeto: "ANÁLISE COMPARATIVA DE PROTEOMA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E TECIDO ADIPOSEO DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO PARA LINHAGEM HEPATOCITICA", com a finalidade de dissertação de mestrado da aluna Marilisa Ferrada Andreoli, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

**III – DATA DA REUNIÃO.**

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de agosto de 2009.

  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Cidade Postal 611  
13083-867 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7107  
cep@fcm.unicamp.br

Página 1 de 1

### **ANEXO 3 – Submissão de Artigo**

Em fase de pré-submissão até o momento de impressão da presente dissertação.

## **Second Harmonic Generation Microscopy Used to Evaluate the Effect of the Dimethyl Sulfoxide Cryopreservation Process in Collagen Fibers of Differentiated Chondrocytes**

M. F. Andreoli-Rizzo<sup>a</sup>, A. S. S. Duarte<sup>a</sup>, T. B. Ribeiro<sup>a</sup>, P. Bordeaux-Rago<sup>a</sup>, A. Luzo<sup>b</sup>, M. O. Baratti<sup>c</sup>, J. Adur<sup>d</sup>, A. A. de Thomas<sup>e</sup>, V. B. Pelegati<sup>f</sup>, H. F. Carvalho<sup>f</sup>, C. L. Cesar<sup>g</sup>, P. Khamudayan<sup>h</sup>, F. F. Costa<sup>g</sup> and S. T. Ohalla-Saad<sup>g</sup>

<sup>a</sup>Department of Internal Medicine, Hematology and Hemotherapy Center - Hemocentro, School of Medical Science, UNICAMP. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, Campinas, Brazil.

<sup>b</sup>Cord Blood Bank, Hematology and Hemotherapy Center - Hemocentro, School of Medical Science, UNICAMP. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, Campinas, Brazil.

<sup>c</sup>Lab. de Aplicações Biomédicas de Lasers, IFGW, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil;

<sup>d</sup>Lab. de Microscopia Aplicada a Estudos Moleculares y Celulares, FI UNER, Argentina;

<sup>e</sup>Instituto de Biologia – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

<sup>f</sup>Plastic Surgery Service, School of Medical Science, University of Campinas-UNICAMP, Campinas, Brazil.

### **ABSTRACT**

Cartilaginous lesions are a significant public health problem and the use of adult stem cells represents a promising therapy for this condition. Cryopreservation confers many advantages for practitioners engaged in cell-based therapies. However, conventional slow freezing has always been associated with damage and mortality due to intracellular ice formation, cryoprotectant toxicity, and dehydration. The aim of this work is to observe the effect of the usual Dimethyl Sulfoxide (DMSO) cryopreservation process on the architecture of the collagen fiber network of chondrogenic cells from mesenchymal stem cells by Second Harmonic Generation (SHG) microscopy. To perform this study we used Mesenchymal Stem Cells (MSC) derived from adipose tissue which presents the capacity to differentiate into other lineages such as osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages. Mesenchymal stem cells obtained after liposuction were isolated digested by collagenase type I and characterization was carried out by differentiation of mesodermic lineages, and flow cytometry using specific markers. The isolated MSCs were cryopreserved by the DMSO technique and the chondrogenic differentiation was carried out using the micromass technique. We then compared the cryopreserved vs non-cryopreserved collagen fibers which are naturally formed during the differentiation process. We observed that non-cryopreserved MSCs presented a directional trend in the collagen fibers formed which was absent in the cryopreserved MSCs. We confirmed this trend quantitatively by the aspect ratio obtained by Fast Fourier Transform which was 0.76 for cryopreserved and 0.52 for non-cryopreserved MSCs, a statistical significant difference.

**Keywords:** Second Harmonic Generation (SHG) microscopy, Mesenchymal Stem Cells, chondrogenic differentiation, collagen, Dimethyl Sulfoxide (DMSO).

### **1. INTRODUCTION**

Cartilage damage is a significant and growing health care problem. It is widely accepted that injuries usually do not heal spontaneously<sup>1</sup>. A variety of approaches, such as chondrocyte-based therapies, have been tested to improve cartilage healing but these methods have drawbacks in clinical practice<sup>2,3</sup>. Stem cell therapy has been investigated to facilitate regenerative tissue repair. Mesenchymal stem cells (MSC) are pluripotent, self-

\* [marilissandreoli@yahoo.com.br](mailto:marilissandreoli@yahoo.com.br); phone 0055-19-3521-8611.



## ***Apêndices***





**APENDICE 1** – Escolha dos genes de estudo e Padronização dos oligos iniciadores.

### **Análise de expressão gênica: Escolha dos genes**

O processo de padronização da técnica de PCR em tempo Real (RT-PCR) deu-se a partir de RNA extraído de tecido adiposo, cartilagem e a linhagem celular U2OS, inicialmente conhecida como linhagem 2T, essas células imortalizadas foram cultivadas a partir do tecido ósseo de uma paciente com osteosarcoma [126, 127], e foi adotada como opção para identificação de genes relacionados a osteogêneses. A primeira etapa consiste na definição dos genes a serem analisados, priorizando genes envolvidos com processos da diferenciação nas linhagens escolhidas. Os genes selecionados para a diferenciação adipogênica foram: gene codificante de adiponectina (*ADIPOQ* – adiponectin, C1Q and collagen containing) que se apresenta atuante no processo de maturação de pré-adipócitos, responsável pela codificação da adiponectina, uma proteína plasmática derivada de tecido adiposo [97, 98], o gene de codificação da proteína de ligação com ácidos graxos-4 (*FABP4* - fatty acid binding protein 4) que apresenta um papel chave na regulação da produção de lipídeos em mamíferos, além de desempenhar um papel crítico na absorção e metabolismo desses ácidos graxos [99] e o gene do receptor ativado por proliferador de peroxissomo-2 (*PPARG* - peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -2), fator de transcrição que apresenta papel regulatório no processo de adipogênese. Para a diferenciação condrogênica foram selecionados: *COL2A1* (collagen, type II, alpha 1), o qual codifica a proteína colágeno do tipo II, a mais expressa na matriz extracelular de tecido cartilaginoso em articulações [106], *COL1A1* (collagen, type I, alpha 1), responsável pela codificação da proteína colágeno do tipo I, outra proteína expressa na matriz extracelular de tecidos cartilagosos e de tecido ósseo. O gene *AGCAN*

(aggrecan), codificador da proteína de mesmo nome que se liga às estruturas do colágeno do tipo II e formam a matriz extracelular dando as características físico/mecânicas de uma cartilagem articular [105]. *SOX9* é um gene, cujo produto é envolvido na diferenciação condrogênica, sendo que a sua deficiência leva a uma malformação óssea e cartilaginosa [104]. Para a diferenciação osteogênica foi selecionado o gene *COL1A1* e os genes *OC* e *OPN*, ambos conhecidos biomarcadores de osteogênese [101-103]. Nos itens abaixo descrevemos os métodos de análises e de padronização que realizamos para obtermos uma quantificação confiável por RT-PCR.

### **Escolha dos genes de estudo por RT-PCR em tempo real**

Os oligos iniciadores (*primers*) foram desenhados com dois programas diferentes. Primeiramente, o software PRIMER EXPRESS® v3.0 (Applied Biosystems) foi utilizado para desenhar os *primers* com uma temperatura de anelamento de 65 °C e tamanho dos amplicons entre 100 e 150 pares de bases. Posteriormente, o programa Gene Runner Version 3.5 (Hastings software®) foi utilizado para checar a ausência de estruturas que podem ser formadas dentro do *primer* ou entre os *primers*, como dímeros ou alças, que podem diminuir a eficiência da reação.

Com o objetivo de evitar amplificação de possível DNA contaminante presente nas amostras, os *primers* da fita sense e anti-sense foram desenhados em éxons diferentes. Para a delimitação de éxons e íntrons utilizou-se o programa BLAT<sup>4</sup>. Todos os pares de *primers* desenhados foram então analisados com o programa BLAST<sup>5</sup> para nos certificarmos de que eles não amplificariam produtos inespecíficos.

---

<sup>4</sup> BLAT disponível em <http://genome.csdb.cn/cgi-bin/hgBlat>

<sup>5</sup> BLAST disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

### **Padronização da concentração dos oligos iniciadores e curvas de eficiência**

Para realizar a verificação da concentração ideal de cada par de iniciadores foi realizada uma curva de concentrações de 150 nM 300 nM e 600 nM, com o objetivo de obter o menor Ct com o maior sinal fluorescente. As concentrações escolhidas encontram-se no Quadro 3.

A eficiência de amplificação é obtida através da fórmula  $10^{(-1/\text{slope})}$ , onde slope é derivado da inclinação da curva e deve estar em torno de -3,32. Quando aplicado à fórmula de eficiência, o valor de  $10^{(-1/\text{slope})}$  tem que ser próximo de 2, o que significa que a cada ciclo de amplificação o material genômico está sendo duplicado e isso equivale a 100% de eficiência [128]. Para observação da eficiência foram realizadas curvas de diluição na ordem de 1:10 com 5 ou 6 pontos. Cada curva foi realizada em triplicata e a concentração inicial da amostra foi de 120 ou 240 ng. Apenas os iniciadores considerados com ótima eficiência foram utilizados nas reações de PCR em tempo real.

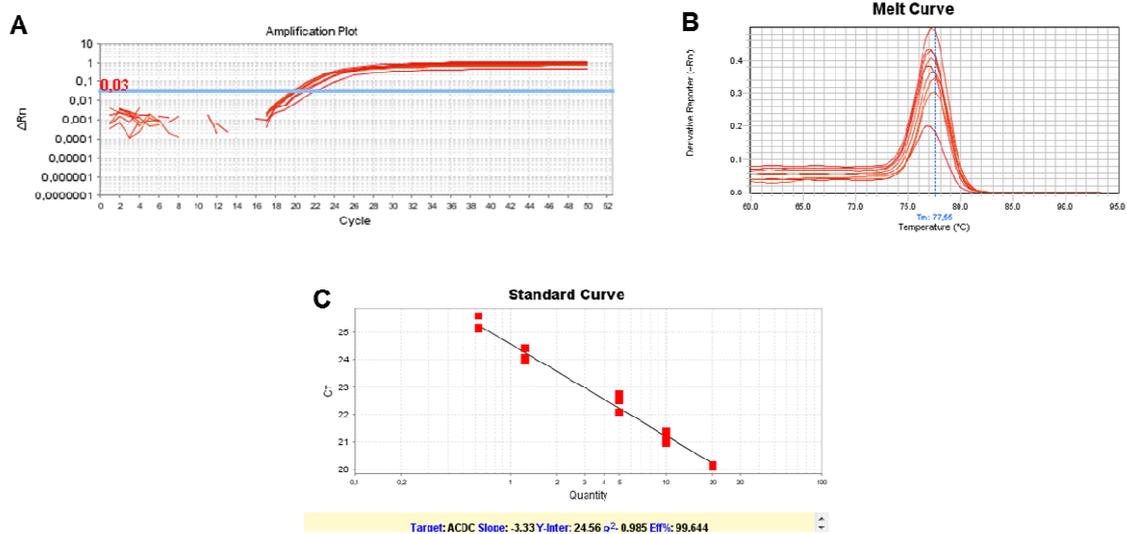
Em seguida realizaram-se experimentos para padronização da concentração dos *primers* e as suas respectivas curvas de eficiência. Primeiramente encontrou-se a concentração ótima de cada *primer*, na qual permite a amplificação do produto gênico usando a menor quantidade de *primers*, evitando assim o excesso de reagente e a possibilidade na formação de estruturas durante a amplificação (dímeros e alças).

Após a determinação da concentração dos *primers*, realizou-se uma reação para determinar as quantidades de cDNAs que poderíamos utilizar na detecção e quantificação. Para controle das reações dos *primers*, utilizou-se cDNA extraído de tecido adiposo, cartilagem humanos e linhagem U2OS, os qual expressam os genes estudados. Para isso fez-se uma curva de eficiência dos *primer* utilizando diferentes concentrações de cDNA feitos a partir de uma diluição seriada. Dessa forma espera-se obter uma reta mostrando que quanto mais cDNA se utiliza mais cedo ocorre a amplificação. A inclinação da reta obtida é a variável usada para o

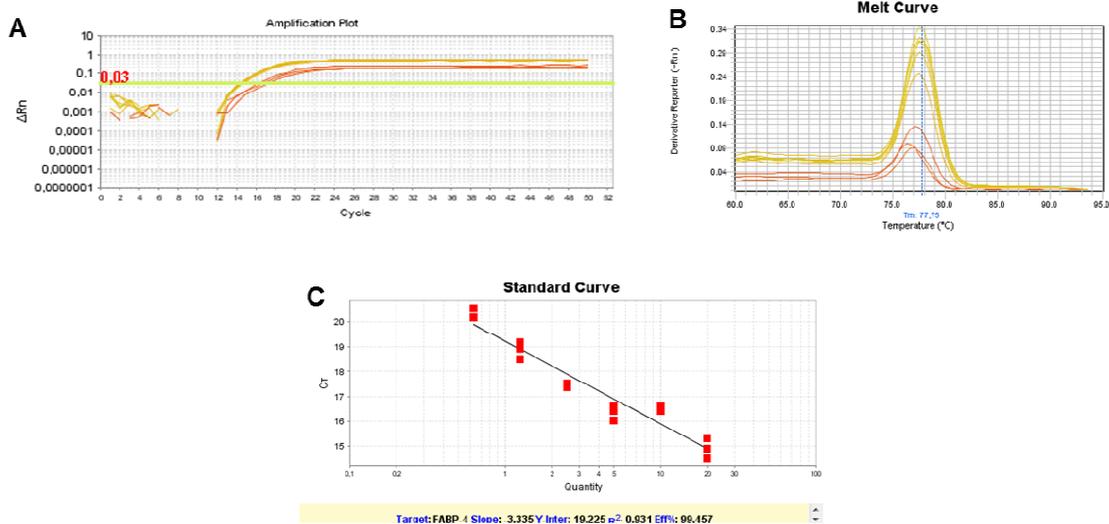
cálculo da eficiência da reação como mostra a equação (2). Portanto, para que a reação tenha 100% de eficiência, o valor da inclinação deve ser -3,32 nas condições utilizadas [128]:

$$(2) \quad \text{Eficiência (E)} = 10^{-(1/\text{inclinação})} - 1$$

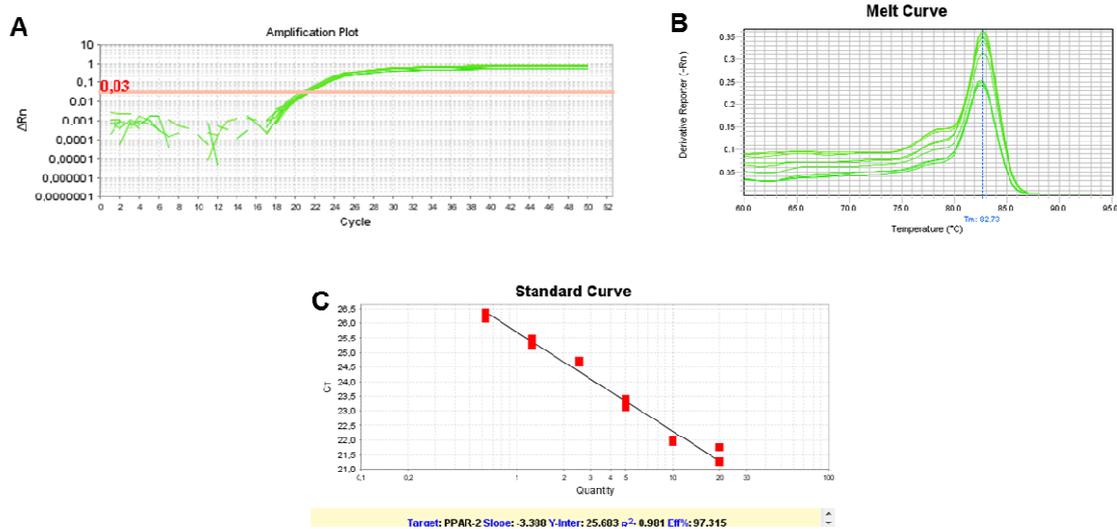
Após a padronização da reação e dos *primers*, a expressão gênica das células ADSCs cultivadas com fatores de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica foram validadas por RT-PCR, utilizando como controles endógenos os genes *ACTB*, *GAPDH* e *HPRT*. O RNA foi extraído pelo Mini RNA Isolation Kit da GE Healthcare™. Utilizando Nano Drop Spectrophotometer (ND-1000®) quantificando-se o RNA extraído e logo em seguida realizando-se uma transcrição reversa utilizando o kit 100 U RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, Life Sciences, Thermo Fisher Scientific Inc) obtendo os cDNAs. Realizou-se quantificação do cDNA obtido. Usou-se 10ng de cDNA por amostra e realizamos uma reação de RT-PCR (StepOnePlus™ Real-Time PCR - Applied Biosystems) com SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) normalizando a expressão a partir dos controles endógenos.



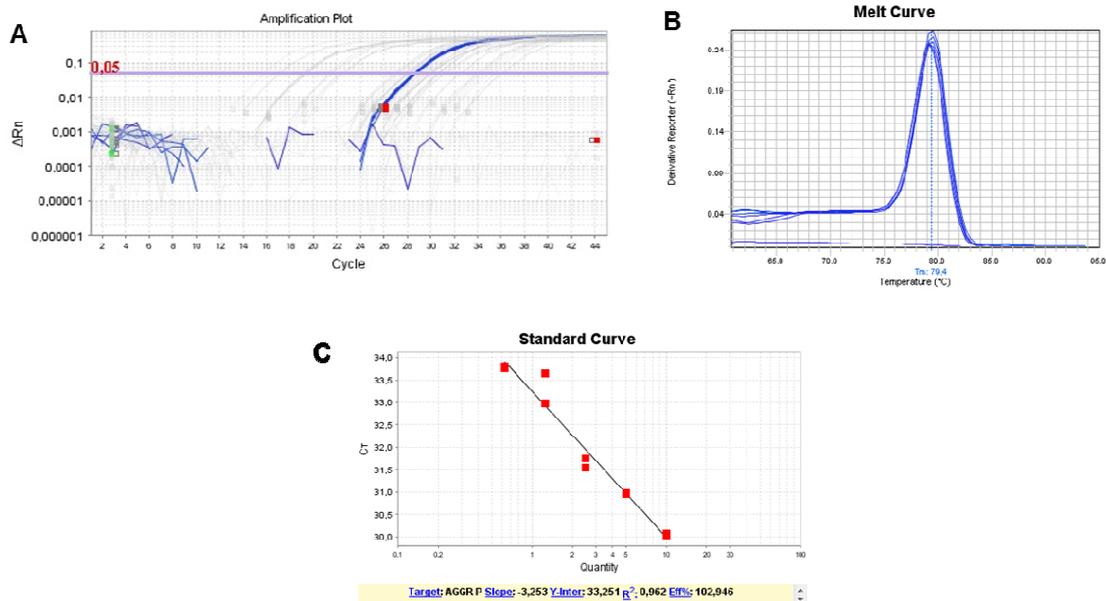
**Figura 24. Padronização da análise expressão gênica de *ADIPOQ* em tecido adiposo humano.** (A) Curva de Amplificação sem variações de expressão (Ct) significativas entre as concentrações testadas (Curva de Concentração dos Primes: 150nm, 300nm e 600nm) e a concentração escolhida foi de 300nm, fase exponencial (*Threshold*) 0,03. (B) Curva de anelamento, sem formação de dímeros de *primer* e contaminação com DNA ou amplificação inespecífica, Tm: 77,55. (C) Curva padrão de 5 pontos e slope de -3,33, correlação de Pearson acima de 0,95 e eficiência de 99,644.



