

# ZIMOGRAFIA: PRINCÍPIOS, TIPOS E FATORES DE INTERFERÊNCIA<sup>1</sup>

*Data de submissão: 28/06/2023*

*Data de aceite: 01/08/2023*

### **Ana Letícia Garcia Baptista**

Piracicaba School of Dentistry, UNICAMP  
– São Paulo, Brazil  
<https://orcid.org/0000-0001-7507-4846>

### **Simone Gomes de Oliveira**

Piracicaba School of Dentistry, UNICAMP  
– São Paulo, Brazil  
School of Dentistry, State University of Rio  
de Janeiro - Rio de Janeiro, Brazil  
<https://orcid.org/0000-0002-1414-3155>

### **Flávio Henrique Baggio Aguiar**

Piracicaba School of Dentistry, UNICAMP  
– São Paulo, Brazil  
<https://orcid.org/0000-0003-3389-5536>

**RESUMO:** A zimografia é um método versátil e amplamente utilizado para avaliar o perfil de proteínas de um substrato. Devido a sua versatilidade a zimografia pode ser adaptada para investigar diferentes enzimas, substratos e sistemas biológicos, contribuindo para a compreensão de processos metabólicos, regulação enzimática e diagnóstico de doenças. Este estudo visa revisar os princípios da zimografia, seus principais tipos e indicações técnicas, informando

também sobre alguns dos principais fatores que influenciam seu desempenho e que devem ser considerados em sua utilização. A zimografia pode ser utilizada para identificar isoenzimas, variantes estruturais de uma mesma enzima, para monitorar processos metabólicos e descobrir marcadores metabólicos de doenças, identificando alterações relevantes para seu diagnóstico e prognóstico. Os diferentes tipos de zimografia determinam a visualização da atividade enzimática em contextos espaciais diferentes quanto à localização e à distribuição das enzimas. Embora as técnicas compartilhem semelhanças, cada uma possui características distintas. A escolha da técnica mais adequada deve considerar os objetivos específicos do estudo e as características da amostra a ser investigada. Aperfeiçoamentos adicionais desta técnica permitirão o contínuo desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico e o desenvolvimento de métodos específicos para o estudo de proteínas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Zimografia. Proteína. Enzimologia. Matriz Metaloproteinase. Ensaio Bioquímico.

1. Este trabalho recebeu o apoio da FAPESP, por meio do projeto nº 2019/20576-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## ZYMOGRAPHY: PRINCIPLES, TYPES AND FACTORS OF INTERFERENCE

**ABSTRACT:** Zymography is a versatile and widely used method to evaluate the protein profile of a substrate. Due to its versatility, zymography can be adapted to investigate different enzymes, substrates, and biological systems, contributing to the understanding of metabolic processes, enzyme regulation, and disease diagnosis. This study aims to review the principles of zymography, its main types, and technical indications, also informing about some of the main factors that influence its performance and that must be considered in its use. Zymography can be used to identify isoenzymes and structural variants of the same enzyme, monitor metabolic processes, and discover metabolic markers of diseases, identifying changes relevant to their diagnosis and prognosis. The different types of zymography determine the visualization of enzymatic activity in different spatial contexts regarding the location and distribution of enzymes. Although the techniques share similarities, each has distinct characteristics. The choice of the most appropriate technique should consider the specific objectives of the study and the characteristics of the sample to be investigated. Additional improvements in this technique will allow the continuous development of new diagnostic tools and the development of specific methods for the study of proteins.

**KEYWORDS:** Zymography. Protein. Enzymology. Matrix Metalloproteinase. Biochemical Assays.

## 1 | INTRODUÇÃO

A Zimografia é um método não quantitativo utilizado para avaliar o perfil de proteínas de um substrato. Devido a sua versatilidade a zimografia pode ser adaptada para investigar diferentes enzimas, substratos e sistemas biológicos. Sua aplicação é ampla e contribui para a melhor compreensão de processos bioquímicos e moleculares.

