LUIZ GUILHERME DE SABOYA LENZI

CORRELAÇÃO ENTRE OS GLICOSAMINOGLICANOS, PROTEOGLICANOS E COLÁGENO E A GRAVIDADE DA DOENÇA DE DUPUYTREN.

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2023

LUIZ GUILHERME DE SABOYA LENZI

CORRELAÇÃO ENTRE OS GLICOSAMINOGLICANOS, PROTEOGLICANOS E COLÁGENOS E A GRAVIDADE DA DOENÇA DE DUPUYTREN.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Faloppa
Coorientadores: Profª. Drª. Helena B. Nader
Dr. João Baptista Gomes dos Santos

São Paulo
2023

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL

Coordenação: Prof. Dr. Alfredo Gragnani Filho

ORIENTADOR: Prof. Dr. Flavio Faloppa

COORIENTADORES: Profª. Drª. Helena B. Nader

Dr. João Baptista Gomes dos Santos

2023

Lenzi, Luiz Guilherme de Saboya
CORRELAÇÃO ENTRE OS GLICOSAMINOGLICANOS, PROTEOGLICANOS E COLÁGENOS E A GRAVIDADE DA DOENÇA DE DUPUYTREN / Luiz Guilherme de Saboya Lenzi. – São Paulo, 2023.
XII, 124 f.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Correlation between the glycosaminoglycans, proteoglycans, collagens, and the severity of Dupuytren`s disease.

1. Doença de Dupuytren. 2. Glicosaminoglicanos. 3. Proteoglicanos. 4. Colágeno. 5. Marcadores

DEDICATÓRIA

Para **minha esposa, Dra. Laura Elaine Bisol**, pelo amor, paciência e compreensão ao longo de toda esta jornada, e principalmente, pela dedicação e zelo com nosso maior tesouro.

Para **minha filha, Olivia Helena Bisol Lenzi**, por me ensinar diariamente o sentido do amor, com toda sua pureza e leveza.

Para **meu pai, Dr. Luiz Carlos Lenzi**, responsável por isso tudo, sempre com braço forte e mão amiga e por quem sempre nutri o sentimento de admiração e vontade incessante de lhe deixar orgulhoso.

Para minha **mãe, Myra Saboya Bezerra de Menezes Lenzi,** por não deixar, sequer por um minuto, de acreditar na minha capacidade, e por me ensinar o verdadeiro significado da palavra resiliência.

Para minha **irmã, Juliana Myra de Saboya Lenzi**, pelo sentimento de orgulho recíproco, e por me dar a possibilidade do amor de uma sobrinha linda e um sobrinho apaixonante.

Para a minha **sobrinha Valentina** e **meu sobrinho Artur**, que possam sempre fazer as melhores escolhas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **PROFESSOR DR. FLAVIO FALOPPA,** Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (DOT-EPM/UNIFESP), pela oportunidade do aprendizado e da experiência, não só como pesquisador, mas também como profissional. Grato por sua sabedoria e pela serenidade em momentos adversos ao longo desta caminhada e por portar-se muito mais do que um orientador, como exímio professor na arte da ciência.

Ao meu coorientador, **DR. JOÃO BAPTISTA GOMES DOS SANTOS**, Professor Adjunto do Disciplina de Cirurgia da Mão e Membro Superior do DOT-EPM/UNIFESP, pela ajuda, amizade, incentivo e ilimitada paciência em todas as nossas correções. Meu agradecimento por sempre estar ao meu lado, disponível e disposto a extrair minha última gota de conhecimento com seus questionamentos, desde o primeiro dia da minha formação dentro da querida EPM.

À minha coorientadora **PROFESSORA DRA. HELENA BONCIANI NADER,** Professora Sênior da EPM/UNIFESP, Presidente da Academia Brasileira de Ciências, por toda a ajuda e carinho praticamente materno com a nossa tese. Agradeço os contatos nos finais de semana e feriados, bem como ensinamentos científicos e a dedicação de um tempo extra, dentro de uma agenda tão disputada por muitos outros alunos.

Ao **DR. RENAN PELLUZZI CAVALHEIRO** por toda a ajuda, desde o embrião do projeto, até a conclusão desta tese, ao longo destes oito anos.

À **ELSA YOKO KOBAIASHI** e à **DRA. ALINE MENDES**, pela dedicação com os experimentos do trabalho e ajuda com a confecção dos artigos para a publicação.

Aos preceptores do Programa de Residência Médica em Cirurgia da Mão da EPM/UNIFESP, **DR. CARLOS HENRIQUE FERNANDES, DR. JORGE RADUAN NETO, DR. NICOLAU GRANADO SEGRE, CELSO KIYOSHI HIRAKAWA, DR. JOÃO CARLOS BELOTTI** e **DRA. MARCELA FERNANDES,** pela contribuição, conselhos e incentivo ao longo destes dez anos.

Aos colegas de profissão e amigos do Programa de Residência Médica em Cirurgia da Mão da EPM/UNIFESP, **DRA. GISELLY VERÍSSIMO DE MIRANDA, DR. ALEXANDRE YOITI AOYAGUI, DR. GIUSEPPE DE LUCA JR., DRA. REBECA BARROS FURUKAWA, DR. FELIPE ROTH, DR. MAURÍCIO VIEIRA DE PADUA MAIA** e **DR. RODRIGO GUERRA SABONGI**.

À **ROSE PASCHOA**, por toda a paciência e ajuda ao longo destes anos de pós-graduação.

À **ENFERMEIRA LEILA SOUZA DA CRUZ PEIXOTO** e à **ENFERMEIRA AKIKO KAWATA**, da Casa da Mão da EPM/UNIFESP, por toda ajuda, carinho e compreensão.

Aos **FUNCIONÁRIOS DA CASA DA MÃO** da EPM/UNIFESP, em especial, à **SILVANA LOPES,** pela colaboração e por toda sua disponibilidade e organização.

Aos **MÉDICOS ANESTESIOLOGISTAS** assistentes do Serviço de Anestesiologia da EPM/UNIFESP.

Ao **PROFESSOR JAIRO REIS JR.** pela disponibilidade mais uma vez em me ajudar na redação desta tese.

Aos **PACIENTES** da cirurgia da mão da Casa da Mão da EPM/UNIFESP, pela confiança e disponibilidade.

EPÍGRAFE

"É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem a vitória, nem derrota"

Theodore Roosevelt

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA III

AGRADECIMENTOS IV

EPÍGRAFE VII

LISTA DE FIGURAS IX

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS X

RESUMO XII

ABSTRACT XIII

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVO 9

3 LITERATURA 11

4 MÉTODO 20

5 RESULTADOS 30

6 DISCUSSÃO 41

7 CONCLUSÃO 48

8 REFERÊNCIAS 51

NORMAS ADOTADAS 62

APÊNDICES 64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Conteúdo de controitim sulfato (A), dermatam sulfato (B), heparam sulfato (C) e ácido hialurônico (D) em regiões da fáscia palmar de doentes com diferentes estágios da doença de Dupuytren. 32
Figura 2 – Teor de ácido hialurônico (A) e glicosaminoglicanos sulfatados (B) na fáscia palmar de doentes com diferentes estágios da doença de Dupuytren. 33
Figura 3 – Quantidade de condrotim sulfato (A), dermatam sulfato (B) e heparam sulfato (C) na fáscia palmar de pacientes com diferentes estágios da doença de Dupuytren. 34
Figura 4 – Expressão de versicam (A), agrecam (B), decorim (C) e biglicam (D) na fáscia palmar de pacientes com diferentes estágios da doença de Dupuytren.....35
Figura 5 – Imagens de imunofluorescência indicam que a expressão de versicam aumenta e a de decorim diminui com o aumento da gravidade dos pacientes com doença de Dupuytren. 36
Figura 6 – Imuno-histoquímica suplementar para a detecção de ácido hialurônico em diferentes fases da doença de Dupuytren.....37
Figura 7 – Microscopia de dispersão coerente anti-stokes de Raman do colágeno na doença de Dupuytren. (A) As imagens representam a digitalização de secções palmares para os estágios II e III da doença de Dupuytren e o controle realizado nos planos XY e Z. A projeção mostra em verde o sinal de geração de segundo harmônico dos colágenos. Barras: 100 μm. (B) Orientação do colágeno nas fases I a IV da doença de Dupuytren e no controle. A análise da orientação da estrutura do colágeno foi efetuada utilizando-se a geração do segundo harmônico das imagens das fibras de colágeno (série Z de pilhas confocais) dos doentes do controle e da DD, construída pelo plug-in OrientationJ do software ImageJ. I-IV, diferentes fases da doença de Dupuytren; ctr, controle.....38
Figura 8 – Excreção urinária de ácido hialurônico (HA) e glicosaminoglicanos sulfatados (SGAG).....40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

ºC	Graus Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
CARS	Microscopia de dispersão coerente anti-stokes de Raman
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CS	Condroitim Sulfato
D	Distal
DAPI	*4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride*
DD	Doença de Dupuytren
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DS	Dermatam sulfato
ELISA	Ensaio imunoenzimático
et al.	*et alii* (latim), em português: e outros.
GAGs	Glicosaminoglicanos
HA	Ácido hialurônico
HS	Heparam Sulfato
KS	Queratam Sulfato
M	Média
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
Ng	Nanograma
P	Proximal
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	*Polymerase chain reaction* em português: Reação em Cadeia da Polimerase
PG	Proteoglicano (s)

pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
SFB	Soro Fetal Bovino
SGAG	Glicosaminoglicanos sulfatados
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
Wnt	*Wingless-related integration*

RESUMO

Introdução: A doença de Dupuytren (DD) é uma condição fibroproliferativa típica da mão, resultante de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Sua origem está relacionada à síntese de matriz extracelular (MEC), uma rede complexa de diferentes tipos de macromoléculas. Alterações em seu conteúdo e disposição têm impacto nos processos fisiológicos normais e nas condições patológicas. **Objetivo:** correlacionar os glicosaminoglicanos, proteoglicanos e colágeno na matriz extracelular de doentes com diferentes estágios clínicos da doença de Dupuytren. **Métodos:** O estudo envolveu 14 pacientes categorizados em quatro grupos com base nos seus estágios I, II, III e IV. A análise das moléculas foi realizada a partir da biópsia da fáscia palmar e de amostras de urina, por meio da utilização de métodos cromatográficos, análises de mRNA, detecção de proteínas na microscopia confocal e microscopia CARS (microscopia de dispersão coerente anti-stokes de Raman). **Resultados:** Foram observadas alterações significantes no conteúdo e disposição do condroitim sulfato, dermatam sulfato e colágeno na fáscia palmar dos doentes em comparação com o tecido normal, independentemente do grau da doença. Pela primeira vez na literatura, foi possível associar o aumento da expressão do versicam, agrecam e do decorim de forma significante. Além disso, a excreção de glicosaminoglicanos sulfatados está significantemente diminuída na urina dos doentes com DD. **Conclusão:** Os dados indicam que os proteoglicanos e a disposição do colágeno são possíveis marcadores do estádio da doença. Ademais, a diminuição da excreção urinária de glicosaminoglicanos sugere um efeito sistêmico da doença.

ABSTRACT

Introduction: Dupuytren's disease (DD) is a typical fibroproliferative condition of the hand resulting from genetic, epigenetic, and environmental factors. Its origin is related to the synthesis of extracellular matrix (ECM), a complex network of different types of macromolecules. Changes in its content and arrangement impact normal physiological processes and pathological conditions. **Objective**: To correlate glycosaminoglycans, proteoglycans, and collagen in the ECM of patients with different clinical stages of DD. **Methods**: The study involved 14 patients categorized into four groups based on their stages: I, II, III, and IV. Molecules in palmar fascia biopsy and urine samples were analyzed using chromatographic methods, RNA analysis, protein detection in confocal microscopy, and Coherent anti-stokes Raman scattering (CARS) microscopy. **Results**: Significant changes in the content and arrangement of chondroitin sulfate, dermatan sulfate, and collagen were observed in the palmar fascia of patients compared to normal tissue, regardless of the degree of disease. For the first time in the literature, It was possible to significantly associate expression of versican, aggrecan, and decorin. In addition, the excretion of hyaluronic and sulfated glycosaminoglycans is significantly decreased in the urine of DD patients. **Conclusion**: The data indicate that proteoglycans and collagen arrangement are possible markers of the disease stage. Furthermore, the decreased urinary excretion of glycosaminoglycans suggests a systemic effect of the disease.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Dupuytren (DD), também conhecida como fibromatose palmar, é uma desordem fibroproliferativa que tem como consequência a contratura em flexão progressiva e permanente dos dedos (LAYTON *et al*., 2023). O aparecimento dessa perturbação funcional é considerado debilitante, uma vez que diminui a qualidade de vida por sua irreversibilidade e progressão gradual com o passar dos anos (WILBURN *et al*., 2013).

A prevalência da DD no mundo é de 8,2%, caracterizada por uma maior prevalência em indivíduos caucasianos ou de origem nórdica (MANSUR *et al.,* 2018; SALARI *et al.,* 2020). Alguns relatos apresentam a DD como uma doença que remete aos vikings desde o século 16 (NUNN & SCHREUDER, 2014). Quando analisada a proporção entre os gêneros, observa-se frequência maior em homens, com idade superior a 50 anos de idade quando comparados com as mulheres, com uma proporção de homens para mulheres de aproximadamente 6:1 (HINDOCHA *et al*., 2009; MANSUR *et al*., 2018).

A DD é considerada multifatorial, não apresentando apenas uma causa para seu desenvolvimento, mas diversos fatores associados, por meio de uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais (LAYTON & NANCHAHAL, 2019). Durante muitos anos, fatores ambientais como álcool, tabagismo e trabalho manual foram considerados de risco para a DD, contudo, os resultados apresentados ainda geram controvérsias (HART & HOOPER, 2005). Em uma revisão sistemática recente, Salari e colaboradores identificaram que indivíduos acometidos por desordens

metabólicas, como *Diabetes mellitus*, apresentaram 34,1% de prevalência da DD, seguidos por doentes etilistas (24%) (SALARI *et al.,* 2020).

Apesar de a DD ser considerada uma das doenças mais recorrentes do tecido conjuntivo, sua etiologia permanece pouco clara (LIU *et al*. 2015). A apresentação clínica inicial remete à formação de nódulos na região da prega palmar distal, que podem ser assintomáticos ou dolorosos (LAYTON & NANCHAHAL, 2019). Esses nódulos se apresentam firmes, aderidos à pele e à fáscia palmar, ao redor da prega palmar distal. A fáscia palmar é uma aponeurose, que apresenta formato triangular complexo na região palmar, que compreende fibras longitudinais, transversais e verticais (RAYAN 1999). A progressão é medida pela formação de cordões fibróticos que se estendem até os dedos e, conforme esses cordões amadurecem, engrossam e contraem, levando a deformidades permanentes (LAYTON & NANCHAHAL, 2019).

De uma forma geral são relatados três diferentes fases da DD, a proliferativa, a involutiva e o residual, que variam de acordo com a histologia da fáscia palmar analisada (SHIH & BAYAT, 2010). Na fase proliferativa ocorre a proliferação e a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos formando os nódulos. Já na involutiva, os miofibroblastos se alinham ao longo do eixo palmar ao redor das fibras de colágeno, formando as cordas fibróticas. Na fase residual, ocorre a reposição dos miofibroblastos pelos fibrócitos progressivamente, formando um cordão de colágeno avascular (LUCK, 1959; SHIH & BAYAT, 2010).

Além dessa classificação, com a evolução do estudo da DD, passou-se a utilizar a classificação proposta por Tubiana (1986), que completa a análise da lesão por meio da observação da contratura em flexão de cada raio da mão, atribuindo valores para as articulações metacarpofalângicas,

interfalângicas proximais e distais, bem como classificando a variação da DD em quatro diferentes estágios: I (déficit menor ou igual a 45 graus), II (46 até 90 graus), III (91 até 135 graus) e IV (acima de 135 graus) (TUBIANA, 1986).

As principais células envolvidas no desenvolvimento da DD são os miofibroblastos, que são células que apresentam características tanto de fibroblastos como de células musculares lisas, apresentando de certa forma a capacidade de se contrair ativamente (BIANCHI *et al.,* 2015). O comportamento celular anormal pode resultar em alterações na matriz extracelular e, consequentemente, alterações na matriz do tecido conjuntivo (NASCIMENTO *et al.,* 2016). Esse comportamento relatado se deve a alterações nos níveis de fatores de crescimento e radicais livres, que acometem o comportamento celular anormal caracterizado pela intensa atividade proliferativa, aparecimento do fenótipo miofibroblástico caracterizado pela presença de feixes de microfilamentos de α-actina no citoplasma, bem como alterações na síntese dos componentes da matriz extracelular (KOŹMA *et al.* 2005).

Na análise do microambiente associado a essas células, encontra-se que as prostaglandinas presentes nos nódulos afetam a contratilidade dos miofibroblastos, além de fatores de crescimento, proteínas envolvidas em processos fibróticos e outras macromoléculas, como os glicosaminoglicanos (GAGs) (BIANCHI *et al*. 2015).

Os GAGs são polissacarídeos lineares complexos presentes na superfície celular e na matriz extracelular, podendo ser constituídos por uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) unida por ligação glicosídica a um açúcar não nitrogenado, que pode ser um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou um açúcar neutro (D-galactose) (NADER *et*

al., 1984; SHI *et al*., 2021). Essas moléculas apresentam uma estrutura dissacarídica básica e interagem com as mais diversas moléculas, como fatores de crescimento, citocinas, entre outras, permitindo sua mediação e participação em diversos processos fisiológicos (VALLET *et al.*, 2021; KOGUT *et al.,* 2022)

A classificação dos diferentes tipos de GAGs ocorre de acordo com o tipo de hexosamina, ácido urônico ou hexose na cadeia, grau de sulfatação e posição em que são sulfatados, bem como quanto ao tipo de ligação glicosídica inter e intradissacarídica, podendo ser classificados em cinco famílias: condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS), queratam sulfato (KS) e ácido hialurônico (HA) (SAMPAIO & NADER, 2006; KHAN *et al*., 2020; SHI *et al*., 2021). Com exceção do HA, todos os outros GAGs são sulfatados, ou seja, apresentam grupamentos sulfatados em diferentes posições e ocorrem nos tecidos covalentemente ligados a proteínas constituindo os proteoglicanos (NADER *et al.,* 1984; NADER *et al.*, 1989; VALLET *et al.,* 2021). As funções de cada tipo de GAGs variam de acordo com sua localização e são consequência direta de sua estrutura tridimensional (SAHU *et al*., 2023).

A função básica do HA é reter água e regular seu fluxo no tecido e, devido à alta viscosidade, atua como um excelente protetor e lubrificante das articulações (LIN *et al*., 2020). O HA possui grande capacidade de interação com diversas proteínas por meio de ligações não covalentes, tais como com o esqueleto proteico do agrecam e regiões específicas da proteína de outros proteoglicanos. Em alguns casos, essas interações são estabilizadas por uma glicoproteína denominada proteína de ligação (SEROR *et al*., 2011).

O CS é um componente característico da matriz dos tecidos conjuntivos, incluindo ossos, cartilagem, pele e ligamentos (HENROTIN *et*

al., 2010) e, quando associado ao HA, possui a função de reter água nos tecidos, favorecendo a manutenção da integridade desses quando submetidos a altas pressões (TSANAKTSIDOU *et al*., 2022).

O DS é um composto amplamente distribuído, na forma de proteoglicanos (PG), em tecidos e células como córnea, pele, tecido hepático e tecido conjuntivo (MIZUMOTO & YAMADA, 2022), além de desempenhar um importante papel na manutenção da integridade estrutural do tecido participando da deposição e manutenção das fibras de colágeno (SCOTT & PARRY, 1992).

O HS está localizado na membrana plasmática e na matriz extracelular promovendo regulação de interações entre as células e seu meio importantes para o crescimento, desenvolvimento e manutenção das funções celulares. Acredita-se que tenha papel no reconhecimento e controle da divisão celular, proporcionando contato entre as células homólogas por meio de marcadores de superfície (NADER *et al*., 1999; ELGUNDI *et al.*, 2020; FARIA-RAMOS *et al*. 2021).

Os PG são compostos de alto peso molecular formados por uma ou mais cadeias de GAGs, unidas por ligação covalente a uma proteína. Estão presentes na matriz extracelular, em compartimentos intracelulares (grânulos secretórios) e na superfície celular (ligados à membrana plasmática) (DIETRICH, 1984; LINDAHL *et al*., 2015).

A atividade biológica de cada PG depende das propriedades do seu esqueleto proteico, da estrutura química do GAG que o compõe e de sua localização celular. Os PG apresentam variabilidade com relação ao número de cadeias de GAGs ligadas a seu esqueleto proteico, encontrando-se desde uma até mais de cem cadeias (NADER *et al.,* 2005; PEREZ *et al.,* 2023). Além disso, o mesmo esqueleto proteico pode conter mais de um tipo de

cadeia de GAG, formando assim um PG híbrido (BALBINOT-ALFARO *et al*., 2021; PEREZ *et al.,* 2023).

Os PG podem ser classificados em três grandes grupos: PG de superfície celular, PG de matriz extracelular e PG intracelulares (IOZZO & SCHAEFER, 2015). Entre os PG de matriz extracelular podem ser citados o biglicam, o decorim, o agrecam (IOZZO & SCHAEFER, 2015). Tanto o decorim quanto o biglicam são PG de CS e DS. O decorim, por exemplo, pode ocorrer associado ao colágeno e liga-se ao fator de necrose tumoral alfa (TGF-α), podendo funcionar como um reservatório deste (TAKEUCHI *et al.*, 1994; BURTON-WURSTER *et al.,* 2003; GUBBIOTTI *et al.*, 2016).

A análise dos GAGs na DD é comumente realizada por meio de marcação histológica e cultura de fibroblastos do tecido conjuntivo coletado durante procedimento cirúrgico. Todavia, recentemente, observou-se que é possível analisar os GAGs pela da urina dos pacientes (KAKKIS & MARSDEN, 2020), visto que, na análise em relação à presença e concentração de glicosaminoglicanos circulantes, estabeleceram-se correlações entre os achados e o estágio da doença (MARTINS *et al.,* 2004). Dessa maneira, observa-se que existem diversas doenças que se beneficiam com o estudo dos GAGs como biomarcadores, como lesões uroteliais (SOLER *et al.* 2008), diversos tipos de câncer (ONYEISI *et al*., 2020), e cicatrização óssea (DIAS DOS SANTOS *et al.*, 2015).

O tratamento da DD tem-se desenvolvido ao longo dos últimos anos, todavia, de uma forma geral, todos envolvem tratamento cirúrgico, que ocorre em estágios mais avançados da doença (DESAI *et al*., 2011). Classicamente, o tratamento cirúrgico é indicado na presença de contraturas maiores do que 30° das articulações metacarpofalângica, ou contraturas maiores que 20° articulação interfalângica proximal, ou ainda na presença

de nódulos dolorosos (BOE *et al*., 2021). Dessa maneira, a avaliação concreta de danos, até hoje, só é possível após a intervenção, o que dificulta o desenvolvimento de abordagens precoces e preventivas. Na literatura não há disponibilidade de parâmetros diagnósticos biológicos de fácil captação, não invasivos, ou que facilitem esse processo.

Nesse contexto, a análise de moléculas teciduais envolvidas na DD (como por exemplo os GAGs) auxiliaria no encontro de novos indicadores para o diagnóstico. Sendo assim, o presente estudo busca correlacionar dados clínicos da gravidade da doença, através da classificação de Tubiana, com os níveis de GAGs, PGs e alterações do colágeno.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Correlacionar os glicosaminoglicanos, proteoglicanos e colágeno na matriz extracelular de doentes com diferentes estágios clínicos da doença de Dupuytren.

3 LITERATURA

3 LITERATURA

3.1 Doença de Dupuytren (DD)

ELLIOT (1999) apresenta as primeiras citações que fazem referência a DD ou fibromatose da fáscia palmar. Inicialmente, a primeira referência é ao estudo de Felix Plater em 1614, que por meio de um relato de caso, descreve um paciente que apresentava contratura do quarto e quinto dedos, atribuindo a contratura em flexão ao trauma dos tendões flexores. Ainda de acordo com esse autor, há registros de que, em 1822, Ashley Cooper descreve a contratura, diferenciando-a de contraturas produzidas pela lesão dos flexores, correlacionando a causa da doença ao espessamento da fáscia e sugere o tratamento pela da fasciotomia.

DUPUYTREN (1833) foi o primeiro a descrever detalhadamente a patologia, bem como tratamento cirúrgico, sendo a doença nomeada em sua homenagem. DUPUYTREN (1833) descreveu tanto o padrão anatômico da fáscia palmar, as bandas acometidas, como a posição de ressecção de cada uma delas durante liberação cirúrgica.

LUCK (1959) foi o primeiro a realizar uma classificação histológica da DD. Segundo esse autor, a DD pode ser separada em três fases distintas: proliferativa, involutiva e residual. A fase proliferativa é descrita como o início da doença, com a formação dos nódulos; na fase involutiva, há o alinhamento das células com os cordões do tecido, iniciando a contratura; e a última fase, a residual, é descrita pela diminuição da quantidade de células, exibindo um predomínio de tecido fibroso formado pelas fibras colágenos dos tipos I e III.

LING (1963) evidenciou, por meio de um levantamento de pacientes com DD, o fator genético da doença. Outros autores também indicam a participação do fator genético, como a sugestão de herança dominante e os relatos de estudos em gêmeos idênticos, como o estudo de Couch (1938).

GABBIANI & MAJNO (1972) investigaram os nódulos palmares de pacientes com DD pelo do uso de microscopia eletrônica. Nessa análise, perceberam que os fibroblastos presentes no tecido apresentavam características atípicas, assemelhando-os a células musculares lisas, sugerindo-lhes pela primeira vez o nome de miofibroblastos e conectando seu papel na patogênese da contratura observada clinicamente

BRICKLEY-PARSONS *et al.* (1981) realizaram uma análise do colágeno presente na fáscia palmar dos pacientes com DD. Pela análise de mais de 400 pacientes, observaram que a fáscia palmar de pacientes com DD apresenta sinais bioquímicos de reparação alterados, como o aumento do conteúdo de colágeno, principalmente o colágeno tipo III que na fáscia adulta normal está ausente, mas no tecido dos pacientes com DD é abundante. Dessa maneira, os autores propuseram que a contratura grosseira ou encurtamento da fáscia palmar ocorria devido a um processo celular ativo que aproxima as extremidades distais do tecido afetado ao mesmo tempo que o tecido original é substituído.