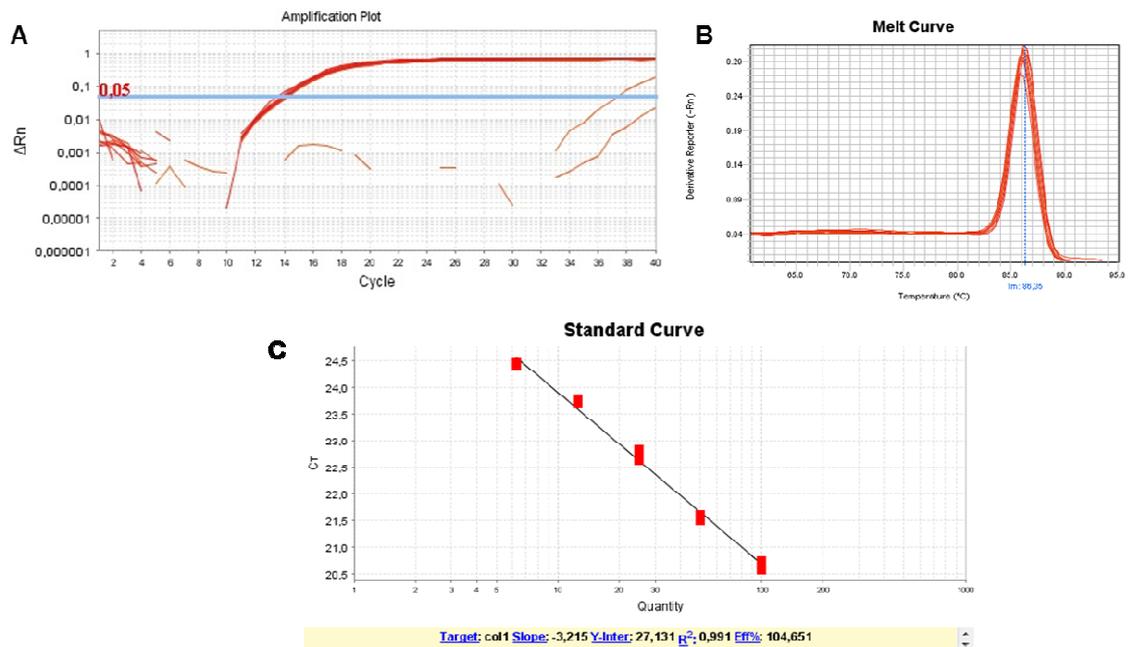
**Figura 25. Padronização da análise expressão gênica de *FABP4* em tecido adiposo humano.** (A) Curva de Amplificação sem variações de expressão (Ct) significativas entre as concentrações testadas (Curva de Concentração dos Primes: 150nm, 300nm e 600nm) e a concentração escolhida foi de 300nm, fase exponencial (*Threshold*) 0,03. (B) Curva de anelamento, sem formação de dímeros de *primer* e contaminação com DNA ou amplificação inespecífica, Tm: 77,75. (C) Curva padrão de 6 pontos e slope de -3,33, correlação de Pearson abaixo de 0,95 porém eficiência de 99,457 o que torna os valores encontrados aceitáveis.



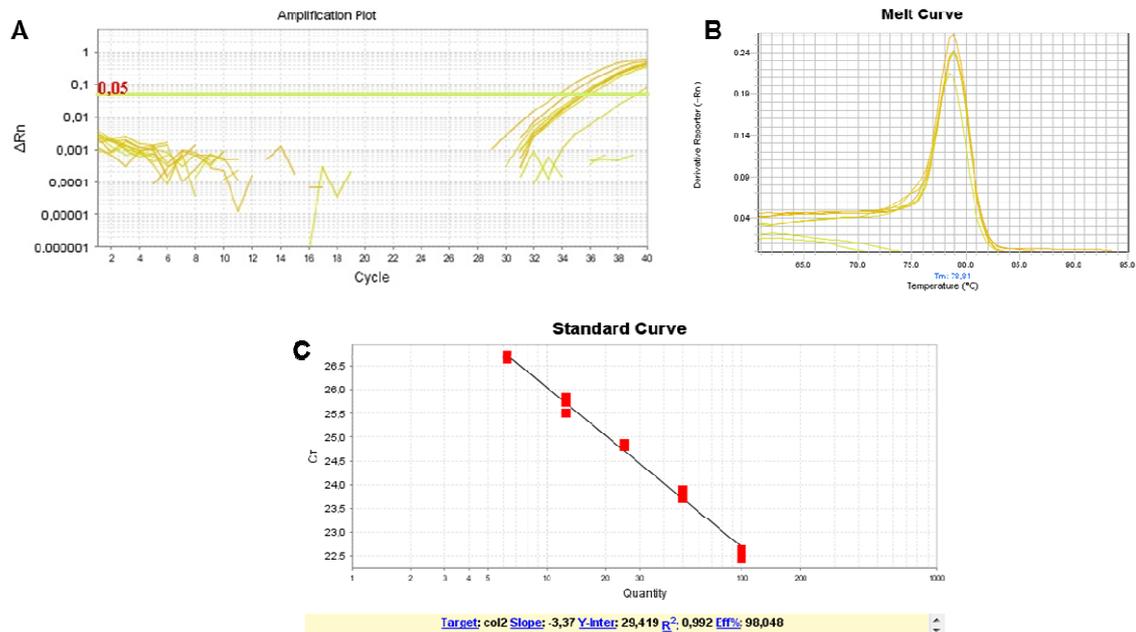
**Figura 26. Padronização da análise expressão gênica de *PPARG* em tecido adiposo humano.** (A) Curva de Amplificação sem variações de expressão (Ct) entre as concentrações testadas (Curva de Concentração dos Primes: 150nm, 300nm e 600nm) e a concentração escolhida foi de 300nm, fase exponencial (*Threshold*) 0,03. (B) Curva de anelamento, sem formação de dímeros de *primer* e contaminação com DNA ou amplificação inespecífica, Tm: 82,73. (C) Curva padrão de 6 pontos e slope de -3,38, correlação de Pearson acima de 0,95 e eficiência de 97,315.



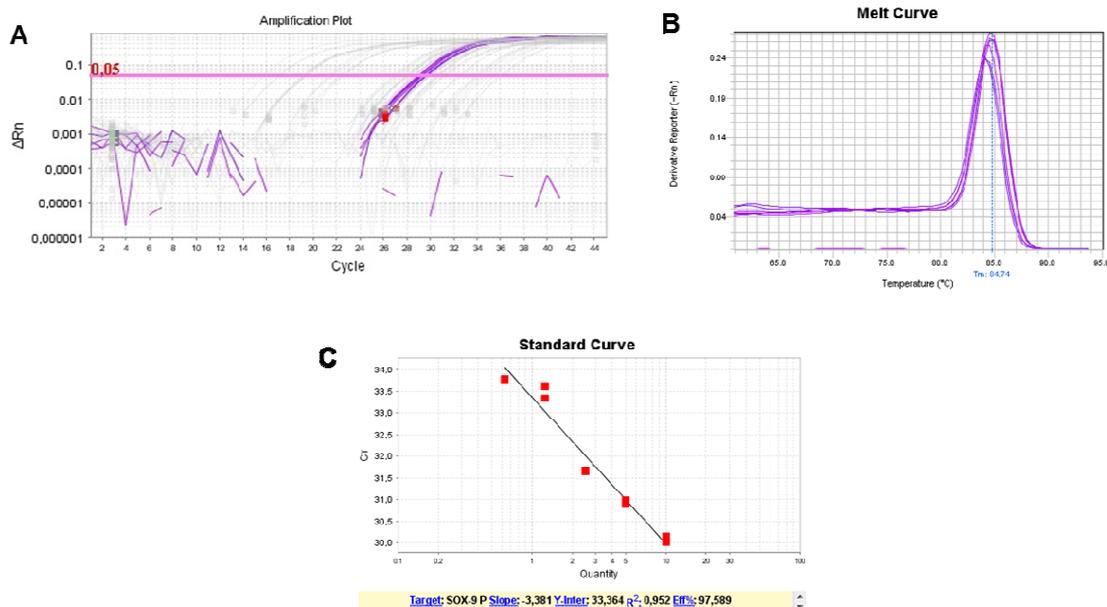
**Figura 27. Padronização da análise expressão gênica de AGCAN em cartilagem hialina humana.** (A) Curva de Amplificação com variações de expressão (Ct) entre as concentrações testadas (Curva de Concentração dos Primes: 150nm, 300nm e 600nm) e a concentração escolhida foi de 150nm, fase exponencial (*Threshold*) 0,05. (B) Curva de anelamento, próxima do ideal, Tm: 79,4. (C) Curva padrão de 5 pontos e slope de -3,25, correlação de Pearson acima de 0,95 e eficiência de 102,94.



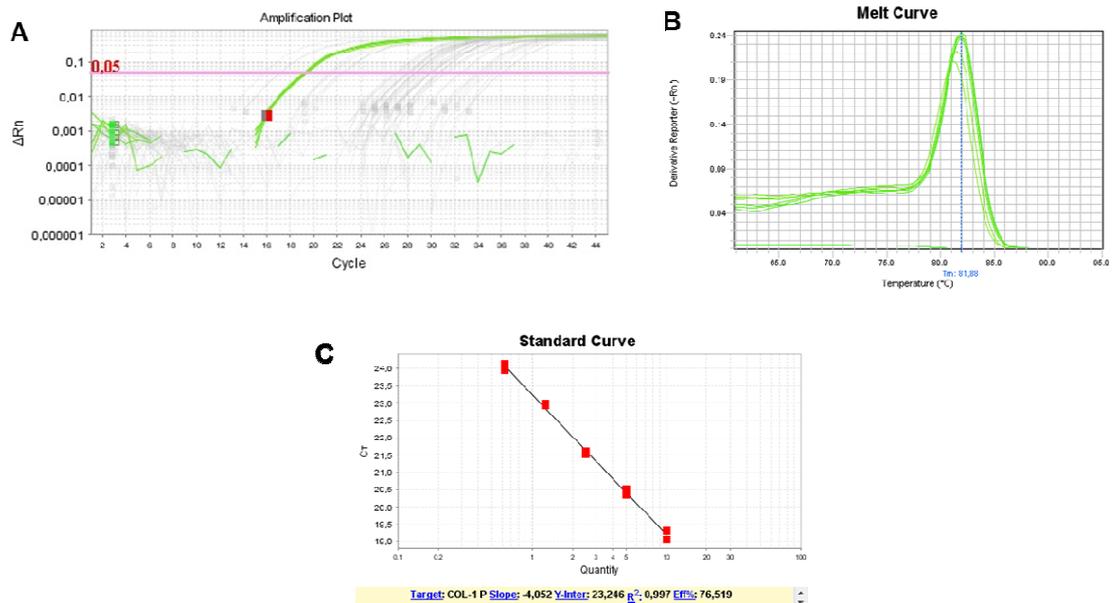
**Figura 28. Padronização da análise expressão gênica de COL1A1 em cartilagem hialina humana.** (A) Curva de Amplificação com variações de expressão (Ct) entre as concentrações testadas (Curva de Concentração dos Primes: 150nm, 300nm e 600nm) e a concentração escolhida foi de 150nm, fase exponencial (*Threshold*) 0,05. (B) Curva de anelamento, sem formação de dímeros de *primer* e contaminação com DNA ou amplificação inespecífica, Tm: 86,35. (C) Curva padrão de 5 pontos e slope de -3,21, correlação de Pearson acima de 0,95 e eficiência de 104,65.



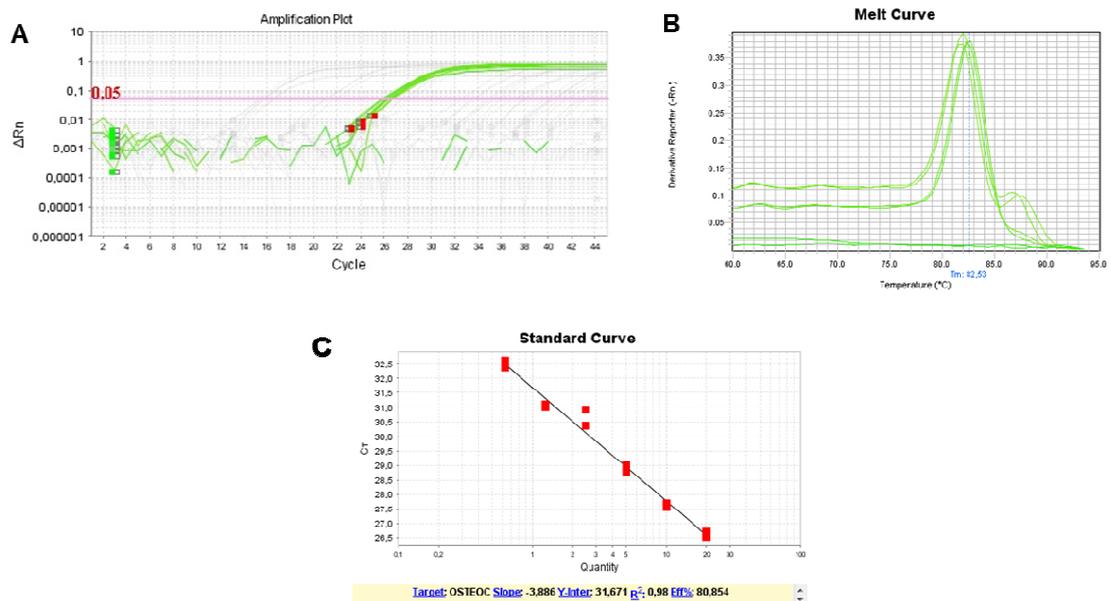
**Figura 29. Padronização da análise expressão gênica de COL2A1 em cartilagem hialina humana.** (A) Curva de Amplificação com variações de expressão (Ct) entre as concentrações testadas (Curva de Concentração dos Primes: 150nm, 300nm e 600nm) e a concentração escolhida foi de 150nm, fase exponencial (*Threshold*) 0,05. (B) Curva de anelamento, sem formação de dímeros de *primer* e contaminação com DNA ou amplificação inespecífica, Tm: 78,81. (C) Curva padrão de 5 pontos e slope de -3,37, correlação de Pearson acima de 0,95 e eficiência de 98,04.



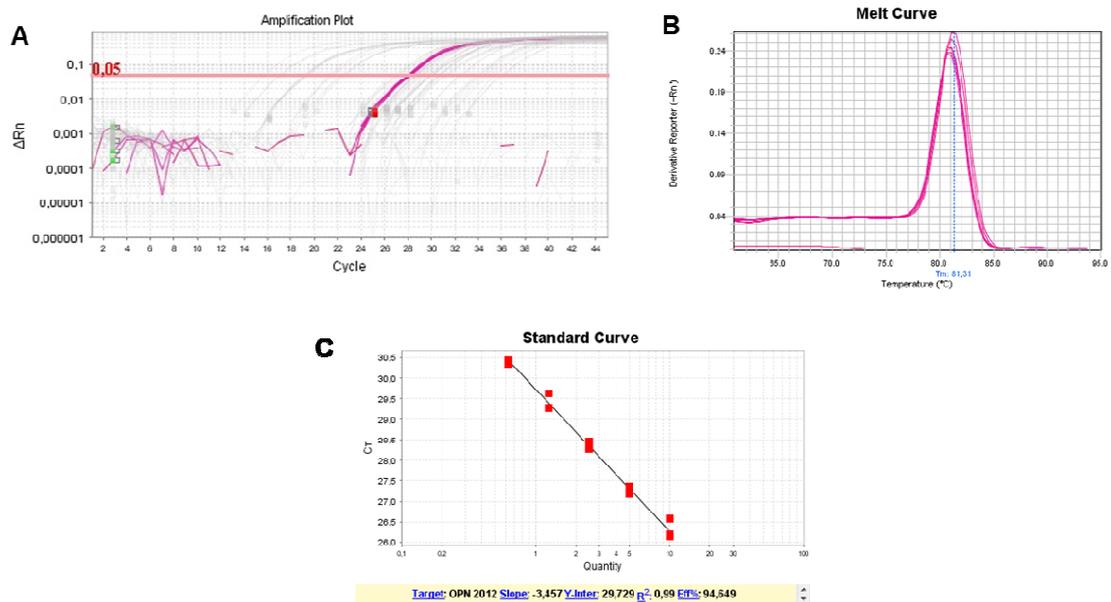
**Figura 30. Padronização da análise expressão gênica de SOX9 em cartilagem hialina humana.** (A) Curva de Amplificação com variações de expressão (Ct) entre as concentrações testadas (Curva de Concentração dos Primes: 150nm, 300nm e 600nm) e a concentração escolhida foi de 150nm, fase exponencial (*Threshold*) 0,05. (B) Curva de anelamento, próxima do ideal, Tm: 84,74. (C) Curva padrão de 5 pontos e slope de -3,381, correlação de Pearson acima de 0,95 e eficiência de 97,58.



**Figura 31. Padronização da análise expressão gênica de *COL1A1* em linhagem U2OS.** (A) Curva de Amplificação com variações de expressão (Ct) entre as concentrações testadas (Curva de Concentração dos Primes: 150nm, 300nm e 600nm) e a concentração escolhida foi de 150nm, fase exponencial (*Threshold*) 0,05. (B) Curva de anelamento, próxima do ideal, sem formação de dímeros de *primer* e contaminação com DNA ou amplificação inespecífica, Tm: 81,88. (C) Curva padrão de 5 pontos e slope de -4,05, correlação de Pearson acima de 0,95 e eficiência de 76,51.



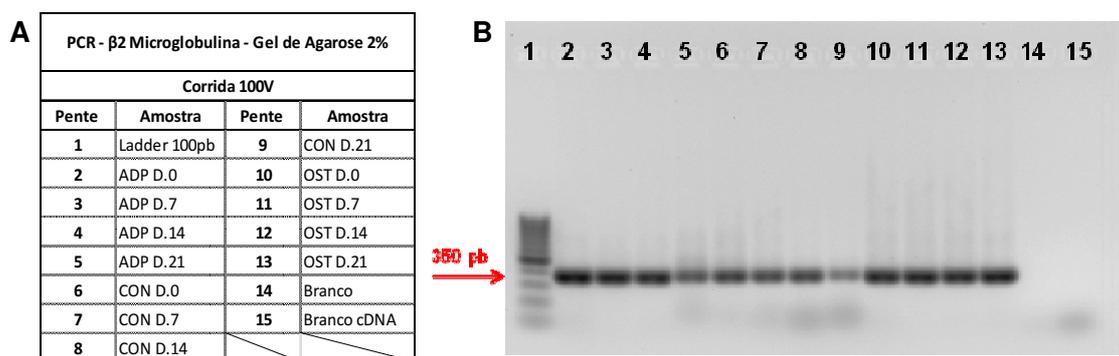
**Figura 32. Padronização da análise expressão gênica de OC em linhagem U2OS.** (A) Curva de Amplificação com variações de expressão (Ct) entre as concentrações testadas (Curva de Concentração dos Primes: 150nm, 300nm e 600nm) e a concentração escolhida foi de 150nm, fase exponencial (*Threshold*) 0,05. (B) Curva de anelamento, sem formação de dímeros de *primer* e contaminação com DNA ou amplificação inespecífica, Tm: 82,53. (C) Curva padrão de 5 pontos e slope de - 3,88, correlação de Pearson acima de 0,95, o que torna os valores encontrados aceitáveis e eficiência de 80,85.



**Figura 33. Padronização da análise expressão gênica de *OPN* em linhagem U2OS.**

(A) Curva de Amplificação com variações de expressão ( $C_t$ ) entre as concentrações testadas (Curva de Concentração dos Primes: 150nm, 300nm e 600nm) e a concentração escolhida foi de 150nm, fase exponencial (*Threshold*) 0,05. (B) Curva de anelamento, próxima do ideal,  $T_m$ : 81,31. (C) Curva padrão de 5 pontos e slope de - 3,45, correlação de Pearson acima de 0,95 e eficiência de 94,64.

Como controle da transcrição em cDNA foi realizado uma PCR para o gene  $\beta 2$ -microglobulina. A PCR para amplificação de  $\beta 2$ -microglobulina foi realizada uma reação de volume final de 50  $\mu$ L, contendo 1,5  $\mu$ L do cDNA sintetizado, 5  $\mu$ L de tampão de reação, 3  $\mu$ L  $MgCl_2$  50 mM, 2,5 unidades de Taq polimerase e 200 nM de cada iniciador. Foi realizado um controle negativo da síntese de cDNA, no qual não foi adicionado cDNA para a reação de síntese e controle negativo da reação de PCR, o qual não recebeu adição de cDNA. As sequências dos iniciadores de  $\beta 2$ -microglobulina utilizados foram: F 5'- ATG TCT CGC TCC GTG GCC TTA GCT - 3'; R 5' - RV: CCT CCA TGA TGC TGC TTA CAT GTC - 3'. O programa foi composto de 5 minutos de desnaturação à 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos à 92 °C, 50 segundos à 58 °C e 50 segundos à 72 °C, com uma fase final de 72 °C por 7 minutos, com temperatura de manutenção de 4 °C. Os fragmentos resultantes de 350 pb foram visualizados e foto-documentados em luz ultravioleta em gel de agarose 2% (Figura 34 A – B).



**Figura 34. PCR para amplificação de  $\beta 2$ -microglobulina – Controle de Qualidade da Extração de RNA e Síntese de cDNA.** (A) Quadro com a distribuição das amostras no gel de agarose 2%. (B) Produtos resultantes da PCR para amplificação de  $\beta 2$ -microglobulina a seta indica a presença da banda de 350 pb correspondente ao produto amplificado de  $\beta 2$ -microglobulina. A presença das bandas é indicativa que a síntese de cDNA foi bem sucedida.