Lars Ernster e Sture Forsén criaram a zimografia na década de 1960. Eles buscavam uma técnica sensível e de fácil aplicação para estudar a atividade de enzimas em sistemas biológicos. Inicialmente, ela foi utilizada para estudar a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Ao longo do tempo, a zimografia tornou-se uma ferramenta valiosa, permitindo a análise da atividade enzimática em diversos contextos, desde estudos bioquímicos básicos até aplicações clínicas e de pesquisa em várias áreas da ciência e contribuindo para avanços significativos para a compreensão de processos metabólicos, regulação enzimática e diagnóstico de doenças relacionadas às atividades enzimáticas alteradas.

A versatilidade da zimografia permite que ela seja adaptada para analisar a atividade de proteínas e outras moléculas como as de RNAs e outras envolvidas na síntese proteica, de lipídios, oligo e polissacarídeos.

Nos últimos anos o número de artigos científicos publicados que utilizam a zimografia tem aumentado significativamente, principalmente em estudos das proteases. No entanto, apesar de aproximadamente 50 anos de descoberta ainda é reduzido o número de estudos que abordem a zimografia como técnica em si. Fato identificado pelo

escasso número de publicações científicas que contém o termo como título ou palavra-chave. Assim, este estudo tem por objetivo rever os princípios da técnica de zimografia, os principais tipos e indicações da técnica, informando ainda a respeito de alguns dos principais fatores que influenciam sua performance e devem ser considerados na realização de ensaios que utilizam a zimografia.

## 2 | USOS E APLICAÇÕES

Dentre as aplicações da zimografia possibilita a identificação de isoenzimas, variantes estruturais de uma mesma enzima, ou seja, são diferentes formas de uma enzima específica que possuem propriedades bioquímicas e fisiológicas semelhantes, mas com algumas diferenças em sua estrutura molecular.

As diferenças observadas em isoenzimas podem surgir devido a variações genéticas, modificando a sequência de aminoácidos ou a estrutura tridimensional da enzima. As isoformas podem apresentar variações na sua atividade, especificidade de substrato, estabilidade ou regulação. Diferenças que podem ser relevantes em termos de diagnóstico, prognóstico e monitoramento de doenças, bem como na compreensão dos mecanismos envolvidos em processos biológicos complexos.

Técnicas como a zimografia têm um papel crucial no monitoramento de processos metabólicos através da investigação dos perfis metabólicos e na descoberta de marcadores metabólicos de doenças. Através do monitoramento desses perfis é possível a identificação de desequilíbrios metabólicos, deficiências nutricionais, disfunções metabólicas e alterações bioquímicas associadas a diferentes condições fisiológicas e patológicas, o que auxilia o diagnóstico precoce de doenças, o monitoramento da eficácia de tratamentos e na avaliação da progressão de doenças ao longo do tempo.

Estudos de expressão gênica utilizam zimografia para uma abordagem funcional da atividade enzimática, e assim conhecer e compreender os mecanismos moleculares subjacentes em diferentes processos biológicos. A análise da expressão gênica permite identificar quais genes estão ativos em determinadas condições e entender como eles são regulados. Isso é fundamental para compreender o desenvolvimento normal e patológico de tecidos e órgãos, assim como as respostas biológicas a estímulos externos, como estresse, doenças ou tratamentos medicamentosos.

