

Capítulo V. StSBTC-3: Una serín proteasa de *Solanum tuberosum* con actividad antiplaquetaria y fibrin(ogen) olítica

(Alfonso Pepe, Eugenia Frey, Fernando Muñoz, Belén Fernández, Gustavo Daleo, Gabriela Guevara).

Resumen

Las serín proteasas están ampliamente distribuidas y pueden ser encontradas en todos los reinos. Se han propuesto serín proteasas de plantas como agentes anticoagulantes y antiplaquetarios. En el presente trabajo reportamos la actividad fibrinogenolítica y antiplaquetaria de una proteasa del tipo subtilisina de *Solanum tuberosum* (StSBTC-3), previamente identificada y purificada en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos muestran que StSBTC-3 es capaz de degradar todas las cadenas del fibrinógeno y redissolver el coagulo de fibrina en forma dosis dependiente. También se realizó una caracterización bioquímica de la proteasa en estudio. El pH óptimo para la actividad fibrinogenolítica fue 8 y la temperatura óptima fue de 37 C. StSBTC-3 presentó un amplio rango de actividad en función del pH (5 a 12). En cuanto a la temperatura, presentó actividad entre 30 C 60 C. También se determinaron siete sitios de clivado de la cadena B de la insulina. Se realizaron ensayos para determinar la actividad antiplaquetaria. Estos muestran que StSBTC-3 es capaz de inhibir la agregación plaquetaria. StSBTC-3 no produce hemólisis a las concentraciones utilizadas.

Los resultados sugieren que StSBTC-3 puede ser evaluada para ser utilizada en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares con desórdenes trombóticos.

Introducción

Las enzimas proteolíticas (proteasas) juegan un papel importante en varios mecanismos bioquímicos para mantener procesos metabólicos en todos los organismos (van der Hoorn 2008; Laskar et al. 2012). Dentro del grupo 3 (hidrolasas) las proteasas del subgrupo 4 llevan a cabo la hidrólisis de enlaces peptídicos. A su vez este subgrupo se subdivide en seis clases catalíticas de acuerdo al mecanismo correspondiente. A saber: serin proteasas serine (EC 3.4.21); cysteine (EC 3.4.22);

aspartic; glutamic (EC 3.4.23); metalo (EC 3.4.24); and threonine (EC 3.4.25) (Barrett 2013; Hartley 1960).

Varias proteasas, en su mayoría serín proteasas, son conocidas por su actividad hemostática, pudiendo actuar tanto como pro o anticoagulantes (Kornalík & Vorlová 1990; Markland 1991; Siigur & Siigur 1992; Rajesh et al. 2005; Patel et al. 2012; Arima et al. 2000).

De acuerdo a su mecanismo de acción, los agentes trombolíticos son clasificados en dos grupos: uno está conformado por los activadores del plasminógeno como el activador tisular de plasminógeno (t-PA) o la urokinasa, el otro grupo corresponde a las proteínas tipo plasmina como la natokinasa (Sumi et al. 1987) y la lumbrokinasa (MIHARA et al. 1991) que pueden degradar directamente el coágulo de fibrina. Sin embargo estas enzimas son costosas y los pacientes pueden sufrir efectos secundarios no deseados como sangrado gastrointestinal o reacción alérgica (Lip et al. 2002; Bode et al. 1996). Debido a esto se siguen nuevos agentes antitrombóticos y anticoagulantes provenientes de distintas fuentes.

Las serín proteasas de plantas han sido ampliamente utilizadas en la industria alimenticia, en biotecnología y en medicina (Feijoo-Siota & Villa 2010). Como su contraparte en mamíferos, serpientes y microorganismos, las serin proteasas de plantas han sido propuestas como potenciales agentes anticoagulantes y antiplaquetarios. La proteasa AMP48, una serín proteasa de *Artocarpus heterophyllus* posee actividad antitrombótica (Siritapetawee et al. 2012). Por otro lado se ha purificado una proteasa proveniente del latex de *Euphorbia mili* que presenta actividad fibrinogenolítica (Fonseca et al. 2010). Choi et al. Han reportado la purificación y caracterización de una nueva serin proteasa bifuncional llamada Codiasa, proveniente del alga *Codium fragile* con actividad trombolítica, anticoagulante y antiplaquetaria (Choi et al. 2013). También puede mencionarse la purificación de una serin proteasa con actividad fibrinogenolítica proveniente de *Petasites japonicus* (Kim et al. 2015).

En una publicación previa de nuestro laboratorio hemos reportado la purificación, identificación y caracterización de una serin proteasa del tipo subtilisina de *Solanum tuberosum* llamada StSBTc-3 (Fernández et al. 2015).

El objetivo del presente trabajo es determinar si StSBTc-3 presenta actividad fibrinogenolítica y/o antiplaquetaria, así como también profundizar su caracterización bioquímica.

Materiales y métodos

Purificación de StSBTc-3

La proteasa StSBTc-3 fue purificada a partir del fluido intercelular de hojas de papa siguiendo el método previamente descrito por Fernandez et al. (Fernández et al. 2015).

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada por el método del ácido bicinónico (Smith et al. 1985) usando seroalbúmina bovina como estándar para la curva de calibración.