## APENDICE 2 – Planilha das Análises de Fast Fourier Transform – FFT.

| AMOSTRA 1 |                      |  |         |        |        |         |          |
|-----------|----------------------|--|---------|--------|--------|---------|----------|
|           | LABEL                | MAJOR  | MINOR   | ANGLE  | RA     |         |          |
| AMOSTRA 1 | 1                    | FFT of IF D21 24W 40X DIF CON_01B ROI-1 si.tif | 81.747  | 53.626 | 97.565 | 0,66    |          |
|           | 2                    | FFT of IF D21 24W 40X DIF CON_01B ROI-2 si.tif | 139.988 | 78.611 | 95.293 | 0,56    |          |
|           | 3                    | FFT of IF D21 24W 40X DIF CON_01B ROI-3 si.tif | 88.656  | 78.213 | 98.889 | 0,88    |          |
|           | 4                    | FFT of IF D21 24W 40X DIF CON_01B ROI-4 si.tif | 149.810 | 72.811 | 97.304 | 0,49    |          |
|           | <b>FRESCA</b>        |  |         |        |        | MEDIANA | 0,61     |
|           |                      |  |         |        |        | DESPAD  | 0,171869 |
|           | 1                    | FFT of ID D19 24W 40X DIF CON_01B ROI-1.tif    | 62.741  | 60.475 | 3.235  | 0,96    |          |
|           | 2                    | FFT of ID D19 24W 40X DIF CON_01B ROI-2 si.tif | 64.562  | 30.568 | 32.821 | 0,47    |          |
|           | 3                    | FFT of ID D19 24W 40X DIF CON_01B ROI-3 si.tif | 71.608  | 40.451 | 84.659 | 0,56    |          |
|           | 4                    | FFT of ID D19 24W 40X DIF CON_01B ROI-4 si.tif | 75.698  | 45.616 | 23.543 | 0,60    |          |
|           | <b>CRIOPRESEVADA</b> |  |         |        |        | MEDIANA | 0,58     |
|           |                      |  |         |        |        | DESPAD  | 0,215383 |

| AMOSTRA 2 |                      |  |         |        |         |         |          |
|-----------|----------------------|--|---------|--------|---------|---------|----------|
|           | LABEL                | MAJOR  | MINOR   | ANGLE  | RA      |         |          |
| AMOSTRA 2 | 1                    | FFT of SnF D21 24W 40X DIF CON_1B ROI-1 si.tif | 163.296 | 61.504 | 67.512  | 0,38    |          |
|           | 2                    | FFT of SnF D21 24W 40X DIF CON_1B ROI-2 si.tif | 115.239 | 61.707 | 57.021  | 0,54    |          |
|           | 3                    | FFT of SnF D21 24W 40X DIF CON_1B ROI-3 si.tif | 91.894  | 45.404 | 83.449  | 0,49    |          |
|           | 4                    | FFT of SnF D21 24W 40X DIF CON_1B ROI-4 si.tif | 124.294 | 61.954 | 98.814  | 0,50    |          |
|           | <b>FRESCA</b>        |  |         |        |         | MEDIANA | 0,50     |
|           |                      |  |         |        |         | DESPAD  | 0,068896 |
|           | 1                    | FFT of SnD D21 24W 40X DIF CON_1B ROI-1 si.tif | 73.560  | 56.583 | 135.105 | 0,77    |          |
|           | 2                    | FFT of SnD D21 24W 40X DIF CON_1B ROI-2 si.tif | 92.961  | 51.102 | 152.130 | 0,55    |          |
|           | 3                    | FFT of SnD D21 24W 40X DIF CON_1B ROI-3 si.tif | 63.845  | 56.079 | 16.346  | 0,88    |          |
|           | 4                    | FFT of SnD D21 24W 40X DIF CON_1B ROI-4 si.tif | 97.626  | 60.593 | 90.181  | 0,62    |          |
|           | <b>CRIOPRESEVADA</b> |  |         |        |         | MEDIANA | 0,69     |
|           |                      |  |         |        |         | DESPAD  | 0,147651 |

| AMOSTRA 3 |               |   |         |        |         |         |          |
|-----------|---------------|---|---------|--------|---------|---------|----------|
|           | LABEL         | MAJOR                                     | MINOR   | ANGLE  | RA      |         |          |
| AMOSTRA 3 | 1             | FFT of BF 24W 40X dif con_01 ROI-1 si.tif | 89.686  | 46.778 | 146.098 | 0,52    |          |
|           | 2             | FFT of BF 24W 40X dif con_01 ROI-2 si.tif | 83.781  | 46.732 | 155.838 | 0,56    |          |
|           | 3             | FFT of BF 24W 40X dif con_01 ROI-3 si.tif | 100.418 | 43.922 | 135.583 | 0,44    |          |
|           | 4             | FFT of BF 24W 40X dif con_01 ROI-4 si.tif | 63.327  | 39.327 | 3.632   | 0,62    |          |
|           | <b>FRESCA</b> |   |         |        |         | MEDIANA | 0,54     |
|           |               |   |         |        |         | DESPAD  | 0,076647 |

AMOSTRA 3

|                      |  |         |        |         |          |
|----------------------|--|---------|--------|---------|----------|
| 1                    | FFT of BD D19 24W 40X DIF CON_01B ROI-1 si.tif | 87.859  | 73.445 | 61.945  | 0,84     |
| 2                    | FFT of BD D19 24W 40X DIF CON_01B ROI-2 si.tif | 98.771  | 79.176 | 38.383  | 0,80     |
| 3                    | FFT of BD D19 24W 40X DIF CON_01B ROI-3 si.tif | 85.863  | 52.479 | 98.906  | 0,61     |
| 4                    | FFT of BD D19 24W 40X DIF CON_01B ROI-4 si.tif | 127.975 | 64.530 | 81.940  | 0,50     |
| <b>CRIOPRESEVADA</b> |  |         |        | MEDIANA | 0,71     |
|                      |  |         |        | DESPAD  | 0,157545 |

AMOSTRA 4

| AMOSTRA 4            |   |         |        |         |          |
|----------------------|---|---------|--------|---------|----------|
|                      | LABEL                                     | MAJOR   | MINOR  | ANGLE   | RA       |
| 1                    | FFT of AF 24W 40X dif con_01 ROI-1 si.tif | 54.908  | 52.012 | 137.606 | 0,95     |
| 2                    | FFT of AF 24W 40X dif con_01 ROI-2 si.tif | 69.685  | 35.757 | 38.955  | 0,51     |
| 3                    | FFT of AF 24W 40X dif con_01 ROI-3 si.tif | 36.942  | 28.848 | 114.098 | 0,78     |
| 4                    | FFT of AF 24W 40X dif con_01 ROI-4 si.tif | 48.822  | 33.329 | 97.051  | 0,68     |
| <b>FRESCA</b>        |   |         |        | MEDIANA | 0,73     |
|                      |   |         |        | DESPAD  | 0,181718 |
| 1                    | FFT of ad_DIFCONd2124w_rtt ROI-1 si.jpg   | 103.299 | 52.767 | 58.888  | 0,51     |
| 2                    | FFT of ad_DIFCONd2124w_rtt ROI-2 si.jpg   | 92.741  | 82.745 | 9.308   | 0,89     |
| 3                    | FFT of ad_DIFCONd2124w_rtt ROI-3 si.jpg   | 76.426  | 36.702 | 59.906  | 0,48     |
| 4                    | FFT of ad_DIFCONd2124w_rtt ROI-4 si.jpg   | 53.484  | 41.446 | 88.926  | 0,77     |
| <b>CRIOPRESEVADA</b> |   |         |        | MEDIANA | 0,64     |
|                      |   |         |        | DESPAD  | 0,201347 |

AMOSTRA 5

| AMOSTRA 5            |   |         |        |         |          |
|----------------------|---|---------|--------|---------|----------|
|                      | LABEL                                     | MAJOR   | MINOR  | ANGLE   | RA       |
| 1                    | FFT of MF 24W 40X dif con_01 ROI-1 si.tif | 66.130  | 48.038 | 173.997 | 0,73     |
| 2                    | FFT of MF 24W 40X dif con_01 ROI-2 si.tif | 66.127  | 52.141 | 81.918  | 0,79     |
| 3                    | FFT of MF 24W 40X dif con_01 ROI-3 si.tif | 65.260  | 33.051 | 50.981  | 0,51     |
| 4                    | FFT of MF 24W 40X dif con_01 ROI-4 si.tif | 105.653 | 63.642 | 78.538  | 0,60     |
| <b>FRESCA</b>        |   |         |        | MEDIANA | 0,66     |
|                      |   |         |        | DESPAD  | 0,126169 |
| 1                    | FFT of md_DIFCONd2124w.jpg                | 132.553 | 67.604 | 69.498  | 0,51     |
| 2                    | FFT of md_DIFCONd2124w ROI-2 si.jpg       | 74.593  | 66.826 | 54.909  | 0,90     |
| 3                    | FFT of md_DIFCONd2124w ROI-3 si.jpg       | 74.312  | 52.446 | 1.989   | 0,71     |
| 4                    | FFT of md_DIFCONd2124w ROI-4 si.jpg       | 124.687 | 71.245 | 80.001  | 0,57     |
| <b>CRIOPRESEVADA</b> |   |         |        | MEDIANA | 0,64     |
|                      |   |         |        | DESPAD  | 0,170894 |

**APENDICE 3 – Planilha das Análises de Gray Level Co-occurrence Matrix – GLCM.**

| AMOSTRAS FRESCAS                |                                 |               |          |             |                   |          |                          |       |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------|----------|-------------|-------------------|----------|--------------------------|-------|
| Análise                         | Quadrante                       | Angular       | Contrast | Correlation | Inverse           | Entropy  | Sum of all GLCM elements |       |
|                                 |                                 | Second Moment |          |             | Difference Moment |          |                          |       |
| PACIENTE 1 - FRESCO             | GLSM 1a<br>(1 pixel e 0 grau)   | 1             | 7,13E-01 | 1,11E+02    | 0,002             | 1,41E-01 | 7,710                    | 1     |
|                                 |                                 | 2             | 8,76E-01 | 9,31E+01    | 0,003             | 1,52E-01 | 7,527                    | 1     |
|                                 |                                 | 3             | 8,79E-01 | 9,05E+01    | 0,003             | 1,55E-01 | 7,504                    | 1     |
|                                 |                                 | 4             | 2,00E-03 | 4,30E+01    | 0,005             | 2,33E-01 | 6,850                    | 1     |
|                                 |                                 | MEDIANA       | 7,94E-01 | 9,18E+01    | 0,003             | 1,54E-01 | 7,516                    | 1,00  |
|                                 |                                 | DESPAD        | 4,18E-01 | 2,91E+01    | 0,001             | 4,23E-02 | 0,377                    | 0,000 |
|                                 | GLSM 1b<br>(5 pixels e 0 grau)  | 5             | 4,97E-01 | 3,39E+02    | 0,001             | 9,50E-02 | 8,069                    | 1     |
|                                 |                                 | 6             | 6,19E-01 | 2,69E+02    | 0,002             | 1,05E-01 | 7,876                    | 1     |
|                                 |                                 | 7             | 6,00E-01 | 2,74E+02    | 0,002             | 1,04E-01 | 7,880                    | 1     |
|                                 |                                 | 8             | 1,00E-03 | 1,12E+02    | 0,004             | 1,56E-01 | 7,206                    | 1     |
|                                 |                                 | MEDIANA       | 5,48E-01 | 2,71E+02    | 0,002             | 1,05E-01 | 7,878                    | 1,00  |
|                                 |                                 | DESPAD        | 2,90E-01 | 9,62E+01    | 0,001             | 2,77E-02 | 0,379                    | 0,000 |
|                                 | GLSM 1c<br>(10 pixels e 0 grau) | 9             | 4,28E-01 | 5,10E+02    | 0,957             | 7,90E-02 | 8,203                    | 1     |
|                                 |                                 | 10            | 5,47E-01 | 3,65E+02    | 0,001             | 9,00E-02 | 7,978                    | 1     |
|                                 |                                 | 11            | 5,23E-01 | 3,69E+02    | 0,001             | 8,80E-02 | 7,994                    | 1     |
|                                 |                                 | 12            | 1,00E-03 | 1,47E+02    | 0,003             | 1,33E-01 | 7,325                    | 1     |
|                                 |                                 | MEDIANA       | 4,76E-01 | 3,67E+02    | 0,002             | 8,90E-02 | 7,986                    | 1,00  |
| DESPAD                          |                                 | 2,55E-01      | 1,50E+02 | 0,478       | 2,41E-02          | 0,381    | 0,000                    |       |
| <b>MEDIANA GLSM 1</b>           |                                 | 5,48E-01      | 2,71E+02 | 0,002       | 1,05E-01          | 7,878    | 1,00                     |       |
| <b>DESPAD GLSM 1</b>            |                                 | 8,57E-02      | 6,04E+01 | 0,275       | 9,60E-03          | 0,002    | 0,000                    |       |
| GLSM 2a<br>(1 pixel e 90 graus) | 13                              | 6,28E-01      | 1,68E+02 | 0,002       | 1,25E-01          | 7,847    | 1                        |       |
|                                 | 14                              | 7,54E-01      | 1,54E+02 | 0,003       | 1,29E-01          | 7,690    | 1                        |       |
|                                 | 15                              | 8,07E-01      | 1,27E+02 | 0,003       | 1,43E-01          | 7,609    | 1                        |       |
|                                 | 16                              | 2,00E-03      | 6,02E+01 | 0,005       | 2,14E-01          | 6,934    | 1                        |       |
|                                 | MEDIANA                         | 6,91E-01      | 1,40E+02 | 0,003       | 1,36E-01          | 7,650    | 1,00                     |       |
|                                 | DESPAD                          | 3,71E-01      | 4,79E+01 | 0,001       | 4,16E-02          | 0,403    | 0,000                    |       |
| pixels                          | 17                              | 4,33E-01      | 4,65E+02 | 0,001       | 7,70E-02          | 8,188    | 1                        |       |

|  |          |          |          |          |       |          |       |       |
|--|----------|----------|----------|----------|-------|----------|-------|-------|
|  |          | 18       | 5,15E-01 | 4,24E+02 | 0,947 | 8,30E-02 | 8,031 | 1     |
|  |          | 19       | 5,36E-01 | 3,42E+02 | 0,001 | 9,30E-02 | 7,971 | 1     |
|  |          | 20       | 1,00E-03 | 1,63E+02 | 0,003 | 1,38E-01 | 7,348 | 1     |
|  |          | MEDIANA  | 4,74E-01 | 3,83E+02 | 0,002 | 8,80E-02 | 8,001 | 1,00  |
|  |          | DESPAD   | 2,51E-01 | 1,34E+02 | 0,473 | 2,76E-02 | 0,369 | 0,000 |
| GLSM 2c<br>(10 pixels e<br>90 graus)             |          | 21       | 3,88E-01 | 6,29E+02 | 0,591 | 6,30E-02 | 8,260 | 1     |
|  |          | 22       | 4,73E-01 | 5,36E+02 | 0,294 | 7,10E-02 | 8,086 | 1     |
|  |          | 23       | 4,62E-01 | 4,80E+02 | 0,656 | 7,40E-02 | 8,082 | 1     |
|  |          | 24       | 8,76E-01 | 2,16E+02 | 0,002 | 1,15E-01 | 7,475 | 1     |
|  |          | MEDIANA  | 4,68E-01 | 5,08E+02 | 0,443 | 7,25E-02 | 8,084 | 1,00  |
| DESPAD   | 2,21E-01 | 1,77E+02 | 0,301    | 2,33E-02 | 0,344 | 0        |       |       |
| <b>MEDIANA GLSM 2</b>                            |          |          | 4,74E-01 | 3,83E+02 | 0,003 | 8,80E-02 | 8,001 | 1,00  |
| <b>DESPAD GLSM 2</b>                             |          |          | 7,97E-02 | 6,58E+01 | 0,238 | 9,54E-03 | 0,030 | 0,000 |
| GLSM 3a<br>(1 pixel e<br>180 graus)              |          | 25       | 7,14E-01 | 1,11E+02 | 0,002 | 1,41E-01 | 7,709 | 1     |
|  |          | 26       | 8,72E-01 | 9,35E+01 | 0,003 | 1,51E-01 | 7,531 | 1     |
|  |          | 27       | 8,80E-01 | 9,02E+01 | 0,003 | 1,55E-01 | 7,502 | 1     |
|  |          | 28       | 2,00E-03 | 4,35E+01 | 0,005 | 2,32E-01 | 6,856 | 1     |
|  |          | MEDIANA  | 7,93E-01 | 9,18E+01 | 0,003 | 1,53E-01 | 7,517 | 1,00  |
| DESPAD   | 4,17E-01 | 2,88E+01 | 0,001    | 4,19E-02 | 0,374 | 0,000    |       |       |
| GLSM 3b<br>(5 pixels e<br>180 graus)             |          | 29       | 4,98E-01 | 3,30E+02 | 0,001 | 9,50E-02 | 8,060 | 1     |
|  |          | 30       | 6,05E-01 | 2,81E+02 | 0,002 | 1,03E-01 | 7,899 | 1     |
|  |          | 31       | 6,01E-01 | 2,71E+02 | 0,002 | 1,04E-01 | 7,877 | 1     |
|  |          | 32       | 1,00E-03 | 1,20E+02 | 0,004 | 1,53E-01 | 7,232 | 1     |
|  |          | MEDIANA  | 5,49E-01 | 2,76E+02 | 0,002 | 1,04E-01 | 7,888 | 1,00  |
| DESPAD   | 2,88E-01 | 9,10E+01 | 0,001    | 2,65E-02 | 0,366 | 0,000    |       |       |
| GLSM 3c<br>(10 pixels e<br>180 graus)            |          | 33       | 4,35E-01 | 4,77E+02 | 0,001 | 7,90E-02 | 8,178 | 1     |
|  |          | 34       | 5,26E-01 | 4,04E+02 | 0,001 | 8,80E-02 | 8,024 | 1     |
|  |          | 35       | 5,20E-01 | 3,70E+02 | 0,001 | 8,70E-02 | 7,996 | 1     |
|  |          | 36       | 9,80E-01 | 1,61E+02 | 0,003 | 1,29E-01 | 7,375 | 1     |
|  |          | MEDIANA  | 5,23E-01 | 3,87E+02 | 0,001 | 8,75E-02 | 8,010 | 1,00  |
| DESPAD   | 2,47E-01 | 1,36E+02 | 0,001    | 2,25E-02 | 0,355 | 0,000    |       |       |
| <b>MEDIANA GLSM 3</b>                            |          |          | 5,49E-01 | 2,76E+02 | 0,002 | 1,04E-01 | 7,888 | 1,00  |
| <b>DESPAD GLSM 3</b>                             |          |          | 8,88E-02 | 5,37E+01 | 0,000 | 1,02E-02 | 0,010 | 0,000 |
| T <sub>0</sub><br>(1<br>pixel e<br>180<br>graus) |          | 37       | 6,26E-01 | 1,69E+02 | 0,002 | 1,25E-01 | 7,850 | 1     |
|  |          | 38       | 7,51E-01 | 1,54E+02 | 0,002 | 1,29E-01 | 7,695 | 1     |