A zimografia também encontra aplicação na área da Odontologia, especialmente em estudos relacionados à atividade enzimática em tecidos orais e materiais odontológicos. A avaliação da atividade enzimática da saliva permite avaliar enzimas que desempenham funções específicas e contribuem para que a saliva desempenhe seu importante papel na manutenção da saúde bucal. Na periodontia, a zimografia pode ser empregada para estudar a atividade de enzimas associadas a doenças periodontais, e auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão e tratamento dessas doenças. A zimografia

pode ser utilizada para investigar a atividade de enzimas relacionadas à degradação e remodelação da dentina o que é de grande interesse em estudos sobre adesão dentinária, onde a interação entre resinas e a dentina é avaliada em busca da maior longevidade de restaurações dentárias. A zimografia também pode ser utilizada para avaliar a liberação e a atividade de enzimas em materiais odontológicos, como cimentos de ionômero de vidro e materiais restauradores. Isso ajuda a compreender a interação entre esses materiais e o tecido dental, bem como sua biocompatibilidade e propriedades de liberação de íons e substâncias bioativas. Esses são apenas alguns exemplos de aplicação da zimografia na Odontologia. A técnica pode ainda fornecer informações valiosas sobre a atividade enzimática em tecidos orais, interações material-tecido e processos patológicos relacionados à saúde bucal, contribuindo para avanços na área odontológica e no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

### 3 | PRINCÍPIOS DA ZIMOGRAFIA

A zimografia em gel deu origem aos diferentes tipos de zimografias disponíveis atualmente. Ela permite detectar e quantificar a atividade de enzimas de um substrato através da aplicação de uma amostra previamente preparada em um gel de poliacrilamida. Através da eletroforese, a amostra correrá ao longo do gel e se distribuirá de acordo com suas propriedades de mobilidade e atividade no gel.

A eletroforese é uma técnica capaz de separar moléculas carregadas eletricamente como proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos. Ela é baseada na aplicação de uma corrente elétrica em um gel ou meio de separação, que faz com que as moléculas se movam em direção ao polo oposto carregado. Isso faz com que as moléculas se separem, de acordo com suas características de mobilidade no campo elétrico aplicado. Como resultado, a atividade enzimática é visualizada como áreas de clareamento no gel, indicando quais substratos ou condições elas estão presentes.

Existem diferentes métodos para estudar o perfil de proteínas em um substrato, como os métodos colorimétricos, fluorométricos, eletroquímicos, a cromatografia e a espectrofotometria. No entanto, a zimografia é o mais frequentemente utilizado. Sua simplicidade, sensibilidade e capacidade de identificar formas ativas e latentes contribui para sua escolha.

Há diferentes tipos de zimografia. Eles podem ser classificados de acordo com o tipo de enzima que são capazes de detectar ou em função do substrato. O tipo mais frequentemente utilizado é a zimografia em gel. Mas há também a zimografia *in situ* e a zimografia *in vivo*.

## 4 | TIPOS DE ZIMOGRAFIA

Os diferentes tipos de zimografia determinam a visualização da atividade enzimática em contextos espaciais diferentes quanto à localização e à distribuição das enzimas. Embora as técnicas compartilhem semelhanças, cada uma possui características distintas. A escolha da técnica mais adequada deve considerar os objetivos específicos do estudo e as características da amostra a ser investigada.

Desde sua primeira descrição, por Gross e Lapière que investigaram a degradação do colágeno no tecido de girinos, quando foi descrita pela primeira vez uma matriz metaloproteinase (MMP), uma enzima proteolítica. Desde então a técnica tem sido adaptada e aprimorada ao longo do tempo. A evolução da técnica e o desenvolvimento dos diferentes tipos de zimografias são acompanhados pela investigação e produção de conhecimento a respeito das MMPs e seus inibidores, conhecidos por TIMPs (inibidores teciduais e matriz metaloproteinases). A seguir são apresentados alguns dos principais tipos de zimografia e que marcaram a evolução da técnica.