Determinación del tiempo de trombina

El tiempo de trombina es el tiempo que tarda en coagular una muestra de plasma pobre en plaquetas (PPP) cuando se le agrega trombina y Ca²⁺. El ensayo fue realizado según lo descrito por Shebuski (Ignjatovic 2013) usando un coagulómetro automático IL ACL 200 con el kit de tiempo de trombina provisto por Wiener Labs siguiendo las instrucciones del fabricante. 100 ul de PPP fueron preincubados con diferentes concentraciones de StSBTc-3 (de 0 a 1 uM) durante 2 h a 37 C.

Actividad fibrinogenolítica humana

La actividad fibrinogenolítica fue detectada según lo descrito por Siritapetawee et al. (Siritapetawee et al. 2015) usando un método modificado de Satake et al (Satake et al. 1963). 40 ul de fibrinógeno humano (10 mg ml⁻¹ de fibrinógeno en buffer 25 mM Glycine-NaOH, pH 11) fueron incubados con diferentes concentraciones de StSBTc-3: 3, 1.5, 0.75, 0.375 and 0.2 µM. La digestión se realizó a 37 C durante 2 h. La reacción se detuvo con el agregado de ácido tricloroacético. Los péptidos liberados por la digestión fueron obtenidos centrifugando las muestras a 10000 rpm por 20 min. La

concentración de péptidos en el sobrenadante fue medida utilizando el método de BCA descrito anteriormente. El blanco se realizó usando la mezcla de reacción sin la enzima. Una unidad de actividad enzimática se definió como cantidad de enzima requerida para incrementar la absorbancia 0.01 a 540 nm a 37 C.

Actividad fibrinogenolítica subunidad específica

La degradación de las cadenas del heterotrímetro de fibrinógeno por *StSBTC-3* fue analizada por SDS-PAGE usando el método descrito por Rajesh (Rajesh et al. 2005) con algunas modificaciones. Se obtuvo la fracción de euglobulinas (fracción rica en fibrinógeno obtenida a partir de plasma humano) según lo descrito por Zamora González (Zamora-González n.d.). Se incubaron 40 ug de la fracción anterior con distintas concentraciones de *StSBTC-3* (0 uM a 2 uM) a 37 C por 2h. La reacción fue detenida por el agregado de sample buffer (1M urea, 4% (p/v) SDS y 4% β ME) y luego calentada a 100 C por 5 min. Las proteínas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida 15 % (Laemmli 1970). Los geles fueron teñidos con Coomassie coloidal G250 (Neuhoff et al. 1988).

Se incubaron 40 ug de la fracción rica en fibrinógeno con una concentración de *StSBTC-3* de 1uM durante diferentes tiempos (0 a 120 min). Los patrones de degradación fueron analizados como en el ensayo dosis dependiente.

Se realizaron densitometrías de las bandas correspondientes al heterotrímetro de fibrinógeno utilizando el software Image J.

Efecto del pH y la temperatura en la actividad fibrinogenolítica de *StSBTC-3*

Se determinó el pH óptimo de *StSBTC-3* variando el pH de la mezcla de reacción entre 3 y 12. Los buffers utilizados fueron: acetato de sodio 25 mM (pH 3–5), fosfato de sodio 25 mM (pH 6–7), TRIS-HCl 25 mM (pH 8–9), y glicina-NaOH 25 mM (pH 10–12). El fibrinógeno humano fue disuelto en los respectivos buffers. La actividad fibrinogenolítica fue medida de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos (Actividad fibrinogenolítica humana).

La temperatura óptima fue determinada en un rango de temperaturas desde 10 C hasta 95 C y la actividad enzimática se midió según lo descrito en materiales y métodos (Actividad fibrinogenolítica humana).

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Determinación de la actividad fibrinolítica a través de la disolución del coágulo de fibrina

Se determinó el descenso de la turbidez del polímero de fibrina causada por *StSBTc-3* en una placa de ELISA de 96 pocillos usando un lector de microplacas automático (ELx800 BioTek Instruments) a una longitud de onda de 350 nm. El ensayo fue preparado según lo descrito por Choi (Choi et al. 2013) con distintas concentraciones de *StSBTc-3*.

Ensayo de hemólisis

Glóbulos rojos humanos fueron lavados en PBS y centrifugados por 10 min a 800 rpm tres veces y luego resuspendidos en PBS a una concentración final de eritrocitos de 4 % v/v. 100 ul de la suspensión de glóbulos rojos fueron incubados con distintas concentraciones en *StSBTc-3* (en buffer PBS). El control 0 % de hemólisis consistió en glóbulos rojos resuspendidos en PBS mientras que el control 100 % consistió en glóbulos incubados con TritónX-100. Se incubaron las mezclas de reacción a 37 C por 1 h. Las muestras fueron centrifugadas a 800 g por 10 min. La liberación de hemoglobina al sobrenadante fue determinada midiendo la absorbancia del mismo a 550 nm.

Preparación de plaquetas humanas lavadas

Se obtuvo plasma rico en plaquetas según Marx (Marx et al. 1998). Las plaquetas fueron sedimentadas por centrifugación (800 g, 15 min) y se lavaron con buffer Hepes dos veces (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1mM MgCl₂, 5.6mM glucosa y 3.8mM Hepes, pH 6.5). Las plaquetas fueron resuspendidas en Hepes pH 7.4 y luego fueron cuantificadas con un contador hematológico Coulter y ajustadas a una concentración final de 3×10^8 plaquetas ml⁻¹.