HUESTON (1984) observou pacientes com histórico familiar, idade de início da DD inferior aos 50 anos, com acometimento bilateral e em regiões ectópicas, que não conseguem mais apoiar por completo a mão espalmada em uma mesa, ou seja, que apresentam quadros mais graves e com maior chance de recidiva. Por meio desse estudo, concluiu que a intervenção cirúrgica deva ser realizada apenas com o objetivo de

recuperação da mão, sendo reservado para áreas específicas nos doentes com probabilidade de recorrência.

TOMASEK *et al.* (1986), em um estudo com imunofluorescência, descrevem características do citoesqueleto e da matriz extracelular dos miofibroblastos relacionados à DD. Os autores demonstram que as células nodulares presentes não contêm miosina do tipo muscular liso, retratando que embora a semelhança morfológica dessas células com células musculares tenha ocorrido, elas não apresentam glicoproteínas associadas ao músculo liso ou proteínas principais do citoesqueleto. Todavia, a quantidade abundante de fibronectina detectada nos miofibroblastos foram relacionadas à contração da fáscia palmar. Sendo assim, sugerem que essas células não estão relacionadas a células musculares, mas a uma subpopulação de células mesenquimais.

TUBIANA (1986) modifica e completa a classificação da DD, em que classificação clínica da doença passa a considerar a contratura em flexão de cada raio da mão, adicionando os valores obtidos nas articulações metacarpofalângicas, interfalângicas proximais e distais. Ou seja, a variação da DD pode ser classificada em quatro diferentes estágios: I (déficit menor ou igual a 45 graus), II (46 até 90 graus), III (91 até 135 graus) e IV (acima de 135 graus).

MURREL, FRANCIS & BROLEY (1991) desenvolveram uma pesquisa buscando relacionar se os fibroblastos encontrados na DD apresentam produção aberrante de colágeno. Foi encontrada uma maior expressão de colágeno tipos II e III, e inibição do colágeno tipo I, sem, porém, essas alterações estarem vinculadas a alterações genéticas, mas ao aumento de densidade dos fibroblastos.

BURGE (1999) realizou um estudo comparando evidências da suscetibilidade hereditária a DD e a variação dos modos de herança. Nesse estudo com diferentes populações sugere-se uma predisposição genética de origem celta ou viking. Entre seus achados, está a variação na prevalência que se aproxima dos 30% em indivíduos com mais de 60 anos na Noruega. Dessa forma, partem do princípio de que existe um traço complexo na gênese da DD, condicionando a quatro fatores: heterogeneidade genética, penetrância incompleta, fenocópias e herança poligênica.

MAHENDRA *et al.* (2001) apresentam um artigo com uma visão geral das formas de tratamento utilizadas para a DD. Os autores, antes da análise das diversas técnicas empregadas, afirmam que a principal forma de tratamento é cirúrgica, mas que existem diversas formas de métodos não cirúrgicos experimentais. A questão dos métodos cirúrgicos são as complicações que podem ocorrer, tanto durante o procedimento, quanto no pós-operatório. Dessa forma, quando analisados outros métodos, os autores sugerem que a fasciotomia enzimática com utilização de colagenase apresenta potencial, além da dermofasciotomia e o uso de enxertos de pele.

HART & HOOPER (2005), em um artigo de revisão, retratam a etiologia conhecida da DD, associando-a a outras doenças sistêmicas como epilepsia, artrite reumatoide, infecção por HIV e trauma.

HINDOCHA *et al.* (2006) analisaram fatores ambientais associados a etiologia da DD, demonstrando relação entre o tabagismo, doenças como ombro congelado, epilepsia, *Diabetes mellitus* e alcoolismo.

SHIH *et al.* (2009), por meio de uma análise comparativa de fibroblastos com biópsias de tecidos específicos, buscaram a identificação de biomarcadores na DD. Foram utilizadas técnicas de bioinformática para identificar genes diferencialmente expressos. Como resultado, encontram 25

genes candidatos que foram refinados em seis, por anotação funcional. Entre eles, os genes *ADAM12*, *POSTN* e *TNC* foram identificados nas amostras de biópsia do cordão umbilical e do nódulo como potenciais biomarcadores em relação ao desenvolvimento da DD.

LAM *et al.* (2010) apresentou uma classificação baseada na de LUCK (1959) relacionando a DD e o colágeno tipo III. Nessa nova abordagem utilizada, é investigado o nível de colágeno dentro de cada um dos estágios propostos inicialmente. Os dados mostraram que no estágio I o colágeno tipo III está acima de 35%; no estágio II, entre 20 e 35%; e, no estágio III, abaixo de 20%.

CHEUNG, WALLEY & ROZENTAL (2015), em uma revisão, apresentaram as complicações da DD e seu manejo, diferenciando as técnicas utilizadas em seu tratamento e as complicações mais frequentes. Dentre elas, a fasciotomia aberta apresentou a maior porcentagem de complicações (infecção, lesão arterial e nervosa), todavia, com os menores índices de recidiva (21%).

BIANCHI *et al.* (2015) apresentaram novos alvos para a estratégia terapêutica por meio do estudo de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento envolvidos na DD.

BECKER *et al*. (2016), com uma meta-análise de estudos de associação de todo o genoma e integração baseada na análise de rede com dados de expressão genética, identificaram 14 novos *loci* e desvendam uma rede centrada em Wnt associada à DD. Nesse experimento foram utilizados 1580 casos e 4480 controles, resultando na evidência de que a via Wnt de sinalização em conjunto com outras vias atua de forma crítica no desenvolvimento da DD.

3.2 Glicosaminoglicanos como biomarcadores para a DD

YANAGISHITA (1993) apresentou uma breve revisão sobre a história dos proteoglicanos, relacionando o primeiro estudo ao final do século 19, em que isolou condroitim sulfato de tecidos cartilaginosos. Essa autora ainda afirma que a descoberta dos glicosaminoglicanos (GAGs) apenas ocorreu na primeira metade do século 20, associada ao refinamento da análise dos carboidratos.

MEYER e colaboradores, ao longo das décadas de 30 a 50, foram responsáveis pelo descobrimento de moléculas como o ácido hialurônico ou hialunoram por MEYER & PALMER (1934), hialuronidase por MEYER *et al.*, 1937, dermatam sulfato por MEYER & CHAFFE (1941), querantam sulfato I e II por MEYER *et al.* (1953), e a diferenciação de condroitim sulfatos A e C por MEYER *et al.* (1956).

SHATTON & SCHUBERT (1954) conseguiram evidenciar a ligação covalente entre a proteína e os GAGs encontrada nos proteoglicanos. Até então, a principal função biológica atribuída aos GAGs era considerá-los como substância fundamental para preenchimento do espaço extracelular dos tecidos conjuntivos.

HASCALL & SAJDERA (1969) desenvolveram um método de gradiente de densidade para separar os proteoglicanos agregados. Esse estudo revelou que a matriz extracelular era muito mais organizada do que se acreditavam.

LINDAHL & HÖÖK (1978) e RÓDEN (1980), em diferentes estudos consecutivos, descreveram os GAGs como polissacarídeos encontrados em tecidos animais associados covalentemente com proteínas. Os autores

apresentam que seis deles são estruturalmente relacionados devido a uma estrutura de carbono, e que todos, com exceção do ácido hialurônico, são sulfatados. Esses estudos em conjunto forneceram informações específicas sobre a ligação das cadeias às proteínas nucleares, permitindo que, a partir deles, os estudos biossintéticos começassem a se desenvolver.

FLINT, GILLARD & REILLY (1982) associaram os GAGs à DD, relatando que foram encontradas diferenças significativas no tipo e na quantidade de GAGs entre as várias manifestações do processo da doença. Nas regiões de proliferação celular mais ativa, os níveis de condroitim sulfato eram 11 vezes superiores aos dos tecidos conjuntivos palmares normais, enquanto os níveis tecidulares de dermatam sulfato apresentaram um aumento de quatro vezes.

KJELLÉN & LINDAHL (1991), em uma extensa revisão, apresentaram a classificação, estrutura, nomenclatura e funções dos proteoglicanos e dos GAGs, descrevendo a síntese na forma de proteoglicanos, e quais cadeias sacarídicas estão ligadas covalentemente ao esqueleto proteico.

Biomarkers Definitions Working Group (2001) chegou ao consenso com a primeira definição do que é um biomarcador: “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica”.

NASCIMENTO *et al*. (2016) avaliaram e compararam o comportamento dos GAGs na DD em um estudo experimental com 23 pacientes, cujos tecidos obtidos por fasciectomia foram avaliados por eletroforese para identificação dos GAGs. Como resultado, foi encontrado

um aumento de GAGs sulfatados, principalmente o dermatam sulfato e a diminuição acentuada do ácido hialurônico na aponeurose palmar.

ZHANG *et al.* (2020), por meio de uma revisão, reuniram as técnicas atualmente disponíveis para detecção e análise de GAGs em amostras biológicas, apresentando vantagens e desvantagens para cada metodologia, além de perspectivas para os métodos em desenvolvimento.

AMENDUM *et al.* (2021) relataram que GAGs que se encontram elevados no sangue podem ser utilizados como biomarcadores, tanto para mucopolissacaridoses, como para outras doenças.

BRATULIC *et al.* (2022) propuseram um estudo para análise do nível de GAGs na urina em comparação com os encontrados no plasma em adultos. Foram utilizados 308 adultos saudáveis para análise dos GAGs na urina e no plasma por cromatografia líquida, associada a espectrometria de massa. Esse foi um dos maiores estudos realizados para a validação da utilização de GAGs presentes na urina como biomarcadores.

LENZI *et al.* (2023), em uma revisão sistemática, apresentaram e analisaram os avanços na utilização de biomarcadores de GAG plasmáticos e urinários para vários tipos de doenças, demonstrando seu potencial promissor como como ferramenta diagnóstica não invasiva.

4 MÉTODO

4 MÉTODO

4.1 Desenho de pesquisa

Este foi um estudo observacional experimental de ciência básica.

4.2 Comitê de ética em pesquisa

O presente estudo encontra-se registrado e aprovado pelo CEP da UNIFESP (n 1.309.625) (Apêndice 01). Todos os procedimentos foram realizados após leitura e assinatura por cada participante do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, Apêndice 02).

4.3 Casuística

Foram selecionados 14 pacientes com a Doença de Dupuytren submetidos à avaliação clínica no ambulatório da Disciplina de Cirurgia de Mão e Membro Superior do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, realizada pela equipe da Cirurgia da Mão, composta pelo Professor Dr. Flavio Faloppa, pelo Dr. João Baptista Gomes do Santos, pelo Dr. Jorge Raduan Neto e pelo estudante de pós-graduação Dr. Luiz Guilherme de Saboya Lenzi, que foi o responsável por classificá-los por grau de contratura, conforme proposto por Tubiana (1986). Participaram do estudo 14 casos controle, selecionados através de seleção aleatória e selecionados, após diagnóstico clínico (exame físico) e eletroneuromiográfico.

4.3.1 Critérios de inclusão e não-inclusão

- Inclusão: Pacientes maiores de 18 anos com diagnóstico clínico de Doença de Dupuytren, de ambos os sexos, com indicação cirúrgica.
- Não inclusão: Pacientes submetidos a cirurgia prévia ou com traumatismos prévios na mão avaliada, assim como pacientes que não quiseram assinar o TCLE da pesquisa.

4.4 Delineamento da pesquisa

Para o grupo controle, optou-se por comparar amostras de fáscia controle de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico para Síndrome do Túnel do Carpo. Esse tipo de amostra controle foi selecionada por ser uma doença sem relação com acometimento da fáscia palmar. A extração dessa fáscia não compromete a técnica cirúrgica adequada e não traz prejuízo à recuperação dos pacientes envolvidos.

Para os grupos com DD analisados, os pacientes foram classificados em quatro diferentes estágios da doença, que compreendem a soma do déficit na goniometria realizada com um goniômetro de dedo, sempre posicionado na parte dorsal das três articulações dos dedos do raio acometido, segundo Tubiana *et al.* (1986). Assim, foram classificados em quatro grupos, que compreendem os estágios I, II, III e IV. Tanto para o grupo controle como para os grupos analisados a amostra para biópsia foi de no mínimo 1 cm^2 ou mais, não havendo qualquer prejuízo ao tratamento do paciente. Todos os pacientes receberam analgesia, antibioticoterapia profilática e retornaram

para verificar a evolução cirúrgica aos sete, catorze, trinta, sessenta, noventa e cento e oitenta dias após a cirurgia.

4.5 Procedimentos

4.5.1 Pré-operatório e técnica operatória

Os pacientes foram encaminhados ao centro cirúrgico para a cirurgia, em que foi realizada a técnica de fasciectomia parcial, conforme técnica padrão consagrada na literatura (HUESTON, 1961; DIAS & AZIZ, 2018).

Foi utilizada a anestesia do tipo bloqueio de plexo no membro operado, a exanguinação com faixa de Esmarch, realizada a hemostasia rigorosa e sutura com fio de *nylon* (4 ou 5-0). Durante o procedimento cirúrgico, corda fibrótica foi ressecada (em torno de 2,5 cm) e dividida em três regiões: proximal (P), média (M) e distal (D) (TUBIANA & DUBERT, 2000).

Para os pacientes controle, a retirada da amostra de fáscia controle, foi realizada através da técnica clássica de liberação aberta do túnel do carpo. Os pacientes foram encaminhados ao centro cirúrgico da instituição proponente da pesquisa, onde foram submetidos ao procedimento anestésico regional intravenoso (bloqueio de Bier) e sedação, seguido pelo preparo cirúrgico adequado e ao procedimento de descompressão neurológica. Após a incisão da pele de aproximadamente 2 a 3 cm, foi realizado a cauterização, para a hemostasia adequada, e realizada a retirada de uma amostra de aproximadamente 1 cm^2 da fáscia palmar do paciente. O procedimento cirúrgico seguiu e foi finalizado conforme técnica adequada (GREEN &

WOLFE, 2011). As amostras controle, assim como a urina controle seguiram o mesmo protocolo de armazenamento da amostra pesquisada.

Todas as amostras foram divididas e mantidas em acetona à temperatura ambiente para estudos de GAGs, no reagente de TRIzol® (Invitrogen, USA), a -80°C para análises de PCR e paraformaldeído 4% a 4°C para métodos microscópicos. Além disso, no dia do procedimento, foram colhidos 50 mL de urina, de cada paciente envolvido na pesquisa, antes da cirurgia e armazenados a 4°C na presença de cristais de timol.

4.5.2 Pós-operatório

Todos os pacientes receberam analgesia e antibioticoterapia profilática e retornaram para realizar curativos e conferência da evolução cirúrgica, com sete, catorze, trinta, sessenta, noventa e cento e oitenta dias de pós-operatório.

4.5.3 Análise de glicosaminoglicanos em amostras de aponeurose palmar

As amostras de aponeurose palmar foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4, trituradas em acetona (10 volumes) e mantidas durante a noite à temperatura ambiente, conforme descrito por FRANCIOZI *et al.* (2013) e MIERZWA *et al.* (2017).

Os precipitados foram separados por centrifugação, secos, pesados e proteolizados com maxatase (Biocon Laboratórios, Brasil). Posteriormente, os peptídeos e os fragmentos de ácido nucleico foram removidos por precipitação com ácido tricloroacético (10% de concentração final) a 4°C.

Após centrifugação, ao sobrenadante foi adicionado metanol. O precipitado foi recolhido por centrifugação e seco. As amostras foram suspensas em água destilada e analisadas em triplicatas para determinar o teor de glicosaminoglicanos sulfatados (SGAG) e ácido hialurônico (HA).

Os SGAG foram identificados e quantificados por eletroforese em gel de agarose em tampão de 1,3-diaminopropano acetato 0,05 Molar, pH 9,0, utilizando padrões de heparan sulfato (HS), dermatam sulfato (DS) e condroitim sulfato (CS). As amostras foram analisadas em triplicatas. Os resultados quantitativos foram expressos em µg SGAG por mg de tecido seco. Os valores foram expressos como médias com limites inferior e superior de ICs de 95%.

A determinação do HA foi efetuada com a utilização um método fluorimétrico semelhante a um ensaio imunoenzimático (ELISA) altamente específico (MARTINS *et al*. 2003). As quantidades absolutas de HA foram expressas em nanogramas de HA por mg de tecido seco.

4.5.4 Análise de glicosaminoglicanos em amostras de urina

Os glicosaminoglicanos presentes em amostras de urina foram extraídos por cromatografia de filtração em gel, conforme descrito por SOLER *et al*. (2018). Para tanto, uma alíquota de 2 mL de amostra de urina foi aplicada a uma coluna de purificação (Sephadex G25) equilibrada com água destilada.

Após descarte do volume de inclusão, foi coletada uma fração de 4 mL de fluxo, que foi seca a vácuo e, finalmente, dissolvida em 10 µl de água destilada e mantidas congeladas a -20 °C para análise. Essa purificação

permitiu uma separação clara entre GAG e sal, para além da exclusão de impurezas, como pigmentos e compostos menores, e foi seguida de microeletroforese em gel de agarose PDA. As quantidades foram expressas em µg SGAG/mg de creatina.

O conteúdo de HA foi determinado utilizando-se um método fluorimétrico tipo "Elisa" não competitivo e expresso como ng HA/µg de creatinina (Martins et al. 2003). A creatinina foi determinada pelo método do picrato alcalino.

4.5.5 Extração de RNA e análise de transcrição reversa-PCR em tempo real

O RNA total foi isolado com reagente de TRIzol® (Invitrogen, USA), quantificado espectrofotometricamente e utilizado como modelo para a reação de transcriptase reversa. O DNA complementar (cDNA) foi transcrito reversamente usando-se 2 µg de RNA total e o kit Improm II™ ReverseTranscriptase (Promega, Brasil).

A amplificação quantitativa por PCR em tempo real, foi realizada com uma alíquota de 2 µl de cDNA diluído com *primers* específicos (Tabela 1) e o kit Syber Green Master Mix (Applied Biosystems, USA) em um termociclador 7500 *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, UK), usando-se o ciclo de ativação: 95 °C (10 minutos), 40 ciclos de 95 °C (15 segundos), 61 °C (1 minuto) e 72 °C (30 segundos).

A expressão relativa foi analisada com um método baseado numa curva de diluição padrão para PCR em tempo real relativa com base no método ΔΔCT (Livak and Schmittgen 2001). Os resultados foram expressos

em unidades arbitrárias e foram utilizados controles negativos em paralelo para confirmar a ausência de qualquer contaminação. Os valores de expressão foram normalizados para o gene de expressão constitutiva da proteína ribossômica L13A.

Tabela 1 – Primers utilizado para a PCR em tempo real

Gene	***Forward* (5'- 3')**	***Reverse* (5'- 3')**
Decorin	GCTTCTTATTCGGGTGTGAGT	TTCCGAGTTGAATGGCAGAG
Biglican	CTCGTCCTGGTGAACAACAA	CAGGTGGTTCTTGGAGATGTAG
Versican	GTCACTCTAATCCCTGTCGTAATG	CTCGGTATCTTGCTCACAAAGT
Agrecan	CCTTACCGTAAAGCCCATCTT	CCAGTCTCATTCTCAACCTCAG
RPL13a	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA

4.5.6 Imunofluorescência, microscopia confocal e imuno-histoquímica

Os espécimes de aponeurose palmar foram fixados em formaldeído a 4% em PBS, incluídos em *Tissue Tek* a -20°C, seccionados em fatias de 10 μm em um criostato e colocados em lâminas para análise de determinadas proteínas por imunofluorescência.

As lâminas foram incubadas com glicina 0,1M em tampão PBS durante 10 min, seguidos por incubação com tampão de bloqueio durante 1 hora à temperatura ambiente e, em seguida, com anticorpos primários a 4°C durante a noite. Foram utilizados anticorpos primários policlonais (diluição de 1:200): decorim (sc-22613), biglicam (sc-33788), versicam (sc-25831),

agrecam (sc-25674). Após lavagem com PBS, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário específico conjugado com Alexa flúor-594 ou estreptavidina conjugada com Alexa 594 à temperatura ambiente durante 1,5 horas.

Os núcleos foram corados com 4',6-*Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride* (DAPI) (diluição de 1:1000) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas foram montadas em Fluoromont G (2:1 em PBS) e analisadas em um microscópio confocal. As imagens foram capturadas com uma objetiva Plan-Apochromat×63 (abertura numérica 1,4) sob imersão em óleo. As imagens são representadas em projeções de intensidade máxima correspondentes à série z (CAVALHEIRO *et a*l. 2017).

Para o ácido hialurônico, as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio a 10% durante 30 minutos, lavadas, bloqueadas com 5% de SFB (soro fetal bovino), para impedir ligação inespecífica e, finalmente, incubadas com proteína de ligação biotinilada a 4° C durante a noite. Após esse período, as lâminas foram lavadas e processadas utilizando-se o Kit Universal Dako LSAB®+, Peroxidase (Kit LSAB+, HRP) e o substrato cromogêneo Dako Liquid DAB+ (Dako, Dinamarca). As lâminas foram contracoradas com H&E e analisadas com a utilização de um microscópio óptico invertido (Axiovert 40 CFL, Zeiss), numa ampliação de 40 vezes.

4.5.7 Microscopia de dispersão coerente anti-stokes de Raman (CARS)

As amostras de fáscia palmar dos doentes com diferentes estágios da doença foram analisadas com o microscópio confocal. O sistema consiste

num microscópio invertido equipado com uma fonte de luz sintonizável picoEmerald (APE). A luz de excitação foi focada com uma objetiva apocromática de imersão múltipla (HC PL APO CS2 20×/0,75). O Epi-SHG foi utilizado para detectar a geração da segunda harmônica das fibras de colágeno. As imagens são representadas em projeções de intensidade máxima que corresponde às imagens adquiridas em série Z. As imagens coletadas em varredura foram processadas com o *software* Leica LAS AF (CAVALHEIRO *et al*. 2017).

Por fim, a análise da orientação da estrutura do colágeno foi realizada com a geração da segunda harmônica das imagens das fibras de colágeno (série Z de pilhas confocais) dos controle e doentes, construída pelo *plugin* OrientationJ do *software* ImageJ.

4.5.8 Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram analisados por meio de testes estatísticos de comparação, com base nos tipos de distribuição das variáveis. As distribuições foram consideradas não paramétricas de acordo com sua distribuição de dois grupos não pareados, utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 9. Os valores obtidos para cada variável contínua foram organizados e descritos pela média e desvio padrão. Para a comparação entre as médias de dois grupos amostrais, foi utilizado o *teste t de student*, seguido do teste de Mann-Whitney. Para os estudos com mais de dois grupos com dados não paramétricos, foi utilizado o teste *one way-Anova* seguido do teste de Kruskal-Wallis. Um valor de probabilidade de $p \leq 0,05$ foi considerado significante.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os dados clínicos e demográficos de todos os pacientes submetidos a cirurgia da fáscia palmar para investigação dos glicosaminoglicanos (GAG) e colágeno estão descritos na tabela 2. A idade média do controle foi de 56 ±8, e a idade média dos acometidos pela doença de Dupuytren (DD) foi de 63 ±7,74.

Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes submetidos a cirurgia da fáscia palmar para investigação dos GAGS e colágeno

	GRUPOS	
	Controle (n=14)	**Dupuytren (n=14)**
Idade (anos)		
Média±DP	56 ± 8	63 ± 7.74
Gênero	Masculino=9	Masculino=13
	Feminino=5	Feminino=1
Etnia	-	Caucasiano= 11
		Não caucasiano=3
Grau de Tubiana	-	I= 4
		II =4
		III =2
		IV = 4

As amostras de fáscia palmar retiradas dos catorze doentes foram divididas em três regiões (P, M, D) e de acordo com os diferentes estágios da doença, sendo possível, dessa forma possível observar um aumento do conteúdo de dermatam sulfato (DS) e condroitim sulfato (CS) em todos os doentes em comparação com o controle. Não foram observadas diferenças em relação ao conteúdo de ácido hialurônico (HA) para os diferentes grupos de controle. Quando comparadas as regiões: proximal (P), média (M) e distal (D) (Figura. 1), não foram observadas diferenças estatísticas.

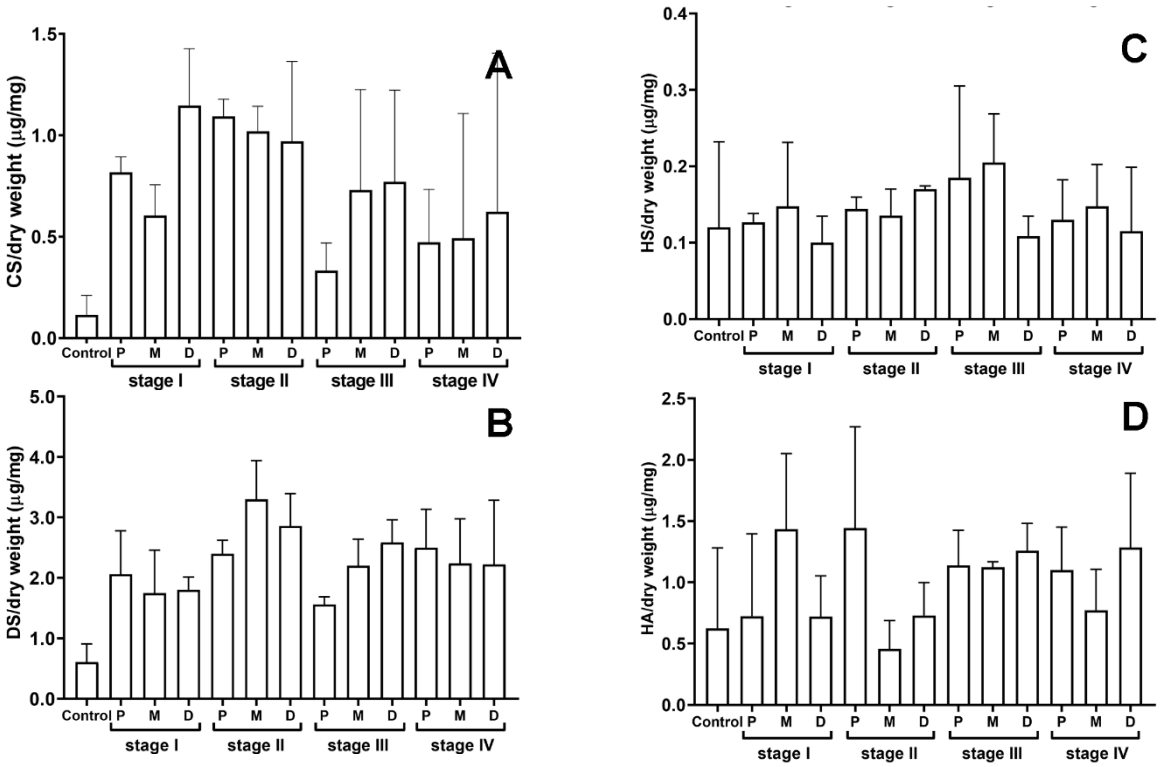


Figura 1 – Conteúdo de controitim sulfato (A), dermatam sulfato (B), heparam sulfato (C) e ácido hialurônico (D) em regiões da fáscia palmar de doentes com diferentes estágios da doença de Dupuytren.

