

## Análise da atividade enzimática de *MMP-2* e *9* coletadas por *swab* em úlcera venosa de membro inferior

### *Enzymatic activity analysis of MMP-2 and 9 collected by swab from lower limb venous ulcers*

Flávio Santos da Silva<sup>1</sup>, Diego Neves Araujo<sup>1</sup>, João Paulo Matos Santos Lima<sup>2</sup>, Adriana Augusto de Rezende<sup>3</sup>, Bento João da Graça Azevedo Abreu<sup>4</sup>, Fernando Augusto Lavezzo Dias<sup>1,5</sup>

#### Resumo

As metaloproteinases participam do reparo das úlceras venosas de membros inferiores. Até o momento, estudos de atividade enzimática utilizaram, em sua maior parte, biópsia das úlceras. Objetivamos avaliar a viabilidade da mensuração da atividade enzimática de metaloproteinases 2 e 9, extraídas por *swab*, em amostras de exsudato de úlcera venosa, através de zimografia. O método de processamento da amostra coletada mostrou-se viável, visto que foi possível obter concentração proteica adequada para análise. Através de zimografia, observamos que as quantidades de proteína total das amostras carregadas nos géis entre 0,125 e 0,5 µg, além do tempo de ativação enzimática de 19 horas (a 37 °C), foram parâmetros adequados e de melhor resultado para a análise da atividade gelatinolítica. A coleta através de *swab* mostrou-se um método simples, rápido e eficaz para a coleta de fluido de úlcera venosa com o objetivo de mensuração da atividade gelatinolítica com grau mínimo de invasividade.

**Palavras-chave:** úlcera venosa; metaloproteinases; gelatinases.

#### Abstract

Metalloproteinases play a role in repair of venous ulcers of the lower limbs. The great majority of studies of metalloproteinase enzyme activity conducted to date have employed material from biopsies of ulcers. We evaluated the viability of using zymography to measure the enzyme activity of metalloproteinases 2 and 9 in samples of venous ulcer exudate collected on swabs. The method chosen for processing the samples proved viable in terms of its ability to provide adequate protein concentrations for analysis. Using zymography, we observed that the parameters that provided the best results for analysis of gelatinolytic activity were 0.125 to 0.5 µg of total protein content in the gels and enzymatic activation time of 19 hours (at 37 °C). Collection of venous ulcer fluid using swabs proved to be a simple, rapid and effective method for obtaining samples for measurement of gelatinolytic activity with a minimum degree of invasivity.

**Keywords:** venous ulcer; metalloproteinases; gelatinases.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Natal, RN, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Departamento de Bioquímica, Natal, RN, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Natal, RN, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Departamento de Morfologia, Natal, RN, Brasil.

<sup>5</sup>Universidade Federal do Paraná – UFPR, Departamento de Fisiologia, Curitiba, PR, Brasil.

Fonte de financiamento: O trabalho teve o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Norte (FAPERN) e CT-INFRA, intermediado pelo MCT/CNPq, através do Edital PPP 2009, do Ministério da Ciência e Tecnologia e do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), através do Edital UNIVERSAL 2010, e contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Bolsas de Mestrado de FSS e DNA).

Conflito de interesse: Os autores declararam não haver conflitos de interesse que precisam ser informados.

Submetido em: 22.03.14. Aceito em: 27.05.14.

O estudo foi realizado no Hospital Universitário Onofre Lopes (etapa de coleta) e no Departamento de Bioquímica do Centro de Biociências (etapa de análise), Campus Central da UFRN, Natal-RN, Brasil.

## ■ INTRODUÇÃO

As úlceras cutâneas venosas (UVs), decorrentes de insuficiência venosa crônica, possuem característica recidivante e processo de cicatrização lento, podendo causar edema, dor, desconforto, diminuição da mobilidade e impactar a qualidade de vida<sup>1,2</sup>. As UVs representam 70 a 80% das úlceras de membros inferiores e seu tratamento acarreta altos custos com serviços de saúde<sup>3,4</sup>. O tratamento destas úlceras, visando a cicatrização completa, bem como a determinação do prognóstico de cicatrização, são difíceis.