|  |                                       |         |          |          |       |          |       |       |
|--|---------------------------------------|---------|----------|----------|-------|----------|-------|-------|
|  |                                       | 39      | 8,09E-01 | 1,26E+02 | 0,003 | 1,43E-01 | 7,605 | 1     |
|  |                                       | 40      | 2,00E-03 | 5,94E+01 | 0,005 | 2,14E-01 | 6,922 | 1     |
|  |                                       | MEDIANA | 6,88E-01 | 1,40E+02 | 0,003 | 1,36E-01 | 7,650 | 1,00  |
|  |                                       | DESPAD  | 3,71E-01 | 4,85E+01 | 0,001 | 4,16E-02 | 0,410 | 0,000 |
|  | GLSM 4b<br>(5 pixels e<br>270 grau)   | 41      | 4,30E-01 | 4,73E+02 | 0,001 | 7,60E-02 | 8,202 | 1     |
|  |                                       | 42      | 5,03E-01 | 4,31E+02 | 0,947 | 8,20E-02 | 8,056 | 1     |
|  |                                       | 43      | 5,45E-01 | 3,35E+02 | 0,001 | 9,40E-02 | 7,954 | 1     |
|  |                                       | 44      | 1,00E-03 | 1,57E+02 | 0,003 | 1,40E-01 | 7,294 | 1     |
|  |                                       | MEDIANA | 4,66E-01 | 3,83E+02 | 0,002 | 8,80E-02 | 8,005 | 1,00  |
|  |                                       | DESPAD  | 2,50E-01 | 1,40E+02 | 0,473 | 2,90E-02 | 0,401 | 0,000 |
|  | GLSM 4c<br>(10 pixels e<br>270 graus) | 45      | 3,78E-01 | 6,66E+02 | 0,560 | 6,20E-02 | 8,292 | 1     |
|  |                                       | 46      | 4,57E-01 | 5,48E+02 | 0,324 | 6,90E-02 | 8,118 | 1     |
|  |                                       | 47      | 4,82E-01 | 4,46E+02 | 0,654 | 7,60E-02 | 8,041 | 1     |
|  |                                       | 48      | 9,44E-01 | 2,04E+02 | 0,002 | 1,19E-01 | 7,391 | 1     |
|  |                                       | MEDIANA | 4,69E-01 | 4,97E+02 | 0,442 | 7,25E-02 | 8,080 | 1,00  |
|  |                                       | DESPAD  | 2,56E-01 | 1,96E+02 | 0,291 | 2,56E-02 | 0,394 | 0,000 |
|  | <b>MEDIANA GLSM 4</b>                 |         | 4,69E-01 | 3,83E+02 | 0,003 | 8,80E-02 | 8,005 | 1,00  |
|  | <b>DESPAD GLSM 4</b>                  |         | 6,82E-02 | 7,46E+01 | 0,238 | 8,39E-03 | 0,008 | 0,000 |

|                        |          |          |       |          |       |       |
|------------------------|----------|----------|-------|----------|-------|-------|
| <b>MEDIANA GLSM IF</b> | 5,11E-01 | 3,29E+02 | 0,002 | 9,58E-02 | 7,945 | 1,00  |
| <b>DESPAD GLSM IF</b>  | 9,09E-03 | 8,85E+00 | 0,126 | 7,71E-04 | 0,012 | 0,000 |

| PACIENTE 2 - FRESCO            | Análise Quadrante | Angular Second Moment | Contrast | Correlation | Inverse Difference Moment | Entropy | Sum of all GLCM elements |
|--------------------------------|-------------------|-----------------------|----------|-------------|---------------------------|---------|--------------------------|
|                                |                   |                       |          |             |                           |         |                          |
| GLSM 1a<br>(1 pixel e 0 grau)  | 1                 | 8,86E-01              | 8,48E+01 | 0,003       | 1,57E-01                  | 7,519   | 1                        |
|                                | 2                 | 2,00E-03              | 3,90E+01 | 0,006       | 2,19E-01                  | 6,641   | 1                        |
|                                | 3                 | 7,35E-01              | 1,04E+02 | 0,002       | 1,43E-01                  | 7,706   | 1                        |
|                                | 4                 | 1,00E-03              | 5,55E+01 | 0,004       | 1,92E-01                  | 7,186   | 1                        |
|                                | MEDIANA           | 3,69E-01              | 7,02E+01 | 0,004       | 1,75E-01                  | 7,353   | 1,00                     |
|                                | DESPAD            | 4,71E-01              | 2,91E+01 | 0,002       | 3,44E-02                  | 0,467   | 0                        |
| GLSM 1b<br>(5 pixels e 0 grau) | 5                 | 5,95E-01              | 2,71E+02 | 0,002       | 1,01E-01                  | 7,921   | 1                        |
|                                | 6                 | 2,00E-03              | 1,06E+02 | 0,005       | 1,49E-01                  | 6,987   | 1                        |
|                                | 7                 | 4,81E-01              | 3,34E+02 | 0,001       | 9,00E-02                  | 8,129   | 1                        |
|                                | 8                 | 7,84E-01              | 1,55E+02 | 0,003       | 1,23E-01                  | 7,592   | 1                        |

|                                   |         |          |          |       |          |       |      |
|-----------------------------------|---------|----------|----------|-------|----------|-------|------|
|                                   | MEDIANA | 5,38E-01 | 2,13E+02 | 0,003 | 1,12E-01 | 7,757 | 1,00 |
|                                   | DESPAD  | 3,33E-01 | 1,05E+02 | 0,002 | 2,61E-02 | 0,499 | 0    |
| GLSM 1c<br>(10 pixels e 0 grau)   | 9       | 5,20E-01 | 3,79E+02 | 0,001 | 8,60E-02 | 8,035 | 1    |
|                                   | 10      | 1,00E-03 | 1,53E+02 | 0,003 | 1,30E-01 | 7,068 | 1    |
|                                   | 11      | 4,09E-01 | 4,97E+02 | 0,869 | 7,30E-02 | 8,258 | 1    |
|                                   | 12      | 6,88E-01 | 2,13E+02 | 0,002 | 1,07E-01 | 7,714 | 1    |
|                                   | MEDIANA | 4,64E-01 | 2,96E+02 | 0,003 | 9,65E-02 | 7,875 | 1,00 |
|                                   | DESPAD  | 2,92E-01 | 1,57E+02 | 0,433 | 2,50E-02 | 0,518 | 0    |
| MEDIANA GLSM 1                    |         | 4,64E-01 | 2,13E+02 | 0,003 | 1,12E-01 | 7,757 | 1,00 |
| DESPAD GLSM 1                     |         | 9,38E-02 | 6,41E+01 | 0,249 | 5,14E-03 | 0,026 | 0    |
| GLSM 2a<br>(1 pixel e 90 graus)   | 13      | 8,00E-01 | 1,46E+02 | 0,002 | 1,43E-01 | 7,657 | 1    |
|                                   | 14      | 2,00E-03 | 5,22E+01 | 0,006 | 2,04E-01 | 6,717 | 1    |
|                                   | 15      | 6,48E-01 | 1,79E+02 | 0,002 | 1,25E-01 | 7,861 | 1    |
|                                   | 16      | 1,00E-03 | 8,58E+01 | 0,004 | 1,74E-01 | 7,323 | 1    |
|                                   | MEDIANA | 3,25E-01 | 1,16E+02 | 0,003 | 1,59E-01 | 7,490 | 1,00 |
|                                   | DESPAD  | 4,21E-01 | 5,73E+01 | 0,002 | 3,48E-02 | 0,500 | 0    |
| GLSM 2b<br>(5 pixels e 90 graus)  | 17      | 5,20E-01 | 4,05E+02 | 0,001 | 8,50E-02 | 8,035 | 1    |
|                                   | 18      | 1,00E-03 | 1,34E+02 | 0,004 | 1,36E-01 | 7,046 | 1    |
|                                   | 19      | 4,17E-01 | 5,07E+02 | 0,837 | 7,30E-02 | 8,254 | 1    |
|                                   | 20      | 6,93E-01 | 2,29E+02 | 0,002 | 1,08E-01 | 7,717 | 1    |
|                                   | MEDIANA | 4,68E-01 | 3,17E+02 | 0,003 | 9,65E-02 | 7,876 | 1,00 |
|                                   | DESPAD  | 2,94E-01 | 1,68E+02 | 0,417 | 2,78E-02 | 0,526 | 0    |
| GLSM 2c<br>(10 pixels e 90 graus) | 21      | 4,71E-01 | 4,98E+02 | 0,671 | 7,70E-02 | 8,095 | 1    |
|                                   | 22      | 1,00E-03 | 1,81E+02 | 0,002 | 1,24E-01 | 7,113 | 1    |
|                                   | 23      | 3,68E-01 | 6,72E+02 | 0,250 | 6,10E-02 | 8,323 | 1    |
|                                   | 24      | 6,28E-01 | 2,99E+02 | 0,001 | 9,40E-02 | 7,797 | 1    |
|                                   | MEDIANA | 4,20E-01 | 3,98E+02 | 0,126 | 8,55E-02 | 7,946 | 1,00 |
|                                   | DESPAD  | 2,66E-01 | 2,17E+02 | 0,316 | 2,69E-02 | 0,525 | 0    |
| MEDIANA GLSM 2                    |         | 4,20E-01 | 3,17E+02 | 0,003 | 9,65E-02 | 7,876 | 1,00 |
| DESPAD GLSM 2                     |         | 8,27E-02 | 8,19E+01 | 0,217 | 4,33E-03 | 0,015 | 0    |
| GLSM 3a<br>(1 pixel e 180 graus)  | 25      | 8,86E-01 | 8,49E+01 | 0,003 | 1,57E-01 | 7,519 | 1    |
|                                   | 26      | 2,00E-03 | 3,92E+01 | 0,006 | 2,18E-01 | 6,645 | 1    |
|                                   | 27      | 7,37E-01 | 1,04E+02 | 0,002 | 1,43E-01 | 7,705 | 1    |
|                                   | 28      | 1,00E-03 | 5,59E+01 | 0,004 | 1,92E-01 | 7,192 | 1    |
|                                   | MEDIANA | 3,69E-01 | 7,04E+01 | 0,004 | 1,75E-01 | 7,356 | 1,00 |

|                                       |          |          |          |          |          |       |      |
|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|------|
|                                       | DESPAD   | 4,72E-01 | 2,89E+01 | 0,002    | 3,40E-02 | 0,465 | 0    |
| GLSM 3b<br>(5 pixels e<br>180 graus)  | 29       | 5,89E-01 | 2,73E+02 | 0,002    | 1,00E-01 | 7,927 | 1    |
|                                       | 30       | 2,00E-03 | 1,07E+02 | 0,004    | 1,48E-01 | 7,001 | 1    |
|                                       | 31       | 4,85E-01 | 3,32E+02 | 0,001    | 9,00E-02 | 8,122 | 1    |
|                                       | 32       | 7,66E-01 | 1,59E+02 | 0,003    | 1,22E-01 | 7,616 | 1    |
|                                       | MEDIANA  | 5,37E-01 | 2,16E+02 | 0,003    | 1,11E-01 | 7,772 | 1,00 |
|                                       | DESPAD   | 3,27E-01 | 1,03E+02 | 0,001    | 2,57E-02 | 0,490 | 0    |
| GLSM 3c<br>(10 pixels e<br>180 graus) | 33       | 5,13E-01 | 3,81E+02 | 0,001    | 8,50E-02 | 8,042 | 1    |
|                                       | 34       | 1,00E-03 | 1,61E+02 | 0,003    | 1,28E-01 | 7,097 | 1    |
|                                       | 35       | 4,16E-01 | 4,89E+02 | 0,888    | 7,30E-02 | 8,243 | 1    |
|                                       | 36       | 6,56E-01 | 2,27E+02 | 0,002    | 1,05E-01 | 7,762 | 1    |
|                                       | MEDIANA  | 4,64E-01 | 3,04E+02 | 0,003    | 9,50E-02 | 7,902 | 1,00 |
|                                       | DESPAD   | 2,82E-01 | 1,48E+02 | 0,443    | 2,41E-02 | 0,500 | 0    |
| MEDIANA GLSM 3                        | 4,64E-01 | 2,16E+02 | 0,003    | 1,11E-01 | 7,772    | 1,00  |      |
| DESPAD GLSM 3                         | 9,92E-02 | 6,03E+01 | 0,255    | 5,29E-03 | 0,018    | 0     |      |
| GLSM 4a<br>(1 pixel e<br>270 graus)   | 37       | 7,97E-01 | 1,46E+02 | 0,002    | 1,43E-01 | 7,661 | 1    |
|                                       | 38       | 2,00E-03 | 5,26E+01 | 0,006    | 2,03E-01 | 6,721 | 1    |
|                                       | 39       | 6,49E-01 | 1,78E+02 | 0,002    | 1,25E-01 | 7,858 | 1    |
|                                       | 40       | 1,00E-03 | 8,57E+01 | 0,004    | 1,74E-01 | 7,325 | 1    |
|                                       | MEDIANA  | 3,26E-01 | 1,16E+02 | 0,003    | 1,59E-01 | 7,493 | 1,00 |
|                                       | DESPAD   | 4,21E-01 | 5,70E+01 | 0,002    | 3,44E-02 | 0,498 | 0    |
| GLSM 4b<br>(5 pixels e<br>270 grau)   | 41       | 5,12E-01 | 4,17E+02 | 0,001    | 8,50E-02 | 8,056 | 1    |
|                                       | 42       | 1,00E-03 | 1,43E+02 | 0,003    | 1,34E-01 | 7,064 | 1    |
|                                       | 43       | 4,22E-01 | 4,97E+02 | 0,858    | 7,30E-02 | 8,239 | 1    |
|                                       | 44       | 6,81E-01 | 2,26E+02 | 0,002    | 1,08E-01 | 7,732 | 1    |
|                                       | MEDIANA  | 4,67E-01 | 3,22E+02 | 0,003    | 9,65E-02 | 7,894 | 1,00 |
|                                       | DESPAD   | 2,89E-01 | 1,64E+02 | 0,428    | 2,69E-02 | 0,517 | 0    |
| GLSM 4c<br>(10 pixels e<br>270 graus) | 45       | 4,54E-01 | 5,34E+02 | 0,598    | 7,50E-02 | 8,137 | 1    |
|                                       | 46       | 1,00E-03 | 2,13E+02 | 0,002    | 1,21E-01 | 7,155 | 1    |
|                                       | 47       | 3,77E-01 | 6,42E+02 | 0,301    | 6,20E-02 | 8,299 | 1    |
|                                       | 48       | 6,14E-01 | 2,81E+02 | 0,002    | 9,40E-02 | 7,818 | 1    |
|                                       | MEDIANA  | 4,15E-01 | 4,08E+02 | 0,152    | 8,45E-02 | 7,978 | 1,00 |
|                                       | DESPAD   | 2,60E-01 | 2,04E+02 | 0,285    | 2,56E-02 | 0,506 | 0    |
| MEDIANA GLSM 4                        | 4,15E-01 | 3,22E+02 | 0,003    | 9,65E-02 | 7,894    | 1,00  |      |
| DESPAD GLSM 4                         | 8,59E-02 | 7,59E+01 | 0,217    | 4,74E-03 | 0,009    | 0     |      |

|                  |          |          |       |          |       |      |
|------------------|----------|----------|-------|----------|-------|------|
| MEDIANA GLSM SnF | 4,42E-01 | 2,66E+02 | 0,003 | 1,04E-01 | 7,824 | 1,00 |
| DESPAD GLSM SnF  | 7,50E-03 | 1,00E+01 | 0,021 | 4,29E-04 | 0,007 | 0    |

| Análise                         | Quadrante | Angular       | Contrast | Correlation | Inverse           | Entropy | Sum of all GLCM elements |
|---------------------------------|-----------|---------------|----------|-------------|-------------------|---------|--------------------------|
|                                 |           | Second Moment |          |             | Difference Moment |         |                          |
| GLSM 1a<br>(1 pixel e 0 grau)   | 1         | 2,23E-01      | 3,78E+02 | 0,001       | 6,60E-02          | 8,680   | 1                        |
|                                 | 2         | 1,97E-01      | 4,05E+02 | 0,001       | 6,30E-02          | 8,742   | 1                        |
|                                 | 3         | 2,37E-01      | 3,78E+02 | 0,001       | 6,80E-02          | 8,639   | 1                        |
|                                 | 4         | 2,15E-01      | 3,98E+02 | 0,001       | 6,50E-02          | 8,702   | 1                        |
|                                 | MEDIANA   | 2,19E-01      | 3,88E+02 | 0,001       | 6,55E-02          | 8,691   | 1,00                     |
|                                 | DESPAD    | 1,64E-02      | 1,35E+01 | 0,000       | 2,08E-03          | 0,043   | 0                        |
| GLSM 1b<br>(5 pixels e 0 grau)  | 5         | 1,90E-01      | 6,22E+02 | 0,795       | 5,30E-02          | 8,837   | 1.000                    |
|                                 | 6         | 1,72E-01      | 6,27E+02 | 0,778       | 5,20E-02          | 8,884   | 1.000                    |
|                                 | 7         | 1,97E-01      | 6,87E+02 | 0,685       | 5,40E-02          | 8,815   | 1.000                    |
|                                 | 8         | 1,86E-01      | 6,36E+02 | 0,768       | 5,40E-02          | 8,840   | 1.000                    |
|                                 | MEDIANA   | 1,88E-01      | 6,32E+02 | 0,773       | 5,35E-02          | 8,839   | 1000,00                  |
|                                 | DESPAD    | 1,05E-02      | 3,00E+01 | 0,049       | 9,57E-04          | 0,029   | 0                        |
| GLSM 1c<br>(10 pixels e 0 grau) | 9         | 1,77E-01      | 7,72E+02 | 0,560       | 4,80E-02          | 8,898   | 1                        |
|                                 | 10        | 1,62E-01      | 7,82E+02 | 0,514       | 4,50E-02          | 8,940   | 1                        |
|                                 | 11        | 1,81E-01      | 9,02E+02 | 0,339       | 4,50E-02          | 8,882   | 1                        |
|                                 | 12        | 1,76E-01      | 7,82E+02 | 0,524       | 4,70E-02          | 8,890   | 1                        |
|                                 | MEDIANA   | 1,76E-01      | 7,82E+02 | 0,519       | 4,60E-02          | 8,894   | 1,00                     |
|                                 | DESPAD    | 8,44E-03      | 6,18E+01 | 0,099       | 1,50E-03          | 0,026   | 0                        |
| MEDIANA GLSM 1                  | 1,88E-01  | 6,32E+02      | 0,519    | 5,35E-02    | 8,839             | 1,00    |                          |
| DESPAD GLSM 1                   | 4,16E-03  | 2,46E+01      | 0,050    | 5,62E-04    | 0,009             | 0       |                          |
| GLSM 2a<br>(1 pixel e 90 graus) | 13        | 2,21E-01      | 4,06E+02 | 0,001       | 6,50E-02          | 8,699   | 1                        |
|                                 | 14        | 2,00E-01      | 3,95E+02 | 0,001       | 6,30E-02          | 8,731   | 1                        |
|                                 | 15        | 2,35E-01      | 3,97E+02 | 0,001       | 6,60E-02          | 8,651   | 1                        |
|                                 | 16        | 2,18E-01      | 3,91E+02 | 0,001       | 6,60E-02          | 8,691   | 1                        |
|                                 | MEDIANA   | 2,19E-01      | 3,96E+02 | 0,001       | 6,55E-02          | 8,695   | 1,00                     |
|                                 | DESPAD    | 1,42E-02      | 6,47E+00 | 0,000       | 1,41E-03          | 0,033   | 0                        |
| 17                              | 1,92E-01  | 6,44E+02      | 0,759    | 5,40E-02    | 8,832             | 1       |                          |