Dessa forma, para as experiências seguintes, as três regiões foram incluídas como três medições diferentes para o mesmo doente (Figura 2). Não foram observadas quaisquer diferenças significantes no conteúdo de HA entre os doentes com diferentes estágios de DD e o controle novamente (Figura 2A). Por outro lado, os dados indicaram claramente um aumento do

conteúdo total de glicosaminoglicanos sulfatados para os pacientes com Dupuytren em comparação com os controles, sem diferença significante entre os quatro estágios da doença (Figura 2B).

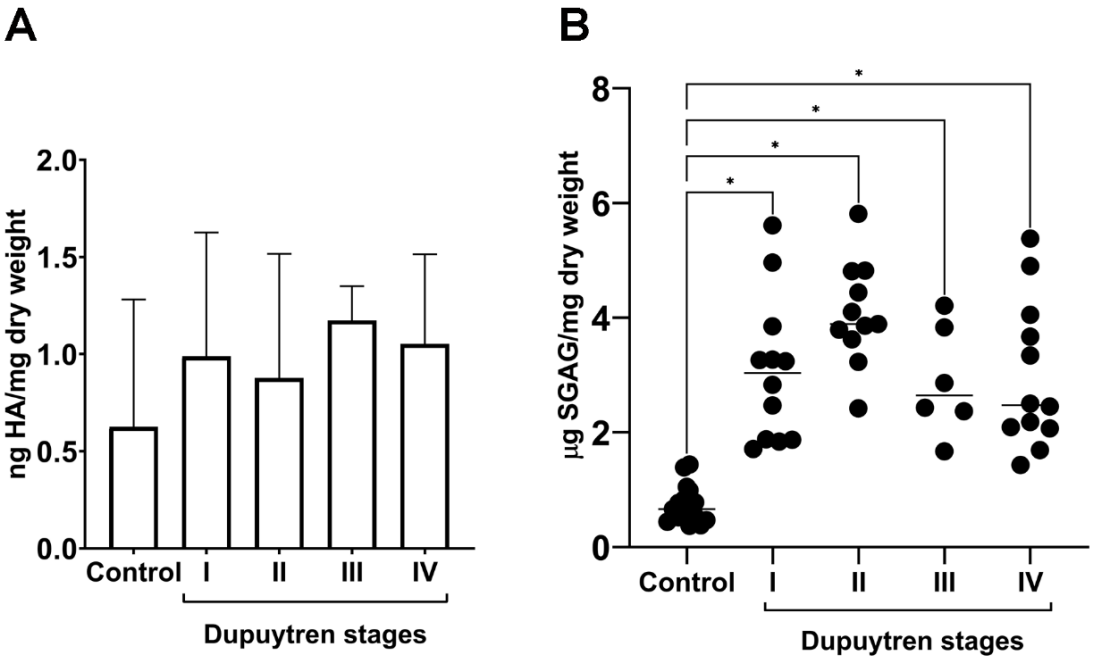


Figura 2 – Teor de ácido hialurônico (A) e glicosaminoglicanos sulfatados (B) na fáscia palmar de doentes com diferentes estágios da doença de Dupuytren.

A análise individual dos diferentes tipos de SGAG revelou igualmente um aumento significante do teor de CS (Figura 3A) e DS (Figura 3B) em todas as fases da doença. O conteúdo de HS é 10 vezes inferior ao de DS (Figura 3C).

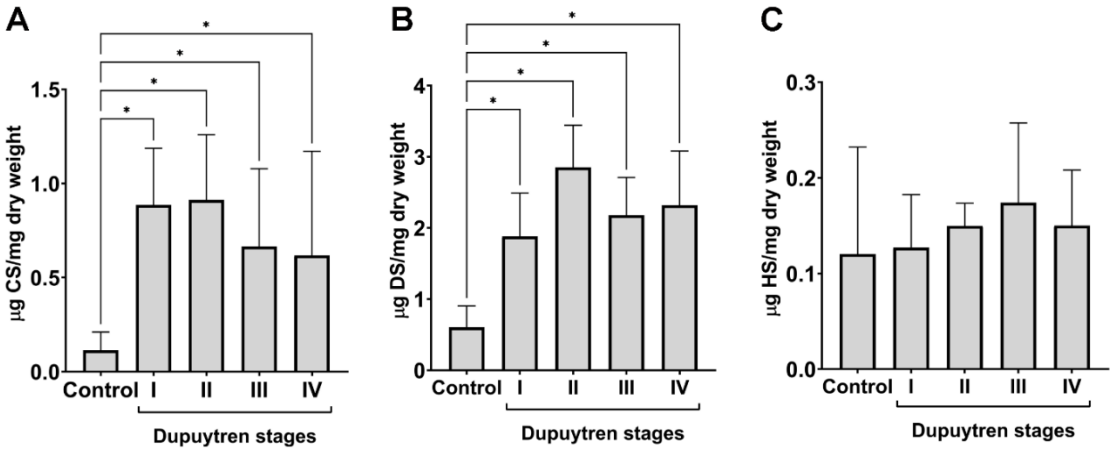


Figura 3 – Quantidade de condrotim sulfato (A), dermatam sulfato (B) e heparam sulfato (C) na fáscia palmar de pacientes com diferentes estágios da doença de Dupuytren. Todas as barras de erro representam desvio padrão, p<0,05

Os resultados do conteúdo de condroitim sulfato e dermatam sulfato nos levaram a investigar a expressão de alguns PG contendo cadeias de CS ou DS ligadas covalentemente à proteína central. Inicialmente, foram realizados estudos de PCR em tempo real para as três regiões da fáscia DD para cada paciente individual e que não mostraram diferenças na expressão dos PGs analisados (dados não mostrados).

Assim, na Figura 4A é possível observar o resultado do PCR em tempo real em que as três regiões diferentes são incluídas como amostras do mesmo doente. Foram investigados dois PG de elevado peso molecular que contêm cadeias CS. Foi observado um aumento significante da expressão de versicam e agrecam nos estágios II a IV (Figura 4A, B). No entanto, o nível de expressão do versicam é cerca de oito vezes superior ao do agrecam. Entre os pequenos proteoglicanos ricos em leucina, investigou-se a expressão de decorim e biglicam. Os resultados mostraram aumento significante do RNA

mensageiro de decorim apenas nos estágios I e II da doença (Figura 4C), sem alterações na expressão do biglicam (Figura 4D).

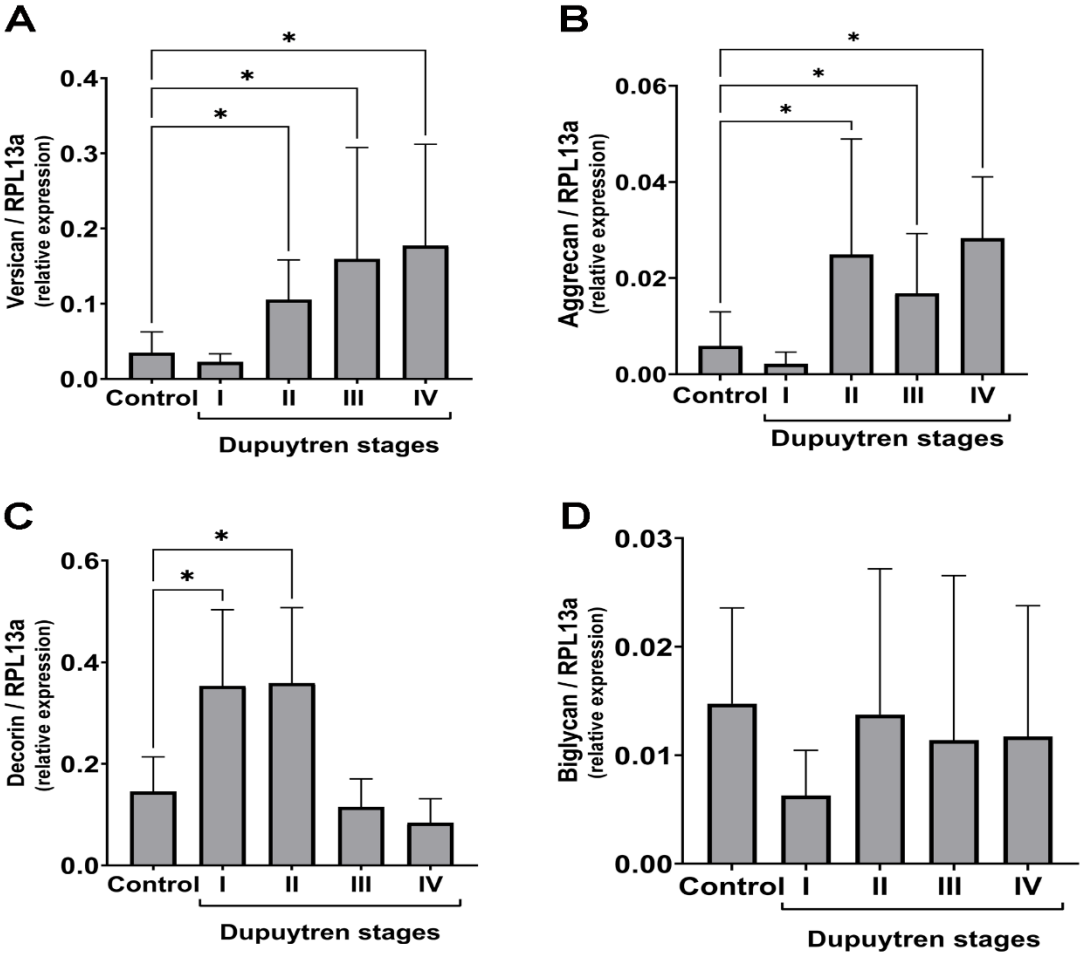


Figura 4 – Expressão de versicam (A), agrecam (B), decorim (C) e biglicam (D) na fáscia palmar de pacientes com diferentes estágios da doença de Dupuytren.

A expressão de versicam e decorim foi também investigada por microscopia confocal e os resultados estão de acordo com os dados obtidos por análises de PCR em tempo real (Figura 5). A expressão de versicam aumenta com a gravidade da doença (estágios I a IV) e as imagens sugerem alterações na distribuição e disposição desse PG.

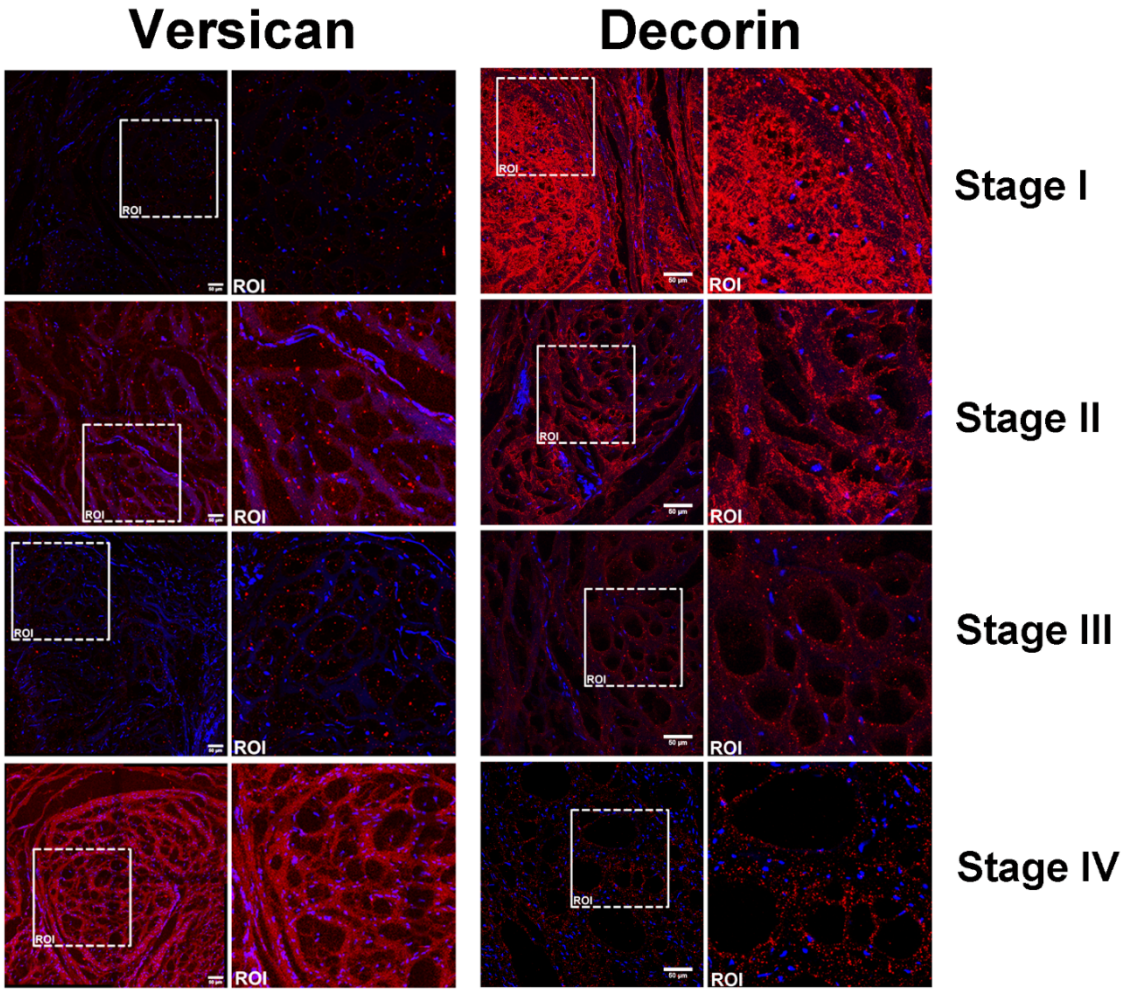


Figura 5 – Imagens de imunofluorescência indicam que a expressão de versicam aumenta e a de decorim diminui com o aumento da gravidade dos pacientes com doença de Dupuytren.

A expressão de decorim diminui dos estágios I a IV, corroborando os resultados obtidos pelas análises de PCR em tempo real. A expressão de ácido hialurônico (HA) por imuno-histoquímica (Figura 6) é paralela aos resultados obtidos pela medição direta de HA nas amostras (Figura 2).

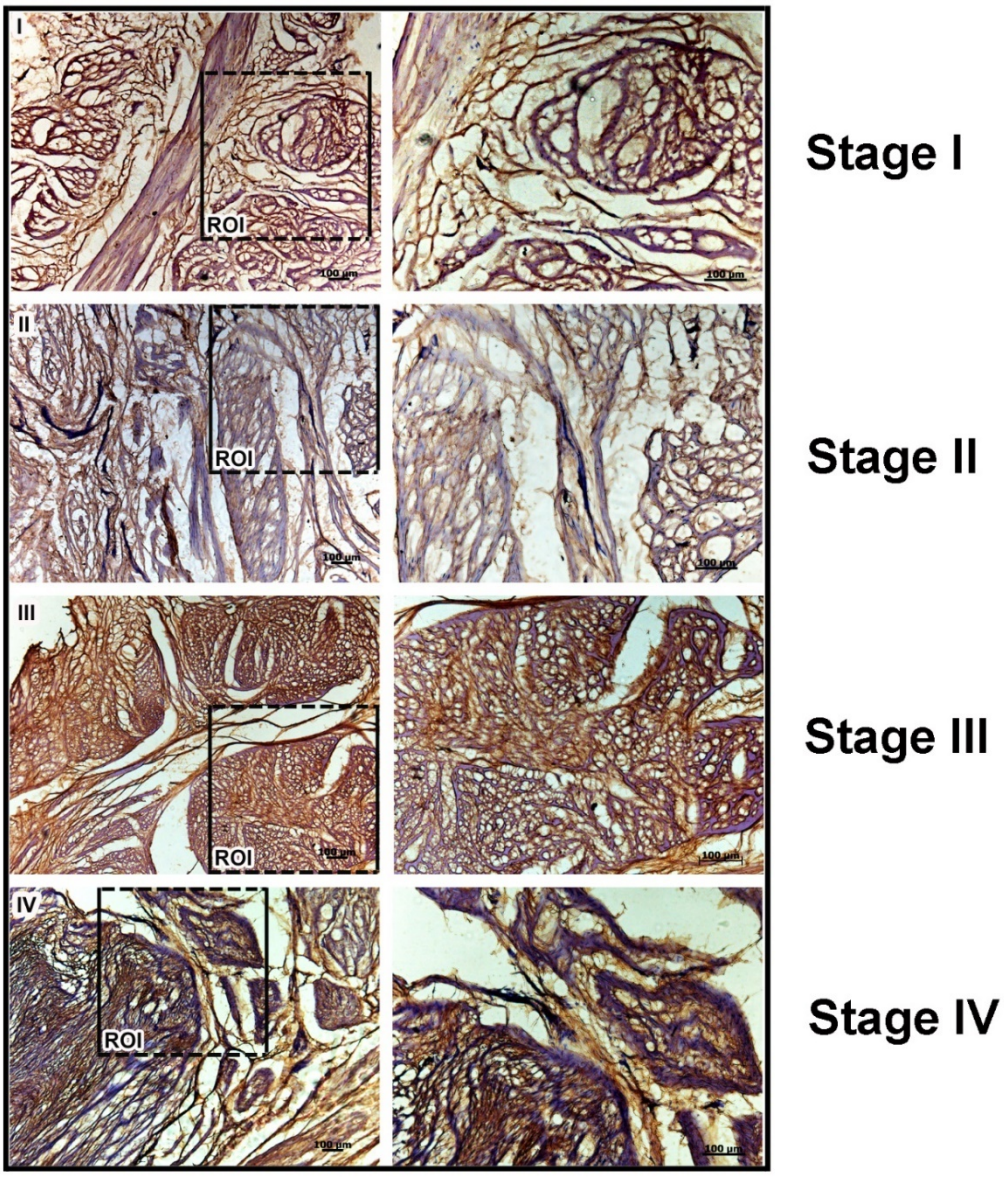


Figura 6 – Imuno-histoquímica suplementar para a detecção de ácido hialurônico em diferentes fases da doença de Dupuytren.

A arquitetura do colágeno (fibras e feixes) foi investigada pela geração da segunda harmônica utilizando-se a microscopia CARS. A Figura 7 evidencia de maneira clara a alteração na orientação das fibras de colágeno entre amostras controle e amostras de pacientes com DD (Figura 7A). A distribuição angular dentro da amostra de colágeno pode ser quantificada (Figura 7B). As diferentes fases da DD apresentam três picos principais (-

45, 45 e zero graus), ao passo que, no controle a orientação apresenta dois picos a -90 e 90 graus. Esses dados evidenciam que os tecidos doentes apresentam uma desorganização na disposição do colágeno.

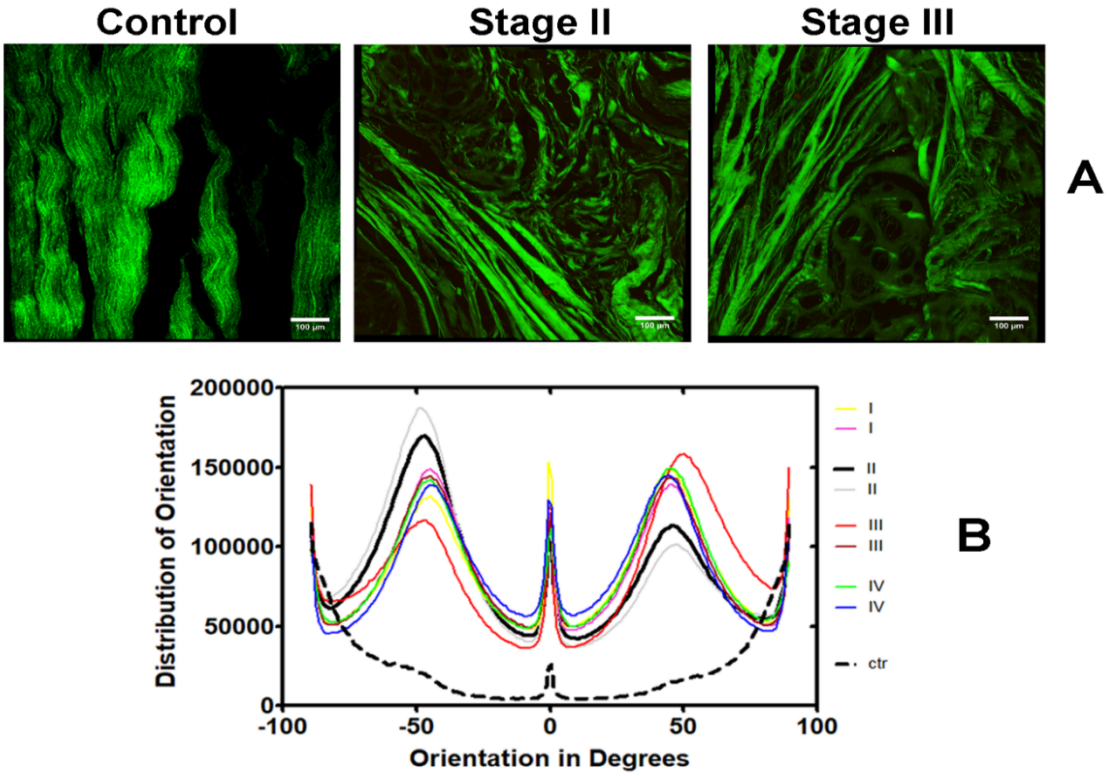


Figura 7 – Microscopia de dispersão coerente anti-stokes de Raman do colágeno na doença de Dupuytren. (A) As imagens representam a digitalização de secções palmares para os estágios II e III da doença de Dupuytren e o controle realizado nos planos XY e Z. A projeção mostra em verde o sinal de geração de segundo harmônico dos colágenos. Barras: 100 µm. (B) Orientação do colágeno nas fases I a IV da doença de Dupuytren e no controle. A análise da orientação da estrutura do colágeno foi efetuada utilizando-se a geração do segundo harmônico das imagens das fibras de colágeno (série Z de pilhas confocais) dos doentes do controle e da DD, construída pelo plug-in OrientationJ do software ImageJ. I-IV, diferentes fases da doença de Dupuytren; ctr, controle.

A distribuição e os valores médios de HA na urina dos controles e dos doentes com DD estão mostrados na Figura 8A. Os controles apresentaram um valor médio de 25,6 ng HA/µg creatinina, enquanto para as quatro fases diferentes da doença os valores variaram entre 5,6 e 10,6 (ng HA/µg creatina). Os resultados não mostram alterações significante quando se comparam os controles com cada fase da DD. Além disso, a distribuição do teor de HA nos doentes com DD mostra uma menor dispersão quando comparada com os controles.

Assim, as quantidades de HA na urina de doentes com DD, sem levar em consideração o grau da doença, foram representadas em comparação com os controles (Figura 8B). Os dados mostram uma diminuição significante do teor de HA nos doentes com DD em comparação com os controles ($p<0.035$).

O conteúdo de glicosaminoglicanos sulfatados (SGAG) na urina de controles e de doentes com diferentes fases da DD é apresentado na Figura 8C. Observa-se uma diminuição significante nos estágios II, ($p<0,01$) e IV ($p<0,002$) em comparação com o controle. Os controles apresentam valor médio de 16,7 µg SGAG/mg de creatinina, ao passo que, para os quatro estágios diferentes da doença, os valores variam entre 5,5 e 9,6 µg SGAG/mg de creatinina. As quantidades de SGAG na urina dos doentes com DD, independentemente do grau da doença, mostram uma diminuição significante em comparação com os controles (Figura 8D) ($p<0,001$).

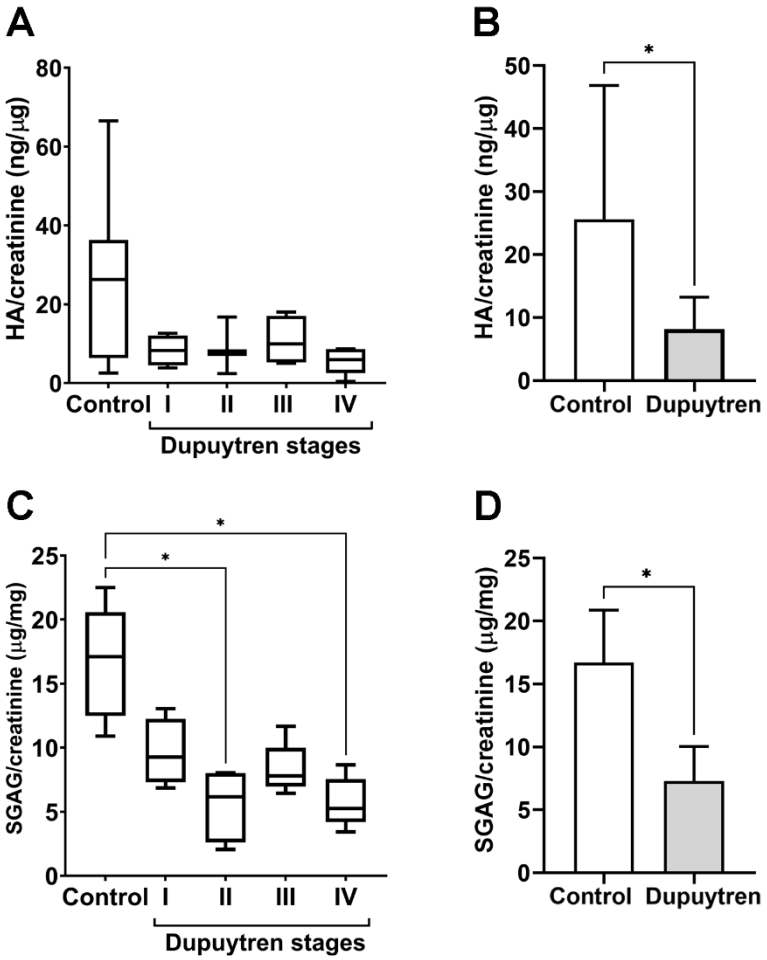


Figura 8 – Excreção urinária de ácido hialurônico (HA) e glicosaminoglicanos sulfatados (SGAG).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este trabalho é o primeiro da literatura a pesquisar os glicosaminoglicanos (GAGs) presentes na urina dos pacientes com a doença de Dupuytren (DD) e compara-los com a excreção de indivíduos normais. Ainda foram realizados estudos do conteúdo de GAGs obtidos de amostra de biópsia da fáscia palmar na busca por potenciais biomarcadores prognósticos. Pelas análises realizadas foi possível relacionar alterações significantes no conteúdo e disposição do condroitim sulfato, dermatam sulfato e colágeno na fáscia palmar dos doentes em comparação com o tecido normal, independentemente do grau da doença. Ainda foi observada diminuição na excreção dos GAGs sulfatados (SGAG) e do ácido hialurônico (HA) na urina dos pacientes portadores de DD.