### 4.1 Zimografia em gel

A zimografia em gel foi introduzida em 1973, quando era denominada de denominada zimografia de sobreposição ou zimografia indireta. Com ela é possível analisar qualquer célula ou lisado de tecido, cultura de células ou fluido corporal. O procedimento envolve a separação das proteínas em um gel de poliacrilamida, utilizando a eletroforese em gel. Após a separação, o gel é incubado em uma solução contendo um substrato específico para a enzima de interesse. A enzima presente na amostra irá digerir o substrato, resultando na formação de bandas ou manchas correspondentes à atividade enzimática. Para visualizar as bandas ou manchas de atividade enzimática, podem ser utilizados diferentes métodos, como a coloração específica para a enzima, reações de precipitação ou fluorescência. As áreas onde ocorre a atividade enzimática aparecem como bandas ou manchas. A distribuição das bandas é comparada a um controle em que são conhecidos os tamanhos e pesos moleculares. Assim, a intensidade e a localização dessas bandas ou manchas podem ser analisadas e quantificadas para obter informações sobre a atividade enzimática presente na amostra. Apesar de se um método qualitativo, quando associada a outras metodologias pode informar sobre a quantidade de enzima presente na amostra e nessas condições é classificada como semiquantitativa.

A zimografia em gel convencional requer a copolimerização do substrato com acrilamida no gel de separação de SDS-PAGE. Após a separação da amostra por SDS-PAGE sem a presença de agente redutor, ocorre a troca do SDS por um detergente não iônico com uma concentração micelar crítica reduzida. Isso possibilita a parcial reestruturação das enzimas em sua conformação ativa.

A zimografia em gel é uma técnica amplamente utilizada em pesquisas nas áreas de biologia molecular, bioquímica, medicina e odontologia. A identificação e a caracterização

de enzimas específicas permitem insights sobre sua atividade, distribuição e regulação sob diferentes desafios experimentais.

## 4.2 Zimografia *in situ*

A zimografia *in situ* passou a ser amplamente utilizada a partir da marcação de substratos com fluorescência e da disponibilidade de equipamentos apropriados para visualizar a fluorescência. Ela é uma técnica que permite visualizar a atividade enzimática em tecidos ou células intactas, preservando sua estrutura e contexto espacial. Nesse método, os tecidos são fixados e tratados com um substrato específico para a enzima de interesse, que é convertido em um produto detectável quando metabolizado pela enzima. A reação enzimática ocorre no local onde a enzima está presente no tecido, permitindo a visualização direta da atividade enzimática no contexto anatômico original.

Após a incubação do substrato, os tecidos são lavados e processados para preservar sua morfologia e permitir a análise posterior. A zimografia *in situ* pode ser realizada em diferentes escalas, desde o nível de órgãos inteiros até o nível celular. A detecção da atividade enzimática pode ser feita utilizando ainda métodos de coloração, imunohistoquímica ou técnicas de hibridização *in situ*, dependendo do tipo de enzima e do objetivo do estudo.

A zimografia *in situ* tem sido amplamente utilizada em estudos de desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, resposta a lesões e estímulos e em condições de doença. Ela fornece informações sobre a localização espacial da atividade enzimática em tecidos complexos, permitindo uma compreensão mais abrangente dos processos biológicos. Além disso, a zimografia *in situ* pode auxiliar na identificação de células ou regiões específicas que apresentam atividade enzimática alterada em condições patológicas, fornecendo insights importantes sobre mecanismos de doenças e potenciais alvos terapêuticos.

## 4.3 Zimografia *in vivo*

A zimografia *in vivo* é geralmente realizada em modelos animais, como camundongos transgênicos ou organismo modelo, nos quais a expressão de uma enzima específica é marcada com um sinal fluorescente ou outro marcador visível.

Alguns dos modelos animais mais comumente utilizados incluem camundongos, ratos, coelhos e porcos. Esses modelos apresentam vantagens específicas, como tamanho, facilidade de manipulação, disponibilidade e semelhanças fisiológicas e genéticas com os seres humanos em certos aspectos. A escolha do modelo animal depende do objetivo do estudo e da natureza da enzima que está sendo investigada. Por exemplo, camundongos e ratos são frequentemente utilizados devido à sua disponibilidade, facilidade de manipulação genética e semelhanças em muitos aspectos biológicos. Por outro lado, coelhos e porcos podem ser preferidos para estudos que requerem uma escala maior ou para investigações que visam simular condições mais próximas das encontradas em humanos.