Dentre os reguladores fisiológicos do processo de reparo tecidual, estão as metaloproteinases (MMPs)<sup>5</sup>. As MMPs constituem uma família de enzimas zinco-dependentes que degradam várias moléculas da matriz extracelular (MEC). O balanço entre a produção de proteínas da MEC e a ação das MMPs é o principal determinante do remodelamento tecidual na homeostasia e na resposta a uma lesão<sup>6</sup>. Entretanto, quando a expressão de MMPs e sua cinética de atividade estão descontroladas, devido a altas taxas de síntese ou à falta de mecanismos regulatórios/inibitórios, seus efeitos podem ser deletérios. Tal desregulação pode contribuir para a destruição e a perda das propriedades mecânicas normais do tecido conjuntivo e para a cronicidade da ferida<sup>7,8</sup>.

Estudos verificaram um aumento global da atividade e da expressão de MMPs em UVs<sup>7,9</sup>. Nesse contexto, as MMPs 2 e 9, também conhecidas como gelatinases, têm recebido atenção especial. A expressão tecidual específica de MMP-9 é indicada como marcador prognóstico da cicatrização de úlceras crônicas<sup>10</sup>. Em estudo prévio, foram demonstrados altos níveis das MMPs 2 e 9 em UVs crônicas de membros inferiores<sup>9</sup>, sugerindo um papel crítico destas duas isoformas de MMPs na cicatrização de úlceras venosas. Desse modo, a expressão e a atividade dessas enzimas podem servir como marcadores para avaliar a efetividade e o mecanismo de ação de intervenções terapêuticas que visem acelerar o processo de cicatrização de úlceras crônicas.

A avaliação da atividade das MMPs 2 e 9 pode ser feita por zimografia, um método prático, reprodutível e de baixo custo. Contudo, o método de coleta de material biológico para análise de MMPs nos estudos envolve biópsia tecidual, o que dificulta a análise serial e causa desconforto e risco para o paciente, além de não ser tecnicamente prática para todos os profissionais de saúde. Outras técnicas, como a

aspiração do exsudato, requerem uso de curativos específicos e demandam tempo<sup>11</sup>.

O objetivo do presente estudo foi determinar a viabilidade da avaliação da atividade enzimática das MMPs 2 e 9 através de um protocolo modificado de zimografia, a partir de amostras extraídas do exsudato de UV de membro inferior utilizando *swab*. Idealizamos um método simples, rápido, minimamente invasivo e de baixo custo, para extração serial (em diferentes fases da cicatrização) desse tipo de material biológico e análise da atividade de MMPs.

## ■ MÉTODO

### Sujeitos

Foram estudadas amostras de seis pacientes com UV crônica de membro inferior, usuários do serviço ambulatorial do hospital universitário local. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo 376/09). Os resultados são dados preliminares do ensaio clínico registrado com número RBR-44xmsx. Os pacientes apresentavam UV por pelo menos oito semanas, sem sinais clínicos de infecção ou doença arterial obstrutiva periférica, determinada pela aferição do índice tornozelo-braquial.

### Coleta e processamento da amostra

Amostras de fluido proveniente da UV foram obtidas através de bastão com algodão estéril na ponta (*swab*), com movimentos de rolamento, lentos, de borda a borda, após pouca irrigação com solução salina estéril. O procedimento ocorreu durante a troca de curativo primário. Em seguida, as pontas dos *swabs* contendo as amostras coletadas foram colocadas em microtubos de 2 mL, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o processamento de extração proteica, após duas a três semanas.

Para homogeneização, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de tampão de homogeneização aos *swabs* nos microtubos, composto de 50 mM Tris-HCl (pH 7,4); 3,1 mM Sacarose; 0,1% Triton X-100, à temperatura de 4  $^{\circ}\text{C}$ , sem agente redutor. As amostras foram misturadas em vórtex cinco vezes por 3 s, com repouso de 15 s entre as misturas. Posteriormente, os *swabs* foram invertidos nos microtubos e centrifugados (dois minutos, 10.000 rpm, 4  $^{\circ}\text{C}$ ). Durante todo o procedimento, as amostras foram mantidas em gelo. A Figura 1 sumariza as etapas descritas.