Agregación plaquetaria

La agregación plaquetaria fue medida utilizando un agregómetro (Chrono-log Co. PA, USA) según lo descrito por Rho (Rho et al. 1996). Las plaquetas lavadas fueron incubadas a 37 C en el agregómetro con una concentración de *StSBTc-3* de 0.2 μ M en presencia de 1mM de CaCl₂. Luego la agregación plaquetaria fue inducida por colágeno. La agregación resultante se mide como el cambio de la turbidez. Se midió un control sin *StSBTc-3*, otra muestra sin colágeno y otra con colágeno y *StSBTc-3*. Los resultados se expresan como % de agregación.

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como la media +/- SD. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas utilizando ANOVA y test t. Los análisis estadísticos fueron realizados en GraphPad Prism 6 Windows Version 6.01, Septiembre 21, 2012.

Resultados y discusión

Actividad fibrinogenolítica

Como se muestra en la Figura 1, *StSBTc-3* incrementa el tiempo de trombina de manera dosis dependiente. El tiempo de trombina es una prueba de coagulación que evalúa la vía final común, es decir la conversión de fibrinógeno en fibrina mediada por la trombina (Ignjatovic 2013).

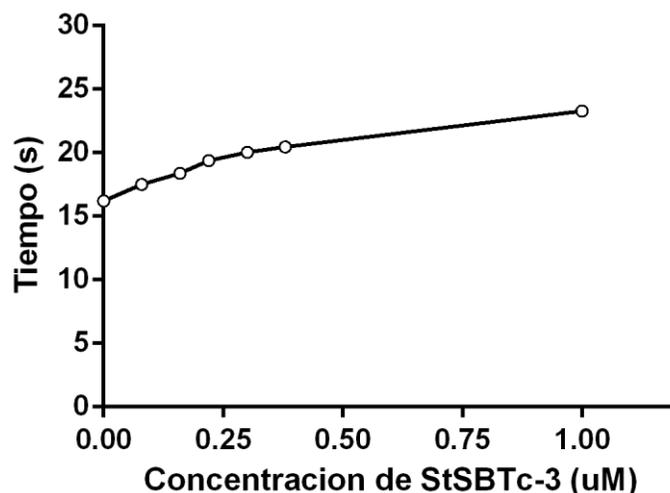


Figura 1. Tiempo de trombina. Plasma pobre en plaquetas fue incubado por 2 h a 37 C con diferentes concentraciones de StSBTc-3: 0 uM; 0.08 uM; 0.16 uM; 0.22 uM; 0.30 uM; 0.38 uM; 1uM. Los valores representan la media de tres experimentos independientes.

Los datos obtenidos muestran que a concentraciones de 1 uM el tiempo de trombina aumentó un 40%. Este aumento es significativo y es comparable al producido por otras serín proteasas vegetales (Siritapetawee et al. 2012; Siritapetawee et al. 2015).

Uno de los factores que afectan la medida del tiempo de trombina son las deficiencias en el fibrinógeno así como también una disminución en la concentración del mismo (Ignjatovic 2013).

Para determinar si StSBTc-3 es capaz de degradar al heterotrímero de fibrinógeno se analizó la actividad fibrinogenolítica subunidad específica según lo descrito en materiales y métodos.

Como se muestra en la Figura 2 StSBTc-3 es capaz de degradar las tres cadenas a todas las concentraciones utilizadas, en forma más marcada a partir de los 0,8 uM.

Este resultado es consistente con otras serín proteasas vegetales que también son capaces de degradar al heterotrímero de fibrinógeno (Siritapetawee et al. 2012).

En la Figura 3 se muestran los patrones de degradación a diferentes tiempos. Puede observarse que la cadena Beta se degrada más rápidamente que las otras dos. Estos resultados sugieren una posible diferencia de especificidad en cuanto al clivado de las

tres cadenas que componen el fibrinógeno. Los resultados reportados para otras serin proteasas aisladas del látex de algunas plantas muestran diferencias en cuanto a esta especificidad, degradando preferentemente la cadena alfa y luego la gama (Fonseca et al. 2010).