No procedimento, o organismo é preparado para permitir a visualização da atividade enzimática em tempo real. Isso pode envolver a administração de um substrato específico que é convertido em um produto fluorescente ou detectável, quando metabolizado pela enzima de interesse. A atividade enzimática é então monitorada utilizando técnicas de imagem, como microscopia confocal ou tomografia de fluorescência, que permitem visualizar a distribuição espacial da atividade enzimática no organismo vivo.

A zimografia *in vivo* tem se mostrado uma ferramenta poderosa em diversas áreas de pesquisa, incluindo biologia celular, desenvolvimento embrionário, fisiologia e patologia. Ela permite a compreensão de processos enzimáticos em condições fisiológicas mais próximas da realidade, contribuindo para a elucidação de mecanismos moleculares e o avanço do conhecimento científico. A zimografia *in vivo* tem potencial para auxiliar na identificação e validação de alvos terapêuticos, bem como na avaliação de respostas a tratamentos e medicamentos em estudos pré-clínicos. No entanto, vale ressaltar que a zimografia *in vivo* pode exigir técnicas avançadas e específicas, além de considerações éticas relacionadas ao uso de animais em experimentação.

As zimografias em gel, *in situ* e *in vivo* se complementam. Juntas elas permitem obter informações que não são obtidas por imunoenaios convencionais ou outras técnicas, principalmente quando são investigados precursores inativos ou quando há a presença de diferentes formas de regulação pós-traducional.

#### **4.4 Zimografia em gel de gradiente**

Atualmente, a zimografia mais avançada é a zimografia em gel de gradiente. Nesse método, é utilizado um gel de poliacrilamida que possui uma concentração variável de acrilamida ao longo do seu comprimento. Isso cria um gradiente de porosidade no gel, permitindo a melhor separação e resolução das proteínas. Com essa abordagem, é possível obter a separação mais precisa das enzimas e a melhor visualização da atividade enzimática em diferentes regiões do gel.

A zimografia em gel de gradiente oferece vantagens em relação à zimografia em gel convencional, pois permite a melhor separação de proteínas de diferentes tamanhos e pesos moleculares. Isso é especialmente útil quando se trabalha com enzimas que possuem diferentes formas, isoformas ou complexos multienzimáticos. Além disso, a zimografia em gel de gradiente oferece maior sensibilidade na detecção da atividade enzimática, possibilitando uma análise mais precisa e quantitativa. Esse método tem sido amplamente utilizado para investigar a atividade enzimática em diversas áreas, incluindo biologia celular, bioquímica, medicina e odontologia. Ela auxilia na melhor compreensão de processos bioquímicos e fisiológicos que envolvem as enzimas, fornecendo informações valiosas para a pesquisa científica e o desenvolvimento de novas terapias e tratamentos.

## 4.5 Zimografia reversa

A técnica da zimografia reversa foi descrita pela primeira vez em 1999 e diferentemente da zimografia convencional, em que as enzimas são ativadas e digerem um substrato presente no gel, na zimografia reversa, as enzimas são inativadas durante a eletroforese. Em seguida, o gel é submetido a condições específicas para a renaturação das enzimas, através da remoção de detergentes desnaturantes e da adição de agentes de renaturação, como íons metálicos e cofatores específicos, que permitem que a proteína recupere sua conformação tridimensional e conseqüentemente a sua atividade.

## 5 | FATORES DE INTERFERÊNCIA

### 5.1 Resolução espacial e sensibilidade

A resolução espacial na zimografia se refere à capacidade de identificar a localização e a distribuição das enzimas em um tecido ou substrato. Quanto maior a resolução espacial, mais precisa será a visualização da atividade enzimática e quanto mais complexa for a amostra, maior será a necessidade de utilizar uma técnica com maior capacidade de resolução. A resolução espacial também é influenciada pelo tipo de substrato e pela sensibilidade do método de detecção.