|  |  |         |          |          |       |          |       |      |
|--|--|---------|----------|----------|-------|----------|-------|------|
|  |  | 18      | 1,79E-01 | 5,58E+02 | 0,896 | 5,50E-02 | 8,843 | 1    |
|  |  | 19      | 1,99E-01 | 6,79E+02 | 0,698 | 5,40E-02 | 8,809 | 1    |
|  |  | 20      | 1,91E-01 | 5,90E+02 | 0,845 | 5,60E-02 | 8,817 | 1    |
|  |  | MEDIANA | 1,92E-01 | 6,17E+02 | 0,802 | 5,45E-02 | 8,825 | 1,00 |
|  |  | DESPAD  | 8,37E-03 | 5,43E+01 | 0,088 | 9,57E-04 | 0,015 | 0    |
| GLSM 2c<br>(10 pixels e<br>90 graus)             |  | 21      | 1,82E-01 | 7,77E+02 | 0,546 | 4,90E-02 | 8,881 | 1    |
|  |  | 22      | 1,69E-01 | 6,62E+02 | 0,720 | 4,80E-02 | 8,896 | 1    |
|  |  | 23      | 1,83E-01 | 8,61E+02 | 0,405 | 4,50E-02 | 8,870 | 1    |
|  |  | 24      | 1,78E-01 | 7,32E+02 | 0,618 | 5,10E-02 | 8,880 | 1    |
|  |  | MEDIANA | 1,80E-01 | 7,55E+02 | 0,582 | 4,85E-02 | 8,881 | 1,00 |
|  |  | DESPAD  | 6,45E-03 | 8,33E+01 | 0,132 | 2,50E-03 | 0,011 | 0    |
| MEDIANA GLSM 2                                   |  |         | 1,92E-01 | 6,17E+02 | 0,582 | 5,45E-02 | 8,825 | 1,00 |
| DESPAD GLSM 2                                    |  |         | 4,03E-03 | 3,88E+01 | 0,067 | 7,92E-04 | 0,012 | 0    |
| GLSM 3a<br>(1 pixel e<br>180 graus)              |  | 25      | 2,23E-01 | 3,78E+02 | 0,001 | 6,60E-02 | 8,678 | 1    |
|  |  | 26      | 1,97E-01 | 4,05E+02 | 0,001 | 6,30E-02 | 8,742 | 1    |
|  |  | 27      | 2,37E-01 | 3,78E+02 | 0,001 | 6,80E-02 | 8,637 | 1    |
|  |  | 28      | 2,14E-01 | 3,98E+02 | 0,001 | 6,50E-02 | 8,703 | 1    |
|  |  | MEDIANA | 2,19E-01 | 3,88E+02 | 0,001 | 6,55E-02 | 8,691 | 1,00 |
|  |  | DESPAD  | 1,68E-02 | 1,37E+01 | 0,000 | 2,08E-03 | 0,044 | 0    |
| GLSM 3b<br>(5 pixels e<br>180 graus)             |  | 29      | 1,93E-01 | 6,15E+02 | 0,806 | 5,30E-02 | 8,826 | 1    |
|  |  | 30      | 1,72E-01 | 6,25E+02 | 0,782 | 5,20E-02 | 8,883 | 1    |
|  |  | 31      | 2,00E-01 | 6,82E+02 | 0,689 | 5,40E-02 | 8,804 | 1    |
|  |  | 32      | 1,85E-01 | 6,38E+02 | 0,769 | 5,40E-02 | 8,849 | 1    |
|  |  | MEDIANA | 1,89E-01 | 6,31E+02 | 0,775 | 5,35E-02 | 8,838 | 1,00 |
|  |  | DESPAD  | 1,19E-02 | 2,96E+01 | 0,051 | 9,57E-04 | 0,034 | 0    |
| GLSM 3c<br>(10 pixels e<br>180 graus)            |  | 33      | 1,83E-01 | 7,60E+02 | 0,575 | 4,90E-02 | 8,877 | 1    |
|  |  | 34      | 1,62E-01 | 7,77E+02 | 0,519 | 4,60E-02 | 8,938 | 1    |
|  |  | 35      | 1,86E-01 | 8,77E+02 | 0,363 | 4,70E-02 | 8,860 | 1    |
|  |  | 36      | 1,72E-01 | 7,99E+02 | 0,514 | 4,70E-02 | 8,910 | 1    |
|  |  | MEDIANA | 1,77E-01 | 7,88E+02 | 0,516 | 4,70E-02 | 8,894 | 1,00 |
|  |  | DESPAD  | 1,09E-02 | 5,16E+01 | 0,091 | 1,26E-03 | 0,035 | 0    |
| MEDIANA GLSM 3                                   |  |         | 1,89E-01 | 6,31E+02 | 0,516 | 5,35E-02 | 8,838 | 1,00 |
| DESPAD GLSM 3                                    |  |         | 3,16E-03 | 1,90E+01 | 0,045 | 5,82E-04 | 0,006 | 0    |
| T <sub>0</sub><br>(1<br>pixel e<br>180<br>graus) |  | 37      | 2,21E-01 | 4,07E+02 | 0,001 | 6,50E-02 | 8,701 | 1    |
|  |  | 38      | 2,00E-01 | 3,96E+02 | 0,001 | 6,30E-02 | 8,732 | 1    |

|  |                                       |          |          |          |          |          |          |       |      |
|--|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|------|
|  |                                       | 39       | 2,35E-01 | 3,96E+02 | 0,001    | 6,60E-02 | 8,649    | 1     |      |
|  |                                       | 40       | 2,18E-01 | 3,91E+02 | 0,001    | 6,60E-02 | 8,690    | 1     |      |
|  |                                       | MEDIANA  | 2,19E-01 | 3,96E+02 | 0,001    | 6,55E-02 | 8,696    | 1,00  |      |
|  |                                       | DESPAD   | 1,44E-02 | 6,84E+00 | 0,000    | 1,41E-03 | 0,034    | 0     |      |
|  | GLSM 4b<br>(5 pixels e<br>270 grau)   | 41       | 1,90E-01 | 6,52E+02 | 0,748    | 5,40E-02 | 8,844    | 1     |      |
|  |                                       | 42       | 1,78E-01 | 5,64E+02 | 0,885    | 5,50E-02 | 8,846    | 1     |      |
|  |                                       | 43       | 2,00E-01 | 6,73E+02 | 0,703    | 5,50E-02 | 8,800    | 1     |      |
|  |                                       | 44       | 1,93E-01 | 5,88E+02 | 0,848    | 5,60E-02 | 8,811    | 1     |      |
|  |                                       | MEDIANA  | 1,91E-01 | 6,20E+02 | 0,798    | 5,50E-02 | 8,828    | 1,00  |      |
|  |                                       | DESPAD   | 9,28E-03 | 5,18E+01 | 0,085    | 8,16E-04 | 0,023    | 0     |      |
|  | GLSM 4c<br>(10 pixels e<br>270 graus) | 45       | 1,77E-01 | 7,99E+02 | 0,522    | 4,80E-02 | 8,902    | 1     |      |
|  |                                       | 46       | 1,67E-01 | 6,79E+02 | 0,688    | 4,80E-02 | 8,903    | 1     |      |
|  |                                       | 47       | 1,86E-01 | 8,48E+02 | 0,410    | 4,60E-02 | 8,855    | 1     |      |
|  |                                       | 48       | 1,81E-01 | 7,23E+02 | 0,628    | 5,10E-02 | 8,866    | 1     |      |
|  |                                       | MEDIANA  | 1,79E-01 | 7,61E+02 | 0,575    | 4,80E-02 | 8,884    | 1,00  |      |
|  |                                       | DESPAD   | 7,87E-03 | 7,56E+01 | 0,123    | 2,06E-03 | 0,025    | 0     |      |
|  | MEDIANA GLSM 4                        | 1,91E-01 | 6,20E+02 | 0,575    | 5,50E-02 | 8,828    | 1,00     |       |      |
|  | DESPAD GLSM 4                         | 3,41E-03 | 3,49E+01 | 0,063    | 6,23E-04 | 0,006    | 0        |       |      |
|  | MEDIANA GLSM BF                       |          |          | 1,90E-01 | 6,26E+02 | 0,547    | 5,40E-02 | 8,833 | 1,00 |
|  | DESPAD GLSM BF                        |          |          | 4,82E-04 | 9,12E+00 | 0,010    | 1,05E-04 | 0,003 | 0    |

| PACIENTE 4 - FRESCO               | Análise | Quadrante | Angular          | Contrast | Correlation | Inverse              | Entropy | Sum of all<br>GLCM<br>elements |
|-----------------------------------|---------|-----------|------------------|----------|-------------|----------------------|---------|--------------------------------|
|                                   |         |           | Second<br>Moment |          |             | Difference<br>Moment |         |                                |
| GLSM 1a<br>(1 pixel e 0 grau)     | 1       | 1,00E-03  | 1,31E+02         | 0,004    | 1,47E-01    | 7,288                | 1       |                                |
|                                   | 2       | 8,00E-03  | 8,49E+01         | 0,004    | 3,05E-01    | 6,357                | 1       |                                |
|                                   | 3       | 7,24E-01  | 1,54E+02         | 0,003    | 1,14E-01    | 7,541                | 1       |                                |
|                                   | 4       | 8,65E-01  | 1,45E+02         | 0,003    | 1,39E-01    | 7,450                | 1       |                                |
|                                   | MEDIANA | 3,66E-01  | 1,38E+02         | 0,004    | 1,43E-01    | 7,369                | 1,00    |                                |
|                                   | DESPAD  | 4,60E-01  | 3,08E+01         | 0,001    | 8,70E-02    | 0,545                | 0       |                                |
| GLSM 1b<br>(5 pixels e<br>0 grau) | 5       | 9,39E-01  | 1,57E+02         | 0,003    | 1,32E-01    | 7,340                | 1       |                                |
|                                   | 6       | 6,00E-03  | 1,06E+02         | 0,004    | 2,39E-01    | 6,475                | 1       |                                |
|                                   | 7       | 6,89E-01  | 1,85E+02         | 0,003    | 1,01E-01    | 7,591                | 1       |                                |

|  |  |                |          |          |       |          |       |      |
|--|--|----------------|----------|----------|-------|----------|-------|------|
|  |  | <b>8</b>       | 7,83E-01 | 1,68E+02 | 0,003 | 1,24E-01 | 7,507 | 1    |
|  |  | MEDIANA        | 7,36E-01 | 1,62E+02 | 0,003 | 1,28E-01 | 7,424 | 1,00 |
|  |  | DESPAD         | 4,12E-01 | 3,43E+01 | 0,001 | 6,14E-02 | 0,513 | 0    |
| <b>GLSM 1c</b><br>(10 pixels e 0 grau)   |  | <b>9</b>       | 9,12E-01 | 1,66E+02 | 0,003 | 1,25E-01 | 7,364 | 1    |
|  |  | <b>10</b>      | 6,00E-03 | 1,16E+02 | 0,004 | 2,33E-01 | 6,509 | 1    |
|  |  | <b>11</b>      | 6,71E-01 | 2,01E+02 | 0,002 | 9,60E-02 | 7,621 | 1    |
|  |  | <b>12</b>      | 7,32E-01 | 1,89E+02 | 0,003 | 1,15E-01 | 7,562 | 1    |
|  |  | MEDIANA        | 7,01E-01 | 1,77E+02 | 0,003 | 1,20E-01 | 7,463 | 1,00 |
|  |  | DESPAD         | 3,96E-01 | 3,72E+01 | 0,001 | 6,17E-02 | 0,515 | 0    |
|  |  | MEDIANA GLSM 1 | 7,01E-01 | 1,62E+02 | 0,003 | 1,28E-01 | 7,424 | 1,00 |
|  |  | DESPAD GLSM 1  | 3,30E-02 | 3,21E+00 | 0,000 | 1,47E-02 | 0,018 | 0    |
| <b>GLSM 2a</b><br>(1 pixel e 90 graus)   |  | <b>13</b>      | 1,00E-03 | 1,35E+02 | 0,004 | 1,50E-01 | 7,286 | 1    |
|  |  | <b>14</b>      | 8,00E-03 | 8,44E+01 | 0,004 | 2,96E-01 | 6,363 | 1    |
|  |  | <b>15</b>      | 7,21E-01 | 1,58E+02 | 0,003 | 1,11E-01 | 7,546 | 1    |
|  |  | <b>16</b>      | 8,71E-01 | 1,46E+02 | 0,003 | 1,40E-01 | 7,443 | 1    |
|  |  | MEDIANA        | 3,64E-01 | 1,41E+02 | 0,004 | 1,45E-01 | 7,365 | 1,00 |
|  |  | DESPAD         | 4,61E-01 | 3,25E+01 | 0,001 | 8,28E-02 | 0,542 | 0    |
| <b>GLSM 2b</b><br>(5 pixels e 90 graus)  |  | <b>17</b>      | 9,50E-01 | 1,58E+02 | 0,003 | 1,29E-01 | 7,338 | 1    |
|  |  | <b>18</b>      | 7,00E-03 | 1,04E+02 | 0,004 | 2,43E-01 | 6,450 | 1    |
|  |  | <b>19</b>      | 6,87E-01 | 1,91E+01 | 0,002 | 1,00E-01 | 7,596 | 1    |
|  |  | <b>20</b>      | 7,66E-01 | 1,69E+02 | 0,003 | 1,20E-01 | 7,520 | 1    |
|  |  | MEDIANA        | 7,26E-01 | 1,31E+02 | 0,003 | 1,25E-01 | 7,429 | 1,00 |
|  |  | DESPAD         | 4,12E-01 | 6,85E+01 | 0,001 | 6,45E-02 | 0,529 | 0    |
| <b>GLSM 2c</b><br>(10 pixels e 90 graus) |  | <b>21</b>      | 9,27E-01 | 1,72E+02 | 0,003 | 1,26E-01 | 7,369 | 1    |
|  |  | <b>22</b>      | 7,00E-03 | 1,18E+02 | 0,004 | 2,33E-01 | 6,483 | 1    |
|  |  | <b>23</b>      | 6,63E-01 | 2,15E+02 | 0,002 | 9,40E-02 | 7,625 | 1    |
|  |  | <b>24</b>      | 6,97E-01 | 1,94E+02 | 0,003 | 1,10E-01 | 7,593 | 1    |
|  |  | MEDIANA        | 6,80E-01 | 1,83E+02 | 0,003 | 1,18E-01 | 7,481 | 1,00 |
|  |  | DESPAD         | 3,95E-01 | 4,15E+01 | 0,001 | 6,29E-02 | 0,535 | 0    |
|  |  | MEDIANA GLSM 2 | 6,80E-01 | 1,41E+02 | 0,003 | 1,25E-01 | 7,429 | 1,00 |
|  |  | DESPAD GLSM 2  | 3,41E-02 | 1,88E+01 | 0,000 | 1,11E-02 | 0,007 | 0    |
| <b>GLSM 3a</b><br>(1 pixel e 180 graus)  |  | <b>25</b>      | 1,00E-03 | 1,31E+02 | 0,004 | 1,47E-01 | 7,288 | 1    |
|  |  | <b>26</b>      | 8,00E-03 | 8,51E+01 | 0,004 | 3,04E-01 | 6,362 | 1    |
|  |  | <b>27</b>      | 7,25E-01 | 1,54E+02 | 0,003 | 1,15E-01 | 7,539 | 1    |
|  |  | <b>28</b>      | 8,59E-01 | 1,46E+02 | 0,003 | 1,38E-01 | 7,453 | 1    |
|  |  |                |          |          |       |          |       |      |

|                                       |         |          |          |       |          |       |      |
|---------------------------------------|---------|----------|----------|-------|----------|-------|------|
|                                       | MEDIANA | 3,66E-01 | 1,38E+02 | 0,004 | 1,43E-01 | 7,371 | 1,00 |
|                                       | DESPAD  | 4,58E-01 | 3,06E+01 | 0,001 | 8,64E-02 | 0,542 | 0    |
| GLSM 3b<br>(5 pixels e<br>180 graus)  | 29      | 9,31E-01 | 1,56E+02 | 0,003 | 1,32E-01 | 7,339 | 1    |
|                                       | 30      | 6,00E-03 | 1,08E+02 | 0,004 | 2,37E-01 | 6,498 | 1    |
|                                       | 31      | 6,86E-01 | 1,83E+02 | 0,003 | 1,04E-01 | 7,591 | 1    |
|                                       | 32      | 7,63E-01 | 1,71E+02 | 0,003 | 1,21E-01 | 7,521 | 1    |
|                                       | MEDIANA | 7,25E-01 | 1,64E+02 | 0,003 | 1,27E-01 | 7,430 | 1,00 |
|                                       | DESPAD  | 4,07E-01 | 3,31E+01 | 0,001 | 6,01E-02 | 0,504 | 0    |
| GLSM 3c<br>(10 pixels e<br>180 graus) | 33      | 9,02E-01 | 1,65E+02 | 0,003 | 1,25E-01 | 7,362 | 1    |
|                                       | 34      | 6,00E-03 | 1,20E+02 | 0,004 | 2,29E-01 | 6,552 | 1    |
|                                       | 35      | 6,62E-01 | 1,98E+02 | 0,002 | 1,01E-01 | 7,628 | 1    |
|                                       | 36      | 7,00E-01 | 1,95E+02 | 0,002 | 1,09E-01 | 7,586 | 1    |
|                                       | MEDIANA | 6,81E-01 | 1,80E+02 | 0,003 | 1,17E-01 | 7,474 | 1,00 |
|                                       | DESPAD  | 3,89E-01 | 3,62E+01 | 0,001 | 5,95E-02 | 0,500 | 0    |
| MEDIANA GLSM 3                        |         | 6,81E-01 | 1,64E+02 | 0,003 | 1,27E-01 | 7,430 | 1,00 |
| DESPAD GLSM 3                         |         | 3,58E-02 | 2,80E+00 | 0,000 | 1,53E-02 | 0,023 | 0    |
| GLSM 4a<br>(1 pixel e<br>270 graus)   | 37      | 1,00E-03 | 1,36E+02 | 0,004 | 1,49E-01 | 7,292 | 1    |
|                                       | 38      | 8,00E-03 | 8,51E+01 | 0,004 | 2,94E-01 | 6,381 | 1    |
|                                       | 39      | 7,20E-01 | 1,58E+02 | 0,003 | 1,11E-01 | 7,546 | 1    |
|                                       | 40      | 8,73E-01 | 1,46E+02 | 0,003 | 1,40E-01 | 7,443 | 1    |
|                                       | MEDIANA | 3,64E-01 | 1,41E+02 | 0,004 | 1,45E-01 | 7,368 | 1,00 |
|                                       | DESPAD  | 4,62E-01 | 3,20E+01 | 0,001 | 8,20E-02 | 0,533 | 0    |
| GLSM 4b<br>(5 pixels e<br>270 grau)   | 41      | 8,95E-01 | 1,62E+02 | 0,003 | 1,25E-01 | 7,370 | 1    |
|                                       | 42      | 6,00E-03 | 1,08E+02 | 0,004 | 2,34E-01 | 6,542 | 1    |
|                                       | 43      | 6,82E-01 | 1,88E+02 | 0,003 | 1,02E-01 | 7,597 | 1    |
|                                       | 44      | 7,72E-01 | 1,68E+02 | 0,003 | 1,21E-01 | 7,516 | 1    |
|                                       | MEDIANA | 7,27E-01 | 1,65E+02 | 0,003 | 1,23E-01 | 7,443 | 1,00 |
|                                       | DESPAD  | 3,98E-01 | 3,41E+01 | 0,001 | 5,98E-02 | 0,485 | 0    |
| GLSM 4c<br>(10 pixels e<br>270 graus) | 45      | 8,27E-01 | 1,82E+02 | 0,003 | 1,16E-01 | 7,429 | 1    |
|                                       | 46      | 5,00E-03 | 1,28E+02 | 0,004 | 2,17E-01 | 6,665 | 1    |
|                                       | 47      | 6,55E-01 | 2,08E+02 | 0,002 | 1,00E-01 | 7,629 | 1    |
|                                       | 48      | 7,08E-01 | 1,90E+02 | 0,003 | 1,11E-01 | 7,584 | 1    |
|                                       | MEDIANA | 6,81E-01 | 1,86E+02 | 0,003 | 1,14E-01 | 7,507 | 1,00 |
|                                       | DESPAD  | 3,69E-01 | 3,44E+01 | 0,001 | 5,44E-02 | 0,449 | 0    |
| MEDIANA GLSM 4                        |         | 6,81E-01 | 1,65E+02 | 0,003 | 1,23E-01 | 7,443 | 1,00 |

|                 |          |          |       |          |       |      |
|-----------------|----------|----------|-------|----------|-------|------|
| DESPAD GLSM 4   | 4,72E-02 | 1,28E+00 | 0,000 | 1,46E-02 | 0,042 | 0    |
| MEDIANA GLSM AF | 6,81E-01 | 1,63E+02 | 0,003 | 1,26E-01 | 7,430 | 1,00 |
| DESPAD GLSM AF  | 6,52E-03 | 8,20E+00 | 0,000 | 1,92E-03 | 0,015 | 0    |