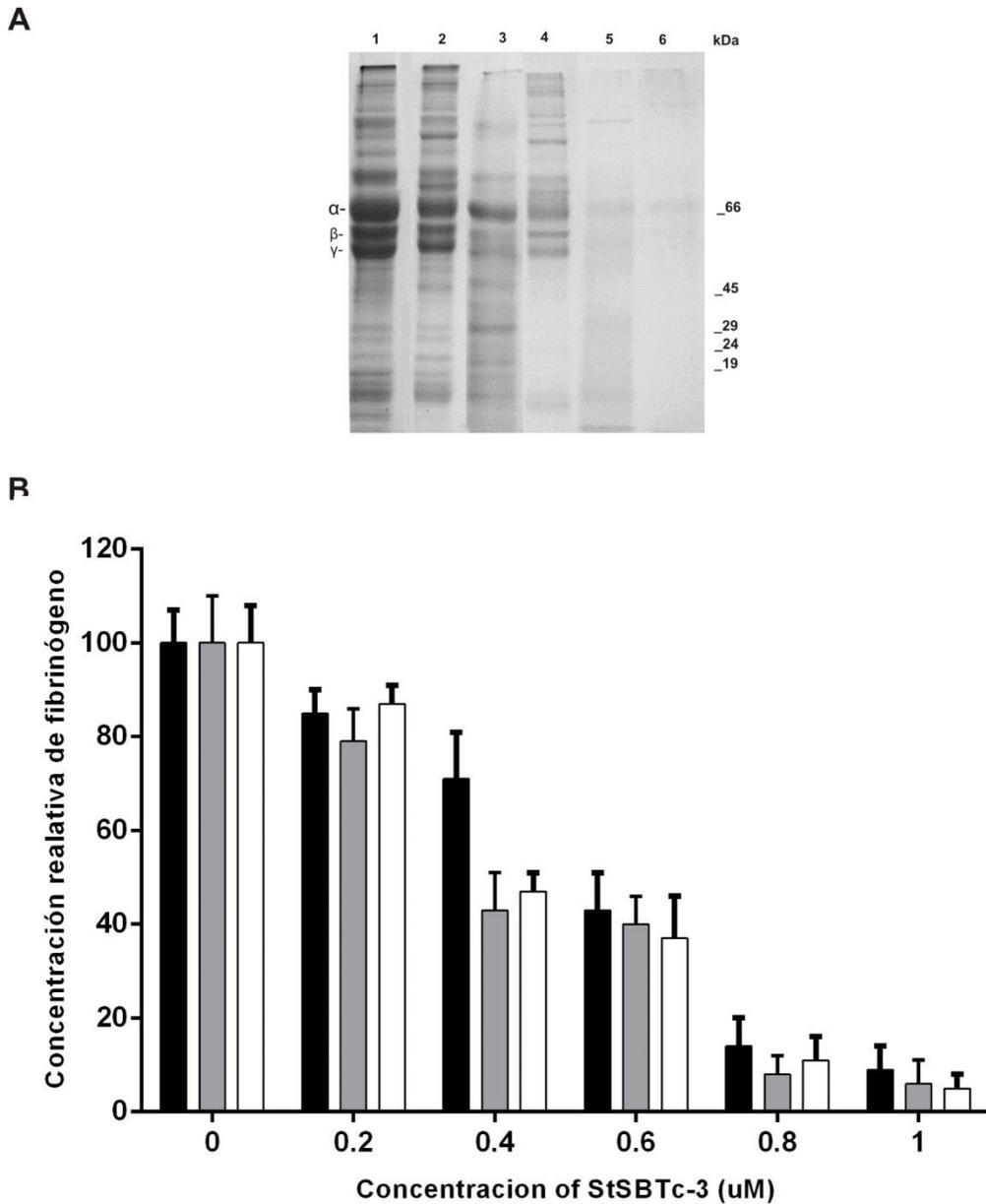
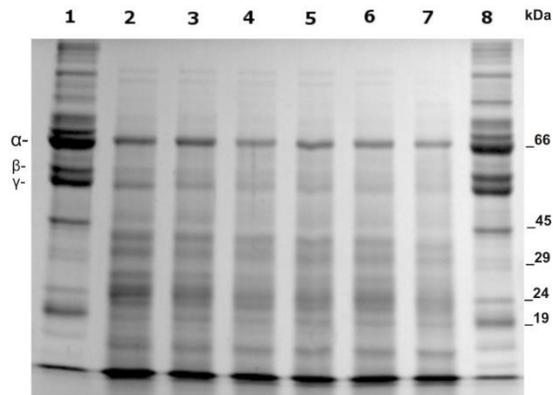


Figura 2. Actividad fibrinogenolítica de StSBTc-3 dosis dependiente. Todos los patrones de hidrólisis de la fracción enriquecida de fibrinógeno se muestran en un gel de poliacrilamida SDS/15% PAGE (A). A. Se incubó la fracción enriquecida en fibrinógeno proveniente de plasma humano (40 ug) con diferentes concentraciones de StSBTc-3. 0 μ M (calle 1), 0,2 μ M (calle 2), 0,4 μ M (calle 3), 0,8 μ M (calle 4), 1,6 μ M (calle 5) and 3,2 μ M (calle 6) por 2 h at 37 C. B. Densitometrías correspondientes a las 3 cadenas del heterotrimero de fibrinógeno correspondientes al gel de acrilamida: cadena alfa (negro), cadena beta (gris), cadena gama (blanco).