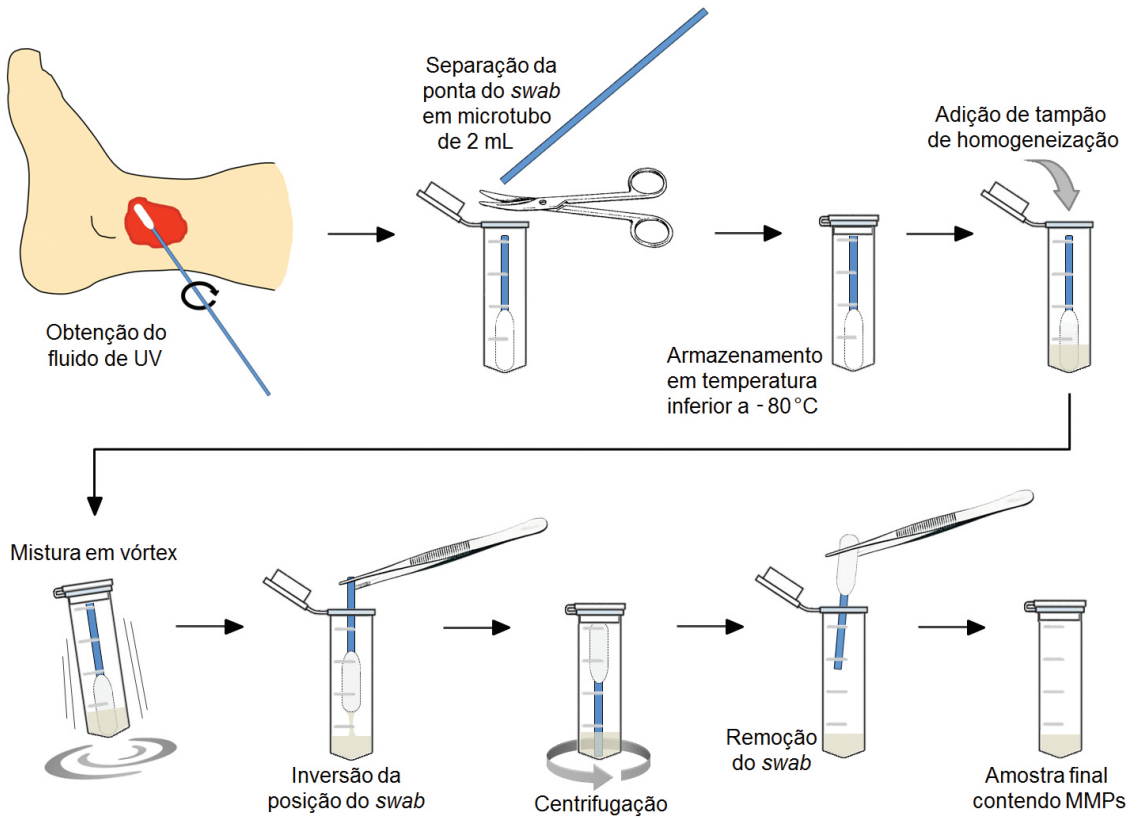


Figura 1. Fluxograma dos procedimentos de coleta e processamento das amostras. Estão representadas desde as etapas de obtenção do exsudato venoso com *swab* até a aquisição da amostra final, contendo MMPs, para as análises subsequentes.