| Análise                         | Quadrante | Angular       | Contrast | Correlation | Inverse           | Entropy | Sum of all GLCM elements |
|---------------------------------|-----------|---------------|----------|-------------|-------------------|---------|--------------------------|
|                                 |           | Second Moment |          |             | Difference Moment |         |                          |
| GLSM 1a<br>(1 pixel e 0 grau)   | 1         | 2,00E-03      | 1,02E+02 | 0,004       | 1,65E-01          | 6,793   | 1                        |
|                                 | 2         | 2,00E-03      | 8,86E+01 | 0,005       | 1,56E-01          | 6,737   | 1                        |
|                                 | 3         | 1,00E-03      | 1,44E+02 | 0,003       | 1,29E-01          | 7,294   | 1                        |
|                                 | 4         | 2,00E-03      | 1,16E+02 | 0,003       | 1,52E-01          | 7,014   | 1                        |
|                                 | MEDIANA   | 2,00E-03      | 1,09E+02 | 0,004       | 1,54E-01          | 6,904   | 1,00                     |
|                                 | DESPAD    | 5,00E-04      | 2,39E+01 | 0,001       | 1,53E-02          | 0,253   | 0                        |
| GLSM 1b<br>(5 pixels e 0 grau)  | 5         | 2,00E-03      | 2,42E+02 | 0,002       | 1,31E-01          | 6,938   | 1                        |
|                                 | 6         | 2,00E-03      | 1,63E+02 | 0,003       | 1,32E-01          | 6,857   | 1                        |
|                                 | 7         | 1,00E-03      | 3,15E+02 | 0,001       | 1,09E-01          | 7,451   | 1                        |
|                                 | 8         | 1,00E-03      | 2,43E+02 | 0,002       | 1,26E-01          | 7,160   | 1                        |
|                                 | MEDIANA   | 1,50E-03      | 2,43E+02 | 0,002       | 1,29E-01          | 7,049   | 1,00                     |
|                                 | DESPAD    | 5,77E-04      | 6,19E+01 | 0,001       | 1,07E-02          | 0,266   | 0                        |
| GLSM 1c<br>(10 pixels e 0 grau) | 9         | 2,00E-03      | 3,11E+02 | 0,796       | 1,20E-01          | 6,962   | 1                        |
|                                 | 10        | 2,00E-03      | 2,06E+02 | 0,001       | 1,24E-01          | 6,898   | 1                        |
|                                 | 11        | 9,64E-01      | 3,80E+02 | 0,948       | 1,00E-01          | 7,501   | 1                        |
|                                 | 12        | 1,00E-03      | 3,06E+02 | 0,001       | 1,19E-01          | 7,200   | 1                        |
|                                 | MEDIANA   | 2,00E-03      | 3,08E+02 | 0,399       | 1,20E-01          | 7,081   | 1,00                     |
|                                 | DESPAD    | 4,81E-01      | 7,16E+01 | 0,507       | 1,07E-02          | 0,273   | 0                        |
| MEDIANA GLSM 1                  | 2,00E-03  | 2,43E+02      | 0,004    | 1,29E-01    | 7,049             | 1,00    |                          |
| DESPAD GLSM 1                   | 2,77E-01  | 2,52E+01      | 0,292    | 2,68E-03    | 0,010             | 0       |                          |
| GLSM 2a<br>(1 pixel e 90 graus) | 13        | 2,00E-03      | 9,89E+01 | 0,004       | 1,63E-01          | 6,783   | 1                        |
|                                 | 14        | 2,00E-03      | 9,36E+01 | 0,005       | 1,60E-01          | 6,743   | 1                        |
|                                 | 15        | 1,00E-03      | 1,58E+02 | 0,003       | 1,31E-01          | 7,300   | 1                        |
|                                 | 16        | 2,00E-03      | 1,32E+02 | 0,003       | 1,55E-01          | 7,026   | 1                        |
|                                 | MEDIANA   | 2,00E-03      | 1,15E+02 | 0,004       | 1,58E-01          | 6,905   | 1,00                     |
|                                 | DESPAD    | 5,00E-04      | 3,00E+01 | 0,001       | 1,45E-02          | 0,257   | 0                        |

|                                    |          |          |          |          |          |       |      |
|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|------|
| GLSM 2b<br>(5 pixels e 90 graus)   | 17       | 2,00E-03 | 2,38E+02 | 0,002    | 1,34E-01 | 6,926 | 1    |
|                                    | 18       | 2,00E-03 | 1,68E+02 | 0,002    | 1,33E-01 | 6,857 | 1    |
|                                    | 19       | 1,00E-03 | 3,25E+02 | 0,001    | 1,09E-01 | 7,437 | 1    |
|                                    | 20       | 1,00E-03 | 2,77E+02 | 0,002    | 1,28E-01 | 7,172 | 1    |
|                                    | MEDIANA  | 1,50E-03 | 2,57E+02 | 0,002    | 1,31E-01 | 7,049 | 1,00 |
|                                    | DESPAD   | 5,77E-04 | 6,64E+01 | 0,001    | 1,16E-02 | 0,263 | 0    |
| GLSM 2c<br>(10 pixels e 90 graus)  | 21       | 2,00E-03 | 3,28E+02 | 0,583    | 1,24E-01 | 6,973 | 1    |
|                                    | 22       | 2,00E-03 | 2,01E+02 | 0,928    | 1,24E-01 | 6,884 | 1    |
|                                    | 23       | 9,81E-01 | 3,77E+02 | 0,823    | 9,90E-02 | 7,462 | 1    |
|                                    | 24       | 1,00E-03 | 3,44E+02 | 0,915    | 1,17E-01 | 7,214 | 1    |
|                                    | MEDIANA  | 2,00E-03 | 3,36E+02 | 0,869    | 1,21E-01 | 7,094 | 1,00 |
|                                    | DESPAD   | 4,90E-01 | 7,73E+01 | 0,160    | 1,18E-02 | 0,260 | 0    |
| MEDIANA GLSM 2                     | 2,00E-03 | 2,57E+02 | 0,004    | 1,31E-01 | 7,049    | 1,00  |      |
| DESPAD GLSM 2                      | 2,82E-01 | 2,48E+01 | 0,092    | 1,63E-03 | 0,003    | 0     |      |
| GLSM 3a<br>(1 pixel e 180 graus)   | 25       | 2,00E-03 | 1,02E+02 | 0,004    | 1,65E-01 | 6,793 | 1    |
|                                    | 26       | 2,00E-03 | 8,88E+01 | 0,005    | 1,56E-01 | 6,737 | 1    |
|                                    | 27       | 1,00E-03 | 1,44E+02 | 0,003    | 1,30E-01 | 7,291 | 1    |
|                                    | 28       | 2,00E-03 | 1,17E+02 | 0,003    | 1,51E-01 | 7,019 | 1    |
|                                    | MEDIANA  | 2,00E-03 | 1,09E+02 | 0,004    | 1,54E-01 | 6,906 | 1,00 |
|                                    | DESPAD   | 5,00E-04 | 2,38E+01 | 0,001    | 1,48E-02 | 0,252 | 0    |
| GLSM 3b<br>(5 pixels e 180 graus)  | 29       | 2,00E-03 | 2,40E+02 | 0,002    | 1,32E-01 | 6,939 | 1    |
|                                    | 30       | 2,00E-03 | 1,65E+02 | 0,003    | 1,32E-01 | 6,852 | 1    |
|                                    | 31       | 1,00E-03 | 3,11E+02 | 0,001    | 1,09E-01 | 7,433 | 1    |
|                                    | 32       | 1,00E-03 | 2,48E+02 | 0,002    | 1,25E-01 | 7,184 | 1    |
|                                    | MEDIANA  | 1,50E-03 | 2,44E+02 | 0,002    | 1,29E-01 | 7,062 | 1,00 |
|                                    | DESPAD   | 5,77E-04 | 5,95E+01 | 0,001    | 1,08E-02 | 0,262 | 0    |
| GLSM 3c<br>(10 pixels e 180 graus) | 33       | 2,00E-03 | 3,00E+02 | 0,839    | 1,21E-01 | 6,964 | 1    |
|                                    | 34       | 2,00E-03 | 2,16E+02 | 0,001    | 1,24E-01 | 6,887 | 1    |
|                                    | 35       | 9,79E-01 | 3,71E+02 | 0,896    | 1,01E-01 | 7,465 | 1    |
|                                    | 36       | 1,00E-03 | 3,17E+02 | 0,001    | 1,17E-01 | 7,246 | 1    |
|                                    | MEDIANA  | 2,00E-03 | 3,08E+02 | 0,420    | 1,19E-01 | 7,105 | 1,00 |
|                                    | DESPAD   | 4,88E-01 | 6,43E+01 | 0,501    | 1,02E-02 | 0,266 | 0    |
| MEDIANA GLSM 3                     | 2,00E-03 | 2,44E+02 | 0,004    | 1,29E-01 | 7,062    | 1,00  |      |
| DESPAD GLSM 3                      | 2,82E-01 | 2,22E+01 | 0,289    | 2,50E-03 | 0,007    | 0     |      |
| pixel e                            | 37       | 2,00E-03 | 9,90E+01 | 0,004    | 1,63E-01 | 6,785 | 1    |

|                                      |                                       |          |          |          |          |          |       |   |
|--------------------------------------|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|---|
| GLSM 4b<br>(5 pixels e<br>270 graus) | 38                                    | 2,00E-03 | 9,43E+01 | 0,005    | 1,60E-01 | 6,745    | 1     |   |
|                                      | 39                                    | 1,00E-03 | 1,58E+02 | 0,003    | 1,31E-01 | 7,303    | 1     |   |
|                                      | 40                                    | 2,00E-03 | 1,33E+02 | 0,003    | 1,55E-01 | 7,030    | 1     |   |
|                                      | MEDIANA                               | 2,00E-03 | 1,16E+02 | 0,004    | 1,58E-01 | 6,908    | 1,00  |   |
|                                      | DESPAD                                | 5,00E-04 | 3,01E+01 | 0,001    | 1,45E-02 | 0,258    | 0     |   |
|                                      | 41                                    | 2,00E-03 | 2,40E+02 | 0,002    | 1,33E-01 | 6,929    | 1     |   |
|                                      | 42                                    | 2,00E-03 | 1,73E+02 | 0,002    | 1,32E-01 | 6,864    | 1     |   |
|                                      | 43                                    | 1,00E-03 | 3,34E+02 | 0,001    | 1,09E-01 | 7,459    | 1     |   |
|                                      | 44                                    | 1,00E-03 | 2,78E+02 | 0,002    | 1,28E-01 | 7,191    | 1     |   |
|                                      | MEDIANA                               | 1,50E-03 | 2,59E+02 | 0,002    | 1,30E-01 | 7,060    | 1,000 |   |
|                                      | DESPAD                                | 5,77E-04 | 6,76E+01 | 0,001    | 1,12E-02 | 0,272    | 0,000 |   |
|                                      | GLSM 4c<br>(10 pixels e<br>270 graus) | 45       | 2,00E-03 | 3,32E+02 | 0,526    | 1,21E-01 | 6,978 | 1 |
|                                      |                                       | 46       | 2,00E-03 | 2,13E+02 | 0,840    | 1,23E-01 | 6,895 | 1 |
|                                      |                                       | 47       | 9,47E-01 | 3,98E+02 | 0,825    | 9,90E-02 | 7,505 | 1 |
|                                      |                                       | 48       | 1,00E-03 | 3,43E+02 | 0,001    | 1,18E-01 | 7,250 | 1 |
| MEDIANA                              |                                       | 2,00E-03 | 3,37E+02 | 0,675    | 1,20E-01 | 7,114    | 1,00  |   |
| DESPAD                               |                                       | 4,73E-01 | 7,79E+01 | 0,392    | 1,10E-02 | 0,277    | 0,000 |   |
| MEDIANA GLSM 4                       | 2,00E-03                              | 2,59E+02 | 0,004    | 1,30E-01 | 7,060    | 1,000    |       |   |
| DESPAD GLSM 4                        | 2,73E-01                              | 2,52E+01 | 0,226    | 1,98E-03 | 0,010    | 0,000    |       |   |
| MEDIANA GLSM MF                      | 2,00E-03                              | 2,51E+02 | 0,004    | 1,29E-01 | 7,055    | 1,00     |       |   |
| DESPAD GLSM MF                       | 4,47E-03                              | 1,46E+00 | 0,094    | 4,78E-04 | 0,003    | 0        |       |   |

| AMOSTRAS CRIOPRESERVADAS          |                                 |               |          |             |                   |          |                          |      |
|-----------------------------------|---------------------------------|---------------|----------|-------------|-------------------|----------|--------------------------|------|
| Análise                           | Quadrante                       | Angular       | Contrast | Correlation | Inverse           | Entropy  | Sum of all GLCM elements |      |
|                                   |                                 | Second Moment |          |             | Difference Moment |          |                          |      |
| PACIENTE 1 - CRIOPRESEVADO        | GLSM 1a<br>(1 pixel e 0 grau)   | 1             | 3,00E-03 | 4,17E+01    | 0,010             | 2,11E-01 | 6,410                    | 1    |
|                                   |                                 | 2             | 3,00E-03 | 3,59E+01    | 0,011             | 2,25E-01 | 6,343                    | 1    |
|                                   |                                 | 3             | 2,00E-03 | 4,18E+01    | 0,009             | 2,10E-01 | 6,556                    | 1    |
|                                   |                                 | 4             | 2,00E-03 | 4,28E+01    | 0,008             | 2,11E-01 | 6,625                    | 1    |
|                                   |                                 | MEDIANA       | 2,50E-03 | 4,18E+01    | 0,010             | 2,11E-01 | 6,483                    | 1,00 |
|                                   |                                 | DESPAD        | 5,77E-04 | 3,14E+00    | 0,001             | 7,18E-03 | 0,130                    | 0    |
|                                   | GLSM 1b<br>(5 pixels e 0 grau)  | 5             | 2,00E-03 | 8,67E+01    | 0,005             | 1,57E-01 | 6,610                    | 1    |
|                                   |                                 | 6             | 2,00E-03 | 8,14E+01    | 0,006             | 1,60E-01 | 6,599                    | 1    |
|                                   |                                 | 7             | 2,00E-03 | 8,50E+01    | 0,006             | 1,56E-01 | 6,794                    | 1    |
|                                   |                                 | 8             | 2,00E-03 | 1,01E+02    | 0,005             | 1,48E-01 | 6,919                    | 1    |
|                                   |                                 | MEDIANA       | 2,00E-03 | 8,59E+01    | 0,006             | 1,57E-01 | 6,702                    | 1,00 |
|                                   |                                 | DESPAD        | 0,00E+00 | 8,54E+00    | 0,001             | 5,12E-03 | 0,154                    | 0    |
|                                   | GLSM 1c<br>(10 pixels e 0 grau) | 9             | 2,00E-03 | 1,03E+02    | 0,003             | 1,44E-01 | 6,650                    | 1    |
|                                   |                                 | 10            | 2,00E-03 | 1,03E+02    | 0,003             | 1,43E-01 | 6,650                    | 1    |
|                                   |                                 | 11            | 2,00E-03 | 1,04E+02    | 0,004             | 1,39E-01 | 6,864                    | 1    |
|                                   |                                 | 12            | 1,00E-03 | 1,32E+02    | 0,003             | 1,29E-01 | 6,994                    | 1    |
|                                   |                                 | MEDIANA       | 2,00E-03 | 1,04E+02    | 0,003             | 1,41E-01 | 6,757                    | 1,00 |
|                                   |                                 | DESPAD        | 5,00E-04 | 1,42E+01    | 0,001             | 6,85E-03 | 0,170                    | 0    |
|                                   | MEDIANA GLSM 1                  | 2,00E-03      | 8,59E+01 | 0,006       | 1,57E-01          | 6,702    | 1,00                     |      |
|                                   | DESPAD GLSM 1                   | 3,13E-04      | 5,54E+00 | 0,000       | 1,11E-03          | 0,020    | 0                        |      |
|                                   | GLSM 2a<br>(1 pixel e 90 graus) | 13            | 3,00E-03 | 4,37E+01    | 0,010             | 2,07E-01 | 6,429                    | 1    |
|                                   |                                 | 14            | 3,00E-03 | 3,55E+01    | 0,011             | 2,29E-01 | 6,327                    | 1    |
|                                   |                                 | 15            | 2,00E-03 | 4,45E+01    | 0,009             | 2,13E-01 | 6,563                    | 1    |
|                                   |                                 | 16            | 2,00E-03 | 4,76E+01    | 0,007             | 2,16E-01 | 6,631                    | 1    |
| MEDIANA                           |                                 | 2,50E-03      | 4,41E+01 | 0,010       | 2,15E-01          | 6,496    | 1,00                     |      |
| DESPAD                            |                                 | 5,77E-04      | 5,17E+00 | 0,002       | 9,29E-03          | 0,136    | 0                        |      |
| GLSM 2b<br>(5 pixels e 90 graus)  | 17                              | 2,00E-03      | 8,83E+01 | 0,005       | 1,56E-01          | 6,623    | 1                        |      |
|                                   | 18                              | 2,00E-03      | 7,56E+01 | 0,006       | 1,65E-01          | 6,575    | 1                        |      |
|                                   | 19                              | 2,00E-03      | 9,15E+01 | 0,005       | 1,53E-01          | 6,813    | 1                        |      |
|                                   | 20                              | 2,00E-03      | 1,11E+02 | 0,004       | 1,51E-01          | 6,933    | 1                        |      |
|                                   | MEDIANA                         | 2,00E-03      | 8,99E+01 | 0,005       | 1,55E-01          | 6,718    | 1,00                     |      |
|                                   | DESPAD                          | 0,00E+00      | 1,46E+01 | 0,001       | 6,18E-03          | 0,167    | 0                        |      |
| GLSM 2c<br>(10 pixels e 90 graus) | 21                              | 2,00E-03      | 1,04E+02 | 0,003       | 1,43E-01          | 6,663    | 1                        |      |
|                                   | 22                              | 2,00E-03      | 9,23E+01 | 0,004       | 1,50E-01          | 6,635    | 1                        |      |
|                                   | 23                              | 2,00E-03      | 1,08E+02 | 0,004       | 1,39E-01          | 6,871    | 1                        |      |
|                                   | 24                              | 1,00E-03      | 1,60E+02 | 0,002       | 1,24E-01          | 7,039    | 1                        |      |

|                                       |                |          |          |       |          |       |      |
|---------------------------------------|----------------|----------|----------|-------|----------|-------|------|
|                                       | MEDIANA        | 2,00E-03 | 1,06E+02 | 0,004 | 1,41E-01 | 6,767 | 1,00 |
|                                       | DESPAD         | 5,00E-04 | 3,02E+01 | 0,001 | 1,10E-02 | 0,190 | 0    |
|                                       | MEDIANA GLSM 2 | 2,00E-03 | 8,99E+01 | 0,005 | 1,55E-01 | 6,718 | 1,00 |
|                                       | DESPAD GLSM 2  | 3,13E-04 | 1,27E+01 | 0,000 | 2,43E-03 | 0,027 | 0    |
| GLSM 3a<br>(1 pixel e<br>180 graus)   | 25             | 3,00E-03 | 4,18E+01 | 0,010 | 2,11E-01 | 6,412 | 1    |
|                                       | 26             | 3,00E-03 | 3,59E+01 | 0,011 | 2,24E-01 | 6,343 | 1    |
|                                       | 27             | 2,00E-03 | 4,17E+01 | 0,009 | 2,10E-01 | 6,554 | 1    |
|                                       | 28             | 2,00E-03 | 4,29E+01 | 0,008 | 2,10E-01 | 6,629 | 1    |
|                                       | MEDIANA        | 2,50E-03 | 4,17E+01 | 0,010 | 2,11E-01 | 6,483 | 1,00 |
|                                       | DESPAD         | 5,77E-04 | 3,17E+00 | 0,001 | 6,85E-03 | 0,130 | 0    |
| GLSM 3b<br>(5 pixels e<br>180 graus)  | 29             | 2,00E-03 | 8,68E+01 | 0,005 | 1,56E-01 | 6,627 | 1    |
|                                       | 30             | 2,00E-03 | 8,18E+01 | 0,006 | 1,61E-01 | 6,598 | 1    |
|                                       | 31             | 2,00E-03 | 8,48E+01 | 0,006 | 1,56E-01 | 6,786 | 1    |
|                                       | 32             | 2,00E-03 | 1,01E+02 | 0,005 | 1,47E-01 | 6,933 | 1    |
|                                       | MEDIANA        | 2,00E-03 | 8,58E+01 | 0,006 | 1,56E-01 | 6,707 | 1,00 |
|                                       | DESPAD         | 0,00E+00 | 8,35E+00 | 0,001 | 5,83E-03 | 0,155 | 0    |
| GLSM 3c<br>(10 pixels e<br>180 graus) | 33             | 2,00E-03 | 1,06E+02 | 0,003 | 1,42E-01 | 6,689 | 1    |
|                                       | 34             | 2,00E-03 | 1,04E+02 | 0,003 | 1,42E-01 | 6,656 | 1    |
|                                       | 35             | 2,00E-03 | 1,04E+02 | 0,004 | 1,40E-01 | 6,848 | 1    |
|                                       | 36             | 1,00E-03 | 1,33E+02 | 0,003 | 1,27E-01 | 7,023 | 1    |
|                                       | MEDIANA        | 2,00E-03 | 1,05E+02 | 0,003 | 1,41E-01 | 6,769 | 1,00 |
|                                       | DESPAD         | 5,00E-04 | 1,43E+01 | 0,001 | 7,23E-03 | 0,168 | 0    |
|                                       | MEDIANA GLSM 3 | 2,00E-03 | 8,58E+01 | 0,006 | 1,56E-01 | 6,707 | 1,00 |
|                                       | DESPAD GLSM 3  | 3,13E-04 | 5,55E+00 | 0,000 | 7,23E-04 | 0,019 | 0    |
| GLSM 4a<br>(1 pixel e<br>270 graus)   | 37             | 3,00E-03 | 4,39E+01 | 0,010 | 2,07E-01 | 6,431 | 1    |
|                                       | 38             | 3,00E-03 | 3,55E+01 | 0,011 | 2,29E-01 | 6,328 | 1    |
|                                       | 39             | 2,00E-03 | 4,45E+01 | 0,009 | 2,13E-01 | 6,563 | 1    |
|                                       | 40             | 2,00E-03 | 4,76E+01 | 0,007 | 2,16E-01 | 6,630 | 1    |
|                                       | MEDIANA        | 2,50E-03 | 4,42E+01 | 0,010 | 2,15E-01 | 6,497 | 1,00 |
|                                       | DESPAD         | 5,77E-04 | 5,15E+00 | 0,002 | 9,29E-03 | 0,135 | 0    |
| GLSM 4b<br>(5 pixels e<br>270 grau)   | 41             | 2,00E-03 | 8,99E+01 | 0,005 | 1,56E-01 | 6,632 | 1    |
|                                       | 42             | 2,00E-03 | 7,61E+01 | 0,006 | 1,65E-01 | 6,580 | 1    |
|                                       | 43             | 2,00E-03 | 9,40E+01 | 0,005 | 1,53E-01 | 6,812 | 1    |
|                                       | 44             | 2,00E-03 | 1,11E+02 | 0,004 | 1,50E-01 | 6,934 | 1    |
|                                       | MEDIANA        | 2,00E-03 | 9,19E+01 | 0,005 | 1,55E-01 | 6,722 | 1,00 |
|                                       | DESPAD         | 0,00E+00 | 1,46E+01 | 0,001 | 6,48E-03 | 0,163 | 0    |
| GLSM 4c<br>(10 pixels e<br>270 graus) | 45             | 2,00E-03 | 1,05E+02 | 0,003 | 1,43E-01 | 6,675 | 1    |
|                                       | 46             | 2,00E-03 | 9,44E+01 | 0,004 | 1,49E-01 | 6,646 | 1    |
|                                       | 47             | 2,00E-03 | 1,11E+02 | 0,004 | 1,40E-01 | 6,861 | 1    |
|                                       | 48             | 1,00E-03 | 1,62E+02 | 0,002 | 1,22E-01 | 7,040 | 1    |