Os resultados combinados demonstraram alterações na composição e arquitetura da matriz extracelular dos doentes com DD. O mecanismo de progressão do nódulo encontrado nas fases iniciais da DD para o cordão de colágeno ainda é mal compreendido, e a hipóteses mais aceita atualmente associa a doença a fatores inerentes à matriz extracelular que, quando alterados, podem mudar a composição e desencadear ações nas células para levar a um fenótipo proliferativo e contrátil (VI *et al.,* 2010; GORMAN, 2017; SAMULENAS *et al.*, 2022). Os GAGs fazem parte da matriz extracelular e atuam em diferentes processos celulares, como a diferenciação, migração, adesão, proliferação celular, entre outros (MERRY *et al.*, 2022).

Entre os estudos que já reportaram a associação dos GAGs com a DD, um dos mais recentes foi o desenvolvido por SINACI *et al*. (2022), que analisou a ação do HA no tratamento da DD, por meio do qual determinaram

que o efeito da aplicação *ex-vivo* de HA em fibroblastos em cultura obtido de tecido normal e em doentes com DD diminuía a taxa de atividade dos fibroblastos e a proporção de colágeno tipo 1 e 3 (SINACI *et al*., 2022). Todavia, quando comparados os resultados obtidos nesse estudo, os resultados encontrados sugerem a utilização da molécula do HA como um alvo potencial para atuar como um biomarcador, ampliando sua utilização na investigação da DD.

Os resultados obtidos por NASCIMENTO *et al.* (2016) se assemelham aos observados neste estudo na fáscia palmar, onde por meio de um estudo experimental com 23 pacientes foi observado o aumento de SGAG, principalmente o dermatam sulfato, e a diminuição do HA nas amostras de fáscia palmar de pacientes com a DD (NASCIMENTO *et al*., 2016).

Já a análise dos GAGs presentes na urina parece ser uma alternativa que precisa ser mais investigada, uma vez que os dados sinalizaram uma diminuição significante do teor de HA nos doentes com DD em comparação com os controles ($p<0.035$). Os dados também mostraram diminuição significante na excreção urinária dos glicosaminoglicanos sulfatados. Não existem outros dados na literatura referentes à excreção de HA nos doentes com DD.

Os resultados obtidos a partir das amostras de fáscia palmar analisadas apresentaram alterações significativas no conteúdo dos SGAG, principalmente devido ao aumento do dermatam sulfato e condroitim sulfato, enquanto não foram observadas diferenças no conteúdo do HA. Estudos da expressão de alguns proteoglicanos, mostraram que tanto o decorim como o versicam estavam significativamente alterados na matriz extracelular dos doentes com DD.

Os resultados demonstraram, pela primeira vez na literatura, que o aumento da expressão de versicam, um proteoglicano de condrotim sulfato de elevado peso molecular (WIGHT *et al.*, 2020), está relacionado com o avanço do estágio da doença, ao passo que o decorim, um pequeno proteoglicano de dermatam sulfato rico em leucina (SVENSSON *et al.,* 2001), diminui significativamente dos estágios I a IV, detectado tanto por análises de mRNA como por deteção de proteínas na microscopia confocal .

KOZMA *et al.* (2005) foram um dos primeiros a reportar a caracterização dos proteoglicanos da matriz derivados da fáscia normal e de Dupuytren, com a presença da decorim, biglicam e condroitim, sugerindo que a alteração mais proeminente é o acumulo de biglicam e condroitim, em contraste com o decorim, cujas suas alterações afetam principalmente a estrutura de dermatam sulfato (KOŹMA *et al*.. 2005).

Nas análises proximal, mediana e distal realizadas, não houve diferença estatística entre os grupos de grau de contratura. TRIPOLI *et al.* (2016) apresentaram que as seções proximal, distal, radial e ulnar da aponeurose palmar patológica apresentaram aumento da concentração de HA nos sentidos próximo-distal e ulnorradial (TRIPOLI *et al.*, 2016).

Na análise a partir da microscopia CARS (Coherent anti-stokes Raman scattering), foi possível observar que a arquitetura das fibrilas de colágeno se altera nos doentes com DD, e que a desorganização das fibrilas aumenta com os estágios da doença, dessa forma, relacionando-se a diminuição do decorim com a gravidade da DD, devido às alterações na disposição das fibrilas de colágeno. Entre os proteoglicanos de baixo peso molecular ricos em leucina, o decorim é um dos PG envolvidos na montagem das fibrilas de colágeno (ZAPPIA *et al.*, 2020). Além disso, foi relatado por

CHEN *et al.* (2020) que o versicam se liga diretamente ao colágeno e é capaz de regular sua estrutura e mecânica (CHEN *et al.,* 2020).

Curiosamente, o estudo realizado por ALFONSO-RODRÍGUEZ *et al*. (2014) com a fáscia palmar da lesão de DD e da fáscia clinicamente não acometida por Dupuytren, demonstrou que a expressão imuno-histoquímica de decorim estava elevada na DD, enquanto o versican estava altamente expresso na fáscia normal, sem diferenças para o agrecan, além do aumento do conteúdo de colágeno. Um aspeto interessante do trabalho foi a constatação de que o tecido clinicamente não afetado apresentava alterações em alguns componentes da matriz extracelular, indicando que pode estar afetado, o que é muito relevante e justifica a escolha de nossas amostras de controle (ALFONSO-RODRÍGUEZ *et al.,* 2014).

Além disso, a análise da excreção de ácido hialurônico e de glicosaminoglicanos sulfatados mostrou diminuição significante na excreção desses compostos para os doentes com DD, o que por si só sugere um efeito sistêmico da doença. Os dados combinados demostram que a arquitetura das fibrilas de colágeno na DD é mais relevante para os sintomas que levam à contratura, tal como observado para a cápsula em doentes com ombros congelados (KIM *et al.,* 2023).

Este estudo foi capaz de apresentar uma via de possível correlação entre diferentes biomarcadores que podem estar atuando concomitantemente ou de forma individual durante o processo de lesão induzido pela DD. Os dados sugerem que estes glicosaminoglicanos e proteoglicanos desempenham papéis importantes no estabelecimento de fibras de colágeno intersticiais e na montagem de fibrilas em fibras na fáscia palmar de doentes com DD e, por conseguinte, na arquitetura da matriz extracelular.

Algumas limitações ocorreram durante o desenvolvimento deste estudo, especialmente devido ao ineditismo proposto. Um dos grandes fatores a se analisar é a dificuldade de extrapolação dos dados para comparar com referenciais para o estabelecimento de critérios diagnósticos precisos, podendo comprometer a validade e a aplicabilidade clínica dos biomarcadores de GAGs. Tal fato se deve à complexidade dos processos fisiopatológicos envolvidos na doença, incluindo a interação entre células fibroblásticas, matriz extracelular e citocinas, o que torna difícil estabelecer uma relação direta entre os GAGs e a predisposição genética. Além disso, outros fatores ambientais e epigenéticos podem contribuir para a progressão da doença, o que pode limitar a capacidade dos GAGs de prever o risco individual de desenvolvimento ou agravamento da doença. A obtenção de amostras também foi considerada um fator limitante, devido a procedimentos invasivos, como a biópsia, que pode causar desconforto e riscos para o paciente.

Além disso, outro aspecto a ser analisado é a acessibilidade dessas análises para serem incorporadas à rotina clínica de análise de pacientes com suspeita da DD. Vale ressaltar que a metodologia empregada, principalmente a busca de marcadores na urina dos pacientes com DD, permitiu o entendimento individual da presença da doença e é, portanto, uma boa escolha para se analisar pacientes com DD. Contudo, a interpretação dos níveis de GAGs como biomarcadores de predisposição à DD requer estudos posteriores, buscando a padronização da metodologia analítica para a quantificação de GAGs.

Essa estratégia, quando bem estabelecida, será capaz de determinar um perfil independente dos marcadores tradicionais utilizados até então, abrindo novas perspectivas e mais oportunidades de estudo a busca por

marcadores periféricos que permitam um possível diagnóstico e tratamento precoce da doença.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Condroitim sulfato e dermatam sulfato na fáscia palmar dos pacientes apresenta aumento significante, independentemente do grau da doença.

O colágeno apresenta alterações significantes, independente do grau da doença.

O aumento na expressão do versicam e do agrecam foi significante nos estágios II, III e IV.

A expressão do decorin apresentou aumento significante nos estágios I e II.

A diminuição da excreção urinária de glicosaminoglicanos sulfatados e ácido hialurônico sugere um efeito sistêmico da doença.

Os dados obtidos indicam que os glicosaminoglicanos, os proteoglicanos e a disposição do colágeno são possíveis biomarcadores do estágio da doença de Dupuytren.

8 REFERÊNCIAS

Alfonso-Rodríguez CA, Garzón I, Garrido-Gómez J, Oliveira ACX, Martín-Piedra MÁ, Scionti G, Carriel V, Herná Ndez-Cortés P, Campos A, Alaminos M. Identification of histological patterns in clinically affected and unaffected palm regions in dupuytren's disease. PLoS One. 2014 9(11):e112457.

Amendum PC, Khan S, Yamaguchi S, Kobayashi H, Ago Y, Suzuki Y, Celik B, Rintz E, Hossain J, Xiao W, et al. Glycosaminoglycans as biomarkers for mucopolysaccharidoses and other disorders. Diagnostics. 2021 11(9).

Balbinot-Alfaro E, da Rocha M, Alfaro A da T, Martins VG. Properties, bioactive potential and extraction processes of glycosaminoglycans: An overview. Cienc Rural. 2021 51(7):1–9..

Becker K, Siegert S, Toliat MR, Du J, Casper R, Dolmans GH, Werker PM, Tinschert S, Franke A, Gieger C, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies and network analysis-based integration with gene expression data identify new suggestive loci and unravel a Wnt-centric network associated with Dupuytren's disease. PLoS One. 2016 11(7):1–18..

Bianchi E, Taurone S, Bardella L, Signore A, Pompili E, Sessa V, Chiappetta C, Fumagalli L, Gioia C Di, Pastore FS, et al. Involvement of pro-inflammatory cytokines and growth factors in the pathogenesis of Dupuytren ' s contracture : a novel target for a possible future therapeutic strategy ? Clin Sci. 2015 129:711–720.

Biomarkers definitions Working Group B definitions W. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther. 2001 69(3):89–95.

Boe C, Blazar P, Iannuzzi N. Dupuytren Contractures: An Update of Recent Literature. J Hand Surg Am. 2021 46(10):896–906.

Bratulic S, Limeta A, Maccari F, Galeotti F, Volpi N, Levin M, Nielsen J, Gatto F. Analysis of normal levels of free glycosaminoglycans in urine and plasma in adults. J Biol Chem. 2022 298(2):101575.

Brenner P, Krause-Bergmann A, Van VH. Die Dupuytren-Kontraktur in Norddeutschland - epidemiologische Erfassungsstudie anhand von 500 Fällen. Unfallchirurg. 2001

(104):303–311.

Brickley-Parsons D, Glimcher MJ, Smith RJ, Albin R, Adams JP. Biochemical changes in the collagen of the palmar fascia in patients with Dupuytren's disease. J Bone Jt Surg - Ser A. 1981 63(5).

Burge P. Genetics of Dupuytren's disease. Hand Clin. 1999 15(1).

Burton-Wurster N, Liu W, Matthews GL, Lust G, Roughley PJ, Glant TT, Cs-Szabó G. TGF beta 1 and biglycan, decorin, and fibromodulin metabolism in canine cartilage. Osteoarthr Cartil. 2003 11(3):167–176.

Cavalheiro RP, Lima MA, Jarrouge-Bouças TR, Viana GM, Lopes CC, Coulson-Thomas VJ, Dreyfuss JL, Yates EA, Tersariol ILS, Nader HB. Coupling of vinculin to F-actin demands Syndecan-4 proteoglycan. Matrix Biol. 2017 63:23–37.

Chen D, Smith LR, Khandekar G, Patel P, Yu CK, Zhang K, Chen CS, Han L, Wells RG. Distinct effects of different matrix proteoglycans on collagen fibrillogenesis and cell-mediated collagen reorganization. Sci Rep. 2020 10(1):1–13.

Cheung K, Walley KC, Rozental TD. Management of complications of dupuytren contracture. Hand Clin. 2015 31(2):345–354.

Coert JH, Nérin JPB, Meek MF. Results of partial fasciectomy for Dupuytren disease in 261 consecutive patients. Ann Plast Surg. 2006 57(1):13–17.

Couch JH. Identical Dupuytrens Contracture in Identical Twins. J Nerv Ment Dis. 1938 89(1):89.

Davidson E, Hoffman P, Linker A, Meyer K. The acid mucopolysaccharides of connective tissue. Biochim Biophys Acta. 1956 21(3).

Desai SS, Hentz VR, Orthopedic N, Beach N, Hand RAC, Limb U. The Treatment of Dupuytren Disease. J Hand Surg Am. 2011 36(5):936–942.

Dias Dos Santos PR, De Medeiros VP, Freire Martins de Moura JP, Eduardo da Silveira Franciozi C, Nader HB, Faloppa F. Effects of shock wave therapy on glycosaminoglycan expression during bone healing. Int J Surg. 2015 24:120–123.

Dias JJ, Aziz S. Fasciectomy for Dupuytren Contracture. Hand Clin. 2018 34(3):351–

366.

Dietrich CP. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. Brazilian J Med Biol Res. 1984 17(1).

Dupuytren B. Clinical Lectures On Surgery. Lancet. 1833:1–23.

Elgundi Z, Papanicolaou M, Major G, Cox TR, Melrose J, Whitelock JM, Farrugia BL. Cancer Metastasis: The Role of the Extracellular Matrix and the Heparan Sulfate Proteoglycan Perlecan. Front Oncol. 2020 9(January).

Elliot D. The early history of Dupuytren's disease. Hand Clin. 1999a 15(1).

Elliot D. Pre-1900 literature on Dupuytren's disease. Hand Clin. 1999b 15(1).

Faria-Ramos I, Poças J, Marques C, Santos-Antunes J, Macedo G, Reis CA, Magalhães A. Heparan sulfate glycosaminoglycans: (un)expected allies in cancer clinical management. Biomolecules. 2021 11(2):1–28.

Flint MH, Gillard GC, Reilly HC. The glycosaminoglycans of dupuytren's disease. Connect Tissue Res. 1982. 9(3):173–179.

Franciozi CES, Tarini VAF, Reginato RD, Gonçalves PRS, Medeiros VP, Ferretti M, Dreyfuss JL, Nader HB, Faloppa F. Gradual strenuous running regimen predisposes to osteoarthritis due to cartilage cell death and altered levels of glycosaminoglycans. Osteoarthr Cartil. 2013 21(7):965–972.

Gabbiani G, Majno G. Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. Am J Pathol. 1972 66(1):131–146.

Gorman DBO. The Extracellular Matrix in Dupuytren Disease. In: Dupuytren Disease and Related Diseases - The Cutting Edge. 2017 p. 43–54.

Green DP, Wolfe SW. Part V: Nerve: Compression Neuropathies in: Operative Hand Surgery. Publisher: Elsevier/Churchill Livingstone. 2011.6th edition: p.989

Gubbiotti MA, Vallet SD, Ricard-Blum S, Iozzo R V. Decorin interacting network: A comprehensive analysis of decorin-binding partners and their versatile functions. Matrix biol. 2016 55:7–21.

Hart MG, Hooper G. Clinical associations of Dupuytren's disease. Postgrad Med J. 2005 81(957):425–428.

Hascall VC, Sajdera SW. Proteinpolysaccharide Complex from Bovine Nasal Cartilage. J Biol Chem. 1969 244(9):2384–2396.

Henrotin Y, Mathy M, Sanchez C, Lambert C. Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: From in vitro studies to clinical recommendations. Ther Adv Musculoskelet Dis. 2010 2(6):335–348.

Hindocha S, John S, Stanley JK, Watson SJ, Bayat A. The heritability of Dupuytren's disease: Familial aggregation and its clinical significance. J Hand Surg Am. 2006 31(2):204–210.

Hindocha S, Mcgrouther DA, Bayat A. Epidemiological Evaluation of Dupuytren ' s Disease Incidence and Prevalence Rates in Relation to Etiology. Hand. 2009 4:256–269.

Hueston JT. Limited Fasciectomy For Dupuytren´s contracture. Plast Reconstrutive Surg. 1961 27(6):569–584.

Hueston JT.. Current State of Treatment of Dupuytren's Disease. Ann Chir Main. 1984 3(1):81–92.

Iozzo R V, Schaefer L.. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. Matrix Biol. 2015 42:11–55

Kakkis E, Marsden D. Urinary glycosaminoglycans as a potential biomarker for evaluating treatment efficacy in subjects with mucopolysaccharidoses. Mol Genet Metab. 2020 130(1):7–15.

Khan SA, Mason RW, Kobayashi H, Yamaguchi S, Tomatsu S. Advances in glycosaminoglycan detection. Mol Genet Metab. 2020 130(2):101–109.

Kim SK, Khan C, Ladd AL, Tashjian RZ. A shared genetic architecture between adhesive capsulitis and Dupuytren disease. J Shoulder Elb Surg. 2023 32(1).

Kjellen L, Lindahl U. Proteoglycans: Structures And Interactions 1991 60:443-75

Kogut MM, Marcisz M, Samsonov SA. Modeling glycosaminoglycan–protein complexes. Curr Opin Struct Biol. 2022 73.

Koźma EM, Olczyk K, Wisowski G, Głowacki A, Bobiński R. Alterations in the extracellular matrix proteoglycan profile in Dupuytren's contracture affect the palmar fascia. J Biochem. 2005 137(4):463–476.

Lam WL, Rawlins JM, Karoo ROS, Naylor I, Sharpe DT. Re-Visiting Luck ' S Classification : A Histological Analysis Of Dupuytren ' S Disease. J ofHand Surg. European V 2010 (35 E):312–317.

Layton TB, Nanchahal J. Recent advances in understanding of Dupuytren`s diease. F1000Research. 2019 231(8):1–8.

Layton TB, Williams L, Nanchahal J. Dupuytren's disease: a localised and accessible human fibrotic disorder. Trends Mol Med. 2023 29(3):218–227.

Lenzi LGS, Santos JBG, Mendes A, Nader HB, Cavalheiro RP, Kobatashi EY, Faloppa F. Glycosaminoglycans as disease biomarkers : a systematic review. Rev Eletrônica Acervo Saúde. 2023 23(9):1–14.

Lin W, Liu Z, Kampf N, Klein J. The Role of Hyaluronic Acid in Cartilage Boundary Lubrication. Cells. 2020 9(7):1–14.

Lindahl U, Couchman J, Kiamata K, Esko JD. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: Essentials of Glycobiology. 2015 p. 1–9.

Lindahl U, Höök M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. Ann Rev Biochem. 1978 47:385–417.

Ling RS. The Genetic Factor In Dupuytren's Disease. J Bone Joint Surg Br. 1963 45.

Liu H, Yin W, Liu B, Liu Y, Guo B, Wei Z. Screening of candidate genes in fibroblasts derived from patients with Dupuytren's contracture using bioinformatics analysis. Rheumatol Int. 2015.35(8):1343–1350.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods. 2001 25(4):402–408.

Luck J V. Dupuytren's contracture; a new concept of the pathogenesis correlated with surgical management. J Bone Joint Surg Am. 1959 41 A(4).

Mahendra S, Cherian A, Raine C, Dixon JE, Irvine BE, MWH E. Dupuytren's Disease:

An overview of Aetiology, Pathology and Treatment. Br J Hand Ther. 2001 6(3):73–78.

Mansur HG, Oliveira ER de, Gonçalves CB. Epidemiological analysis of patients with Dupuytren's disease. Rev Bras Ortop (English Ed. 2018 53(1):10–14.

Martins JRM, Furlanetto RP, Oliveira LM, Mendes A, Passerotti CC, Chiamolera MI, Rocha AJ, Manso PG, Nader HB, Dietrich CP, et al. Comparison of practical methods for urinary glycosaminoglycans and serum hyaluronan with clinical activity scores in patients with Grave's ophthalmopathy. Clin Endocrinol (Oxf). 2004 60(6):726–733.

Martins JRM, Passerotti CC, Maciel RMB, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. Anal Biochem. 2003 319(1):65–72.

Merry CLR, Lindahl U, Couchman J, Esko JD. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: Essentials of Glycobiology. 2022 p. 1–23.

Meyer K, Chaffee E. The Mucopolysaccharides of Skin. J Biol Chem. 1941 138(2).

Meyer K, Dubos R, Smyth EM. The Hydrolysis of The Polysaccharide Acids of Vitreous Humor, of Umbilical Cord, And of Streptococcus by The Autolytic Enzyme ff Pneumococcus. J Biol Chem. 1937 118(1).

Meyer K, Linker A, Davidson EA, Weissmann B. The mucopolysaccharides of bovine cornea. J Biol Chem. 1953 205(2).

Meyer K, Palmer JW. The Polysaccharide of The Vitreous Humor. J Biol Chem. 1934 107(3).

Mierzwa AGH, Campos JF, Jesus MF, Nader HB, Lazaretti-Castro M, Reginato RD. Different doses of strontium ranelate and mechanical vibration modulate distinct responses in the articular cartilage of ovariectomized rats. Osteoarthr Cartil. 2017 25(7):1179–1188.

Mizumoto S, Yamada S. The Specific Role of Dermatan Sulfate as an Instructive Glycosaminoglycan in Tissue Development. Int J Mol Sci. 2022 23(13).

Murrell GAC, Francis MJO, Bromley L. The Collagen Changes Of Dupuytren 'S Contracture. J Hand Surg Am. 1991 16B:263–266.

Nader H, Lopes C, Rocha H, Santos E, Dietrich C. Heparins and Heparinoids: Occurrence, Structure and Mechanism of Antithrombotic and Hemorrhagic Activities. Curr Pharm Des. 2005 10(9).

Nader HB, Buonassisi V, Colburn P, Dietrich CP. Heparin stimulates the synthesis and modifies the sulfation pattern of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. J Cell Physiol. 1989 140(2):305–310.

Nader HB, Ferreira TMPC, Paiva JF. Isolation and structural studies of heparan sulfates and chondroitin sulfates from three species of molluscs. J Biol Chem. 1984 259(3):1431–1435.

Nader HB, Chavante SF, dos-Santos EA, Oliveira TW, de Paiva JF, Jerônimo SM, Medeiros GF, de Abreu LR, Leite EL, de Sousa Filho JF, Castro RAB, Toma L, Tersariol ILS, Porcionatto MA, Dietrich CP. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? Braz J Med Biol Res. 1999 32(5):529–38.

Nascimento PCH, Kobayashi EY, De Lenzi LGS, Dos Santos JBG, Nader HB, Faloppa F. Glycosaminoglycans and proteoglycans in palmar fascia of patients with dupuytren. Acta Ortop Bras. 2016 24(2):98–101.

Nunn AC, Schreuder FB. Dupuytren's contracture: emerging insight into a Viking disease. Hand Surg. 2014 19(3):481–490.

Onyeisi JOS, Ferreira BZF, Nader HB, Lopes CC. Heparan sulfate proteoglycans as targets for cancer therapy: a review. Cancer Biol Ther. 2020 21(12):1087–1094.

Perez S, Makshakova O, Angulo J, Bedini E, Bisio A, de Paz JL, Fadda E, Guerrini M, Hricovini Michal, Hricovini Milos, et al. Glycosaminoglycans: What Remains To Be Deciphered? JACS Au. 2023 3(3):628–656.

Rayan GM. Palmar fascial complex anatomy and pathology in Dupuytren's disease. Hand Clin. 1999. 15(1).

Riesmeijer SA, Werker PMN, Nolte IM. Ethnic differences in prevalence of Dupuytren disease can partly be explained by known genetic risk variants. Eur J Hum Genet. 2019 27(12):1876–1884.

Rodén L. Structure and Metabolism of Connective Tissue Proteoglycans. In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. 1980p. 22–23.

Sahu B, Sharma DD, Jayakumar GC, Madhan B, Zameer F. A review on an imperative by-product: Glycosaminoglycans- A holistic approach. Carbohydr Polym Technol Appl. 2023 5(December 2022):100275.

Salari N, Heydari M, Hassanabadi M, Kazeminia M, Farshchian N, Niaparast M, Solaymaninasab Y, Mohammadi M, Shohaimi S, Daneshkhah A. The worldwide prevalence of the Dupuytren disease: a comprehensive systematic review and meta-analysis. J Orthop Surg Res. 2020 15(1):1–13.

Sampaio LO, Nader HB. Emergence and Structural Characteristics of Chondroitin Sulfates in the Animal Kingdom. Adv Pharmacol. 2006 53(05):233–251.

Samulenas G, Insodaite R, Kunceviciene E, Poceviciute R, Masionyte L, Zitkeviciute U, Pilipaityte L, Smalinskiene A. The Role of Functional Polymorphisms in the Extracellular Matrix Modulation-Related Genes on Dupuytren's Contracture. Genes (Basel). 2022 13(5):743.

Scott JE, Parry DAD. Control of collagen fibril diameters in tissues. Int J Biol Macromol. 1992 14(5):292–293.

Seror J, Merkher Y, Kampf N, Collinson L, Day AJ, Maroudas A, Klein J. Articular cartilage proteoglycans as boundary lubricants: Structure and frictional interaction of surface-attached hyaluronan and hyaluronan-aggrecan complexes. Biomacromolecules. 2011. 12(10):3432–3443.