A



B

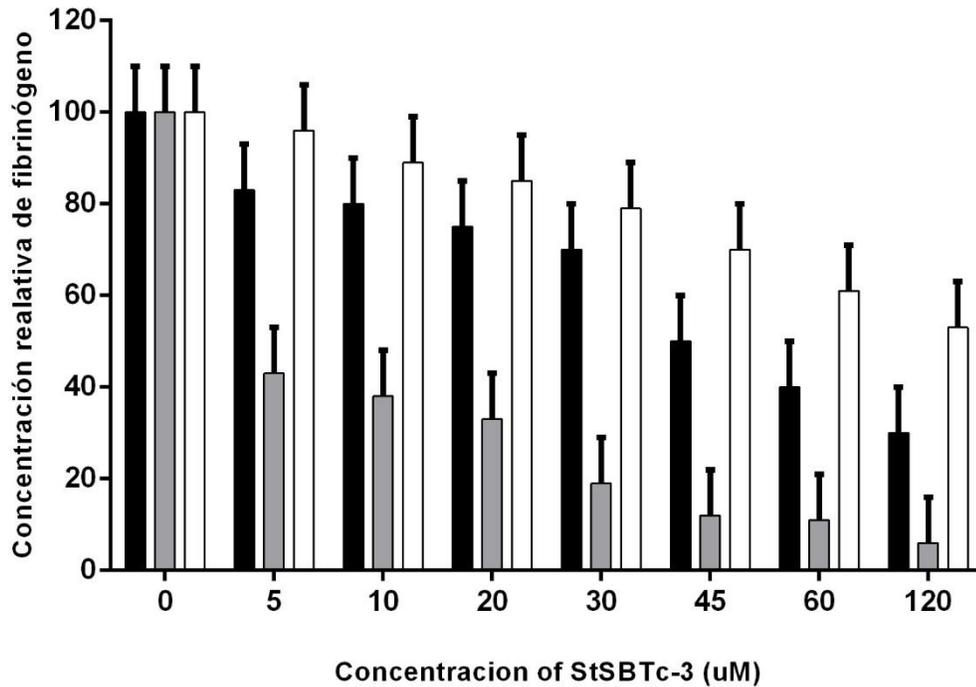


Figura 3. Actividad fibrinogenolítica de StSBTc-3 en función del tiempo. Todos los patrones de hidrólisis de la fracción enriquecida de fibrinógeno se muestran en un gel de poliacrilamida SDS/15% PAGE (A). A. Se incubó la fracción enriquecida en fibrinógeno proveniente de plasma humano (40 ug) con StSBTc-3 (1 uM) durante diferentes tiempos: 0 min (calle 1), 15 min (calle 2), 30 min (calle 3), 60 min (calle 4), 120 min (calle 5), 240 min (calle 6), 300 min (calle 7) y 300 min sin StSBTc-3 a 37 C. B. Densitometrías correspondientes a las 3 cadenas del heterotrímero de fibrinógeno correspondientes al gel de acrilamida: cadena alfa (negro), cadena beta (gris), cadena gama (blanco).

El efecto de StSBTc-3 sobre el coágulo de fibrina fue examinado a través de un ensayo de lisis in-vitro del polímero de fibrina (Choi et al. 2013). El coagulo se formó por el agregado de trombina y luego se incubó con 3 concentraciones diferentes de StSBTc-3.

La disolución del coágulo fue medida por medio de un ensayo turbidimétrico como se describió en materiales y métodos. En la Figura 4 podemos ver que StSBTc-3 es capaz de inducir la lisis del coágulo de fibrina. StSBTc-3 produce un 50% de lisis luego de 15 hs a una concentración aproximada de 2 uM, similar a la concentración reportada para Codiaase, una serin proteasa con actividad fibrinogenolítica proveniente del alga *Codium fragile* (Choi et al. 2013). La proteasa AMP48 del latex de *Artocarpus heterophyllus* genera productos de degradación de fibrina a concentraciones de 1.6 uM y 3.2 uM (Siritapetawee et al. 2012).

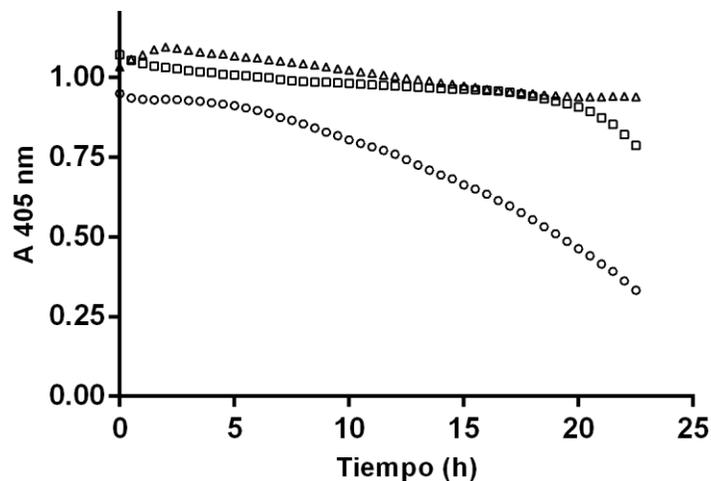


Figura 4. Disolución del polímero de fibrina. La lisis del coágulo de fibrina fue determinada a través de un ensayo turbidimétrico. El coágulo se preparó según lo descrito en materiales y métodos. La lisis se inició con el agregado de distintas cantidades de StSBTc-3 en un volumen final de 100 μ l: 10 μ g (triángulos), 20 μ g (cuadrados), 30 μ g (círculos). El descenso en la turbidez se midió durante 24 hs a 405 nm.