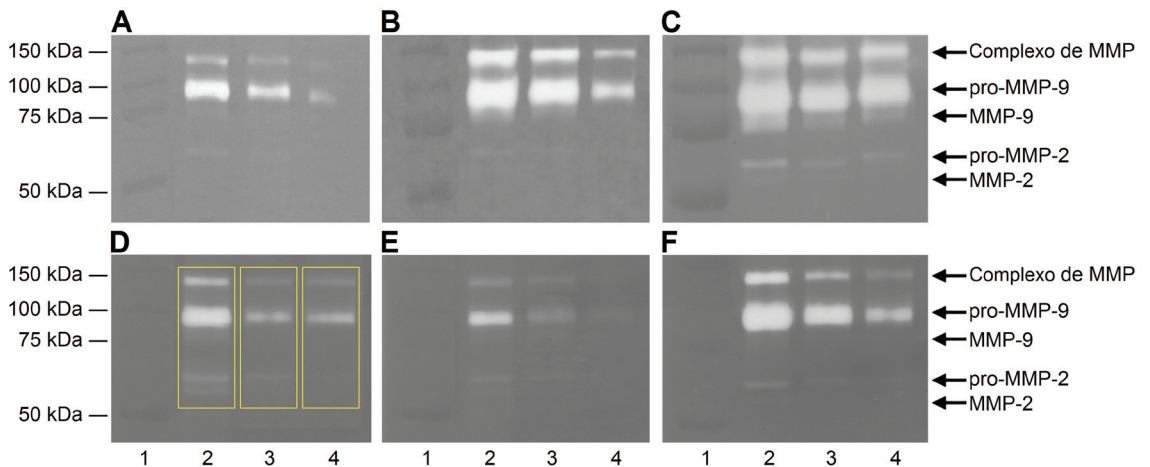


Figura 2. Géis de zimografia das seis amostras colhidas com *swab*. À esquerda, são mostrados os pesos moleculares dos marcadores; à direita estão indicadas as isoformas das metaloproteinases (MMPs) evidenciadas nos géis. Em **D**, é mostrado como o conjunto de bandas em cada poço foi selecionado para densitometria com o programa ImageJ. Complexo de MMP (130 kDa); pro-MMP-9 (92k Da); MMP-9 (84 kDa); pro-MMP-2 (72 kDa); MMP-2 (62 kDa). Poço 1: Marcadores, poços 2, 3 e 4: 0,5 µg, 0,25 µg e 0,125 µg, respectivamente.

A concentração proteica foi determinada pelo Método de Bradford e quantificada utilizando-se controles padrões feitos a partir de albumina bovina em leitor de ELISA. A leitura foi feita em 595 nm, dez minutos após o ensaio, contra um branco de referência.

### Atividade enzimática de MMPs por zimografia

As amostras foram separadas em géis de poli(acrilamida na concentração de 8% de Acrilamida/Bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad®), 0,1% SDS, pH 8,8 e contendo 1 mg/mL de gelatina (de pele suína, tipo A, G2500 - Sigma-Aldrich®). O gel de empacotamento foi de concentração de 4%, pH 6,8 e 0,1% SDS. As proteínas foram separadas sob voltagem constante de 100 V em tampão da seguinte concentração: 192 mM Glicina; 25 mM Tris; 0,1% SDS.

Após eletroforese, os géis foram imersos e agitados em solução de Triton (2,5% Triton X-100; 50 mM Tris, pH 7,4; 5 mM CaCl<sub>2</sub>) para remoção do SDS (três trocas em 60 minutos).

Em seguida, os géis foram imersos em solução de incubação, composta por 50 mM Tris (pH 7,4); 5 mM CaCl<sub>2</sub>; 150 mM NaCl, para ativação das MMPs a uma temperatura de 37 °C por 19 horas. Após a incubação, foi realizada a coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,5% Coomassie blue em 30% metanol e 10% ácido acético). Os géis foram submersos no corante por 30 minutos, em agitação. Logo em seguida, os géis foram descorados (35% Metanol; 10% ácido acético) durante 30 minutos e depois colocados em água deionizada.