|       |                 |          |          |       |          |       |      |
|-------|-----------------|----------|----------|-------|----------|-------|------|
|       | MEDIANA         | 2,00E-03 | 1,08E+02 | 0,004 | 1,42E-01 | 6,768 | 1,00 |
|       | DESPAD          | 5,00E-04 | 2,99E+01 | 0,001 | 1,16E-02 | 0,183 | 0    |
|       | MEDIANA GLSM 4  | 2,00E-03 | 9,19E+01 | 0,005 | 1,55E-01 | 6,722 | 1,00 |
|       | DESPAD GLSM 4   | 3,13E-04 | 1,25E+01 | 0,000 | 2,57E-03 | 0,024 | 0    |
| <hr/> |                 |          |          |       |          |       |      |
|       | MEDIANA GLSM ID | 2,00E-03 | 8,79E+01 | 0,005 | 1,55E-01 | 6,712 | 1,00 |
|       | DESPAD GLSM ID  | 0,00E+00 | 4,05E+00 | 0,000 | 9,33E-04 | 0,004 | 0    |

| Análise                          | Quadrante | Angular       | Contrast | Correlation | Inverse           | Entropy | Sum of all GLCM elements |
|----------------------------------|-----------|---------------|----------|-------------|-------------------|---------|--------------------------|
|                                  |           | Second Moment |          |             | Difference Moment |         |                          |
| GLSM 1a<br>(1 pixel e 0 grau)    | 1         | 8,07E-01      | 1,07E+02 | 0,002       | 1,52E-01          | 7,634   | 1                        |
|                                  | 2         | 5,16E-01      | 1,57E+02 | 0,002       | 1,26E-01          | 8,011   | 1                        |
|                                  | 3         | 5,75E-01      | 1,49E+02 | 0,002       | 1,29E-01          | 7,943   | 1                        |
|                                  | 4         | 5,48E-01      | 1,36E+02 | 0,002       | 1,28E-01          | 7,944   | 1                        |
|                                  | MEDIANA   | 5,61E-01      | 1,43E+02 | 0,002       | 1,29E-01          | 7,944   | 1,00                     |
|                                  | DESPAD    | 1,33E-01      | 2,19E+01 | 0,000       | 1,22E-02          | 0,169   | 0                        |
| GLSM 1b<br>(5 pixels e 0 grau)   | 5         | 4,99E-01      | 3,24E+02 | 0,002       | 8,70E-02          | 8,072   | 1                        |
|                                  | 6         | 3,34E-01      | 4,39E+02 | 0,001       | 7,80E-02          | 8,402   | 1                        |
|                                  | 7         | 3,59E-01      | 4,56E+02 | 0,001       | 7,50E-02          | 8,371   | 1                        |
|                                  | 8         | 3,52E-01      | 4,20E+02 | 0,001       | 7,60E-02          | 8,353   | 1                        |
|                                  | MEDIANA   | 3,56E-01      | 4,30E+02 | 0,001       | 7,70E-02          | 8,362   | 1,00                     |
|                                  | DESPAD    | 7,61E-02      | 5,93E+01 | 0,001       | 5,48E-03          | 0,153   | 0                        |
| GLSM 1c<br>(10 pixels e 0 grau)  | 9         | 4,40E-01      | 4,39E+02 | 0,001       | 7,70E-02          | 8,183   | 1                        |
|                                  | 10        | 2,98E-01      | 5,81E+02 | 0,783       | 6,50E-02          | 8,492   | 1                        |
|                                  | 11        | 3,17E-01      | 5,92E+02 | 0,776       | 6,30E-02          | 8,464   | 1                        |
|                                  | 12        | 3,13E-01      | 5,92E+02 | 0,698       | 6,30E-02          | 8,452   | 1                        |
|                                  | MEDIANA   | 3,15E-01      | 5,86E+02 | 0,737       | 6,40E-02          | 8,458   | 1,00                     |
|                                  | DESPAD    | 6,56E-02      | 7,47E+01 | 0,378       | 6,73E-03          | 0,144   | 0                        |
| MEDIANA GLSM 1                   |           | 3,56E-01      | 4,30E+02 | 0,002       | 7,70E-02          | 8,362   | 1,00                     |
| DESPAD GLSM 1                    |           | 3,61E-02      | 2,72E+01 | 0,218       | 3,59E-03          | 0,013   | 0                        |
| GLSM 2a<br>(1 pixel e 90 graus)  | 13        | 8,15E-01      | 1,50E+02 | 0,002       | 1,49E-01          | 7,670   | 1                        |
|                                  | 14        | 4,72E-01      | 2,28E+02 | 0,002       | 1,16E-01          | 8,114   | 1                        |
|                                  | 15        | 5,59E-01      | 2,00E+02 | 0,002       | 1,26E-01          | 8,003   | 1                        |
|                                  | 16        | 5,00E-01      | 2,04E+02 | 0,002       | 1,17E-01          | 8,049   | 1                        |
|                                  | MEDIANA   | 5,29E-01      | 2,02E+02 | 0,002       | 1,22E-01          | 8,026   | 1,00                     |
|                                  | DESPAD    | 1,56E-01      | 3,27E+01 | 0,000       | 1,53E-02          | 0,198   | 0                        |
| GLSM 2b<br>(5 pixels e 90 graus) | 17        | 5,44E-01      | 3,36E+02 | 0,001       | 9,80E-02          | 8,013   | 1                        |
|                                  | 18        | 3,25E-01      | 4,90E+02 | 0,001       | 7,60E-02          | 8,434   | 1                        |
|                                  | 19        | 3,76E-01      | 4,72E+02 | 0,001       | 8,00E-02          | 8,341   | 1                        |

|                                       |          |                |          |          |       |          |       |       |
|---------------------------------------|----------|----------------|----------|----------|-------|----------|-------|-------|
|                                       |          | 20             | 3,38E-01 | 5,06E+02 | 0,960 | 7,50E-02 | 8,397 | 1     |
|                                       |          | MEDIANA        | 3,57E-01 | 4,81E+02 | 0,001 | 7,80E-02 | 8,369 | 1,00  |
|                                       |          | DESPAD         | 1,01E-01 | 7,77E+01 | 0,480 | 1,07E-02 | 0,193 | 0     |
| GLSM 2c<br>(10 pixels e<br>90 graus)  |          | 21             | 4,76E-01 | 4,33E+02 | 0,001 | 8,30E-02 | 8,115 | 1     |
|                                       |          | 22             | 2,88E-01 | 6,33E+02 | 0,681 | 6,50E-02 | 8,531 | 1     |
|                                       |          | 23             | 3,26E-01 | 6,37E+02 | 0,645 | 6,60E-02 | 8,448 | 1     |
|                                       |          | 24             | 3,01E-01 | 6,40E+02 | 0,584 | 6,10E-02 | 8,480 | 1     |
|                                       |          | MEDIANA        | 3,13E-01 | 6,35E+02 | 0,614 | 6,55E-02 | 8,464 | 1,00  |
|                                       |          | DESPAD         | 8,70E-02 | 1,02E+02 | 0,320 | 9,74E-03 | 0,189 | 0     |
|                                       |          | MEDIANA GLSM 2 | 3,57E-01 | 4,81E+02 | 0,002 | 7,80E-02 | 8,369 | 1,00  |
| DESPAD GLSM 2                         | 3,68E-02 | 3,50E+01       | 0,244    | 2,99E-03 | 0,005 | 0        |       |       |
| GLSM 3a<br>(1 pixel e<br>180 graus)   |          | 25             | 8,11E-01 | 1,06E+02 | 0,002 | 1,52E-01 | 7,629 | 1     |
|                                       |          | 26             | 5,14E-01 | 1,57E+02 | 0,002 | 1,26E-01 | 8,014 | 1     |
|                                       |          | 27             | 5,79E-01 | 1,48E+02 | 0,002 | 1,29E-01 | 7,937 | 1     |
|                                       |          | 28             | 5,45E-01 | 1,37E+02 | 0,002 | 1,28E-01 | 7,949 | 1     |
|                                       |          | MEDIANA        | 5,62E-01 | 1,43E+02 | 0,002 | 1,29E-01 | 7,943 | 1,00  |
|                                       |          | DESPAD         | 1,35E-01 | 2,22E+01 | 0,000 | 1,22E-02 | 0,172 | 0     |
| GLSM 3b<br>(5 pixels e<br>180 graus)  |          | 29             | 5,13E-01 | 3,15E+02 | 0,002 | 8,80E-02 | 8,040 | 1     |
|                                       |          | 30             | 3,28E-01 | 4,46E+02 | 0,001 | 7,80E-02 | 8,422 | 1     |
|                                       |          | 31             | 3,68E-01 | 4,47E+02 | 0,001 | 7,50E-02 | 8,348 | 1     |
|                                       |          | 32             | 3,44E-01 | 4,27E+02 | 0,001 | 7,60E-02 | 8,374 | 1     |
|                                       |          | MEDIANA        | 3,56E-01 | 4,37E+02 | 0,001 | 7,70E-02 | 8,361 | 1,00  |
|                                       |          | DESPAD         | 8,50E-02 | 6,35E+01 | 0,001 | 5,97E-03 | 0,173 | 0     |
| GLSM 3c<br>(10 pixels e<br>180 graus) |          | 33             | 4,67E-01 | 4,18E+02 | 0,001 | 7,90E-02 | 8,115 | 1     |
|                                       |          | 34             | 2,85E-01 | 5,95E+02 | 0,785 | 6,50E-02 | 8,535 | 1     |
|                                       |          | 35             | 3,34E-01 | 5,75E+02 | 0,778 | 6,40E-02 | 8,418 | 1     |
|                                       |          | 36             | 2,98E-01 | 6,06E+02 | 0,718 | 6,20E-02 | 8,496 | 1     |
|                                       |          | MEDIANA        | 3,16E-01 | 5,85E+02 | 0,748 | 6,45E-02 | 8,457 | 1,00  |
|                                       |          | DESPAD         | 8,32E-02 | 8,81E+01 | 0,381 | 7,77E-03 | 0,190 | 0     |
| MEDIANA GLSM 3                        | 3,56E-01 | 4,37E+02       | 0,002    | 7,70E-02 | 8,361 | 1,00     |       |       |
| DESPAD GLSM 3                         | 2,94E-02 | 3,33E+01       | 0,220    | 3,23E-03 | 0,010 | 0        |       |       |
| GLSM 4a<br>(1 pixel e<br>270 graus)   |          | 37             | 8,12E-01 | 1,50E+02 | 0,002 | 1,49E-01 | 7,673 | 1     |
|                                       |          | 38             | 4,72E-01 | 2,28E+02 | 0,002 | 1,16E-01 | 8,115 | 1     |
|                                       |          | 39             | 5,59E-01 | 2,00E+02 | 0,002 | 1,26E-01 | 8,003 | 1     |
|                                       |          | 40             | 5,00E-01 | 2,04E+02 | 0,002 | 1,17E-01 | 8,048 | 1     |
|                                       |          | MEDIANA        | 5,30E-01 | 2,02E+02 | 0,002 | 1,22E-01 | 8,026 | 1,00  |
|                                       |          | DESPAD         | 1,55E-01 | 3,26E+01 | 0,000 | 1,53E-02 | 0,197 | 0     |
| GLSM 4b<br>(5 pixels e<br>270 graus)  |          | 41             | 5,34E-01 | 3,40E+02 | 0,001 | 9,70E-02 | 8,026 | 1,000 |
|                                       |          | 42             | 3,25E-01 | 4,89E+02 | 0,001 | 7,60E-02 | 8,436 | 1     |
|                                       |          | 43             | 3,76E-01 | 4,73E+02 | 0,001 | 8,10E-02 | 8,340 | 1     |

|                                       |                  |          |          |       |          |       |          |
|---------------------------------------|------------------|----------|----------|-------|----------|-------|----------|
| GLSM 4c<br>(10 pixels e<br>270 graus) | 44               | 3,37E-01 | 5,08E+02 | 0,953 | 7,40E-02 | 8,398 | 1        |
|                                       | MEDIANA          | 3,56E-01 | 4,81E+02 | 0,001 | 7,85E-02 | 8,369 | 1,00     |
|                                       | DESPAD           | 9,68E-02 | 7,66E+01 | 0,476 | 1,04E-02 | 0,187 | 499,5    |
|                                       | 45               | 4,60E-01 | 4,48E+02 | 0,001 | 8,20E-02 | 8,142 | 1        |
|                                       | 46               | 2,89E-01 | 6,31E+02 | 0,682 | 6,40E-02 | 8,529 | 1        |
|                                       | 47               | 3,29E-01 | 6,29E+02 | 0,657 | 6,70E-02 | 8,438 | 1        |
|                                       | 48               | 2,99E-01 | 6,54E+02 | 0,558 | 6,00E-02 | 8,488 | 1        |
|                                       | MEDIANA          | 3,14E-01 | 6,30E+02 | 0,607 | 6,55E-02 | 8,463 | 1,00     |
|                                       | DESPAD           | 7,91E-02 | 9,58E+01 | 0,320 | 9,60E-03 | 0,175 | 0        |
|                                       | MEDIANA GLSM 4   | 3,56E-01 | 4,81E+02 | 0,002 | 7,85E-02 | 8,369 | 1,00     |
|                                       | DESPAD GLSM 4    | 3,98E-02 | 3,24E+01 | 0,243 | 3,10E-03 | 0,011 | 288,3865 |
|                                       | MEDIANA GLSM SnD | 3,56E-01 | 4,59E+02 | 0,002 | 7,75E-02 | 8,366 | 1,00     |
|                                       | DESPAD GLSM SnD  | 4,35E-03 | 3,40E+00 | 0,014 | 2,61E-04 | 0,003 | 144,1932 |

| Análise                         | Quadrante | Angular          | Contrast | Correlation | Inverse              | Entropy  | Sum of<br>all GLCM<br>elements |
|---------------------------------|-----------|------------------|----------|-------------|----------------------|----------|--------------------------------|
|                                 |           | Second<br>Moment |          |             | Difference<br>Moment |          |                                |
| GLSM 1a<br>(1 pixel e 0 grau)   | 1         | 2,00E-03         | 4,65E+01 | 0,009       | 2,09E-01             | 6,481    | 1                              |
|                                 | 2         | 2,00E-03         | 3,89E+01 | 0,010       | 2,33E-01             | 6,445    | 1                              |
|                                 | 3         | 2,00E-03         | 5,83E+01 | 0,005       | 1,85E-01             | 6,906    | 1                              |
|                                 | 4         | 2,00E-03         | 5,08E+01 | 0,005       | 2,05E-01             | 6,799    | 1                              |
|                                 | MEDIANA   | 2,00E-03         | 4,87E+01 | 0,007       | 2,07E-01             | 6,640    | 1,00                           |
|                                 | DESPAD    | 0,00E+00         | 8,13E+00 | 0,003       | 1,97E-02             | 0,230    | 0                              |
| GLSM 1b<br>(5 pixels e 0 grau)  | 5         | 2,00E-03         | 9,78E+01 | 0,005       | 1,60E-01             | 6,694    | 1                              |
|                                 | 6         | 2,00E-03         | 8,29E+01 | 0,006       | 1,71E-01             | 6,685    | 1                              |
|                                 | 7         | 1,00E-03         | 1,33E+02 | 0,004       | 1,35E-01             | 7,168    | 1                              |
|                                 | 8         | 1,00E-03         | 1,28E+02 | 0,004       | 1,49E-01             | 7,075    | 1                              |
|                                 | MEDIANA   | 1,50E-03         | 1,13E+02 | 0,005       | 1,55E-01             | 6,885    | 1,00                           |
|                                 | DESPAD    | 5,77E-04         | 2,40E+01 | 0,001       | 1,54E-02             | 0,252    | 0                              |
| GLSM 1c<br>(10 pixels e 0 grau) | 9         | 2,00E-03         | 1,15E+02 | 0,004       | 1,48E-01             | 6,746    | 1                              |
|                                 | 10        | 2,00E-03         | 9,75E+01 | 0,005       | 1,60E-01             | 6,740    | 1                              |
|                                 | 11        | 1,00E-03         | 1,80E+02 | 0,003       | 1,21E-01             | 7,260    | 1                              |
|                                 | 12        | 1,00E-03         | 1,71E+02 | 0,003       | 1,31E-01             | 7,150    | 1                              |
|                                 | MEDIANA   | 1,50E-03         | 1,43E+02 | 0,004       | 1,40E-01             | 6,948    | 1,00                           |
|                                 | DESPAD    | 5,77E-04         | 4,08E+01 | 0,001       | 1,74E-02             | 0,271    | 0                              |
| MEDIANA GLSM 1                  | 1,50E-03  | 1,13E+02         | 0,005    | 1,55E-01    | 6,885                | 1,00     |                                |
| DESPAD GLSM 1                   | 3,33E-04  | 1,64E+01         | 0,001    | 2,15E-03    | 0,021                | 0        |                                |
| za<br>(1<br>pixel<br>e 90)      | 13        | 2,00E-03         | 5,43E+01 | 0,008       | 2,01E-01             | 6530,000 | 1                              |
|                                 | 14        | 2,00E-03         | 4,75E+01 | 0,009       | 2,18E-01             | 6501,000 | 1                              |