Efecto del pH y la temperatura en la actividad fibrinogenolítica de StSBTc-3

StSBTc-3 resultó activa en un rango de pH entre 4 y 11 (Figura 5) y en un intervalo de temperaturas entre 10 C y 70 C (Figura 6). El pH óptimo fue de 8 mientras que la temperatura óptima fue de 37 C

Los efectos de la temperatura y el pH en la actividad fibrinogenolítica de StSBTc-3 fueron similares con los datos reportados para otras serin proteasas de plantas, bacterias y algas (Majumdar et al. 2014; Siritapetawee et al. 2012; Siritapetawee et al. 2015; Kim et al. 2015; Choi et al. 2013).

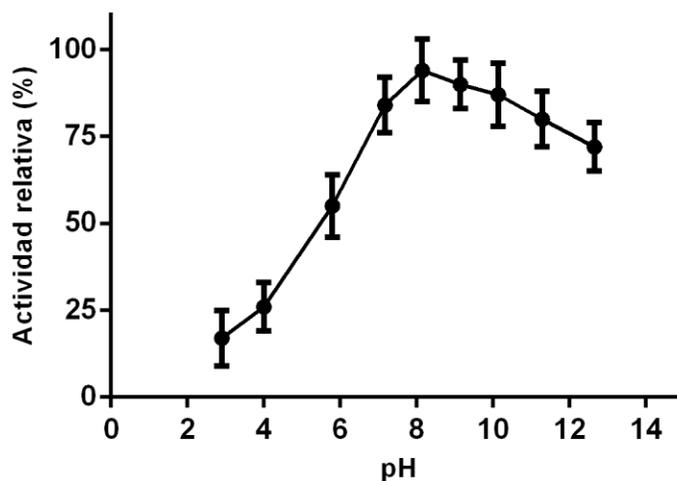


Figura 5. Efecto del pH en la actividad fibrinogenolítica de StSBTc-3. El pH óptimo para la actividad fibrinogenolítica fue determinado digiriendo fibrinógeno humano (40 ug) con StSBTc-3 (1 uM) a diferentes pH entre 3 y 12 durante 24 h y midiendo la actividad mediante lo descrito en materiales y métodos. Los valores representan la media de tres medidas independientes.

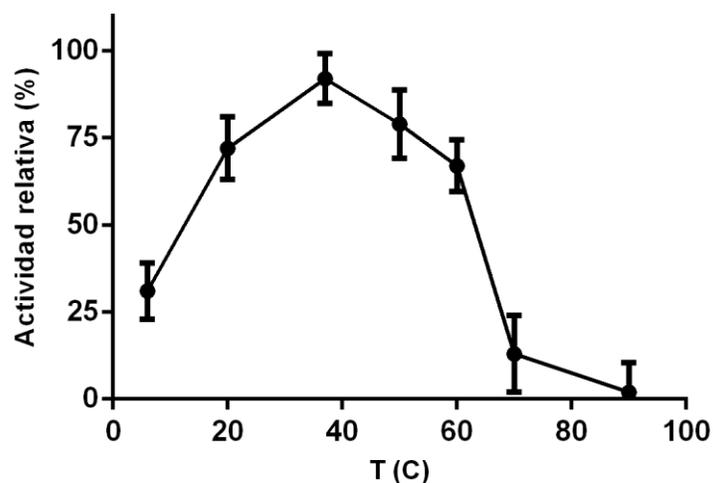


Figura 6. Efecto de la temperatura en la actividad fibrinogenolítica de StSBTc-3. La temperatura óptima para la actividad fibrinogenolítica fue determinada digiriendo fibrinógeno humano (40 ug) con StSBTc-3 (1 uM) a diferentes temperaturas entre 10 C y 95 C durante 24 hs y midiendo la actividad mediante lo descrito en materiales y métodos. Los valores representan la media de tres medidas independientes.

Actividad antiplaquetaria de StSBTc-3

La agregación plaquetaria es un complejo fenómeno que involucra diversas vías de señalización. Las plaquetas se agregan en respuesta a una variedad de sustancias endógenas y secretan otras que amplifican la agregación original. Pueden promover la formación de trombos y son importantes en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Dinerman & Mehta 1990).

Los resultados obtenidos muestran que StSBTc-3 inhibe la agregación plaquetaria inducida por colágeno (Figura 6) a una concentración menor (0.3 uM) que la concentración necesaria para la disolución del coágulo de fibrina in vitro (Figura 4).

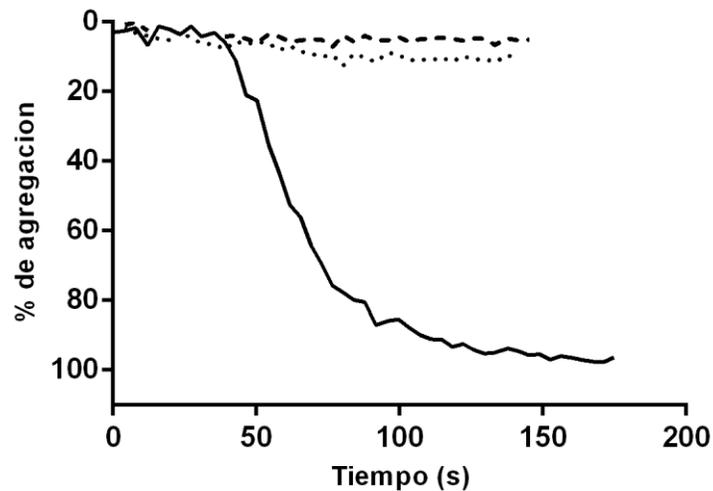


Figura 6. Actividad antiagregante de StSBTc-3. Se midió la agregación plaquetaria sobre plaquetas lavadas incubadas con 0.3 μ M de StSBTc-3 (línea de segmentos); colágeno (línea continua); colágeno + StSBTc-3 (línea de puntos).