Para análise densitométrica, os géis foram digitalizados em *scanner* de mesa. A atividade enzimática das MMPs foi determinada pela intensidade das bandas claras contra o fundo corado e identificada de acordo com os pesos moleculares, conforme descrito previamente<sup>9,12</sup>, com o programa ImageJ 1.46 (NIH, <http://imagej.nih.gov/ij/>). Nesse programa, a imagem inicialmente foi transformada em 8-bits. Depois, uma área retangular foi selecionada, envolvendo as bandas (áreas de digestão enzimática) e parte do fundo corado do gel. O contraste entre esses dois elementos pôde, então, ser demonstrado graficamente, indicando o nível de degradação da gelatina contida no gel<sup>13</sup>.

## RESULTADOS

Inicialmente, constatamos a obtenção de quantidade proteica adequada de fluido de UV colhida através de *swab*, por meio do método de Bradford, em placa de ELISA (Tabela 1).

Testamos e definimos a concentração ideal de 8% para o gel de poli(acrilamida, bem como um tempo de incubação para ativação enzimática de 19 horas e quantidades ideais de proteína total carregadas por poço nos géis entre 0,125 µg e 0,50 µg, para melhor visualização e quantificação das bandas.

A Figura 2 ilustra os resultados da zimografia. Descrições anteriores<sup>9,12</sup> e cálculo da massa molecular permitiram identificar bandas referentes às formas de pró-MMP-9 e MMP-9, e pró-MMP-2 e MMP-2. Também se pode observar atividade gelatinolítica entre 100 kDa e 150 kDa (~130 kDa), descrito na literatura como um complexo de MMP, provavelmente contendo MMP-9<sup>9,12</sup>. As bandas correspondentes às formas latente e ativa de cada enzima foram selecionadas conjuntamente (modelo da Figura 2D) e quantificadas por densitometria (Figura 3) para ilustração.

## DISCUSSÃO

O presente estudo descreve um método viável e reprodutível para a extração de MMPs do exsudato de UVs através de *swab* e para análise da atividade enzimática por zimografia. Até onde sabemos, esta é a primeira descrição desta forma minimamente invasiva de extração de MMPs, além da demonstração da viabilidade da análise bioquímica a partir deste pequeno volume de amostra.

Durante a insuficiência venosa crônica, tem sido descrita a ocorrência de ativação anormal de MMPs e um desequilíbrio entre as isoformas, o que conseqüentemente contribui para a formação e a manutenção da UV<sup>7-9,14</sup>. Dentre as MMPs, a MMP-9 parece ser um marcador prognóstico da cicatrização de úlceras crônicas<sup>10</sup>. Além disso, a evolução do processo cicatricial de feridas crônicas está associada à diminuição da expressão de algumas MMPs<sup>14</sup>. A partir disso, o desenvolvimento de uma técnica simples de coleta de material biológico para análise das MMPs possibilita uma avaliação serial do processo cicatricial da úlcera e um uso mais difundido para a pesquisa clínica.

Tabela 1. Concentração proteica das amostras.

Paciente	[proteína] (µg/µL)
1	0,452
2	0,376
3	0,468
4	0,425
5	0,211
6	0,329

O presente estudo demonstrou que a coleta de exsudato de UV por *swab* é um método viável e reprodutível para a avaliação da atividade enzimática de MMPs-2 e MMP-9 por zimografia. A zimografia é uma técnica relativamente simples, eficaz e sensível na identificação de MMPs pela degradação de seu substrato preferencial e pelo seu peso molecular, permitindo resultados quantitativos<sup>12</sup>.

Por se basear em procedimento minimamente invasivo, estéril, rápido e de fácil manipulação, a técnica descrita no presente estudo consiste em uma alternativa aos métodos invasivos que envolvem biópsia e avaliação histopatológica utilizados em estudos anteriores<sup>9,15</sup>. Embora a biópsia possa

fornecer informação topográfica, por exemplo, quando se compara o tecido das margens da ferida e o leito ulceroso, esta técnica requer anestesia local e causa desconforto ao paciente, o que dificulta a análise serial da ferida. O uso do exsudato através de aspiração, quando possível, ou pela coleta com *swab*, como apresentado neste estudo, reflete mais especificamente a atividade de MMPs do leito ulceroso. Embora os resultados destes dois métodos de coleta não tenham sido comparados em úlceras venosas, ambos apresentam concordância no caso de úlceras diabéticas<sup>16</sup>. Estudos futuros em úlceras venosas podem ser desenhados para avaliar a concordância entre o método baseado no *swab* e outros métodos, como a biópsia.