Variações na sensibilidade podem ocorrer por influência de diferentes fatores, que podem atuar em conjunto ou isoladamente. A enzima de interesse e sua concentração na amostra, a afinidade do substrato e a capacidade de amplificação do sinal são alguns desses fatores. Métodos com elevada sensibilidade são capazes de detectar concentrações reduzidas de enzimas com maior precisão, o que é particularmente importante para amostras com baixa concentração ou quando se deseja detectar enzimas com níveis sutis de atividade.

### 5.2 Substrato

Em zimografia substratos são moléculas adicionadas às amostras com a função de detectar a atividade enzimática. Eles são reconhecidos e metabolizados pelas enzimas-alvo e desencadeiam uma resposta mensurável que pode ser observada visualmente ou quantificada. A resposta obtida pode ser colorida, fluorescente, quimiluminescente ou outro sinal detectável, de acordo com o método de detecção utilizado na zimografia. A escolha adequada do substrato é fundamental para garantir a sensibilidade e a especificidade da detecção da atividade enzimática e dependerá da enzima alvo e do método de zimografia utilizado.

Existem diferentes tipos de substratos e cada um é projetado para detectar a atividade de uma enzima específica. Para a enzima fosfatase alcalina são utilizados o 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) e nitro blue tetrazolium (NBT), que geram um precipitado azul quando fosfatase alcalina está presente. Para a enzima peroxidase

a indicação é o 3,3'-diaminobenzidina (DAB), que gera uma coloração marrom quando a peroxidase está ativa. Para a enzima beta-galactosidase utiliza-se o X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo), que gera um produto azul. No caso das metaloproteinases, um substrato amplamente empregado em estudos de zimografia é a gelatina. Quando as metaloproteinases degradam a gelatina, surgem áreas claras ou pontos distintos no gel, que são facilmente observáveis. Um exemplo comum é o uso da gelatina fluoresceína conjugada (DQ gelatina), na qual a degradação da gelatina resulta na emissão de fluorescência, permitindo a detecção e quantificação da atividade enzimática.

### 5.3 Gel

A acrilamida desempenha um papel fundamental na preparação do gel para a zimografia. Juntamente com a bis-acrilamida, ela é utilizada como um dos principais componentes para estabelecer a matriz polimérica do gel, assegurando sua funcionalidade. Durante o processo de preparação do gel de acrilamida, é necessário o uso de um iniciador e um catalisador para iniciar a reação de polimerização. O N,N,N',N'-tetrametilenodiamina peróxido (TEMED) e o persulfato de amônio (APS) são comumente empregados como iniciador e catalisador, respectivamente. Esses reagentes são adicionados à mistura de acrilamida/bis-acrilamida antes de serem colocados na placa de gel. Além disso, agentes de tamponamento, como o Tris-HCl, são frequentemente incluídos na solução do gel para manter o pH adequado para a polimerização. É comum adicionar SDS (dodecil sulfato de sódio) ou outros detergentes aniônicos para desnaturar as proteínas durante o processo de eletroforese. É importante ressaltar que a composição exata do gel pode variar dependendo do tipo de zimografia e das enzimas ou proteínas específicas em estudo. Diferentes protocolos podem incorporar aditivos específicos ou modificações para aprimorar a separação e a visualização das proteínas de interesse.

### 5.4 Tampão

A função de uma solução tampão é uma solução química utilizada para preservar a estabilidade do ambiente onde ocorrem reações químicas ou bioquímicas, garantindo a manutenção de um pH específico. O preparo de uma solução tampão é feito através da combinação de um ácido fraco e sua base conjugada, ou um ácido forte e uma base fraca. Essa combinação permite que o tampão aceite ou libere íons H<sup>+</sup> (íons de hidrogênio) de forma controlada, evitando mudanças bruscas no pH da solução.