Actividad hemolítica de StSBTc-3

Se ensayó la actividad hemolítica de StSBTc-3 in vitro sobre glóbulos rojos humanos.

Como se muestra en la Figura 7 StSBTc-3 no muestra actividad hemolítica contra los eritrocitos a ninguna de las concentraciones ensayadas. No todas las serín proteasas poseen esta característica. Según los resultados reportados por Majumdar (Majumdar et al. 2014) una serín proteasa de *Brevibacillus brevis* tampoco posee actividad hemolítica, lo que les confiere un alto potencial terapéutico.

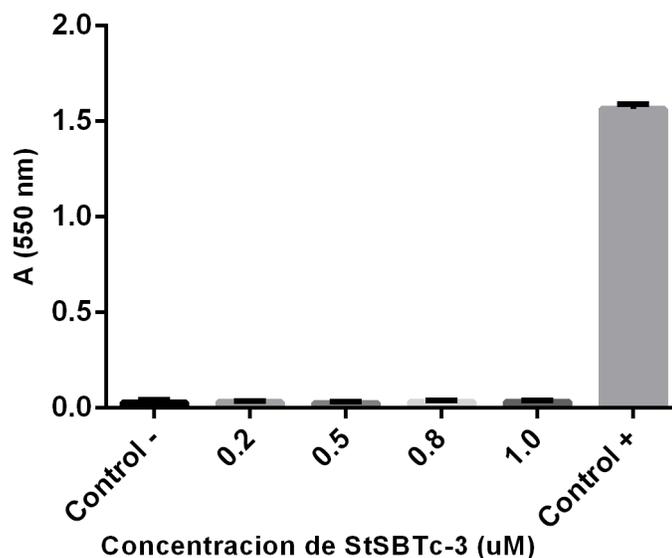


Figura 7. Actividad hemolítica. Eritrocitos frescos humanos fueron incubados en buffer PBS con diferentes concentraciones de StSBTc-3: 0.2 uM; 0.5 uM; 0.8 uM; 1.0 uM. Control - (0 % de hemólisis): eritrocitos resuspendidos en buffer PBS. Control + (100 % de hemólisis): eritrocitos resuspendidos en PBS + Triton X-100. La liberación de hemoglobina al sobrenadante fue medida a 550 nm. Los valores presentados representan la media de 3 medidas independientes.

Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que StSBTc-3 es capaz de degradar fibrinógeno así como también de disolver parcialmente el coágulo de fibrina. Por otro lado StSBTc-3 es capaz de inhibir la agregación plaquetaria inducida por colágeno a concentraciones aún más bajas que las necesarias para observar la actividad antiplaquetaria y fibrinogenolítica. Esto sugiere una potencial acción terapéutica dual. La caracterización bioquímica de StSBTc-3 mostró que presenta actividad en un amplio rango de pH (entre 4 y 11) y temperaturas (entre 10 C y 70 C) sumado a que no posee actividad hemolítica in vitro. Esto le confiere características deseables en un potencial agente terapéutico así como también la ubican como una proteasa potencialmente utilizable para diversos usos biotecnológicos.

Referencias

- Arima, K. et al., 2000. Cucumisin-like protease from the latex of *Euphorbia supina*. *Phytochemistry*, 53(6), pp.639–644.
- Barrett, A.J., 2013. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123822192001022> [Accessed August 26, 2015].
- Bode, C. et al., 1996. Randomized Comparison of Coronary Thrombolysis Achieved With Double-Bolus Reteplase (Recombinant Plasminogen Activator) and Front-Loaded, Accelerated Alteplase (Recombinant Tissue Plasminogen Activator) in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, 94(5), pp.891–898. Available at: <http://circ.ahajournals.org/content/94/5/891.short> [Accessed August 31, 2015].
- Choi, J.H. et al., 2013. Thrombolytic, anticoagulant and antiplatelet activities of codiase, a bi-functional fibrinolytic enzyme from *Codium fragile*. *Biochimie*, 95(6), pp.1266–1277. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.01.023>.
- Dinerman, J.L. & Mehta, J.L., 1990. Endothelial, platelet and leukocyte interactions in ischemic heart disease: Insights into potential mechanisms and their clinical relevance. *Journal of the American College of Cardiology*, 16(1), pp.207–222. Available at: <http://content.onlinejacc.org/article.aspx?articleid=1115568> [Accessed August 31, 2015].
- Feijoo-Siota, L. & Villa, T.G., 2010. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), pp.1066–1088. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-010-0431-4> [Accessed May 12, 2014].
- Fernández, M.B., Daleo, G.R. & Guevara, M.G., 2015. Isolation and characterization of a *Solanum tuberosum* subtilisin-like protein with caspase-3 activity (StSBTc-3). *Plant Physiology and Biochemistry*, 86, pp.137–146.
- Fonseca, K.C. et al., 2010. Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopia* latex. *Phytochemistry*, 71(7), pp.708–715. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.02.009>.
- Hartley, B.S., 1960. No Title. *Ann. Rev. Biochem.*, 29, pp.45–72.
- Van der Hoorn, R. a L., 2008. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual review of plant biology*, 59, pp.191–223. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18257708> [Accessed June 2, 2013].
- Ignjatovic, V., 2013. Thrombin clotting time. *Haemostasis, methods and protocols, methods in molecular biology*, 992, pp.131–138.
- Kim, D.-W. et al., 2015. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Petasites japonicus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, pp.1159–1167. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181301400659X>.