Shatton J, Schubert M. Isolation of a mucoprotein from cartilage. J Biol Chem. 1954 211(2).

Shi D, Sheng A, Chi L. Glycosaminoglycan-Protein Interactions and Their Roles in Human Disease. Front Mol Biosci. 2021 8(March):1–15.

Shih B, Bayat A. Scientific understanding and clinical management of Dupuytren disease. Nat Publ Gr. 2010 6(12):715–726.

Shih B, Wijeratne D, Armstrong DJ, Lindau T, Day P, Bayat A. Identification of

Biomarkers in Dupuytren's Disease by Comparative Analysis of Fibroblasts Versus Tissue Biopsies in Disease-Specific Phenotypes. J Hand Surg Am. 2009 34(1):124–136.

Sinaci CB, Çiçek Ç, Filinte G, Güven Ü. The Effect of Ex-Vivo Hyaluronic Acid on Myofibroblast and Collagen in Dupuytren Disease. J Hand Surg Asian-Pacific 2022 Vol. 27(6).

Soler R, Bruschini H, Martins JR, Dreyfuss JL, Camara NO, Alves MT, Leite KR, Truzzi JC, Nader HB, Srougi M, et al. Urinary Glycosaminoglycans as Biomarker for Urothelial Injury: Is It Possible to Discriminate Damage From Recovery? Urology. 2008.72(4):937–942.

Svensson L, Oldberg Å, Heinegård D. Collagen binding proteins. Osteoarthr Cartil. 2001. 9(SUPPL. A).

Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T. Bone matrix decorin binds transforming growth factor-β and enhances its bioactivity. J Biol Chem. 1994 269(51):32634–32638.

Tomasek JJ, Schultz RJ, Episalla CW, Newman SA. The cytoskeleton and extracellular matrix of the Dupuytren's disease "myofibroblast": An immunofluorescence study of a nonmuscle cell type. J Hand Surg Am. 1986 11(3):365–371.

Tripoli M, Cordova A, Moschella F.. Update on the role of molecular factors and fibroblasts in the pathogenesis of Dupuytren's disease. J Cell Commun Signal. 2016 10(4):315–330.

Tsanaktsidou E, Kammona O, Kiparissides C. Recent Developments in Hyaluronic Acid-Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering Applications. Polymers (Basel). 2022.14(4):1–34.

Tubiana R. Evaluation des déformations dans la maladie de Dupuytren. Ann Chir la Main. 1986. 5(1):5–11.

Tubiana R, Dubert T. Classification des déformations des doigts longs liées à un déséquilibre musculo-tendineux. Chir Main. 2000. 19:7–14.

Vallet SD, Clerc O, Ricard-Blum S. Glycosaminoglycan–Protein Interactions: The First Draft of the Glycosaminoglycan Interactome. J Histochem Cytochem. 2021. 69(2):93–

104.

Vi L, Gan BS, O'Gorman DB. The potential roles of cell migration and extra-cellular matrix interactions in Dupuytren's disease progression and recurrence. Med Hypotheses. 2010 74(3):510–512.

Wight TN, Kang I, Evanko SP, Harten IA, Chang MY, Pearce OMT, Allen CE, Frevert CW. Versican—A Critical Extracellular Matrix Regulator of Immunity and Inflammation. Front Immunol. 2020. 11(March):1–12.

Wilburn J, McKenna SP, Perry-Hinsley D, Bayat A. The impact of dupuytren disease on patient activity and quality of life. J Hand Surg Am. 2013. 38(6):1209–1214.

Yanagishita M. A brief history of proteoglyeans Discovery of glycosaminoglycans From glycosaminoglycans to proteoglycans Biosynthesis of glycosaminoglycans Biosynthesis of glycosaminoglycans 1993. (except for. Experientia. 49(5):366–368.

Zappia J, Joiret M, Sanchez C, Lambert C, Geris L, Muller M, Henrotin Y. From translation to protein degradation as mechanisms for regulating biological functions: A review on the SLRP family in skeletal tissues. Biomolecules. 2020.10(1).

Zhang T, Zhang R, Lv Y, Wang M, Li H, Tan T, Li JP. Glycosaminoglycans in biological samples – Towards identification of novel biomarkers. TrAC - Trends Anal Chem. 2020. 122:115732.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Ferreira ML Projetos, dissertações e teses: orientação normativa: guia prático/ edição, organização e coordenação. São Paulo: Ed. Red Publicações, 2017.

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouer)

APÊNDICES

Apêndice 1

Aprovação do CEP da UNIFESP

UNIFESP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO HOSPITAL SÃO PAULO UNIFESP-HSP

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo sobre a correlação entre os níveis de ácido hialurônico, glicosaminoglicanos e colágenos (I, II,III,IX) e a gravidade da contratura de Dupuytren

Pesquisador: Luiz Guilherme Lenzi
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 48734315.2.0000.5505
Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO PAULO
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.309.625

Apresentação do Projeto:
Trata-se de resposta de pendencia apontada no parecer CEP. 1.232.249 de 17/9/2015

Projeto CEP/UNIFESP n: 1097/2015
A contratura de Dupuytren é um acometimento limitante da mão, muitas vezesseu tratamento é cirúrgico e ocorre em estágios mais avançados da doença. A avaliação concreta de seus danos, até hoje, só é possível após intervenção cirúrgica, o que dificulta uma abordagem precoce e preventiva. Não se tem disponibilidade na literatura de parâmetros diagnósticos biológicos de fácil captação, não invasivo, ou que pudessem facilitar esse processo, como por exemplo a relação dos glicosaminoglicanos presentes na urina. Por este motivo o objetivo do estudo será investigar o comportamento dos glicosaminoglicanos na urina e na fáscia palmar dos pacientes acometidos por Dupuytren buscando uma correlação entre essas moléculas e a clínica. Como métodos serão estudados o comportamento dos tipos de colágenos para estabelecer o grau de acomentimento fibrótico e os níveis de GAGS presentes na urina, ambos por quantificação por imunofluorescência após extração, identificação e dosagem dos mesmos. Os resultados desta pesquisa poderão trazer uma possibilidade de investigação e

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

intervenção precoce nos pacientes com DD, colocando
os GAGs como biomarcadores de primeira análise desta patologia.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar o comportamento dos glicosaminoglicanos na urina e na fáscia palmar dos pacientes acometidos por Dupuytren buscando uma correlação entre essas moléculas e a clínica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de resposta de pendencia apontada no parecer CEP. 1.232.249 de 17/9/2015

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de resposta de pendencia apontada no parecer CEP. 1.232.249 de 17/9/2015

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Trata-se de resposta de pendencia apontada no parecer CEP. 1.232.249 de 17/9/2015

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

pendencias apontadas no parecer inicial:

1-Toda pesquisa a ser realizada no Hospital Universitário - Hospital São Paulo (HU/HSP), ou em qualquer um de seus ambulatórios, deverá vir acompanhada de carta de autorização da Coordenadoria de Ensino e Pesquisa do HU/HSP (que pode ser conseguida na DiretoriaClínica do HSP, no 1º andar do Hospital São Paulo).

2- Em relação ao TCLE:

a)- deixar claro que a cirurgia seria feita de qualquer forma, como parte do tratamento.

b)- informar que os riscos são os esperados para uma cirurgia, e que a retirada do tecido para a pesquisa incorre em riscos mínimos.

c)- é necessário informar que o termo está sendo disponibilizado em 2 vias originais (não usar a palavra 'cópias'), uma para ficar com o participante e outra para ficar com o pesquisador.;

d)-no campo de assinaturas, além da assinatura, inserir local para o nome do participante e do pesquisador.

resposta: carta da CoEP apresentada e TCLE reformulado conforme solicitação - PENDENCIAS ATENDIDAS.

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO HOSPITAL SÃO PAULO UNIFESP-HSP

Continuação do Parecer: 1.309.625

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

Lembramos que é de responsabilidade do pesquisador assegurar que o local onde a pesquisa será realizada ofereça condições plenas de funcionamento garantindo assim a segurança e o bem estar dos participantes da pesquisa e de quaisquer outros envolvidos .

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_567130.pdf	19/10/2015 13:34:13		Aceito
Outros	Carta.docx	19/10/2015 13:29:01	Luiz Guilherme Lenzi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	19/10/2015 13:27:18	Luiz Guilherme Lenzi	Aceito
Outros	Assinatura_Diretor_Clinico.jpg	28/09/2015 11:44:18	Luiz Guilherme Lenzi	Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto - Dupuytren Lenzi.pdf preenchida e assinada.pdf	10/08/2015 16:21:28		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Pesquisa para comite de etica LENZI arrumado.docx	09/08/2015 21:16:17		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 05 de Novembro de 2015

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

Apêndice 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar do estudo chamado: "Correlação entre os estágios da Doença de Dupuytren com alterações da matriz extracelular e os níveis de glicosaminoglicanos sulfatados e ácido hialurônico". O objetivo desta pesquisa é avaliar o comportamento dos glicosaminoglicanos (dermatam sulfato, condroitim sulfato, heparam sulfato e ácido hialurônico), proteoglicanos e colágenos de pacientes portadores da Doença de Dupuytren visando correlacionar estas moléculas com a clínica.

Essa pesquisa será realizada por avaliação clínica da(s) mão(s) acometida(s) seguida da análise laboratorial da urina e da aponeurose palmar ressecada durante o procedimento cirúrgico. Ao aceitar participar deste estudo, você será acompanhado e devidamente tratado. Sendo submetido ao tratamento preconizado pela literatura e devidamente acompanhado nesta instituição. Não há nenhum benefício ou prejuizo a você, ao aceitar participar deste estudo, e seu tratamento será realizado da mesma forma, sem prejuízo, no método ou no tempo do tratamento. Mesmo que não aceite participar do estudo, a cirurgia será realizada.

O procedimento cirúrgico padronizado para o tratamento da doença consiste na retirada do tecido localizado acometido, apresentando um risco mínimo para o local da cirurgia, inerente ao procedimento cirúrgico, não aumentando ou diminuido pelo fato de estar participando da pesquisa

A qualquer momento, você poderá desistir de sua participação deste estudo e seguir o tratamento para a sua doença, sem acarretar problema ou alteração ao tratamento habitual. Os seus dados pessoais não serão divulgados ou publicados (você se manterá anônimo durante todo o estudo).

Em qualquer momento, você poderá questionar ou perguntar sobre o andamento do presente estudo. Você não terá despesa alguma, em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Não existe a possibilidade de dano pessoal ao participar deste estudo. Caso ocorra algum constrangimento, vergonha ou situação desconfortável durante o estudo, você poderá desistir da sua participação na

pesquisa e continuar o tratamento adequado. Os dados coletados serão utilizados somente para a publicação do estudo e em momento nenhum, sua identidade será revelada.

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de qualquer dúvida. O Prof. Dr. Flávio Faloppa (pesquisador responsável) poderá ser encontrado no endereço: Rua Borges Lagoa, número 786, Casa da Mão, Vila Clementino, São Paulo – SP ou pelo telefone: 55717106. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – e-mail: cepunifesp@unifesp.br

Este termo está sendo disponibilizado em duas (02) vias assinandas, tanto pelo pesquisador quanto pelo paciente, sendo que uma ficará com o paciente e a outra com o pesquisador responsável

Discuti e esclareci todas as minhas dúvidas sobre o trabalho (estudo) e minha decisão em participar. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou ao meu tratamento.

Nome do paciente:_____

Assinatura do paciente_____Data ____/_____/_____

Nome da testemunha:_____

Assinatura da testemunha_____Data ____/_____/_____

Nome do pesquisador: LUIZ GUILHERME DE SABOYA LENZI

Assinatura do pesquisador_____Data ____/_____/_____

Apêndice 3

Artigo de revisão publicado

Revista Eletrônica
Acervo Saúde
Electronic Journal Collection Health ISSN 2178-2091

Glycosaminoglycans as disease biomarkers: a systematic review

Glicosaminoglicanos como biomarcadores de doenças: uma revisão sistemática

Glicosaminoglicanos como biomarcadores de enfermedades: una revisión sistemática

Luiz Guilherme de Saboya Lenzi[1], João Baptista Gomes dos Santos[1], Aline Mendes[1], Helena Bonciani Nader[1], Renan Pelluzzi Cavalheiro[1], Elsa Yoko Kobatashi[1], Flavio Faloppa[1].

ABSTRACT

Objective: To identify glycosaminoglycans (GAGs) as biomarkers predictive of normal biological processes, pathological processes, and non-invasive diagnostic interventions. **Methods**: Searches were performed in the databases Acervo+ *Index base*, Scopus, MEDLINE, Web of Science, SciELO and LILACS, and experimental and review studies addressing the use of GAGs as biomarkers in diagnoses of diseases were included. For the critical analysis of the selected studies, the QUADAS-2 method was applied as a tool for evaluating methodological quality. **Results**: We selected 66 potentially relevant articles, 20 of which met the eligibility criteria. After evaluating the methodological quality, 10 studies classified with low risk of bias for narrative synthesis and 1 experimental article that studied the mechanism of GAGs in hepatic fibrosis were included. **Final considerations**: The present systematic review identified that the use of GAGs as biomarkers presents good reproducibility, can be used in non-invasive procedures (blood or urine), be performed in most laboratories, and allow for the evaluation of progress and pathophysiological processes. However, it still has limitations to differentiate intermediate stages in some diseases.

Keywords: Noninvasive diagnoses, Mucopolysaccharides, Pathological processes, Systematic review.

RESUMO

Objetivo: Identificar os glicosaminoglicanos (GAGs) como biomarcadores preditivos de processos biológicos normais, processos patológicos e intervenções diagnósticas não-invasivas. **Métodos**: Foram realizadas buscas nas bases de dados Acervo+ Index base, Scopus, MEDLINE, Web of Science, SciELO e LILACS e incluídos os estudos originais que abordam o uso de GAGs como biomarcadores em diagnósticos de doenças. Para a análise crítica dos estudos selecionados, foi aplicado o método QUADAS-2 como ferramenta de avaliação da qualidade metodológica. **Resultados**: Foram selecionados 66 artigos potencialmente relevantes, os quais 20 atendiam os critérios de elegibilidade. Após avaliação da qualidade metodológica, foram incluídos 10 estudos classificados com nível baixo no risco de viés para a síntese narrativa e 1 artigo experimental que estuda o mecanismo da GAG na fibrose hepática. **Considerações finais**: A presente revisão sistemática, identificou que o uso de GAGs como biomarcadores apresenta boa reprodutibilidade, podem ser empregados em procedimentos não invasivos (sangue ou urina), ser realizados na maior parte

[1] Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo - SP.

SUBMETIDO EM: 4/2023 | ACEITO EM: 5/2023 | PUBLICADO EM: 9/2023

acervo+ index base

Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

dos laboratórios e, permitem a avaliação do progresso e dos processos fisiopatológicos. Contudo, ainda possui limitações para diferenciar estágios intermediários em algumas doenças.

Palavras-chave: Diagnósticos não-invasivos, Mucopolissacarídeos, Processos patológicos.

RESUMEN

Objetivo: Identificar glicosaminoglicanos (GAGs) como biomarcadores predictivos de procesos biológicos normales, procesos patológicos e intervenciones diagnósticas no invasivas. **Métodos:** Se realizaron búsquedas en las bases de datos Acervo+ Index base, Scopus, MEDLINE, Web of Science, SciELO y LILACS y se incluyeron estudios experimentales y de revisión que abordaron el uso de GAGs como biomarcadores en diagnósticos de enfermedades. Para el análisis crítico de los estudios seleccionados se aplicó el método QUADAS-2 como herramienta para evaluar la calidad metodológica. **Resultados:** Se seleccionaron 66 artículos potencialmente relevantes y 20 cumplieron con los criterios de elegibilidad. Después de evaluar la calidad metodológica, se incluyeron 10 estudios clasificados como de bajo riesgo de sesgo para la síntesis narrativa y 1 artículo experimental que estudia el mecanismo de GAG en la fibrosis hepática. **Consideraciones finales:** La presente revisión sistemática identificó que el uso de GAGs como biomarcadores presenta buena reproducibilidad, puede ser utilizado en procedimientos no invasivos (sangre u orina), ser realizado en la mayoría de los laboratorios y permitir la evaluación del progreso y los procesos fisiopatológicos. Sin embargo, todavía tiene limitaciones para diferenciar etapas intermedias en algunas enfermedades.

Palabras clave: Diagnósticos no invasivos, Mucopolisacáridos, Procesos patológicos, Revisión sistemática.

INTRODUCTION

Biomarkers, also called biological markers, are measurable indicators of normal biological processes, which may change in pathological processes as well as a response to clinical or surgical therapeutic interventions. These biomarkers can be molecules, such as hormones, proteins, genes, among others as well as specific cells, as it occurs for some tumors (FISHEL S, et al., 2017).

Glycosaminoglycan molecules (GAGs), also previously referred to as mucopolysaccharides, are long linear polysaccharides consisting of repeated units of disaccharides, composed of an hexosamine (glucosamine or galactosamine) and a uronic acid residue (glucuronic acid or iduronic acid) or galactose. Depending on the type of the hexoaminse and of the other sugar residue, glycosidic linkage and sulfation pattern, GAGs can be classified as hyaluronic acid (HA), chondroitin sulfate (CS), heparan sulfate (HS), dermatan sulfate (DS), heparin (Hep) and keratan sulfate (KS) (ALEKNAVIČIŪTĖ-VALIENĖ G, BANYS V, 2022; KHAN AS, et al., 2020; MENEGHETTI MCZ, et al., 2015).

GAGs occur in the cells covalently linked to a protein constituting the proteoglycans (PG). HA is the only GAG that does not occur as a PG. The expression of GAGs is involved in important biological functions such as regulation of cell growth and proliferation, embryogenesis, interactions between cells and cell surface receptors (enzymes, cytokines, complement proteins and chemokines) and maintenance of residual hydration, anti-coagulation, among others (COULSON-THOMAS YM, et al., 2015; KHAN AS, et al., 2020).

In addition, GAGs exert influence on proteins comprised in pathological and physiological processes and can be used as biological markers (NAKAMURA-UTSUNOMIYA A, 2021; DOS SANTOS PRD, 2015), whose accumulation in multiple tissues generated by the deficiency of lysosomal enzymes can result in an organic dysfunction (KHAN AS, et al., 2020; DREYFUSS JL, et al., 2009).

Among GAGs, hyaluronic acid (HA) is one of the most used biomarkers in studies and clinical practice for the diagnosis or identification pathology occurrence risk. The HA can be found in the blood circulation (half-life of 2-5 minutes), organs, the lymphatic system, interacting to cellular receptors and the extracellular matrix (ALEKNAVIČIŪTĖ-VALIENĖ G and BANYS V, 2022).

acervo+ index base
Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

Under normal health conditions, HA concentrations are low in serological tests, as the circulating molecule is rapidly eliminated from the blood by the liver, kidneys and spleen. However, in health conditions with pathological risks, there is an increase in the production of hyaluronic acid, whose hepatic elimination of the glycosaminoglycan molecule is decreased. Thus, the high serum concentration of HA allows for the identification of stages of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B virus infection, as well as liver cirrhosis. It is noteworthy that HA concentrations are proportional to the negative outcomes of diseases such as liver stiffness in clinical severity and disease activity (ALEKNAVIČIŪTĖ-VALIENĖ G, BANYS V, 2022; NEUMAN MC, et al., 2016).

The deficiency of enzymes that degrade GAGs can cause lysosomal storage disorders, which characterize Mucopolysaccharidoses (MPS) of various types (SINGH R, et al., 2020). There are different types of MPS (I to IX), which are distinguished by the deficient enzyme and, consequently, by the accumulated GAGs (NEUFELD EF, MUENZER J, 2001).

Among the most common MPS are MPS I (Hurler/Scheie syndrome) and MPS II (Hunter syndrome), and MPS type III (MPS III), also called Sanfilipo syndrome with is divided into 4 different syndromes according to the deficient enzyme involved in the degradation of heparan sulfate (HS). In addition, the pathological process of the disease also acts on secondary storage products, resulting in biochemical and cellular changes, such as neuroinflammation and progressive deterioration of nervous system functions (JAKOBKIEWICZ-BANECKA J, et al., 2016).

For the diagnosis of Sanfilipo syndrome, HS can be used as a biomarker in diagnostic and predictive procedures that use urine and plasma (JAKOBKIEWICZ-BANECKA J, et al., 2016; SINGH R, et al., 2020). In summary, GAG biomarkers have also been employed in the diagnosis of cancerous and musculoskeletal diseases (Dupuytren's contracture, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, intervertebral disc degeneration, Peyronie's disease) (BRATULIC S, et al., 2022; MARTEL-PELLETIER J, et al., 2017; NASCIMENTO PCH, et al., 2016; RODRIGUES LMR, et al., 2019; SZEREMETA A, et al., 2018; UETA RHS, et al., 2018; WATANABE MA, et al. 2017).

In the diagnosis of diseases using GAGs as biomarkers, a biochemical evaluation of patient samples can be performed, including the qualitative and quantitative evaluation of serum GAGs, followed by a determination of enzymatic activities and molecular diagnosis. Non-invasive detection techniques using chromatography, spectrometry, spectrophotometry or electrophoresis have been employed to detect GAGs, among which, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry is the fastest, most specific, sensitive and economical method (KHAN AS, et al., 2020).

In this context, the present systematic review seeks to explore the use of GAGs as disease biomarkers and non-invasive diagnoses, highlighting their potential for a prediction of clinical severity and prognosis, and enabling a broad view of therapeutic monitoring and disease screening.

METHODS

The systematic review, registered in the PROSPERO database (record no. CRD42023414144), was conducted in accordance with PRISMA recommendations (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis Statement*) (MOHER D, et al., 2009).

Five bibliographic databases were consulted: Acervo+ Index base, Scopus, *Medical Literature Library of Medicine On-Line* (MEDLINE) by the PubMed platform, *Web of Science*, *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) and Latin American and Caribbean Literature (LILACS).

Search strategy

The search strategy included searching for the unique identifier of the Health Sciences descriptor registry (DeCS). The descriptors used were combined with the boolean operator AND: (*glycosaminoglycans* AND *biomarkers* AND *diseases*), (*glycosaminoglycans* AND *biomarkers*), (*glycosaminoglycans* AND non-invasive diagnostic), (*mucopolysaccharides* AND *biomarkers* AND *diseases*), (*mucopolysaccharides* AND *biomarkers*)

acervo+ index base
Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

and (*mucopolysaccharides* AND *non-invasive diagnostic*), present in the titles, summaries and keywords, to which temporary and linguistic filters were added. The non-invasive diagnostic descriptor does not have a unique DeCS/MeSH record identifier, so it was used as an uncontrolled descriptor.

Eligibility criteria

The inclusion criteria were: original articles, in Portuguese, English or Spanish, available as open access and with a publication period between 2013 and 2023, whose search was updated up until March 2023. Articles reporting glycosaminoglycans as biomarkers of different diseases were included.

Duplicate studies and those that did not present at least two of the descriptors in the abstract or in the title were excluded. After the critical reading, articles that were not relevant to the proposed objective were also excluded.

Literature search process

After importing the articles, intra- and inter-base duplicates were checked, followed by the evaluation of the titles, abstracts and keywords of the relevant articles. The selected articles were submitted to full reading and methodological quality. The narrative synthesis was structured from the data of the use of glycosaminoglycans as biomarkers of pathological processes and non-invasive diagnostic strategies.

Methodological quality assessment a

The articles were evaluated and considered according with the impact of bias and analysis of the findings of experimental, cohort and exploratory studies. Thus, the methodological quality of the studies was evaluated using the QUADAS-2 tool (*Quality Assessment of Studies of Diagnostic Accuracy Included in Systematic Reviews*).

In this system, methodological quality is classified in relation to the risk of bias at high, low or uncertain levels, which comprise the patient selection domains; index test; standard/reference test and patient flow, and time of index and reference tests (WHITING P, et al., 2003).

RESULTS AND DISCUSSION

This systematic review sought to explore the use of GAGs as biomarkers of cancer, musculoskeletal, neurometabolic and hepatic diseases through invasive and non-invasive diagnoses. The originality of this study in relation to previous systematic reviews refers to the use of the PRISMA and QUADAS-2 methodology to sinter high impact and methodological quality works, indicating the potential results and their limitations.

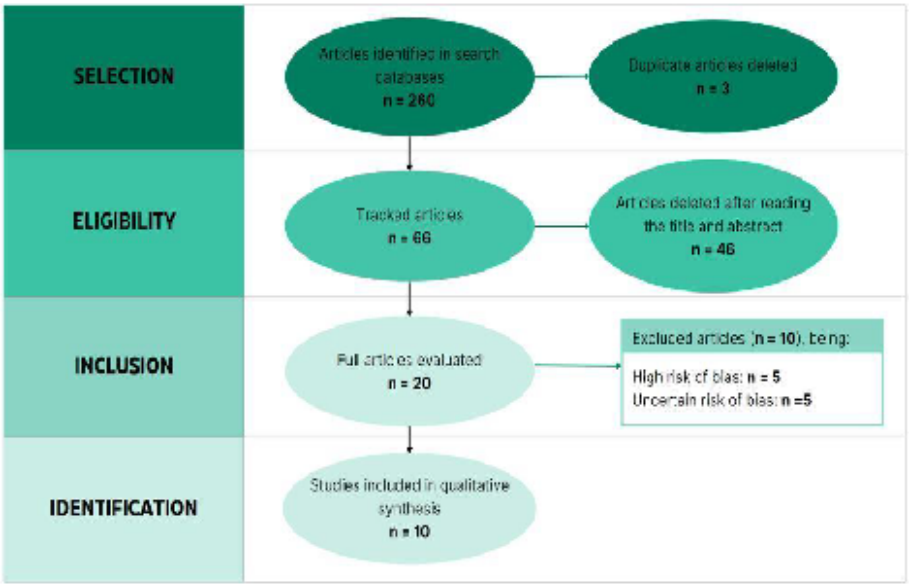
Applying the inclusion and exclusion criteria, 260 potentially relevant articles were identified (**Figure 1**). After the exclusion of duplicate articles, 66 studies were selected for full reading, of which 20 met the eligibility criteria and 10 were included in the narrative synthesis after the analysis of methodological quality.

The methodological evaluation of the analyzed studies resulted in 10 articles classified with low risk of bias (50%) (**Table 1 and Figure 2**), 5 with risk of uncertain bias (25%) and 5 with high risk of bias (25%). An experimental study of risk of uncertain bias was used in narrative synthesis to investigate the mechanism of GAGs in liver fibrosis.