O pH é um fator crítico para a estabilidade e atividade da enzima, portanto, usar um tampão apropriado garante que as enzimas permaneçam ativas e funcionem adequadamente durante a análise zimográfica. A escolha do tampão certo depende da faixa de pH desejada e da faixa de trabalho específica de cada aplicação. Existem vários tipos de tampões (fosfato, Tris e acetato) e cada um deles tem sua faixa de pH ideal, na qual possui propriedades específicas.

Os tampões também auxiliam na estabilização das proteínas durante a eletrofose. A presença de agentes redutores ou detergentes nos tampões auxiliam prevenindo a desnaturação e a agregação das proteínas. Isso permite que a estrutura e a atividade das proteínas sejam mantidas durante a análise. Os íons presentes nas soluções tampão facilitam o fluxo de corrente elétrica através do gel, o que assegura a separação das proteínas de acordo com seus pesos moleculares.

## 6 | CONCLUSÃO

Este capítulo destaca os princípios da zimografia, seus principais tipos, dando ênfase em suas principais características, indicações e fatores que podem influenciar os ensaios que utilizam a zimografia para a identificação de proteínas. O uso dos métodos aqui descritos permite a estudantes, pesquisadores e interessados obterem uma maior compreensão da técnica.

A zimografia é um dos principais métodos para detectar a atividade de diferentes proteínas e avaliar o perfil enzimático de uma ampla gama de amostras biológicas. Aperfeiçoamentos adicionais desta técnica permitirão o contínuo desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico e o desenvolvimento de métodos específicos para o estudo de proteínas.

## REFERÊNCIAS

- Choudhary P, Mishra VK, Swarnakar S. Zymography and Reverse Zymography for Testing Proteases and Their Inhibitors. In: Deep G, editor. *Cancer Biomarkers*. New York. Springer US; 2022. p. 107–20. (Methods in Molecular Biology; vol. 2413).
- Gu L, Mazzoni A, Gou Y, Pucci C, Breschi L, Pashley DH, et al. Zymography of Hybrid Layers Created Using Extrafibrillar Demineralization. *J Dent Res*. 2018 Apr;97(4):409–15.
- Leonard AK, Loughran EA, Klymenko Y, Liu Y, Kim O, Asem M, et al. Methods for the visualization and analysis of extracellular matrix protein structure and degradation. *Methods in Cell Biology*. 2018;143:79–95.
- Zhang Y, Wan R, Zhang Q, Mo Y. Application of Gelatin Zymography in Nanotoxicity Research. In: Zhang Q, editor. *Nanotoxicity*. New York. Springer New York; 2019. p. 133–43. (Methods in Molecular Biology; vol. 1894).
- Ren Z, Chen J, Khalil RA. Zymography as a Research Tool in the Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Methods Mol Biol*. 2017;1626:79-102.
- Ricci S, D'Esposito V, Oriente F, Formisano P, Di Carlo A. Substrate-zymography: a still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2015

Sharma K, Bhattacharyya D. Reverse Zymography: Overview and Pitfalls. In: Wilkesman J, Kurz L, editors. Zymography [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017. p. 125–32. (Methods in Molecular Biology; vol. 1626).

Snoek-van Beurden PAM, Von Den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques*. 2005;38(1):73–83.

Soleimany AP, Kirkpatrick JD, Su S, Dudani JS, Zhong Q, Bekdemir A, et al. Activatable Zymography Probes Enable In Situ Localization of Protease Dysregulation in Cancer. *Cancer Research*. 2021;81(1):213–24.

Wilkesman J, Kurz L. Advances in Zymography Techniques and Patents Regarding Protease Analysis. *BIOT*. 2012 Jul 1;6(2):106–14.

Wilkesman J, Kurz L. Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents. *Recent Patents on Biotechnology*. 2009;3:175–84.