- Kornalík, F. & Vorlová, Z., 1990. Non-specific therapy of a hemorrhagic diathesis after a bite by a young *Bothrops asper* (barba amarilla): A case report. *Toxicon*, 28(12), pp.1497–1501. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0041010190901632> [Accessed August 31, 2015].
- Laemmli, U. k., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of Head of Bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, 227, pp.680–685.
- Laskar, A. et al., 2012. Modeling and structural analysis of PA clan serine proteases. *BMC research notes*, 5(1), p.256. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3434108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 12, 2013].
- Lip, G.Y., Chin, B.S. & Blann, A.D., 2002. Cancer and the prothrombotic state. *The Lancet Oncology*, 3(1), pp.27–34. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204501006192> [Accessed August 31, 2015].
- Majumdar, S. et al., 2014. Characterization, mechanism of anticoagulant action, and assessment of therapeutic potential of a fibrinolytic serine protease (Brevithrombolase) purified from *Brevibacillus brevis* strain FF02B. *Biochimie*, 103, pp.50–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735708> [Accessed August 5, 2014].
- Markland, F.S., 1991. Inventory of alpha- and beta-fibrinogenases from snake venoms. For the Subcommittee on Nomenclature of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and haemostasis*, 65(4), pp.438–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2057928> [Accessed August 31, 2015].
- Marx, R.E. et al., 1998. Platelet-rich plasma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 85(6), pp.638–646. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210498900294>.
- MIHARA, H. et al., 1991. A Novel Fibrinolytic Enzyme Extracted from the Earthworm, *Lumbricus rubellus*. *The Japanese Journal of Physiology*, 41(3), pp.461–472. Available at: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphysiol/41/3/41_3_461/_article [Accessed August 31, 2015].
- Neuhoff, V. et al., 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9(6), pp.255–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2466658> [Accessed August 14, 2015].
- Patel, G.K., Kawale, A.A. & Sharma, A.K., 2012. Plant Physiology and Biochemistry Puri fi cation and physicochemical characterization of a serine protease with fi brinolytic activity from latex of a medicinal herb *Euphorbia hirta*. *Plant Physiology*

- et Biochemistry*, 52, pp.104–111. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.12.004>.
- Rajesh, R. et al., 2005. Procoagulant activity of *Calotropis gigantea* latex associated with fibrin(ogen)olytic activity. *Toxicon*, 46(1), pp.84–92.
- Rho, M.C. et al., 1996. A novel monogalactosylacylglycerol with inhibitory effect on platelet aggregation from the cyanophyceae *Oscillatoria rosea*. *Journal of natural products*, 59(3), pp.308–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/np960088n> [Accessed August 31, 2015].
- Satake, M., Murata, Y. & Suzuki, T., 1963. Snake Chromatographic Separation and Properties of Three from *Agkistrodon halys blomhoffii* Venom ** By MASATOSHI The authors have made a systematic investigation of the enzymes in the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii* (Mamushi) which is a represent. , 53, pp.438–447.
- Siigur, J. & Siigur, E., 1992. The Direct Acting α -Fibrin(Ogen)olytic Enzymes from Snake Venoms. *Toxin Reviews*, 11(2), pp.91–113. Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/15569549209033106> [Accessed August 31, 2015].
- Siritapetawee, J. et al., 2012. A novel serine protease with human fibrin(ogen)olytic activities from *Artocarpus heterophyllus* latex. *Biochimica et biophysica acta*, 1824(7), pp.907–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22579962> [Accessed May 9, 2014].
- Siritapetawee, J., Sojikul, P. & Klaynongsruang, S., 2015. Biochemical characterization of a new glycosylated protease from *Euphorbia cf. lactea* latex. *Plant Physiology and Biochemistry*, 92, pp.30–38. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942815300139>.
- Smith, P.K. et al., 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), pp.76–85. Available at: http://ac.els-cdn.com/0003269785904427/1-s2.0-0003269785904427-main.pdf?_tid=5fb91c6c-ad9d-11e4-8e78-00000aacb361&acdnat=1423185395_e74b81a54e427702030279130b3cb0eb.
- Sumi, H. et al., 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, 43(10), pp.1110–1111. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF01956052> [Accessed August 31, 2015].
- Zamora-González, Y., Pruebas del coagulograma y componentes de la hemostasia. Utilidad para diagnosticar las diátesis hemorrágicas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 28(2), pp.141–150. Available at: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892012000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es [Accessed August 31, 2015].