The articles with uncertain risk of bias did not present enough information to allow for judgment, while those with high risk of bias did not present a reference standard for comparison of results and the interpretation of the index test could have introduced a bias to the study. We emphasize that we chose to keep the name of the authors and their respective works classified as uncertain and high-risk bias, thus presenting only those that were classified with low risk of bias.

acervo+ index base
Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

Figure 1 - Flowchart of the study selection process.



Source: Lenzi LGS, et al., 2023.

The general characteristics of the selected studies are described in **Table 2**. With the exception of the experimental studies of Nascimento PCH, et al. (2016) and Yang YM et al. (2019). The number of patients for the diagnostic tests ranged from 50 to 1260 people, of both genders (predominantly men) with an average age of 65 years, with the exception of 2 studies that extended their research to an age group from 0 to 18 years.

The study designs were based on cohort, exploratory and experimental studies of carcinogenic, neurometabolic, musculoskeletal and hepatic diseases. Most studies investigated the concentration of serum GAGs for the diagnosis of mucopolysaccharidoses type I (Hurler Syndrome), type II (Hunter Syndrome), type III (Sanfilippo Syndrome), type IV (Morquio Syndrome) and type VI (Maroteaux-Lamy Syndrome).

acervo+ open base

Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

Table 1 - Evaluation of the methodological quality of the articles evaluated in the review according to the QUADAS-2 tool (Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies).

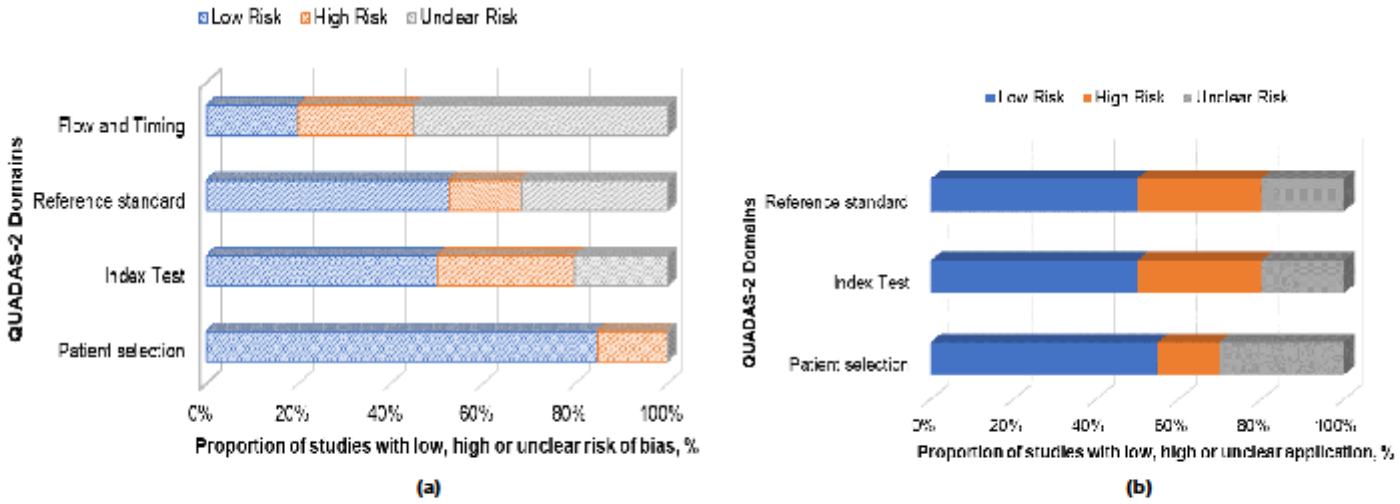
Study by	Risk of Bias				Applicability Concerns		
	PS	IT	RS	F&T	PS	IT	RS
Amendum PC, et al. (2021)	Low risk	Low risk	Low risk	Unclear risk	Unclear risk	Low risk	Low risk
Bratulic S, et al. (2022)	Low risk	Low risk	Low risk	Unclear risk	Low risk	Low risk	Low risk
Gatto F, et al. (2022)	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Gatto F, et al. (2018)	Low risk	Low risk	Low risk	Unclear risk	Low risk	Low risk	Low risk
Herbest ZM, et al. (2022)	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Kantarcioglu B, et al. (2022)	Low risk	Low risk	Low risk	Unclear risk	Low risk	Low risk	Low risk
Khan AS, et al. (2018)	Low risk	Low risk	Low risk	Unclear risk	Low risk	Low risk	Low risk
Lin H, et al. (2018)	Low risk	Low risk	Low risk	Unclear risk	Low risk	Low risk	Low risk
Martel-Pelletier J, et al. (2017)	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Unclear risk	Low risk	Low risk
Sabir E, et al. (2020)	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Unclear risk	Low risk	Low risk
ID 001*	Low risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk
ID 002*	Low risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk
ID 003*	Low risk	High risk	Unclear risk	Unclear risk	Low risk	High risk	Unclear risk
ID 004*	Low risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk	Low risk	Unclear risk	Unclear risk
ID 005*	Low risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk	Unclear risk
ID 006*	Low risk	High risk	High risk	High risk	Low risk	High risk	High risk
ID 007*	Low risk	High risk	High risk	High risk	Low risk	High risk	High risk
ID 008*	High risk	High risk	Unclear risk	High risk	High risk	High risk	Unclear risk
ID 009*	High risk	High risk	High risk	High risk	High risk	High risk	High risk
ID 010*	High risk	High risk	High risk	High risk	High risk	High risk	High risk

Note: **PS**: Pacient Selection; **IT**: Index Test; **RS**: Reference Standard; **F&T**: Flow and Timing; *Author identification preserved. **Source**: Lenzi LGS, et al., 2023.

acervo+ open base

Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

Figure 2 - Proportion of studies with (a) risk of bias and (b) applicability of the articles evaluated in the review according to the QUADAS-2 tool.



Source: Lenzi LGS, et al., 2023.

acervo+ nova base

Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

Table 2 - General characteristics of the studies covered in the review.

N.	Author (year)	Number of individuals	% women	% men	Average age (years)	Follow-up time	Design
1	Amendum PC, et al. (2021)	276[1,*]	42,4	56,6	0-2.9 years: 51% 3-4.9 years: 13% 5-9.9 years: 19% 10-14.9 years: 11% 15-19.9 years: 2% 20+ years: 4,0%	-	Retrospective cohort
2	Bratulic S, et al. (2022)	724 sick 536 healthy	47 sick 55 healthy	53 sick 45 healthy	62 sick 60 healthy	-	Retrospective and prospective cohort
3	Gatto F, et al. (2022)	50	34	66	68,5	3 years	Prospective cohort
4	Gatto F, et al. (2018)	175 sick 19 healthy	31	59	60	4 years	Retrospective cohort
5	Herbest ZM, et al. (2022)	60	NA	NA	1,5	3 years	Experimental
6	Kantarcioglu B, et al. (2022)	101	48,5	51,5	63	-	Exploratory cohort
7	Khan AS, et al. (2018)	109	NA	NA	6.24 (0 to 20 years)	-	Exploratory
8	Lin H, et al. (2018)	79	NA	NA	9.1 (1 month to 49 years)	5 years	Retrospective cohort
9	Martel-Pelletier J, et al. (2017)	97	-	100	61	2 years	Exploratory
10	Sabir E, et al. (2020)	368[2] healthy 47 sick	50.3 healthy 46.8 sick	49.7 healthy 53.2 sick	*Healthy:* 1-12 months: 10,3% 1- 2 years: 9,3% 2- 4 years: 14,1% 4- 6 years: 13,6% 6- 10 years: 14,1% 10-16 years 14.1% 16-18 years: 9,5% 18+ years: 15,0% *Sick:* 1 to 15 years	7 weeks	Exploratory

Subtitles: [1]Japanese patients;[*]1% of people were not discriminated against by gender; [2]Moroccan patients;[*] **NA**: Not evaluated.

Source: Lenzi LGS, et al., 2023.

acervo+ nova base

Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

In the studies, compounds HA, CS and DS were analyzed as the main GAG biomarkers for diseases, mostly from serum samples (plasma and urine), using chromatographic detection techniques associated with mass spectroscopy, spectrophotometric assays or by laser-induced fluorescence capillary electrophoresis analysis (**Table 3**). All authors identified an increased concentration of GAGs in the pathological process of different types of diseases.

Table 3 - Main findings of the studies selected for the review.

Author	Disease	GAG Biomarkers	Sample Type	Detection method	Conclusion
Amendum PC, et al.	MPS (I, II, IIIA, IIIB, IVA, IVB and VII) and Encephalopathy	DS and QS	Plasma	LC-TMS	High levels of serum GAGs have been detected in patients with MPS of various types, viral and non-viral encephalopathy, being a potential biomarker for diseases other than MPS. However, the mechanisms of encephalopathy associated with increased GAGs should still be studied. As well as a validation study of disease groups with a larger sample size.
Bratulic S, et al.	Cancer (breast, bladder, cervix, colorectal, head and neck, small cell lung, prostate); Chronic lymphocytic leukemia; Diffuse glioma; Diffuse large cell lymphoma; Carcinomas (endometrial, ovarian and renal cell); and, neuroendocrine tumor of the small intestine	HA, CS and HS	Plasma and Urine.	Liquid biopsy with UHPLC-MS	The authors observed GAG alterations in all cancers and that five GAG characteristics could extract significant information about the spatial and temporal status of the cancer from the early stage.
Gatto F, et al.	mRCC	CS, HA and HS	Plasma and Urine.	UHPLC-MS	They concluded that changes in plasma- and urine-free GAGs (40%) can be correlated to a progressive disease. Thus, serum-free GAGs are a potential biological marker for MRCC response. However, the understanding of therapeutic problems has yet to be determined.
Gatto F, et al.	nmRCC	CS, HA and HS	Plasma	Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence	The authors concluded that plasma GAGs are highly sensitive for the diagnosis and prognosis of nmRCC.

acervo+ nova base

Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

Author	Disease	GAG Biomarkers	Sample Type	Detection method	Conclusion
Herbest ZM, et al.	MPS-II	HS and DS	Dry blood	Methods of internal and endogenous disaccharides by LC-TMS	The endogenous biomarker method was able to differentiate MPS-II patients from healthy ones.
Kantarcioglu B, et al.	Pulmonary ebullism	Endogenous GAGs	Plasma	Spectrophotometric assay using heparin red and immunoenzymatic serological test	GAGs are related to the pathological process of PE, presenting an increase in the organism. In addition, GAGs correlate with inflammatory biomarkers in patients.
Khan AS, et al.	MPS (II, III, IVA and IVB)	DS, HS and QS	Plasma and Urine.	LC-TMS with enzymatic digestion	Serum GAGs have the potential to diagnose different types of MPS. In addition, the detection method allowed for the separation of GAGs with the same molecular weight and subclasses with specificity and accuracy.
LIN Y, et al	MPS (I, IIA, IIB, III, IV and VI)	DS, HS and QS	Urine	LC-TMS	Urinary GAGs have the potential to diagnose different types of MPs. In addition, the detection method allowed it to be a reliable and sensitive tool in the diagnosis, identification of subclasses and therapeutic monitoring when compared to the spectrophometric assay.
Martel-Pelletier J, et al.	Osteoarthritis	HA	Plasma	Immunoenzymatic serological test	The biomarker HA was effective as a predictive biomarker to assess the inflammation levels of OA patients.
Sabir E, et al.	MPS (I, II, IIIA, IIIB, IVA and VI)	CS	Urinário	Spectrophotometric assay using 1,9-dimethylmethylene blue	Genetic and environmental factors, habitual diet, and socioeconomic status all influence ethnic differences in GAG biomarker concentrations, demonstrating that each population should have specific and updated patterns so as not to lead to an inaccurate interpretation of clinical trial results. In addition, GAGs also decrease with age, presenting a higher reference value in individuals up to 1 year.

Subtitles: **HA**: hyaluronic acid; **nmRCC**: non-metastatic renal cell carcinoma; **LC-TMS**: Liquid Chromatography coupled with tandem mass spectroscopy; **mRCC**: metastatic renal cell carcinoma; **GAG**: glycosaminoglycans; IIA: type 2-moderate; IIB: type II-severe; IVA: type IV-moderate; IVB: type IV-severe; **MPS**: mucopolysaccharidoses; **OA**: osteoarthritis; **CS**: chondroitin sulfates; **DS**: dermatan sulfate; **HS**: heparan sulfate; QS: Keratan sulfate, **UHPLC-MS**: Ultra-high-efficiency liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **Source**: Lenzi LGS, et al., 2023.

acervo+ index base
Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

Multi-cancer Early Detection (MCED) by plasma and urinary free GAG biomarkers (>0.1 µg/mL) was investigated by Bratulic S, et al. (2022) for 14 types of cancers. The authors analyzed 2064 samples using UHPLC-MS. The study showed a sensitivity to any type of low-grade cancer between 41.6-62.3% and specificity of 95%, whose sensitivity could be increased by combining with genomic biomarkers.

The prospective single-center cohort study conducted by Gatto F, et al. (2022) evaluated the correlation of free GAGs of urine and plasma in patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC), whose study design was based on a longitudinal follow-up with the patients every three months. In the study, free GAG was measured in 279 plasma or urine samples (>0.1 µg/mL) using a standardized UHPLC-MS/MS kit and compared to radiological assessments, as free GAG provides information at the molecular level reflecting pathology metabolism.

As a result, the progressive disease was correlated with the increase in the concentration of CSs, whose response to treatment was compatible with the detectable characteristic changes of free GAGs (40%). In addition, through the development of biomarker progression scores in plasma and urinary tests, it is possible to determine progressive disease with a sensitivity and specificity of 94% and 84% for plasma and 92% and 91% for urine, as well as 85% and 97% when combined, being a valid non-invasive diagnostic procedure at the beginning of treatment or after 6-8 weeks.

Prior to this study, Gatto F, et al. (2018) conducted a retrospective design to evaluate the sensitivity and specificity of plasma GAGs for detection of early-stage non-metastatic renal cell carcinomas and prediction of recurrence after surgery. The study consisted of an analysis of data with longitudinal follow-up between 1 and 30 months after surgery. The study then presented for GAGs a sensitivity and specificity of 93.5% and 94.7%, respectively, to discriminate non-metastatic carcinomas from healthy samples. Although the properties of GAGs do not correlate with tumor stage, grade and histology, the results indicated that GAGs have promising potential as a biomarker of the disease. However, the limitations of the study should be taken into account, such as the possibility of changes in GAG concentrations and composition in retrospective sample collections, especially when the "age" of the sample is not known, being an important factor for GAG stability.

GAGs have a high expression in the pathological process of neurometabolic diseases such as mucopolysaccharidosis, encouraging research on biomarkers for different types of the disease. Herbest ZM, et al. (2022) used the internal disaccharide method and endogenous method for analysis of MPS-II biomarkers from the dried blood of newborns and detected through LC-TMS. In the study, the methods were efficient as a screening protocol for the disease, reducing the level of false positives from enzyme assays. However, a study with a larger population of patients must be reproduced to validate the protocol.

Amendum PC, et al. (2021) carry out a retrospective cohort study to investigate GAG biomarkers in the diagnosis of 5 types of MPS; encephalopathy (viral and non-viral), epilepsy; respiratory, renal, developmental disorders; fatty acid, and hepatic metabolism; hypoglycemia; myopathy, and acidosis, through serum samples analyzed by LC-TMS. The largest population analyzed was children between 0 and 9 years old (83%), who had high levels of GAGs in their blood.

Similarly, Khan AS, et al. (2018), explored the levels of DS, KS and HS simultaneously in 4 types of MPS in patients of different ages whose serum samples were analyzed by LC-TMS with enzymatic digestion. The authors observed that biomarkers are able to distinguish the different types of MPS by age according to the concentration of serum GAGs, of which KS was the one with the highest positive correlation in MPS II, IVA and VI. The detection technique used by the authors allowed them to simultaneously investigate the levels of serum GAGs with the same molecular weight and by subclasses, allowing them to differentiate the MPS, diagnose, perform prognosis and evaluate therapeutic efficacy. However, in addition to considering the age of the patient during diagnosis and prognosis, the mechanism related to the increase in KS for these diseases should be investigated.

The efficiency of the LC-TMS technique for the identification and quantification of GAGs was also observed in the study by LIN H, et al. (2018). The study investigated the levels of urinary GAGs in patients who had clinical manifestations of different types of MPS, which observed an increase in DS levels in patients with

acervo+ index base
Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

hernia, joint stiffness, clawed hands, heart valve disease and hepatosplenomegaly. HS was elevated in patients with intellectual disability and in patients with severe MPS-II, while KS was elevated in patients with hypermobile joints. These data were obtained by the LC-TMS detection technique, which were more accurate and reliable compared to the spectrophotometry of the dimethylethylene blue assay.

In addition to a study with a larger population, the need to determine diagnostic reference values for different ethnicities for inaccurate interpretations in diagnostic test results is emphasized. The study by Sabir E, et al. (2020), for example, demonstrated that the reference values for GAG concentration are different for the Moroccan population when compared to the Spanish and Indian population. This is because ethnic differences in GAG biomarker concentrations can be influenced by environmental and genetic factors, habitual diet, and socioeconomic conditions. In addition, the study showed that the reference concentration of biomarkers decreases with age and should be taken into account for the effectiveness of screening and treatment of patients.

Increased endogenous GAG in the blood can also be observed in the pathology of acute pulmonary embolism. In the exploratory cohort study by Kantarcioglu B, et al. (2022), it was observed that in addition to GAGs increasing during disease, they also correlate with inflammatory biomarkers, whose Spearman correlation ranged from 0.007 to 0.381, assuming a direct or indirect interrelationship between endogenous GAGs, inflammatory biomarkers and blood cell index. However, these interrelationships need to be investigated to understand the functions of blood cells in the process of endogenous release into circulation.

HA has been used as a biomarker of musculoskeletal diseases such as osteoarthritis. In the exploratory study of a randomized controlled clinical trial by Martel-Pelletier J, et al. (2017), HA was used as a plasma biomarker to evaluate the response to OA treatment with GAG-CS in reducing cartilage volume loss, which was able to discriminate the extent of systemic cartilage inflammation. In the experimental study by Nascimento PCH, et al. (2016), samples were collected from 23 patients diagnosed with Dupuytren's disease. Tissue collection was performed through fasciotomy with Bruner-type incisions for electrophoresis analysis, whose GAGs were identified by comparing the electrophoretic migration of the sample with known and purified patterns, as well as quantitative determination of the compounds by optical densitometry. As a result, individuals with the disease had higher expression of DS and CS.

Yang YM, et al (2019), studied the mechanism of HA deposition in the pathological process of liver fibrosis, since this GAG is also a biomarker of cirrhosis. The mouse study observed that HA is degraded into lower molecular weight (pro-inflammatory) species through HA synthase 2 (HAS2). HAS2 expression is influenced by hepatic stellate cells (HSCs), which are regulated by the fibrotic mediator TGF-β (transforming growth factor beta), resulting in invasive phenotypes of HSCs that migrate to inflammatory and fibrotic sites and destroy the basement membrane. Thus, the synthesis of HA promoted by HAS2 increases the concentration of serum HA and activates hepatic stellate cells, consequently inducing inflammation and lesions in liver tissue that characterize liver fibrosis.

In summary, the results of all studies have demonstrated the direct relationship of serum GAG levels with the diseases, it being possible to detect and quantify them mainly by chromatographic techniques. However, it is noteworthy that the present systematic review presented limitations in relation to the methodological quality of potential articles, and it is necessary to discard many studies for narrative synthesis. Thus, it is impossible to infer that GAGs should be incorporated into predictive protocols in diagnoses, since it was not possible to evaluate experimental studies with larger sample sizes and that did not use a retrospective cohort design, since the retrospective cohort has limitations in relation to the availability of clinical data of the subjects considered for the study.

FINAL REMARKS

This systematic review made it possible to identify advances in the use of plasma and urinary GAG biomarkers for various types of diseases, demonstrating their promising potential as a non-invasive diagnostic tool. In addition, it was possible to verify the need to understand the association of GAGs with the pathological

acervo+ index base
Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

processes of the diseases, so that the biomarkers have, in addition to their predictive value, a prognostic and discriminatory value.

ACKNOWLEDGMENTS AND FINANCING

The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil [CAPES]) and Escola Paulista de Medicina from Unifesp for financial.

REFERENCES

1. ALEKNAVIČIŪTĖ-VALIENĖ G. e BANYS V. Clinical importance of laboratory biomarkers in liver fibrosis. Biochemia Medica (Zagreb), 2022; 32(3): 03050.
2. AMENDUM PC, et al. Glycosaminoglycans as Biomarkers for Mucopolysaccharidoses and Other Disorders. Diagnostics, 2021;11(9): 1563.
3. BRATULIC S., et al. Noninvasive detection of any-stage cancer using free glycosaminoglycans. PNAS, 2022; 119(50): e2115328119.
4. COULSON-THOMAS YM, et al. The Identification of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in Archaeological Human Bones and Teeth. PLoS ONE 10(6): e0131105.
5. D'AVANZO, F, et al. Mucopolysaccharidosis Type VI, an Updated Overview of the Disease. International Journal of Molecular Sciences, 2021; 22(24): 13456.
6. DREYFUSS JL, et al. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2009; 81(3): 409-429.
7. FISHEL S, et al. LMWH in IVF – Biomarkers and benefits. Thrombosis Research, 2017; 151(1): S65–S69.
8. GATTO, F, et al. Plasma and Urine Free Glycosaminoglycans as Monitoring and Predictive Biomarkers in Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Prospective Cohort Study. JCO Precision Oncology, 2022; 7: e220036.
9. GATTO, F, et al. Plasma Glycosaminoglycans as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Surgically Treated Renal Cell Carcinoma. European Association Urology, 2018; 1: 364-377.
10. HERBST ZM, et al. Evaluation of Two Methods for Quantification of Glycosaminoglycan Biomarkers in Newborn Dried Blood Spots from Patients with Severe and Attenuated Mucopolysaccharidosis Type II. International Journal of Neonatal Screening, 2022; 8(1): 9.
11. JAKOBKIEWICZ-BANECKA J, et al. Glycosaminoglycans and mucopolysaccharidosis type II. Frontiers in Bioscience, 2016; 21: 1393-1409.
12. KANTARCIOGLU B, et al. Predictive Role of Blood Cellular Indices and Their Relationship with Endogenous Glycosaminoglycans as Determinants of Inflammatory Biomarkers in Pulmonary Embolism. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, 2022; 28: 1-11.
13. KHAN SA, et al. Advances in glycosaminoglycan detection. Molecular Genetics and Metabolism, 2020; 130(2): 101-109.
14. KHAN SA, et al. Glycosaminoglycans analysis in blood and urine of patients with mucopolysaccharidosis. Molecular Genetics and Metabolism, 2018; 125(1-2): 44-52.
15. LIN Y, et al. The relationships between urinary glycosaminoglycan levels and phenotypes of mucopolysaccharidoses. Molecular Genetics & Genomic Medicine, 2018; 6(6): 982-999.
16. MARTEL-PELLETIER J, et al. Levels of serum biomarkers from a two-year multicentre trial are associated with treatment response on knee osteoarthritis cartilage loss as assessed by magnetic resonance imaging: an exploratory study. Arthritis Research & Therapy, 2017; 19: 169.
17. MENEGHETTI MCZ, et al. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. Journal of The Royal Society Interface, 2015; 12: 20150589.
18. MOHER D, et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. Plos Medicine, 2009; 6(7): e1000097.

acervo+ index base
Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

19. NAKAMURA-UTSUNOMIYA A. Bone Biomarkers in Mucopolysaccharidoses. International Journal of Molecular Sciences, 2021; 22(23): 12651.
20. NASCIMENTO PCH, et al. Glycosaminoglycans and proteoglycans in palmar fascia of patients with Dupuytren, Acta Ortopédica Brasileira, 2016; 24(2):98-101.
21. NEUFELD EF e MUENZER J. The Mucopolysaccharidoses. In: VALLE et al. (Eds). The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw Hill, 2019.
22. NEUMAN MC, et al. Hyaluronic acid as a non-invasive biomarker of liver fibrosis. Clinical Biochemistry, 2016; 40: 302-315.
23. RODRIGUES LMR, et al. Inflammatory biomarkers in sera of patients with intervertebral disc degeneration. einstein (São Paulo). 2019; 17(4): eAO4637.
24. SABIR E, et al. Usefulness of urinary glycosaminoglycans assay for a mucopolysaccharidosis-specific screening. Pediatrics International, 2020; 62: 1077–1085.
25. DOS SANTOS PRD, et al. Effects of shock wave therapy on glycosaminoglycan expression during bone healing. International Journal of Surgery, 2015, 24: 120-123.
26. SINGH T, et al. Emerging Approaches for Fluorescence-Based Newborn Screening of Mucopolysaccharidoses. International Journal of Molecular Sciences – Diagnostics, 2020; 10: 294.
27. SZEREMETA A, et al. Effects of a 15-month anti-TNF-α treatment on plasma levels of glycosaminoglycans in women with rheumatoid arthritis. Arthritis Research & Therapy, 2018; 20: 211.
28. UETA RHS, et al. Effects of training and overtraining on intervertebral disc proteoglycans. Spine (Phila Pa 1976), 2018; 43(1): E1-E6.
29. WATANABE MS, et al. Extracellular matrix alterations in the Peyronie's disease. Journal of Advanced Research., 2017; 8: 455-461.
30. WHITING P, et al. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. BMC Medical Research Methodology, 2003; 3: 25.
31. YANG YM, et al. Hyaluronan synthase 2–mediated hyaluronan production mediates Notch1 activation and liver fibrosis. Science Translational Medicine 2019; 11(496): 1-27.

Apêndice 4

Artigo experimental submetido

Dupuytren's disease impacts the content and arrangement of extracellular matrix components

collagen/ hyaluronic acid/ proteoglycans/sulfated glycosaminoglycans/urine

Luiz Guilherme Ssaboya Lenzi[1, *], João Baptista Gomes dos Santos[1], Elsa Yoko Kobayashi[2], Aline Mendes[2], Renan Pelluzzi Cavalheiro[2], Helena Bonciani Nader[2], Flávio Faloppa[1]

[1] Department of Orthopaedics and Traumatology, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 04038-032, Brazil

[2] Molecular Biology Program, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 04024-002, Brazil;

[*]Correspondent Author:

Luiz Guilherme de Saboya Lenzi

Departamento de Ortopedia e Traumatologia – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP) – Rua Botucatu, 740 – Vila Clementino, São Paulo – SP, Brasil, CEP: 04023-062.