A técnica descrita no presente estudo também tem a vantagem de permitir a coleta por diversos profissionais da saúde, uma vez que não necessita de anestesia local, incisões ou perfurações, facilitando assim a análise da efetividade biológica de diversas intervenções terapêuticas.

## ■ CONCLUSÃO

A coleta através do *swab* mostrou-se um método minimamente invasivo, estéril, rápido, de fácil manuseio e eficaz para a coleta de fluido de UV, com o objetivo de extrair quantidade adequada de proteína total do exsudato de UV para análise da atividade enzimática de MMPs 2 e 9, através do protocolo de zimografia proposto no presente estudo.

## ■ REFERÊNCIAS

1. de Aguiar ET, Pinto LJ, Figueiredo MA, Savino Neto S. Úlcera de Insuficiência Venosa Crônica: Diretrizes sobre Diagnóstico, Prevenção e Tratamento da Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vasculares (SBACV). J Vasc Bras. 2005;4(Supl.2):S195-200.
2. Lopes CR, Figueiredo M, Ávila AM, Soares LMBM, Dionisio VC. Avaliação das limitações de úlcera venosa em membros inferiores. J Vasc Bras. 2013;12(1):5-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492013000100003>.
3. de Araujo T, Valencia I, Federman DG, Kirsner RS. Managing the patient with venous ulcers. Ann Intern Med. 2003;138(4):326-34. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-138-4-200302180-00012>. PMID:12585831
4. Wipke-Tevis DD, Rantz MJ, Mehr DR, et al. Prevalence, incidence, management, and predictors of venous ulcers in the long-term-care population using the MDS. Adv Skin Wound Care. 2000;13(5):218-24. PMID:11075021.
5. Benjamin MM, Khalil RA. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis and management of vascular disease. EXS. 2012;103:209-79. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-0348-0364-9\\_7](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-0348-0364-9_7). PMID:22642194
6. Dalton SJ, Mitchell DC, Whiting CV, Tarlton JF. Abnormal extracellular matrix metabolism in chronically ischemic skin: a

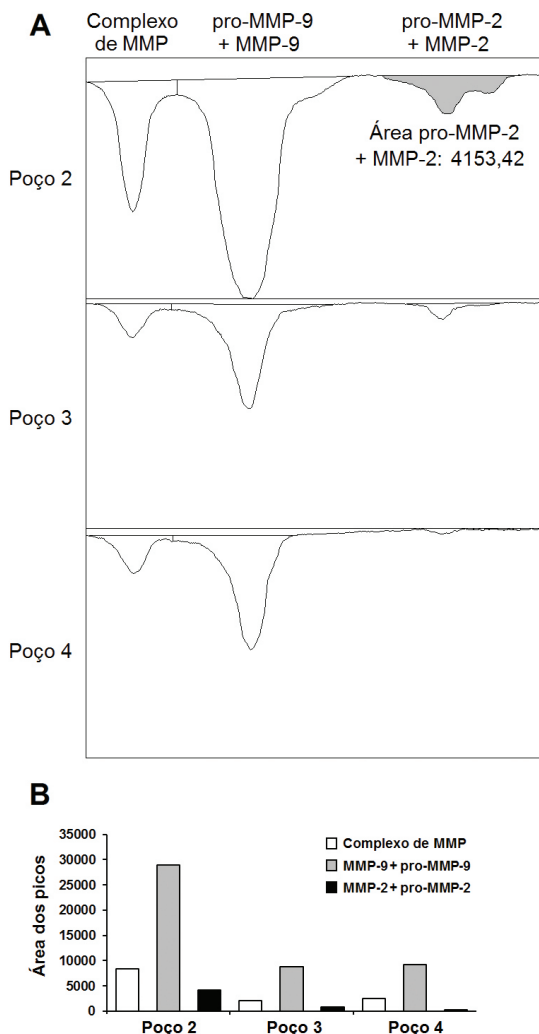


Figura 3. Quantificações das metaloproteinases (MMPs) em um dos géis analisados. **A**: curvas densitométricas (picos invertidos) das bandas em cada poço do gel. A área dos picos representa a atividade gelatinolítica. Notar a área destacada da atividade da MMP-2 no poço 2. **B**: medida da área dos picos em unidades arbitrárias visando à análise comparativa.