|  |                                    |                |          |          |       |          |          |      |
|--|------------------------------------|----------------|----------|----------|-------|----------|----------|------|
|  |                                    | 15             | 2,00E-03 | 8,88E+01 | 0,005 | 1,64E-01 | 7017,000 | 1    |
|  |                                    | 16             | 2,00E-03 | 7,01E+01 | 0,005 | 1,98E-01 | 6867,000 | 1    |
|  |                                    | MEDIANA        | 2,00E-03 | 6,22E+01 | 0,007 | 2,00E-01 | 6698,500 | 1,00 |
|  |                                    | DESPAD         | 0,00E+00 | 1,84E+01 | 0,002 | 2,26E-02 | 254,016  | 0    |
|  | GLSM 2b<br>(5 pixels e 90 graus)   | 17             | 2,00E-03 | 1,12E+02 | 0,004 | 1,50E-01 | 6,730    | 1    |
|  |                                    | 18             | 2,00E-03 | 9,67E+01 | 0,005 | 1,59E-01 | 6,730    | 1    |
|  |                                    | 19             | 1,00E-03 | 2,01E+02 | 0,002 | 1,17E-01 | 7,269    | 1    |
|  |                                    | 20             | 1,00E-03 | 1,69E+02 | 0,003 | 1,38E-01 | 7,155    | 1    |
|  |                                    | MEDIANA        | 1,50E-03 | 1,41E+02 | 0,004 | 1,44E-01 | 6,943    | 1,00 |
|  |                                    | DESPAD         | 5,77E-04 | 4,87E+01 | 0,001 | 1,82E-02 | 0,282    | 0    |
|  | GLSM 2c<br>(10 pixels e 90 graus)  | 21             | 2,00E-03 | 1,25E+02 | 0,003 | 1,36E-01 | 6,758    | 1    |
|  |                                    | 22             | 2,00E-03 | 1,10E+02 | 0,004 | 1,48E-01 | 6,775    | 1    |
|  |                                    | 23             | 1,00E-03 | 2,58E+02 | 0,001 | 1,04E-01 | 7,320    | 1    |
|  |                                    | 24             | 1,00E-03 | 2,07E+02 | 0,002 | 1,22E-01 | 7,213    | 1    |
|  |                                    | MEDIANA        | 1,50E-03 | 1,66E+02 | 0,003 | 1,29E-01 | 6,994    | 1,00 |
|  |                                    | DESPAD         | 5,77E-04 | 6,98E+01 | 0,001 | 1,89E-02 | 0,292    | 0    |
|  |                                    | MEDIANA GLSM 2 | 1,50E-03 | 1,41E+02 | 0,004 | 1,44E-01 | 6,994    | 1,00 |
|  |                                    | DESPAD GLSM 2  | 3,33E-04 | 2,59E+01 | 0,000 | 2,38E-03 | 146,491  | 0    |
|  | GLSM 3a<br>(1 pixel e 180 graus)   | 25             | 2,00E-03 | 4,65E+01 | 0,009 | 2,09E-01 | 6,480    | 1    |
|  |                                    | 26             | 2,00E-03 | 3,90E+01 | 0,010 | 2,32E-01 | 6,446    | 1    |
|  |                                    | 27             | 2,00E-03 | 5,81E+01 | 0,005 | 1,85E-01 | 6,901    | 1    |
|  |                                    | 28             | 2,00E-03 | 5,10E+01 | 0,005 | 2,05E-01 | 6,805    | 1    |
|  |                                    | MEDIANA        | 2,00E-03 | 4,87E+01 | 0,007 | 2,07E-01 | 6,643    | 1,00 |
|  |                                    | DESPAD         | 0,00E+00 | 8,01E+00 | 0,003 | 1,93E-02 | 0,229    | 0    |
|  | GLSM 3b<br>(5 pixels e 180 graus)  | 29             | 2,00E-03 | 9,77E+01 | 0,005 | 1,60E-01 | 6,694    | 1    |
|  |                                    | 30             | 2,00E-03 | 8,35E+01 | 0,006 | 1,69E-01 | 6,688    | 1    |
|  |                                    | 31             | 1,00E-03 | 1,30E+02 | 0,004 | 1,36E-01 | 7,148    | 1    |
|  |                                    | 32             | 1,00E-03 | 1,32E+02 | 0,004 | 1,47E-01 | 7,108    | 1    |
|  |                                    | MEDIANA        | 1,50E-03 | 1,14E+02 | 0,005 | 1,54E-01 | 6,901    | 1,00 |
|  |                                    | DESPAD         | 5,77E-04 | 2,38E+01 | 0,001 | 1,45E-02 | 0,253    | 0    |
|  | GLSM 3c<br>(10 pixels e 180 graus) | 33             | 2,00E-03 | 1,13E+02 | 0,004 | 1,49E-01 | 6,745    | 1    |
|  |                                    | 34             | 2,00E-03 | 9,95E+01 | 0,005 | 1,58E-01 | 6,747    | 1    |
|  |                                    | 35             | 1,00E-03 | 1,72E+02 | 0,003 | 1,24E-01 | 7,214    | 1    |
|  |                                    | 36             | 1,00E-03 | 1,80E+02 | 0,003 | 1,29E-01 | 7,215    | 1    |
|  |                                    | MEDIANA        | 1,50E-03 | 1,43E+02 | 0,004 | 1,39E-01 | 6,981    | 1,00 |
|  |                                    | DESPAD         | 5,77E-04 | 4,06E+01 | 0,001 | 1,61E-02 | 0,270    | 0    |
|  |                                    | MEDIANA GLSM 3 | 1,50E-03 | 1,14E+02 | 0,005 | 1,54E-01 | 6,901    | 1,00 |
|  |                                    | DESPAD GLSM 3  | 3,33E-04 | 1,63E+01 | 0,001 | 2,43E-03 | 0,021    | 0    |
|  | (1 pixel e                         | 37             | 2,00E-03 | 5,45E+01 | 0,008 | 2,01E-01 | 6,533    | 1    |
|  |                                    | 38             | 2,00E-03 | 4,78E+01 | 0,009 | 2,18E-01 | 6,506    | 1    |

|  |                                       |          |          |          |          |          |        |      |
|--|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|--------|------|
|  |                                       | 39       | 2,00E-03 | 8,89E+01 | 0,005    | 1,64E-01 | 7,016  | 1    |
|  |                                       | 40       | 2,00E-03 | 7,01E+01 | 0,005    | 1,98E-01 | 6,868  | 1    |
|  |                                       | MEDIANA  | 2,00E-03 | 6,23E+01 | 0,007    | 2,00E-01 | 6,701  | 1,00 |
|  |                                       | DESPAD   | 0,00E+00 | 1,83E+01 | 0,002    | 2,26E-02 | 0,252  | 0    |
|  | GLSM 4b<br>(5 pixels e<br>270 grau)   | 41       | 2,00E-03 | 1,14E+02 | 0,004    | 1,50E-01 | 6,750  | 1    |
|  |                                       | 42       | 2,00E-03 | 9,79E+01 | 0,005    | 1,59E-01 | 6,745  | 1    |
|  |                                       | 43       | 1,00E-03 | 2,01E+02 | 0,002    | 1,16E-01 | 7,267  | 1    |
|  |                                       | 44       | 1,00E-03 | 1,72E+02 | 0,003    | 1,37E-01 | 7,169  | 1    |
|  |                                       | MEDIANA  | 1,50E-03 | 1,43E+02 | 0,004    | 1,44E-01 | 6,960  | 1,00 |
|  |                                       | DESPAD   | 5,77E-04 | 4,85E+01 | 0,001    | 1,87E-02 | 0,275  | 0    |
|  | GLSM 4c<br>(10 pixels e<br>270 graus) | 45       | 2,00E-03 | 1,30E+02 | 0,003    | 1,35E-01 | 6,796  | 1    |
|  |                                       | 46       | 2,00E-03 | 1,13E+02 | 0,004    | 1,45E-01 | 6,802  | 1    |
|  |                                       | 47       | 1,00E-03 | 2,56E+02 | 0,001    | 1,04E-01 | 7,316  | 1    |
|  |                                       | 48       | 1,00E-03 | 2,14E+02 | 0,002    | 1,20E-01 | 7,245  | 1    |
|  |                                       | MEDIANA  | 1,50E-03 | 1,72E+02 | 0,003    | 1,28E-01 | 7,024  | 1,00 |
|  |                                       | DESPAD   | 5,77E-04 | 6,82E+01 | 0,001    | 1,79E-02 | 0,280  | 0    |
|  | MEDIANA GLSM 4                        | 1,50E-03 | 1,43E+02 | 0,004    | 1,44E-01 | 6,960    | 1,00   |      |
|  | DESPAD GLSM 4                         | 3,33E-04 | 2,52E+01 | 0,000    | 2,53E-03 | 0,015    | 0      |      |
|  | MEDIANA GLSM BD                       |          | 1,50E-03 | 1,27E+02 | 0,004    | 1,49E-01 | 6,930  | 1,00 |
|  | DESPAD GLSM BD                        |          | 0,00E+00 | 5,30E+00 | 0,000    | 1,59E-04 | 73,236 | 0    |

| PACIENTE 4 - CRIOPRESERVADO     | Análise | Quadrante | Angular          | Contrast | Correlation | Inverse              | Entropy | Sum of<br>all GLCM<br>elements |
|---------------------------------|---------|-----------|------------------|----------|-------------|----------------------|---------|--------------------------------|
|                                 |         |           | Second<br>Moment |          |             | Difference<br>Moment |         |                                |
| GLSM 1a<br>(1 pixel e 0 grau)   | 1       | 1         | 1,39E-01         | 9,77E+02 | 0,478       | 4,90E-02             | 9,231   | 1                              |
|                                 | 2       | 2         | 1,56E-01         | 9,25E+02 | 0,513       | 5,00E-02             | 9,134   | 1                              |
|                                 | 3       | 3         | 7,31E-02         | 1,35E+03 | 0,318       | 3,90E-02             | 9,756   | 1                              |
|                                 | 4       | 4         | 8,22E-02         | 1,33E+03 | 0,337       | 4,00E-02             | 9,677   | 1                              |
|                                 | MEDIANA |           | 1,11E-01         | 1,15E+03 | 0,408       | 4,45E-02             | 9,454   | 1,00                           |
|                                 | DESPAD  |           | 4,10E-02         | 2,26E+02 | 0,098       | 5,80E-03             | 0,313   | 0                              |
| GLSM 1b<br>(5 pixels e 0 grau)  | 5       | 5         | 1,20E-01         | 1,62E+03 | 0,294       | 4,30E-02             | 9,364   | 1                              |
|                                 | 6       | 6         | 1,38E-01         | 1,46E+03 | 0,324       | 4,50E-02             | 9,236   | 1                              |
|                                 | 7       | 7         | 6,36E-02         | 2,14E+03 | 0,233       | 3,30E-02             | 9,888   | 1                              |
|                                 | 8       | 8         | 7,10E-02         | 2,28E+03 | 0,214       | 3,20E-02             | 9,817   | 1                              |
|                                 | MEDIANA |           | 9,57E-02         | 1,88E+03 | 0,264       | 3,80E-02             | 9,591   | 1,00                           |
|                                 | DESPAD  |           | 3,67E-02         | 3,95E+02 | 0,051       | 6,70E-03             | 0,325   | 0                              |
| GLSM 1c<br>(10 pixels e 0 grau) | 9       | 9         | 1,13E-01         | 1,91E+03 | 0,209       | 3,80E-02             | 9,408   | 1                              |
|                                 | 10      | 10        | 1,32E-01         | 1,70E+03 | 0,236       | 4,10E-02             | 9,269   | 1                              |

|                                    |                                 |          |          |          |          |          |       |      |
|------------------------------------|---------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|------|
|                                    |                                 | 11       | 5,89E-02 | 2,52E+03 | 0,193    | 2,90E-02 | 9,947 | 1    |
|                                    |                                 | 12       | 6,67E-02 | 2,77E+03 | 0,148    | 3,00E-02 | 9,860 | 1    |
|                                    |                                 | MEDIANA  | 8,99E-02 | 2,22E+03 | 0,201    | 3,40E-02 | 9,634 | 1,00 |
|                                    |                                 | DESPAD   | 3,55E-02 | 5,03E+02 | 0,037    | 5,92E-03 | 0,333 | 0    |
|                                    | MEDIANA GLSM 1                  | 9,57E-02 | 1,88E+03 | 0,264    | 3,80E-02 | 9,591    | 1,00  |      |
|                                    | DESPAD GLSM 1                   | 2,89E-03 | 1,40E+02 | 0,032    | 4,90E-04 | 0,010    | 0     |      |
|                                    | GLSM 2a<br>(1 pixel e 90 graus) | 13       | 1,41E-01 | 9,27E+02 | 0,493    | 5,00E-02 | 9,220 | 1    |
|                                    |                                 | 14       | 1,54E-01 | 9,64E+02 | 0,499    | 5,00E-02 | 9,138 | 1    |
|                                    |                                 | 15       | 7,51E-02 | 1,25E+03 | 0,329    | 4,10E-02 | 9,731 | 1    |
|                                    |                                 | 16       | 8,13E-02 | 1,38E+03 | 0,331    | 4,00E-02 | 9,686 | 1    |
| MEDIANA                            |                                 | 1,11E-01 | 1,11E+03 | 0,412    | 4,55E-02 | 9,453    | 1,00  |      |
| DESPAD                             |                                 | 4,05E-02 | 2,22E+02 | 0,096    | 5,50E-03 | 0,308    | 0     |      |
| GLSM 2b<br>(5 pixels e 90 graus)   | 17                              | 1,27E-01 | 1,43E+03 | 0,347    | 4,40E-02 | 9,324    | 1     |      |
|                                    | 18                              | 1,39E-01 | 1,48E+03 | 0,319    | 4,40E-02 | 9,236    | 1     |      |
|                                    | 19                              | 6,60E-02 | 1,93E+03 | 0,256    | 3,40E-02 | 9,853    | 1     |      |
|                                    | 20                              | 7,14E-02 | 2,24E+03 | 0,218    | 3,10E-02 | 9,810    | 1     |      |
|                                    | MEDIANA                         | 9,90E-02 | 1,71E+03 | 0,287    | 3,90E-02 | 9,567    | 1,00  |      |
|                                    | DESPAD                          | 3,74E-02 | 3,85E+02 | 0,058    | 6,75E-03 | 0,321    | 0     |      |
| GLSM 2c<br>(10 pixels e 90 graus)  | 21                              | 1,20E-01 | 1,71E+03 | 0,265    | 4,20E-02 | 9,370    | 1     |      |
|                                    | 22                              | 1,33E-01 | 1,73E+03 | 0,229    | 4,10E-02 | 9,270    | 1     |      |
|                                    | 23                              | 6,15E-02 | 2,32E+03 | 0,214    | 3,10E-02 | 9,911    | 1     |      |
|                                    | 24                              | 6,70E-02 | 2,74E+03 | 0,150    | 2,90E-02 | 9,857    | 1     |      |
|                                    | MEDIANA                         | 9,33E-02 | 2,03E+03 | 0,222    | 3,60E-02 | 9,614    | 1,00  |      |
|                                    | DESPAD                          | 3,62E-02 | 4,97E+02 | 0,048    | 6,70E-03 | 0,329    | 0     |      |
| MEDIANA GLSM 2                     | 9,90E-02                        | 1,71E+03 | 0,287    | 3,90E-02 | 9,567    | 1,00     |       |      |
| DESPAD GLSM 2                      | 2,20E-03                        | 1,39E+02 | 0,025    | 7,09E-04 | 0,011    | 0        |       |      |
| GLSM 3a<br>(1 pixel e 180 graus)   | 25                              | 1,39E-01 | 9,76E+02 | 0,479    | 4,90E-02 | 9,230    | 1     |      |
|                                    | 26                              | 1,55E-01 | 9,28E+02 | 0,511    | 5,00E-02 | 9,138    | 1     |      |
|                                    | 27                              | 7,33E-02 | 1,35E+03 | 0,318    | 3,90E-02 | 9,756    | 1     |      |
|                                    | 28                              | 8,22E-02 | 1,33E+03 | 0,337    | 4,00E-02 | 9,677    | 1     |      |
|                                    | MEDIANA                         | 1,11E-01 | 1,15E+03 | 0,408    | 4,45E-02 | 9,454    | 1,00  |      |
|                                    | DESPAD                          | 4,07E-02 | 2,25E+02 | 0,098    | 5,80E-03 | 0,311    | 0     |      |
| GLSM 3b<br>(5 pixels e 180 graus)  | 29                              | 1,21E-01 | 1,58E+03 | 0,304    | 4,30E-02 | 9,357    | 1     |      |
|                                    | 30                              | 1,36E-01 | 1,51E+03 | 0,310    | 4,40E-02 | 9,255    | 1     |      |
|                                    | 31                              | 6,41E-02 | 2,12E+03 | 0,236    | 3,30E-02 | 9,884    | 1     |      |
|                                    | 32                              | 7,12E-02 | 2,28E+03 | 0,213    | 3,20E-02 | 9,817    | 1     |      |
|                                    | MEDIANA                         | 9,63E-02 | 1,85E+03 | 0,270    | 3,80E-02 | 9,587    | 1,00  |      |
|                                    | DESPAD                          | 3,57E-02 | 3,85E+02 | 0,049    | 6,38E-03 | 0,318    | 0     |      |
| GLSM 3c<br>(10 pixels e 180 graus) | 33                              | 1,14E-01 | 1,85E+03 | 0,227    | 3,80E-02 | 9,400    | 1     |      |
|                                    | 34                              | 1,28E-01 | 1,79E+03 | 0,215    | 4,00E-02 | 9,301    | 1     |      |

|                                       |                                     |          |          |          |          |          |       |      |
|---------------------------------------|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|------|
|                                       |                                     | 35       | 6,00E-02 | 2,48E+03 | 0,198    | 3,00E-02 | 9,937 | 1    |
|                                       |                                     | 36       | 6,66E-02 | 2,78E+03 | 0,148    | 2,90E-02 | 9,865 | 1    |
|                                       |                                     | MEDIANA  | 9,03E-02 | 2,16E+03 | 0,207    | 3,40E-02 | 9,633 | 1,00 |
|                                       |                                     | DESPAD   | 3,38E-02 | 4,87E+02 | 0,035    | 5,56E-03 | 0,322 | 0    |
|                                       | MEDIANA GLSM 3                      | 9,63E-02 | 1,85E+03 | 0,270    | 3,80E-02 | 9,587    | 1,00  |      |
|                                       | DESPAD GLSM 3                       | 3,58E-03 | 1,32E+02 | 0,033    | 4,20E-04 | 0,005    | 0     |      |
|                                       | GLSM 4a<br>(1 pixel e<br>270 graus) | 37       | 1,40E-01 | 9,29E+02 | 0,492    | 5,00E-02 | 9,222 | 1    |
|                                       |                                     | 38       | 1,54E-01 | 9,69E+02 | 0,497    | 5,00E-02 | 9,143 | 1    |
|                                       |                                     | 39       | 7,52E-02 | 1,25E+03 | 0,329    | 4,10E-02 | 9,731 | 1    |
|                                       |                                     | 40       | 8,12E-02 | 1,38E+03 | 0,331    | 4,00E-02 | 9,687 | 1    |
| MEDIANA                               |                                     | 1,11E-01 | 1,11E+03 | 0,412    | 4,55E-02 | 9,455    | 1,00  |      |
| DESPAD                                |                                     | 4,02E-02 | 2,18E+02 | 0,095    | 5,50E-03 | 0,306    | 0     |      |
| GLSM 4b<br>(5 pixels e<br>270 grau)   | 41                                  | 1,25E-01 | 1,44E+03 | 0,343    | 4,40E-02 | 9,334    | 1     |      |
|                                       | 42                                  | 1,35E-01 | 1,52E+03 | 0,305    | 4,40E-02 | 9,254    | 1     |      |
|                                       | 43                                  | 6,64E-02 | 1,92E+03 | 0,257    | 3,50E-02 | 9,849    | 1     |      |
|                                       | 44                                  | 7,06E-02 | 2,22E+03 | 0,221    | 3,20E-02 | 9,817    | 1     |      |
|                                       | MEDIANA                             | 9,76E-02 | 1,72E+03 | 0,281    | 3,95E-02 | 9,576    | 1,00  |      |
|                                       | DESPAD                              | 3,58E-02 | 3,63E+02 | 0,053    | 6,18E-03 | 0,313    | 0     |      |
| GLSM 4c<br>(10 pixels e<br>270 graus) | 45                                  | 1,16E-01 | 1,74E+03 | 0,258    | 4,00E-02 | 9,391    | 1     |      |
|                                       | 46                                  | 1,27E-01 | 1,81E+03 | 0,204    | 4,00E-02 | 9,300    | 1     |      |
|                                       | 47                                  | 6,24E-02 | 2,29E+03 | 0,218    | 3,20E-02 | 9,903    | 1     |      |
|                                       | 48                                  | 6,55E-02 | 2,72E+03 | 0,159    | 2,90E-02 | 9,874    | 1     |      |
|                                       | MEDIANA                             | 9,08E-02 | 2,05E+03 | 0,211    | 3,60E-02 | 9,633    | 1,00  |      |
|                                       | DESPAD                              | 3,36E-02 | 4,57E+02 | 0,041    | 5,62E-03 | 0,316    | 0     |      |
| MEDIANA GLSM 4                        | 9,76E-02                            | 1,72E+03 | 0,281    | 3,95E-02 | 9,576    | 1,00     |       |      |
| DESPAD GLSM 4                         | 3,35E-03                            | 1,20E+02 | 0,028    | 3,66E-04 | 0,005    | 0        |       |      |
| MEDIANA GLSM AD                       | 9,69E-02                            | 1,78E+03 | 0,276    | 3,85E-02 | 9,581    | 1,00     |       |      |
| DESPAD GLSM AD                        | 6,07E-04                            | 8,83E+00 | 0,004    | 1,51E-04 | 0,003    | 0        |       |      |