Phone: +55 (11) 5576-4848

Email: lenzimedicina@yahoo.com.br

Running headline: ECM in Dupuytren's contracture

Abstract

Objective: Dupuytren's disease (DD) is a typical hand fibroproliferative condition resulting from genetic, epigenetic and environmental factors. Extracellular matrix (ECM) is a complex network of different types of macromolecules and alterations in the content and arrangement of ECM components impact normal physiological processes and pathological conditions.

Design: The present work investigated the content and organization of glycosaminoglycans, proteoglycans and collagen in the ECM of patients with different stages of DD as a putative prognostic factor for this disease.

Results: Significant alterations in the content and arrangement of chondroitin sulfate, dermatan sulfate and collagen in the fascia palmar from patients compared to normal tissue independent of the degree of the disease were observed. Our results showed for the first time in the literature, that the increase in versican expression, a high molecular weight chondroitin sulfate proteoglycan, is related to the rise in the stage of the disease, whereas decorin, a small leucine rich dermatan sulfate proteoglycan, significantly decreases from stages I to IV, detected both by mRNA analyses and protein detection in the confocal microscopy. CARS (Coherent anti-stokes Raman scattering) microscopy indicate that the architecture of collagen fibrils in DD is most relevant for the stages of the disease. Also, the excretion of both hyaluronic and sulfated glycosaminoglycans is significantly decreased in urine of DD patients.

Conclusions: The data indicate proteoglycans and collagen arrangement as possible markers for the stage of the disease. Also, the decrease in the urinary excretion of glycosaminoglycan suggests a systemic effect of the disease.

Introduction

Dupuytren's disease (DD) is a typical hand fibroproliferative condition resulting from genetic, epigenetic and environmental factors(Layton et al. 2023). The worldwide prevalence is around 8%, with differences among global regions, where Africa accounts for 17%, Asia 15%, Europe 10%, and the Americas 2% of the cases (Salari et al. 2020). This disorder results in the development of knots and fibers in the palmar fascia, characterized by flexion contractures of the digits, and appears to involve a decrease in the production of types I and III collagens as well as decrease in metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MMP-13) through mRNA evaluation using myofibroblasts cultures from patients (Kang et al. 2014). On the other hand, Johnston et al (2006) showed an increase in 3 key collagenases, MMP1, MMP13, and MMP14 (Johnston et al. 2007).

Myofibroblasts are the primary cells involved and can actively contract and exhibit behaviors of both fibroblasts and smooth muscle cells as well as high levels of proinflammatory cytokines in tissue from Dupuytren's patients (Tripoli et al. 2016). Growth factors as TGF-beta, TNF-alfa, PDGF, GM-CSF among others have been implicated in the abnormal cell activation, collagen synthesis and extracellular deposition in Dupuytren’s disease (Verjee et al. 2013; van Beuge et al. 2016; Nascimento et al. 2016).

Glycosaminoglycans are linear anionic polysaccharides with critical roles in numerous biological processes. Except for hyaluronan (also known as hyaluronic acid), all glycosaminoglycans occur in the tissues as proteoglycans (PGs), where the polysaccharide chains are covalently linked to a core protein. The glycosaminoglycans are polydisperse linear polysaccharides composed of alternate units of hexosamine and

uronic acid linked by glycosidic linkage. The type of hexosamine (D-glucosamine or D-galactosamine), the type of uronic acid (D-glucuronic acid or L-iduronic acid), the type (α or β) and the relative position (1→3 or 1→4) of the glycosidic linkages distinguish the different glycosaminoglycans. Sulfation occurs at different positions of the disaccharide units, except for hyaluronic acid (Sampaio and Nader 2006; Dreyfuss et al. 2009; Merry et al. 2022). Sulfated glycosaminoglycans (SGAG) encompass heparan sulfate (HS), heparin (Hep), chondroitin sulfate (CS) and dermatan sulfate (DS).

Extracellular matrix (ECM) is a complex network of different types of macromolecules, such as collagens, fibronectins, laminins, proteoglycans, hyaluronic acid, among others. Alterations in the contents and arrangement of ECM components can have significant implications in normal physiological processes, such as tissue development and remodeling, as well as in pathological conditions(Bonnans et al. 2014; Mouw et al. 2014). Dupuytren disease seems to result from a combination of heritable genomic factors and abnormal environmental stimuli (O'Gorman and Gan 2010; Samulenas et al. 2022). Even though most studies usually focus on DD treatment, up to now there is no cure for DD and treatment remain palliative (Hentz et al. 2012; Degreef and De Smet 2013; Soreide et al. 2018; Nordenskjöld et al. 2019; Ruettermann et al. 2021).

The extracellular environment is overlooked, especially in the context of analyses of cells in culture from patients with DD. Preliminary results from our group showed that these patients displayed increase in dermatan sulfate (Nascimento et al. 2016). Thus, the present work aims to study the contents and organization of glycosaminoglycans, proteoglycans and collagen in the extracellular matrix of patients with different stages of Dupuytren's contracture as a putative prognostic factor for this disease. The data showed significant alterations in the content and arrangement of chondroitin sulfate high molecular weight

proteoglycan (versican), small leucine rich dermatan sulfate proteoglycan (decorin) and collagen in the fascia palmar from patients compared to normal tissue according to the stages of the disease. Furthermore, analyses of urine samples from DD patients showed significant decrease in the excretion of hyaluronic acid as well as of sulfated glycosaminoglycans.

Results

The excised fascia palmar specimens from 14 patients were divided into 3 regions (P, M, D) as already indicated and according to the different stages of the disease. There is an increase in the contents of heparan sulfate, dermatan sulfate and chondroitin sulfate for all patients compared to control, with no differences for hyaluronic acid. Furthermore, no statistical differences were observed when comparing the regions P, M and D (Fig. 1 supplementary). Thus, for the next experiments, the 3 regions are included as 3 different measurements for the same patient (Fig. 1).

No significant difference for hyaluronic acid content among patients with different DD stages and control (Fig. 1A) was observed. On the other hand, the data clearly indicates an increase in SGAG content for Dupuytren´s patients compared to controls, with no significant difference among the 4 stages of the disease (Fig. 1B). Individual analyses of the different types of SGAG also shows significant increase in the content of CS (Fig. 2A), DS (Fig. 2B) for all stages of the disease. HS content is 10 times lower than DS and significant increase occurs for stages II to IV (Fig. 2C).

These results led us to investigate the expression of some PG containing CS or DS chains covalently linked to the core protein. PCR data obtained among the 3 regions of the DD fascia for each individual patient showed no differences in the expression of the analyzed

PGs (data not shown). Thus, Fig. 3A shows the PCR result where the 3 different regions are included as samples from the same patient. Two high molecular weight PG (HMWPG) that contain CS chains were investigated. It was observed significant increase in the expression of versican and aggrecan for stages II to IV (Fig 3A, B). Nevertheless, the level of expression of versican is around 8 times higher compared to aggrecan. Among the small leucine rich proteoglycans (SRLP), we investigated the expression of decorin and biglycan. The results showed significant increase in the mRNA for decorin only for stages I and II of the disease (Fig. 3C) with no changes in the expression of biglycan (Fig. 3D).

The expression of versican and decorin investigated by confocal microscopy are in accordance with the data obtained by PCR analyses (Fig. 4). The expression of versican increases with the severity of the disease (stages I to IV) and the images suggest changes in the distribution and arrangement of this PG.

Interestingly, the expression of decorin decreases from stages I to IV, corroborating the results obtained by PCR analyses. The expression of HA by immunohistochemistry (Fig. 2 Supplementary) parallels the results obtained by the direct measurement of HA in the samples (Fig. 1).

Collagen architecture (fibers and bundles) was investigated by the second harmonic generation using CARS microscopy, where it is clear the alteration in collagen fibers orientation from control to samples with DD (Fig. 5A). The angular distribution within the collagen sample can be quantified (Fig. 5B). The different stages of DD show three major peaks (-45, 45 and zero degrees), whereas for control the orientation shows two peaks at -90 and 90 degrees. This data highlights that the diseased tissues show disorganization in collagen arrangement.

The distribution and mean values of HA in urine of controls and DD patients can be depicted in Fig. 6A. Controls show a mean value of 25.6 ng HA/μg creatine whereas for the 4 different stages of the disease the values vary between 5.6 and 10.6 (ng HA/μg creatine). The results show no significant changes when comparing controls with each stage of DD. Also, the distribution in HA contents for DD patients show less dispersion when compared to controls. Thus, the amounts of HA in urine of DD patients without taking into consideration the degree of the disease was plotted compared to controls (Fig. 6B). The data shows a significant decrease in HA contents for DD patients compared to controls ($p<0.035$). The contents of SGAG in urine from controls and patients with different stages of DD is shown in Fig. 6C. It is observed a significant decrease for stages II, ($p< 0.01$) and IV ($p<0.002$) compared to control. Controls show a mean value of 16.7 μg SGAG/mg whereas for the 4 different stages of the disease the values vary between 5.5 to 9.6 μg SGAG/mg creatine. The amounts of SGAG in urine of DD patients independent of the degree of the disease shows significant decrease compared to controls (Fig. 6D) ($p<0.001$).

Discussion

The combined results showed alterations in the ECM composition and architecture of DD patients. Significant changes in the contents of SGAG, mainly due to increase in dermatan sulfate and chondroitin sulfate were observed, whereas no differences in HA content. Furthermore, both decorin and versican were significantly altered in the extracellular matrix of DC patients. Our results showed for the first time in the literature, that the increase in versican expression, a high molecular weight chondroitin sulfate

proteoglycan, is related to the rise in the stage of the disease, whereas decorin, a small leucine rich dermatan sulfate proteoglycan, significantly decreases from stages I to IV, detected both by mRNA analyses and protein detection in the confocal microscopy. CARS (Coherent anti-stokes Raman scattering) microscopy indicate that the architecture of collagen fibrils changes in DD patients and the disorganization in the fibrils increases with the stages of the disease. Thus, the decrease in decorin with the severity of DD correlates with the changes in the arrangement of collagen fibrils. Among the SLRP, decorin is one of the PG involved in the collagen fibril assembly (Scott 1996; Reed and Iozzo 2002; Chen et al. 2020). Also, it has been demonstrated that versican binds collagen directly and regulates its structure and mechanics (Wu et al. 2005; Chen et al. 2020). Interestingly, studies conducted using palmar fascia from the lesion of DD and from clinically unaffected by Dupuytren as well as from normal forehand fascia, using different methodological approaches showed that the immunohistochemical expression of decorin was high in DD, whereas versican was highly expressed in the normal fascia, with no differences for aggrecan, besides increase in collagen content. One interesting aspect of the paper was the finding that the clinically unaffected tissue showed changes in some ECM components, indicating that it may be affected, which is most relevant and justifies the choice of our control samples (Alfonso-Rodríguez et al. 2014).

Also, the excretion of both hyaluronic and sulfated glycosaminoglycans is significantly decreased in urine of DD patients suggesting a systemic effect of the disease. The combined data shows that the architecture of collagen fibrils in DD is most relevant for the symptoms that lead to the contracture, as observed for capsule in frozen shoulders patients (Hagiwara et al. 2012). Furthermore, the collected data advocate that these glycosaminoglycans and proteoglycans are playing important roles in the establishment

of interstitial collagen fibers and the assembly of fibrils into fibers in the palmar fascia of DD patients and thus in the architecture of the ECM.

Material and Methods

Surgical specimens

The present study conducted at the Department of Orthopedics and Traumatology, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, included samples of the palmar fascia from patients diagnosed with DD, that were classified by the severity of the contracture (I, II, III, IV). The study was approved by the Ethics Committee (Nr. 48734315.2.0000.5505) and all participants signed a Free and Informed Consent Term. DD patients with surgical indications who had no previous surgeries or previous traumas were included. Fascia samples from patients undergoing surgical treatment for Carpal Tunnel Syndrome were used as control. All patients received analgesia, prophylactic antibiotic therapy and returned to check the surgical evolution at 7, 14, 30, 60 and 90 days after surgery. The patients were classified in 4 different stages of the disease that includes the sum of the deficit in goniometry performed with a finger goniometer, always positioned on the dorsal part of the three finger joints of the affected radius according to Tubiana et al (1981) (Tubiana et al. 1981). Stages I, II, III and IV comprised 4, 4, 2 and 4 patients, respectively.

For the surgery, the technique of partial fasciectomy was performed, according to the standard established in the literature. Plexus block anesthesia was performed on the operated limb, exsanguination with an Esmarch band, rigorous hemostasis, and suture with sterile nylon thread (4-0 or 5-0). During the surgical procedure, the fibrotic cord was resected (around 2.5 cm) and divided into 3 regions: proximal (P), median (M) and distal

(D) accordingly to the position of the long tendon and median nerve (Tubiana and Dubert 2000). The samples were divided and maintained in acetone at room temperature for GAG studies, in TRIzol at -80° C for PCR analyses and 4% paraformaldehyde at 4° C for microscopic methods. Also, on the day of the procedure, 50 mL of urine were collected from each patient before surgery and stored at 4° C in the presence of thymol crystals.

Glycosaminoglycans analysis in palmar aponeurosis samples

The palmar aponeurosis samples were washed in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, grounded in acetone (10 vol) and kept overnight at room temperature as described (Franciozi et al. 2013; Mierzwa et al. 2017). The precipitates were separated by centrifugation (3,000×g, 15 min), dried, weighted and proteolyzed with maxatase (Biocon Laboratories, Brazil) (4 mg/mL in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0, 18 h at 60° C). Afterward, peptides and nucleic acid fragments were removed by precipitation with trichloroacetic acid (10% final concentration) at 4° C. After centrifugation (10 min, 3,500×g, 4° C), the supernatant containing GAG was precipitated by addition of methanol (3vol, −20° C, 18 h). The precipitate was collected by centrifugation and dried. The samples were suspended in distilled water and analyzed in triplicates for sulfated glycosaminoglycans (SGAG) and HA content. SGAG were identified and quantified by agarose gel electrophoresis in 0.05 M 1,3-diaminopropane acetate (PDA) buffer, pH 9.0 using standards of CS, DS and HS ((Seikagaku, Japan). The samples were analyzed in triplicate. The quantitative results were expressed as μg SGAG per mg of dry tissue. The values were expressed as means with lower and upper limits of 95% CIs. Determination of HA was performed using a highly specific enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA)-like fluorometric method (Martins et al. 2003). The absolute amounts of HA were expressed as nanograms of HA per mg of dry tissue.

Glycosaminoglycans analysis in urine samples

The glycosaminoglycans in urine samples were extracted by gel filtration chromatography as previously described (Soler et al. 2008). For this, an aliquot of 2 ml of urine sample was applied to a Sephadex G25 column equilibrated with distilled water. After discarding the inclusion volume, the following 4 ml flow-through are collected, vacuum dried and, finally, dissolved in 10 μl of distilled water and kept frozen at −20 °C for analysis. This purification permits a clear separation between GAG and salt, in addition to the exclusion of impurities, such as pigments and smaller compounds and is followed by microelectrophoresis in PDA agarose gel. Creatinine was determined by the alkaline picrate method (Labtest kit). The amounts were expressed as μg SGAG/mg creatinine. The amounts of HA were determined using a non-competitive "Elisa-like" fluorimetric and expressed as ng HA/μg of creatinine (Martins et al. 2003).

RNA extraction and real-time reverse transcription–PCR analysis

Total RNA was isolated with TRIzol® Reagent (Invitrogen), spectrophotometrically quantified and used as the template for the reverse transcriptase reaction. Complementary DNA (cDNA) was reverse transcribed using 2 μg of total RNA and the kit Improm II™ ReverseTranscriptase (Promega). Quantitative RT–PCR amplification was performed using a 2 μl aliquot of diluted cDNA with specific primers (Table I Supplementary) and the kit Syber Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, UK), using the activation cycle: 95 °C (10 min), 40 cycles of 95 °C (15 s), 61 °C (1 min), and 72 °C (30 s). Relative expression was

analyzed with a standard dilution curve-based method for relative real-time PCR based on the ΔΔCT method (Schmittgen and Livak 2001). Results were expressed in arbitrary units and negative controls were used in parallel to confirm the absence of any contamination. Expression values were normalized to the housekeeping gene RPL 13A (ribosomal protein L13A).

Immunofluorescence, confocal microscopy and immunohistochemistry

The palmar aponeurosis specimens were fixed in 4% formaldehyde in PBS, included in Tissue Tek at -20° C, sectioned in 10 µm slices on a cryostat and placed on slides for immunofluorescence analysis. The slides were incubated with 0.1M glycine in PBS buffer for 10 min, with blocking buffer (5% FCS, 0.02% saponine in PBS buffer) for 1 h at room temperature, and then with primary antibodies at 4°C overnight. Primary polyclonal antibodies (1:200) from Santa Cruz were employed: decorin (sc-22613), biglycan (sc-33788), versican (sc-25831), aggrecan (sc-25674). After washing with PBS, the samples were incubated with specific secondary antibody conjugated with Alexa fluor-594 or streptavidin conjugated with Alexa 594 at room temperature for 1.5 h. Nuclei were stained with DAPI (1:1000, Molecular Probes, OR) for 15 min at room temperature. Finally, slides were mounted in Fluoromont G and analyzed on a laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP8). Coverslips were mounted on glass microscope slides using a mounting medium (Fluoromount-G, 2:1 in PBS) and images captured with a Plan-Apochromat×63 objective (numerical aperture 1.4) under oil immersion. The images are represented in maximum intensity projections corresponding to the z-series of confocal stacks (Cavalheiro et al. 2017). For HA, the slides were incubated in 10% hydrogen peroxide for 30 min, washed, unspecific protein binding sites blocked with 5% FBS, and

finally incubated with biotinylated link protein at 4° C overnight, washed and then processed using the Universal Dako LSAB®+ Kit, Peroxidase (LSAB+ Kit, HRP) and Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako, Glostrup, Denmark). The slides were counter stained with H&E and analyzed using an inverted light microscopy (Axiovert 40 CFL, Zeiss) at 40 x magnification.

Coherent anti-stokes Raman scattering (CARS) microscopy

Specimens from patients with different stages of the disease were analyzed using TCS SP8 CARS Confocal Microscope. The system consists of an inverted microscope (DMI 6000 CS Trino, Leica) equipped with a picoEmerald tunable light source (APE). The excitation light was focused using a plan apochromatic multi-immersion objective (HC PL APO CS2 20×/0.75). Epi-SHG was used to detect second harmonic generation from collagen fibers. Images are represented as maximum intensity projections, corresponding to the Z-series of confocal stacks and were collected by tile scan and processed with Leica LAS AF software.[28] Finally, the orientation analysis of collagen structure was performed using the second harmonic generation of collagen fibers images (Z-series of confocal stacks) from control and DD patients built by OrientationJ plugin of the ImageJ software.

Statistical analysis

All data obtained were analyzed using statistical tests for comparison, based on the types of distribution of the variables. The distributions were considered nonparametric according to their distribution of 2 unmatched groups using the statistical program GraphPad Prism 9. The values obtained for each continuous variable were organized and described by the mean and standard deviation. For comparison between the means of two sample groups the student t-test followed by Mann-Whitney test were used. For the

studies with more than two groups with nonparametric data, the one way-Anova followed by the Kruskal-Wallis test was used. A probability value of $p \leq 0.05$ was considered significant.

Funding

The work was supported by grants from Brazilian agencies (FAPESP, CAPES, CNPq, FINEP).

Acknowledgments

The authors acknowledge the surgical team provided by the Department of Orthopaedics and Traumatology of Escola Paulista de Medicina and Hospital São Paulo.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Author Contributions

All surgical procedures were performed by the orthopedic surgeons LGSL, JBGS and FF. All authors contributed to the research design, conception, data analysis and interpretation. LGSL, RPC, HBN and FF contributed to the writing and critical revision of the manuscript. All authors gave final approval and agreed to be accountable for all aspects of the work.

Conflict of interest

None of the authors have conflicts of interest related to the manuscript.

References

Alfonso-Rodríguez CA, Garzón I, Garrido-Gómez J, Oliveira ACX, Martín-Piedra MÁ, Scionti G, Carriel V, Herná Ndez-Cortés P, Campos A, Alaminos M. 2014. Identification of histological patterns in clinically affected and unaffected palm regions in dupuytren's disease. *PLoS One*. 9(11):e112457.

van Beuge MM, ten Dam EJPM, Werker PMN, Bank RA. 2016. Matrix and cell phenotype differences in Dupuytren's disease. *Fibrogenes Tissue Repair* [Internet]. 9(1):1–11.

Bonnans C, Chou J, Werb Z. 2014. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. Nat Rev *Mol Cell Biol*. 15(12):786–801.

Cavalheiro RP, Lima MA, Jarrouge-Bouças TR, Viana GM, Lopes CC, Coulson-Thomas VJ, Dreyfuss JL, Yates EA, Tersariol ILS, Nader HB. 2017. Coupling of vinculin to F-actin demands Syndecan-4 proteoglycan. *Matrix Bio*l. 63:23–37.

Chen D, Smith LR, Khandekar G, Patel P, Yu CK, Zhang K, Chen CS, Han L, Wells RG. 2020. Distinct effects of different matrix proteoglycans on collagen fibrillogenesis and cell-mediated collagen reorganization. *Sci Rep* [Internet]. 10(1):1–13.

Degreef I, De Smet L. 2013. Dupuytren disease : On our way to a cure. *Acta Orthop Belg*. 79(3):243–249.

Dreyfuss JL, Regatieri C V., Jarrouge TR, Cavalheiro RP, Sampaio LO, Nader HB. 2009. Heparan sulfate proteoglycans: Structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc*. 81(3).

Franciozi CES, Tarini VAF, Reginato RD, Gonçalves PRS, Medeiros VP, Ferretti M, Dreyfuss JL, Nader HB, Faloppa F. 2013. Gradual strenuous running regimen predisposes to osteoarthritis due to cartilage cell death and altered levels of glycosaminoglycans. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. 21(7):965–972.

Hagiwara Y, Ando A, Onoda Y, Takemura T, Minowa T, Hanagata N, Tsuchiya M, Watanabe T, Chimoto E, Suda H, et al. 2012. Coexistence of fibrotic and chondrogenic process in the capsule of idiopathic frozen shoulders. *Osteoarthr Cartil.* 20(3):241–249.

Hentz VR, Watt AJ, Desai SS, Curtin C. 2012. Advances in the Management of Dupuytren Disease. Collagenase. *Hand Clin.* 28(4):551–563.

Johnston P, Chojnowski AJ, Davidson RK, Riley GP, Donell ST, Clark IM. 2007. A Complete Expression Profile of Matrix-Degrading Metalloproteinases in Dupuytren's Disease. *J Hand Surg Am*. 32(3):343–351.

Kang YM, Choi YR, Yun CO, Park JO, Suk KS, Kim HS, Park MS, Lee BH, Lee HM, Moon SH. 2014. Down-regulation of collagen synthesis and matrix metalloproteinase expression in myofibroblasts from dupuytren nodule using adenovirus-mediated relaxin gene therapy. *J Orthop Res*. 32(4):515–523.

Layton TB, Williams L, Nanchahal J. 2023. Dupuytren's disease: a localised and accessible human fibrotic disorder. *Trends Mol Med* [Internet]. 29(3):218–227.

Martins JRM, Passerotti CC, Maciel RMB, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. 2003. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem*. 319(1):65–72.

Merry CLR, Lindahl U, Couchman J, Esko JD. 2022. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: *Essentials Glycobiol* [Internet]; p. 1–23.

Mierzwa AGH, Campos JF, Jesus MF, Nader HB, Lazaretti-Castro M, Reginato RD. 2017. Different doses of strontium ranelate and mechanical vibration modulate distinct responses in the articular cartilage of ovariectomized rats. *Osteoarthr Cartil*. 25(7):1179–1188.

Mouw JK, Ou G, Weaver VM. 2014. Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. Nat Rev Mol *Cell Biol*. 15(12):771–85.

Nascimento PCH, Kobayashi EY, De Lenzi LGS, Dos Santos JBG, Nader HB, Faloppa F. 2016.

Glycosaminoglycans and proteoglycans in palmar fascia of patients with dupuytren. *Acta Ortop Bras.* 24(2):98–101.

Nordenskjöld J, Lauritzson A, Waldén M, Kopylov P, Atroshi I. 2019. Surgical fasciectomy versus collagenase injection in treating recurrent Dupuytren disease: Study protocol of a randomised controlled trial. *BMJ Open.* 9(2):e024424.

O'Gorman D, Gan VLB. 2010. Molecular mechanisms and treatment strategies for Dupuytren's disease. *Ther Clin Risk Manag.* 6:383–390.

Reed CC, Iozzo R V. 2002. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J.* 19(4–5).

Ruettermann M, Hermann RM, Khatib-Chahidi K, Werker PMN. 2021. Dupuytren's Disease - Etiology and Treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 118(46):781–788.

Salari N, Heydari M, Hassanabadi M, Kazeminia M, Farshchian N, Niaparast M, Solaymaninasab Y, Mohammadi M, Shohaimi S, Daneshkhah A. 2020. The worldwide prevalence of the Dupuytren disease: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res.* 15(1):1–13.

Sampaio LO, Nader HB. 2006. Emergence and Structural Characteristics of Chondroitin Sulfates in the Animal Kingdom. *Adv Pharmacol.* 53(05):233–251.

Samulenas G, Insodaite R, Kunceviciene E, Poceviciute R, Masionyte L, Zitkeviciute U, Pilipaityte L, Smalinskiene A. 2022. The Role of Functional Polymorphisms in the Extracellular Matrix Modulation-Related Genes on Dupuytren's Contracture. *Genes (Basel)*. 13(5):743.

Schmittgen TD, Livak KJ. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4).

Scott JE. 1996. Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. *Biochemistry*. 35(27):8795–9.

Soler R, Bruschini H, Martins JR, Dreyfuss JL, Camara NO, Alves MT, Leite KR, Truzzi JC, Nader HB, Srougi M, Ortiz V. 2008. Urinary Glycosaminoglycans as Biomarker for Urothelial Injury: Is It Possible to Discriminate Damage From Recovery? *Urology*. 72(4):937–942.

Soreide E, Murad MH, Denbeigh JM, Dudakovic A, Kakar S, Lewallen EA, Nordsletten L, Van Wijnen AJ. 2018. Treatment of Dupuytren's contracture: A systematic review. *Bone Jt J.* 100B(9):1138–1145.