- mechanism for dermal failure in leg ulcers. *J Invest Dermatol.* 2005;125(2):373-9. PMID:16098049.
7. Meyer FJ, Burnand KG, Abisi S, Tekoppele JM, van Els B, Smith A. Effect of collagen turnover and matrix metalloproteinase activity on healing of venous leg ulcers. *Br J Surg.* 2008;95(3):319-25. <http://dx.doi.org/10.1002/bjs.5946>. PMID:17854113
  8. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med.* 2008;29(5):290-308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.002>. PMID:18619669
  9. Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol.* 1993;101(1):64-8. <http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12359590>. PMID:8392530
  10. Rayment EA, Upton Z, Shooter GK. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *Br J Dermatol.* 2008;158(5):951-61. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08462.x>. PMID:18284390
  11. Trengove NJ, Stacey MC, MacAuley S, et al. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen.* 1999;7(6):442-52. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1524-475X.1999.00442.x>. PMID:10633003
  12. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques.* 2005;38(1):73-83. <http://dx.doi.org/10.2144/05381RV01>. PMID:15679089
  13. Hu X, Beeton C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. *J Vis Exp.* 2010;(45):e2445. PMID:21085107.
  14. Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Multiplexed analysis of matrix metalloproteinases in leg ulcer tissue of patients with chronic venous insufficiency before and after compression therapy. *Wound Repair Regen.* 2008;16(5):642-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00415.x>. PMID:19128259
  15. La Rocca G, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, Taormina P, Minafra S. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *Br J Cancer.* 2004;90(7):1414-21. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6601725>. PMID:15054465
  16. Schmohl M, Beckert S, Joos TO, Königsrainer A, Schneiderhan-Marra N, Löffler MW. Superficial wound swabbing: a novel method of sampling and processing wound fluid for subsequent

immunoassay analysis in diabetic foot ulcerations. *Diabetes Care.* 2012;35(11):2113-20. <http://dx.doi.org/10.2337/dc11-2547>. PMID:22837363

#### Correspondência

Fernando Augusto Lavezzo Dias  
Universidade Federal do Paraná – UFPR  
Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia, Centro Politécnico  
Avenida Coronel Francisco H. dos Santos, 210 – Jardim das Américas  
CEP 81531-970 – Curitiba (PR), Brasil  
E-mail: fernandoaldias@gmail.com

#### Informações sobre os autores

FSS e DNA são Mestres em Fisioterapia pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), RN, Brasil.  
JPMSL é Doutor em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), RN, Brasil.  
AAR é Doutora em Bioquímica pela Universidade de São Paulo (USP), Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.  
BJGAA é Doutor em Biologia Celular pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Professor Adjunto do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), RN, Brasil.  
FALD é Doutor em Biologia Celular e Molecular (área de concentração Fisiologia) pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), Professor Adjunto do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), PR, Brasil.

#### Contribuições dos autores

Concepção e desenho do estudo: FALD  
Análise e interpretação dos dados: FSS, DNA, JPMSL, AAR, BJGAA, FALD  
Coleta de dados: FSS, DNA  
Redação do artigo: FSS, DNA, FALD  
Revisão crítica do texto: JPMSL, AAR, BJGAA, FALD  
Aprovação final do artigo\*: FSS, DNA, JPMSL, AAR, BJGAA, FALD  
Análise estatística: N/A  
Responsabilidade geral do estudo: FALD

\*Todos os autores leram e aprovaram a versão final submetida ao *J Vasc Bras.*