Tripoli M, Cordova A, Moschella F. 2016. Update on the role of molecular factors and fibroblasts in the pathogenesis of Dupuytren's disease. *J Cell Commun Signal* [Internet]. 10(4):315–330.

Tubiana R, Dubert T. 2000. Classification des déformations des doigts longs liées à un déséquilibre musculo-tendineux. *Chir Main* [Internet]. 19:7–14.

Tubiana R, Fahrer M, McCullough CJ. 1981. Recurrence and other complications in surgery of Dupuytren's contracture. *Clin Plast Surg.* 8(1):45–50.

Verjee LS, Verhoekx JSN, Chan JKK, Krausgruber T, Nicolaidou V, Izadi D, Davidson D, Feldmann M, Midwood KS, Nanchahal J. 2013. Unraveling the signaling pathways promoting fibrosis in Dupuytren's disease reveals TNF as a therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(10):928–937.

Wu YJ, La Pierre DP, Wu J, Yee AJ, Yang BB. 2005. The interaction of versican with its binding partners. *Cell* Res. 15(7):483–94.

Figures

Fig. 1 Hyaluronic acid (A) and sulfated glycosaminoglycans (B) content in palmar fascia from patients with different stages of Dupuytren's disease. Each experiment was performed three times. Quantifications shown in the figure resume all experiments. Kruskal-Wallis one-way ANOVA tests were performed. All error bars represent SD, $*p < 0.05$.

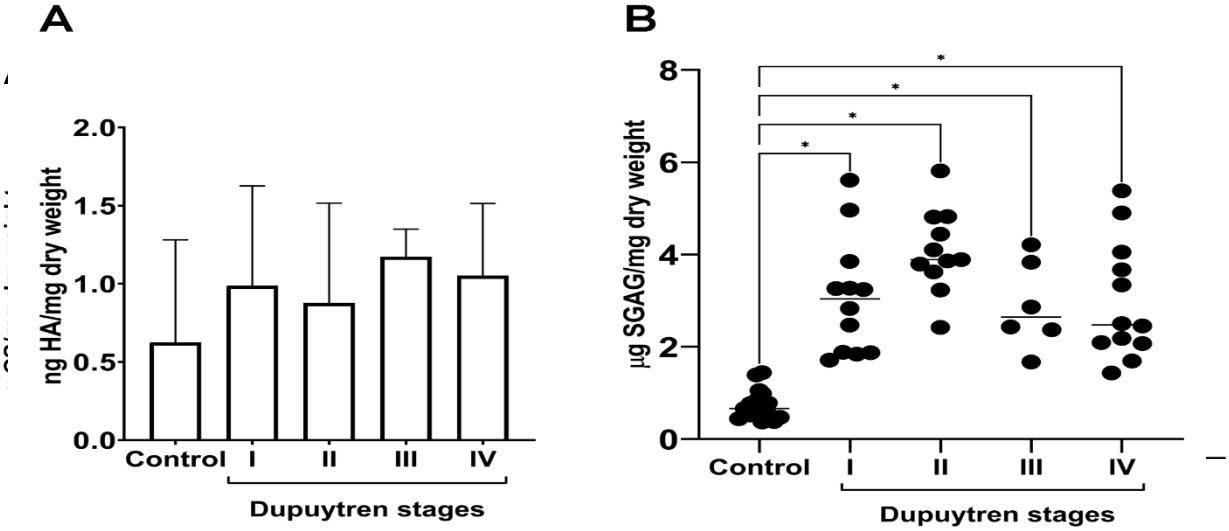


Fig. 2 Amount of chondroitin sulfate (A), dermatan sulfate (B) and heparan sulfate (C) content in palmar fascia from patients with different stages of Dupuytren's disease. Each experiment was performed three times. Quantifications shown in the figure resume all experiments. Kruskal-Wallis one-way ANOVA tests were performed. All error bars represent SD, $*P < 0.05$.

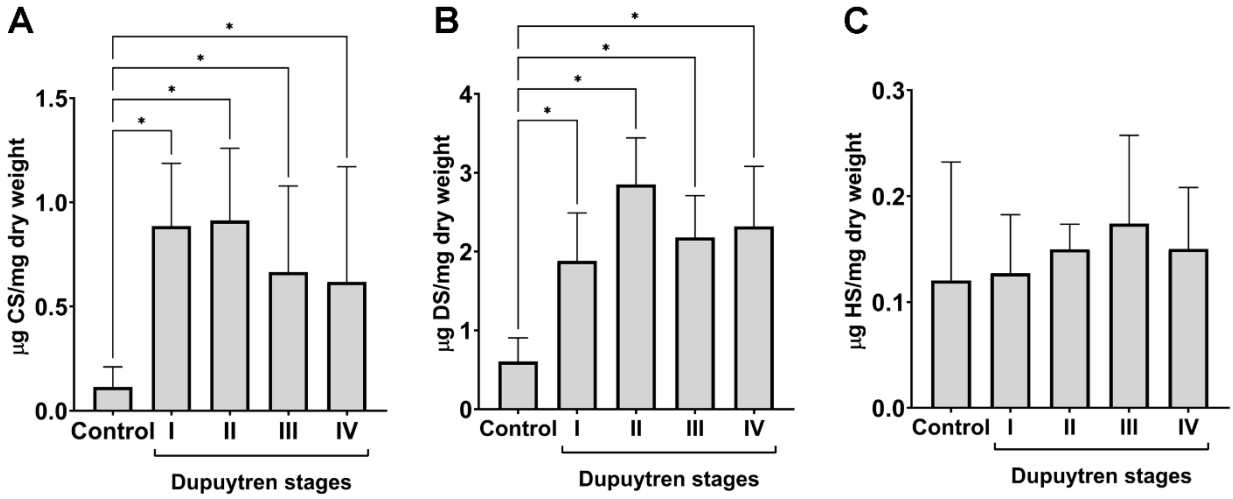


Fig. 3 Expression of versican (A), aggrecan (B), decorin (C) and biglycan (D) in the palmar fascia from patients with different stages of Dupuytren's disease. Each experiment was performed three times. Quantifications shown in the figure resume all experiments. Kruskal-Wallis one-way ANOVA tests were performed. All error bars represent SD, $*P < 0.05$. The numbers indicate the expression of the studied gene relative to the housekeeping gene RPL 13A (ribosomal protein L13A).

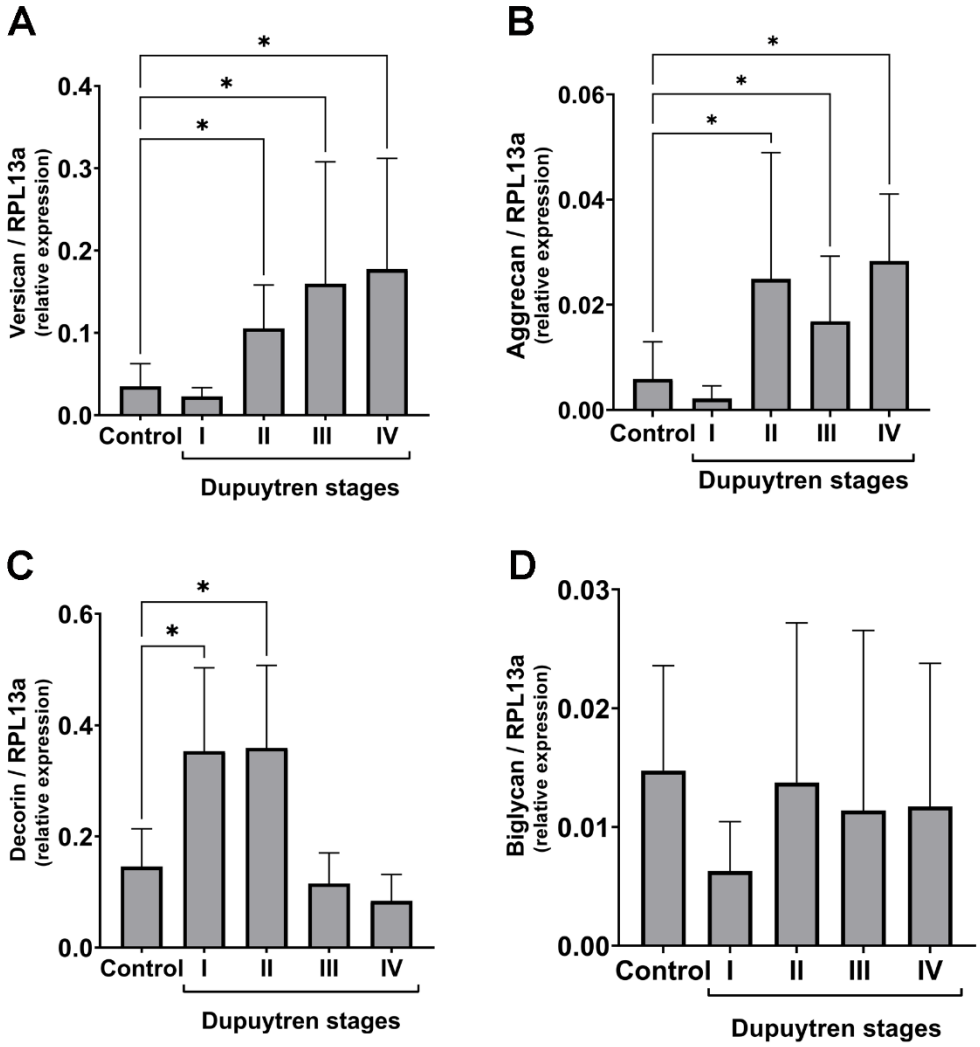
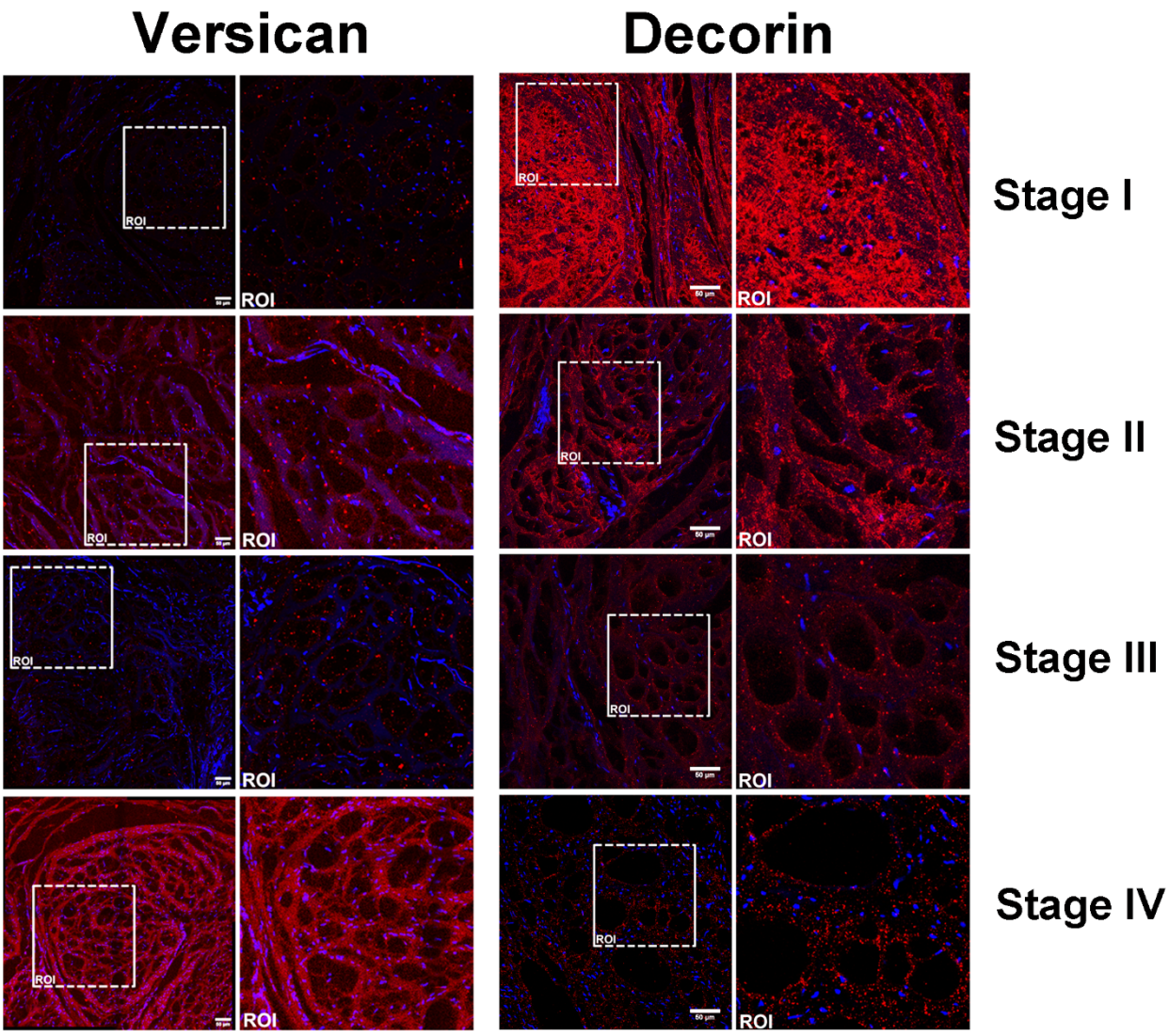


Fig. 4 Versican expression increases and decorin decreases with the rise in the severity of DD patients. The images represent confocal microscopy analyses of palmar fascia from patients with stages II and III of Dupuytren's disease. Bars: 50 µm; ROI: region of



interest.

Fig. 5 Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy of collagen in Dupuytren's disease. (A) The images represent scan of palmar sections for stages II and III of Dupuytren's disease and control performed in both XY and Z planes. The projection shows in green the second harmonic generation signal of collagens. Bars: 100 µm. (B) Collagen orientation for stages I to IV of Dupuytren's disease and control. The orientation analysis of collagen structure was performed using the second harmonic generation of collagen fibers images (Z-series of confocal stacks) from control and DD patients built by OrientationJ plugin of the ImageJ software. I-IV, different stages of Dupuytren's disease; ctr, control.

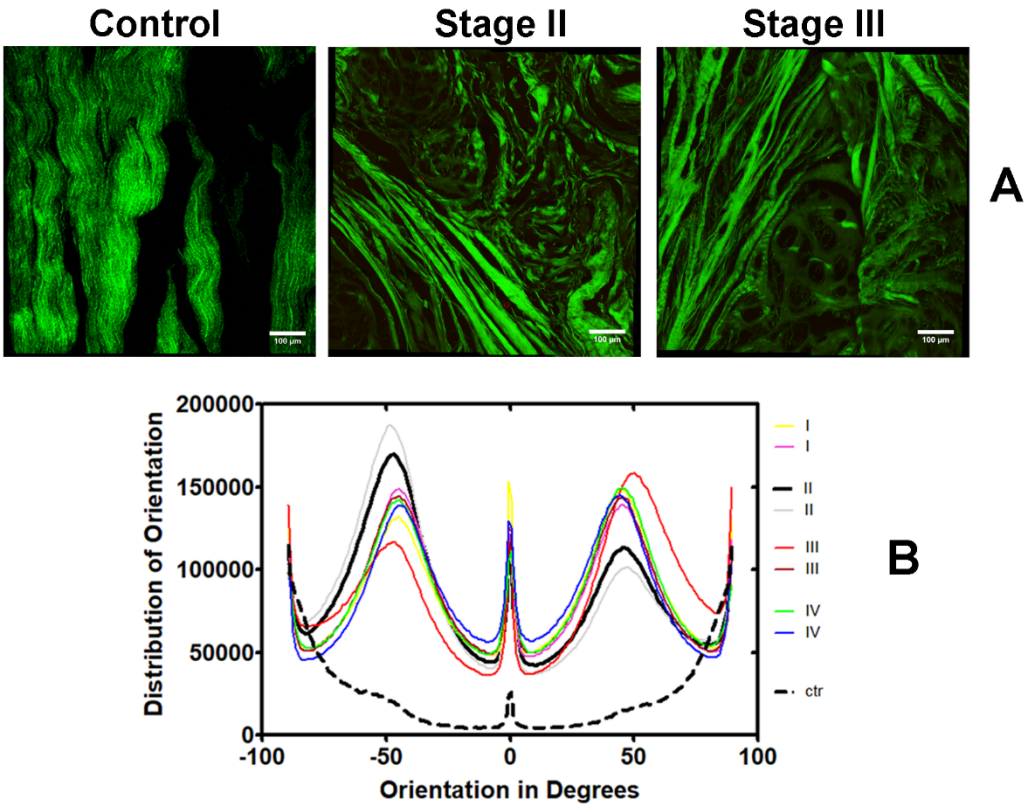
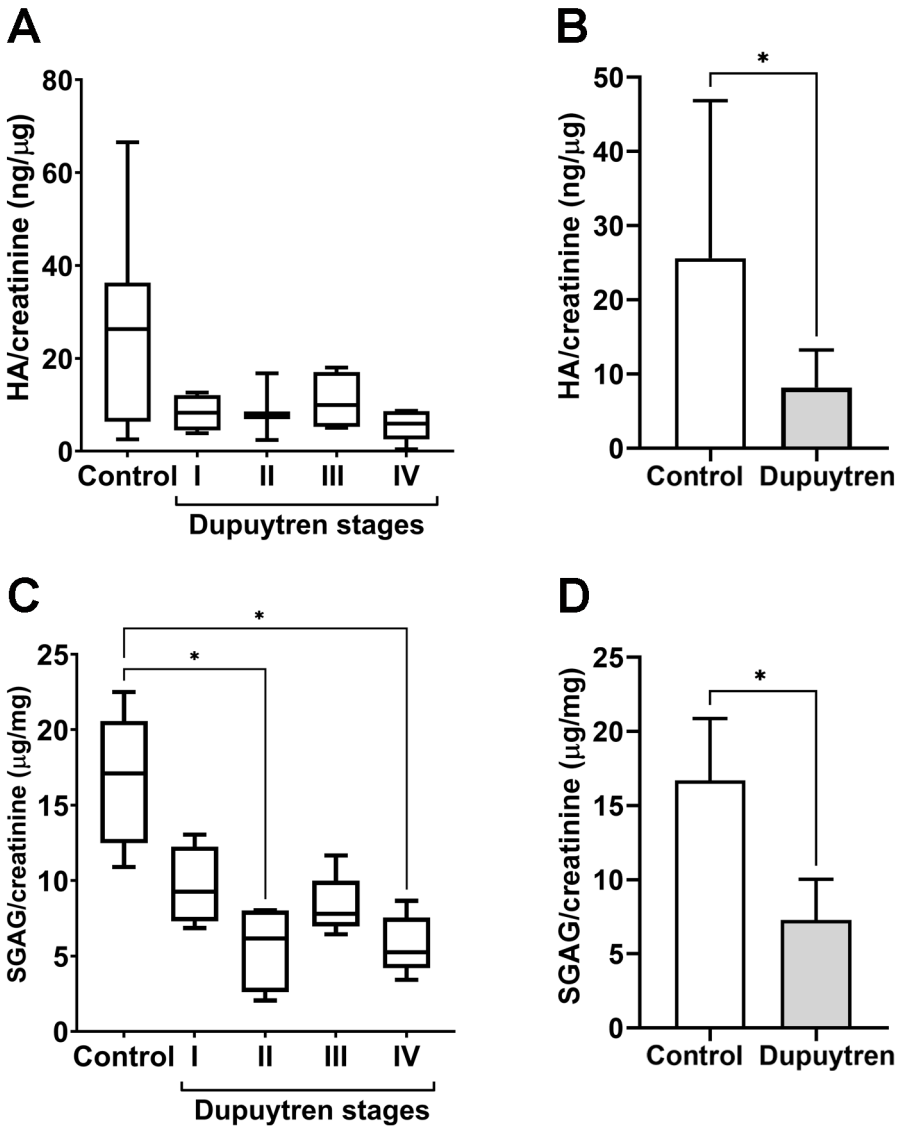


Fig. 6 Urinary excretion of hyaluronic acid (HA) and sulfated glycosaminoglycans (SGAG). HA (A) and SGAG (C) urinary excretion in patients with different stages of the Dupuytren's disease. Each experiment was performed three times. Kruskal-Wallis one-way ANOVA tests were performed. Quantifications shown in the figure resume all experiments. HA (B) and SGAG (D) urinary excretion in all patients. Each experiment was performed three times. The statistic was performed using Student t-test followed by Mann-Whitney. All error bars represent SD, $*P < 0.05$.



Supplementary Data List

Fig. 1 Supplementary Chondroitin sulfate (A), dermatan sulfate (B), heparan sulfate (C) and hyaluronic acid (D) content in regions of palmar fascia from patients with different stages of Dupuytren's disease. Each experiment was performed three times. Quantifications shown in the figure resume all experiments. Kruskal-Wallis one-way ANOVA tests were performed. All error bars represent SD.

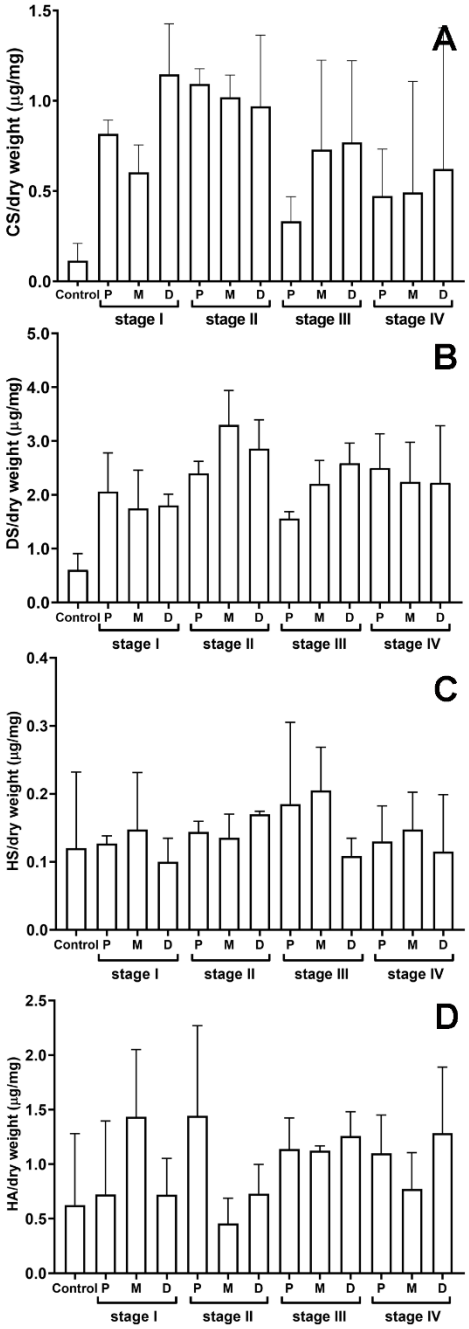


Fig. 2 Supplementary Immunohistochemistry for the detection of hyaluronic acid in different stages of Dupuytren's disease. Bars: 100 µm; ROI: region of interest.

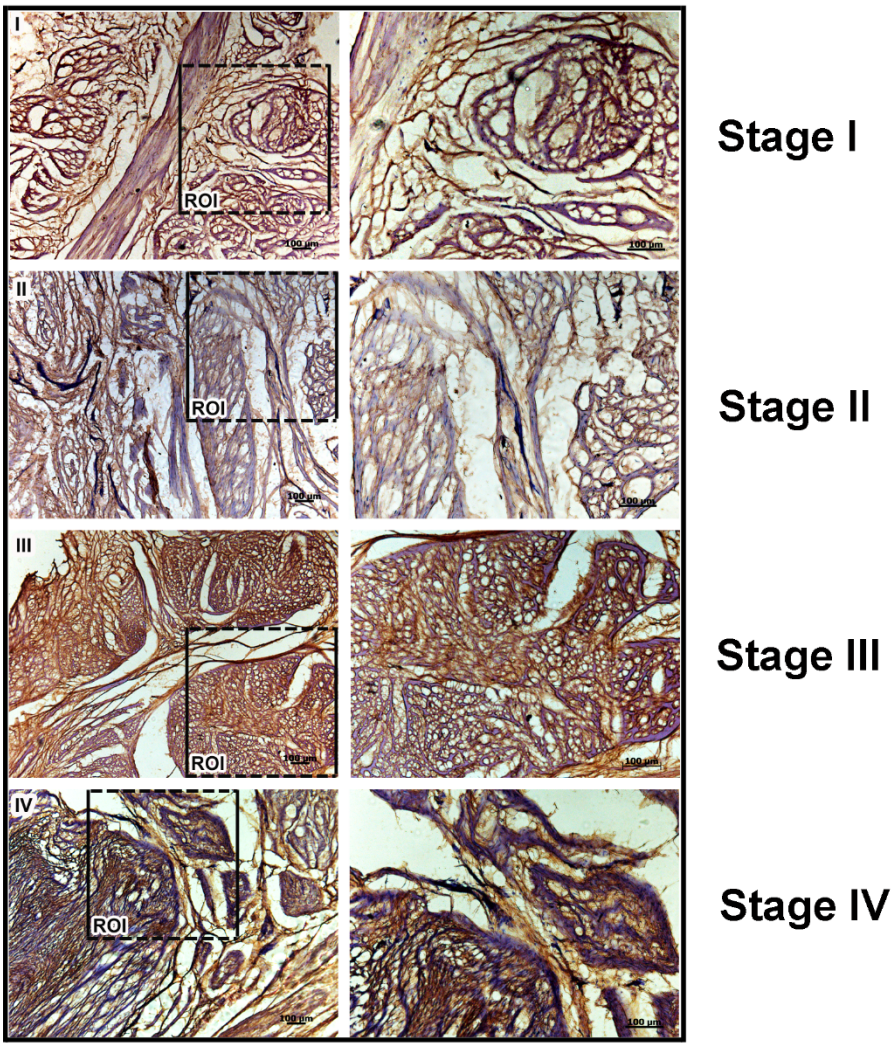


Table I Supplementary. Primers used in Real Time PCR

Gene	***Forward* (5'- 3')**	***Reverse* (5'- 3')**
Decorin	GCTTCTTATTCGGGTGTGAGT	TTCCGAGTTGAATGGCAGAG
Biglican	CTCGTCCTGGTGAACAACAA	CAGGTGGTTCTTGGAGATGTAG
Versican	GTCACTCTAATCCCTGTCGTAATG	CTCGGTATCTTGCTCACAAAGT
Agrecan	CCTTACCGTAAAGCCCATCTT	CCAGTCTCATTCTCAACCTCAG
RPL13a	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA