

# IDENTIFICACIÓN PARCIAL DE LA PRESENCIA DE PÉPTIDOS EN EL VENENO DEL ESCORPIÓN *Tityus sabineae*, PROCEDENTES DE LOS MUNICIPIOS DE SAN MATEO Y EL ESPINO DEL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ COLOMBIA

## PRESENCE PARTIAL IDENTIFICATION OF PEPTIDES IN SCORPION VENOM *Tityus sabineae*, FROM THE MUNICIPALITIES OF SAN MATEO AND EL ESPINO BOYACA COLOMBIA DEPARTMENT

Clara Andrea Rincón-Cortés<sup>1</sup>, Eliana Maritza Landaeta-Valero<sup>2</sup>, Lina María Rodríguez-Ríos<sup>2</sup>, July Stefanni Zapata-Florez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lic.en Química-M.Sc, Biología, Docente- Investigador, Grupo de investigación Ciencias Biológicas y Bioquímicas Aplicadas CB<sup>2</sup>A – Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Calle 222 N°55-37 Bogotá- Colombia. Correo electrónico: clrincon@udca.edu.co; <sup>2</sup>Estudiante Facultad de Enfermería, integrantes Grupo de investigación Ciencias Biológicas y Bioquímicas Aplicadas CB<sup>2</sup>A, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, maritza.landaeta@gmail.com<sup>2</sup>Estudiante Facultad de Enfermería, integrantes Grupo de investigación Ciencias Biológicas y Bioquímicas Aplicadas CB<sup>2</sup>A, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, lina.21.rodriguez@gmail.com<sup>2</sup>Estudiante Facultad de Ingeniería Agronómica, integrante Grupo de investigación Ciencias Biológicas y Bioquímicas Aplicadas CB<sup>2</sup>A, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A julyzapataflorez@hotmail.com

### RESUMEN

Colombia posee gran diversidad de especies de escorpiones pertenecientes a la familia Buthidae. Uno de los géneros de esta familia son los *Tityus*, caracterizados por desarrollar diferentes niveles de toxicidad en sus víctimas, a causa de los componentes bioquímicos presentes en el veneno que producen. Este aspecto se ha tomado como objeto de estudio en diferentes grupos de investigación a nivel nacional e internacional, para determinar su composición y la actividad que desarrollan en diferentes organismos. En los municipios de San Mateo y El Espino, del oriente de Boyacá Colombia, se han presentado varios casos de escorpionismo, a causa del escorpión *Tityus sabineae*, por lo cual, el principal objetivo de esta investigación, fue identificar parcialmente, la presencia de péptidos en el veneno de *T. sabineae*, por medio de SDS-PAGE y HPLC, hallando péptidos con peso molecular inferior a 40kDa. De acuerdo a esta característica pueden corresponder a toxinas capaces de inhibir canales iónicos de Ca<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, en mamíferos e insectos, como se reporta en diferentes estudios como Rowe *et al.* 2011; Baiet *al.* 2010, entre otros.

Palabras clave: Veneno, escorpión, *Tityus sabineae*, péptidos, toxinas.

### SUMMARY

Colombia has a great diversity of species belonging to the family scorpions Buthidae. One of the genera of this family are the *Tityus*, characterized by different levels of toxicity develop their victims, because of biochemical components present in the venom produced. This has been taken as an object of study in different research groups nationally and internationally, to determine their composition and the activities performed in different organisms. In the municipalities of San Mateo and El Espino, Boyacá in eastern Colombia, there have been several cases of scorpion, *Tityus* scorpion because *sabineae*, therefore, the main objective of this research was to identify partially, the presence of peptides in the venom of *T. sabineae*, by SDS-PAGE and HPLC, finding peptides with molecular weight less than 40kDa. According to this feature may correspond to toxins able to inhibit ion channels Ca<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, in mammals and insects, as reported in different studies as Rowe *et al.* 2011; Baiet *al.* 2010, among others.

Key words: Venom, peptides, toxin, scorpion.

## INTRODUCCIÓN

Las toxinas presentes en el veneno de escorpión se pueden definir como polipéptidos de cadena corta desde 36 a 70 residuos de aminoácidos (Possaniet *al.* 1985), se reconocen dos grupos: las que poseen enlaces disulfuro (Disulfure Bond Peptides DBPs) y las que no (No Disulfure Bond Peptides NDBPs). Estas últimas son potencializadores de bradichina, antimicrobianos, hemolíticas e inmunomoduladores, y las DBPs son responsables de los efectos neurotóxicos, al afectar la función de los canales iónicos de células excitables y no excitables (Guerrero-Vargas *et al.* 2012). Los venenos de los escorpiones de la familia Buthidae, poseen una mezcla de varios péptidos de la clase DBPs, que afectan los canales iónicos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  o  $\text{Ca}^{+2}$  en células excitables del sistema nervioso y muscular (Rowe *et al.* 2011). Las toxinas afines a los canales de  $\text{Na}^+$ , se enlazan a estos, alterando su mecanismo de apertura, mientras que las afines a los canales de  $\text{K}^+$ , bloquean el flujo de sus iones, a través del canal, causando hiperexcitabilidad en las células nerviosas y musculares, desencadenando el mal funcionamiento fisiológico de estos tejidos (Petricevich, 2010; Yuet *al.* 2004; Rowe *et al.* 2011 y Guerrero-Vargas *et al.* 2012). Aproximadamente se han secuenciado 120 toxinas de 23 a 64 residuos de aminoácidos (Guerrero-Vargas *et al.* 2012), de estas se pueden destacar: la toxina noxiustoxin del veneno de escorpión *Centruroides noxius*, que bloquea los canales de  $\text{K}^+$  (Possaniet *al.* 1985), del veneno de *Centruroides margaritatus*, las capaces de unirse a canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{Ca}^{+2}$ , afectando el sistema nervioso de insectos, crustáceos y roedores (Escobar *et al.* 2003), del *Tityus serrelatus*, la mezcla de moléculas con significativa actividad inmunomoduladora, al estimular las funciones inmunes in vivo (Petricevich *et al.* 2005) y la toxina Cn2 de *Centruroides noxius* Hoffmannes, utilizada como modelo para el medicamento en el tratamiento de Parkinson, al estimular el núcleo subtalámico (Shiavonet *al.* 2006).

En diferentes regiones de Colombia, existe gran diversidad de especies de escorpiones de la familia Buthidae, pero son muy pocas las especies que han sido objeto de estudio, sin embargo, en el veneno del escorpión *Tityus pachyurus*, hallado a lo largo del río Magdalena entre los 400 a 1500 m de altitud (Flórez, 2001; Gómez & Otero, 2007), Barona y colaboradores (2009) identificaron péptidos con actividad neurotóxica, afines a canales iónicos, con dosis letal media en ratones de 4,8 mg/kg en 2012 por Guerrero-Vargas y colaboradores, diferenciaron la alta conservación de secuencias entre *T. obscurus* y *T. pachyurus*, caracterizadas como moduladores de canales de  $\text{Na}^+$ .

El escorpión *T. sabineae*, pertenece a la familia Buthidae, asociada al grupo del *Tityus magnimanus*, y se diferencia la vez por la coloración oscura en el cuerpo y las patas, rojiza

en los pedipalpos para los machos y amarillentos en las hembras y la cantidad de dientes pectíneos es mayor (22 a 25 aproximadamente) con respecto a las especies más relacionadas. Es común hallarla en las regiones montañosas de Cundinamarca y Boyacá, en bosques húmedos montanos y premontanos dentro de una altura de 1.480 m y 2.850 m, por lo que puede representar un problema de salud pública en la región donde se encuentra distribuido (Lourenço *et al.* 1996).

El principal objetivo de este trabajo fue la identificación y predicción parcial, de forma cualitativa del contenido y posible función de los péptidos en el veneno de *T. sabineae*, obtenidos por electroforesis SDS-PAGE y cromatografía HPLC.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de los especímenes del escorpión *T. sabineae* se realizaron cuatro colectas en los municipios de San Mateo y El Espino del departamento de Boyacá-Colombia, a una altitud de 2500 msnm y 2128 msnm y fueron trasladados al escorpionario o medio artificial, ubicado en la Universidad De Ciencias Aplicadas y Ambientales, para su mantenimiento se usaron los aspectos ecológicos, biológicos y toxicológicos, descritos por Saldarriaga & Otero (2000).

El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica, cada 30 días a los individuos juveniles, adultos y hembras no grávidas. Las muestras de veneno se centrifugaron a 15000 rpm durante 15 minutos, y se dividieron en cuatro grupos: grupo A, las muestras disueltas en 0,5 mL de agua destilada y liofilizadas, B, las disueltas en 0,5 mL de agua destilada no liofilizadas, C, las puras liofilizadas, D, las puras no liofilizadas. Se almacenaron a 4°C, hasta su análisis. La liofilización se realizó empleando el equipo FreeZone 4.5 Liter de Labconco (Labconco 2004).

En cada uno de los grupos de muestras se determinó la concentración por medio del método de Lowry, (1951). El cual se estandarizó, empleando como patrón BSA con un rango de concentración entre 0,075 mg/ml a 1,5 mg/ml, utilizando 5  $\mu$ l de muestra de veneno, la lectura se realizó en lector de ELISA, con filtros de 585 y 690 nm.

La electroforesis vertical SDS-PAGE con gel de acrilamida-bisacrilamida al 12%, se realizó de acuerdo al método de Hames & Rickwood (1990), con un marcador de peso molecular con un rango de 212 a 6.5 KDa y se reveló con azul brillante de Coomassie al 0,1%. Los péptidos presentes en las muestras de veneno, se separaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con una columna analítica de fase reversa C18, y un gradiente lineal desde 0% de solvente A (0.12% ácido trifluoroacético—TFA—en agua) hasta 60% del solvente B (0.10% TFA en acetonitrilo); por 60 min de corrida y con un flujo de 1 ml/min. (Barona *et al.* 2006).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectaron 230 individuos de *T. sabineae* durante la extracción de veneno su obtuvo 0,5 $\mu$ L de veneno con un promedio de concentración de proteína total de 0,100mg/ml en las muestras diluidas y 0,355mg/mL en las muestras puras con un error estándar de 0,0226 y 0,0761 respectivamente. En la electroforesis SDS-PAGE, se observó la presencia de cinco péptidos con un rango de peso molecular entre 45KDa a 14KDa (Figura 1), tres péptidos, con pesos moleculares de 27, 20 y 14,3 KDa aproximadamente, han sido detectados en venenos de otras especies de escorpiones de la misma familia, con mayor similitud en los del mismo género, ya que entre otros géneros se presentan diferencias, por ejemplo en el veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus hebraeu* se ha destacado la presencia de péptidos de 10KDa (Thompson *et al.* 2009), y de acuerdo a lo expuesto por Nascimento *et al.* (2006), existe menor similitud entre el género *Tityus* y el *Leiurus* (Barona *et al.* 2006; Barona *et al.* 2004; Norman *et al.* 1983; Escobar *et al.* 2003).

Las muestras empleadas para la separación por HPLC fueron las no liofilizadas, ya que las muestras liofilizadas mostraban un comportamiento similar al blanco o los solventes

empleados en la técnica, por lo que se cree, que por los cambios de temperatura que se realizaron en el método de liofilización afecto la integridad de los péptidos ayudando a su desnaturalización (Figura 2). Mientras que en las muestras no liofilizadas se logró diferenciar la separación de péptidos, entre los 40 y 45 minutos de retención y otros en menor proporción entre los 20 minutos (Figura 3). Así los péptidos obtenidos tanto por SDS-PAGE como en HPLC, ayudaron a predecir que el veneno del escorpión *T. sabineae*, no podría desarrollar actividad proteolítica ni de fosfolipasa, ya que no presenta péptidos con un rango de peso molecular superior a 30KDa, ni se observó su separación a los 10 minutos de retención en la cromatografía. Siendo una característica común en la mayoría de los venenos de escorpión. Sin embargo los péptidos obtenidos a los 20 minutos de tiempo, se predice que pueden ser toxinas capaces de activar o inhibir los canales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, alterando la funcionalidad del sistema cardiaco en mamíferos y en el tejidonervioso tanto de insectos como mamíferos (Barona *et al.* 2006). También pueden ser toxinas responsables de inducir el dolor, al en longar el potencial de acción del canal de sodio o crear un potencial negativo al inhibir la activación del canal dependiente de voltaje (Rowe *et al.* 2011).

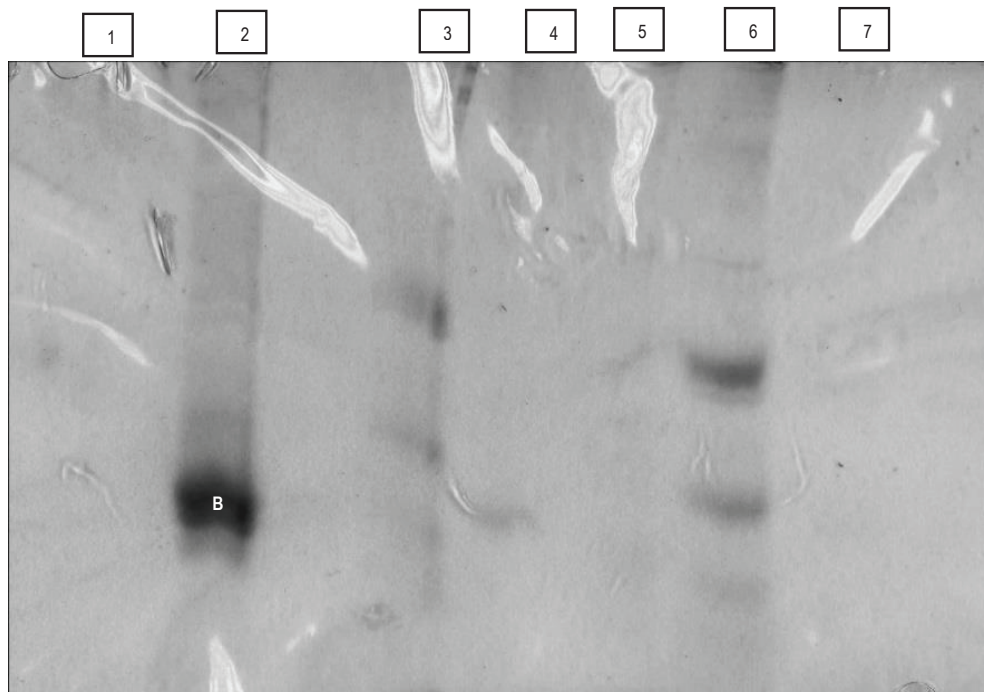
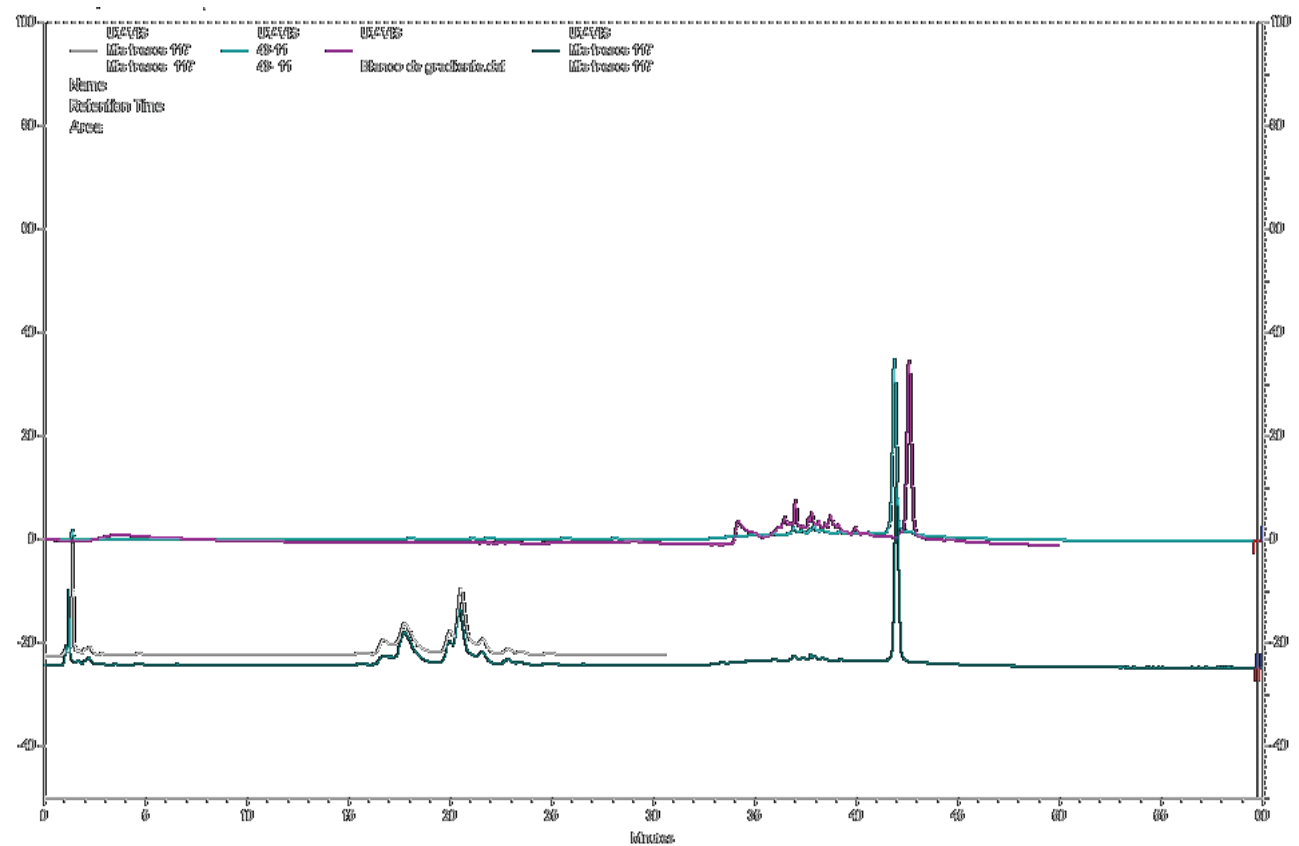


Figura 1. Foto de electroforesis SDS-PAGE, para las muestras de veneno de escorpión *T. sabineae*. Carriles: 1. Muestra 1P liofilizada, 2. Muestra 1P no liofilizada, 3. Muestra 2P no liofilizada, 4. Muestra 2D liofilizada, 5. Muestra 3D no liofilizada, 6. Marcador de peso, 7 Muestra 3D liofilizada. B. Banda de péptido conservado y presente en mayor cantidad en todas las muestras analizadas.

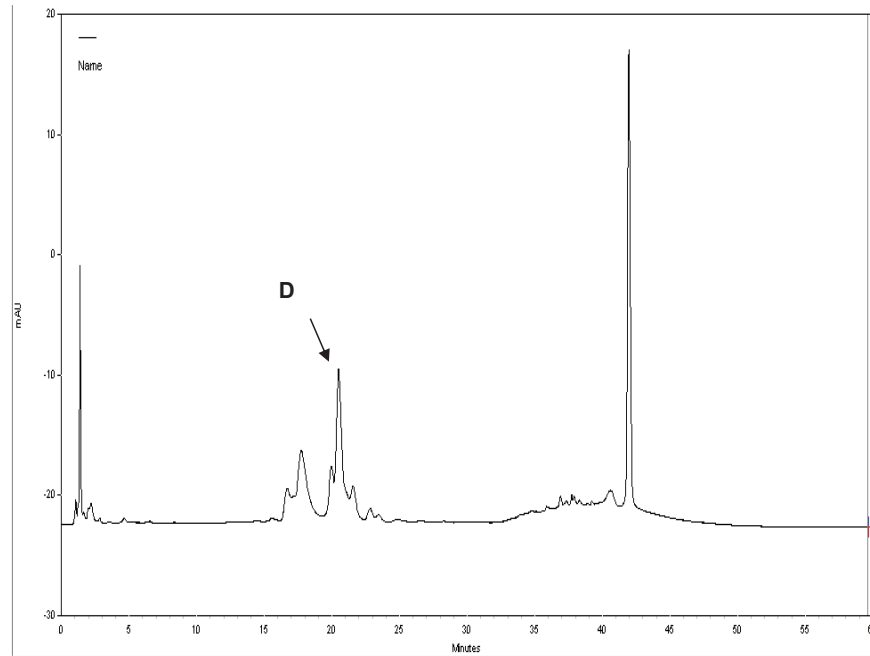
En diferentes estudios, se han reportado y comprobado beneficios o aplicaciones de algunas toxinas, por ejemplo Bagdányet al. (2005), aislaron la Anuroctoxin, que posee alta afinidad para bloquear los canales de potasio en los linfocitos T de humanos, y aplicarlo en diferentes tratamientos terapéuticos para la arteriosclerosis múltiple y otras enfermedades inmunes

mediadas por las células T. Por lo cual al tener en cuenta los resultados obtenidos y las diferentes características descritas de las toxinas de los venenos de escorpión, se permite predecir que en futuras investigaciones de las toxinas del

veneno de *T. sabineae*, podría desarrollar aplicaciones en el control de plagas y tratamiento de enfermedades neurales y escorpionismo en humanos. Además el análisis bioquímico de los venenos de escorpión puede ser una herramienta, para establecer relaciones filogenéticas entre las diferentes especies de escorpiones, ya que la composición de su veneno es similar entre familias y géneros, y el veneno de *T. sabineae* comparte la composición peptídica con los venenos de *T. pachyurus* y *C. margaritatus*, pertenecientes al mismo género y familia, respectivamente (Baronaet al.2006; Escobaret al.2003).



**Figura 2.** Comparación del blanco o solventes utilizados en HPLC con la separación de las muestras liofilizadas. A. Las muestras puras sus duplicados generaron señales que no pertenecen a contaminaciones de columna ni de los solventes. B. Blanco o solventes de la técnica y muestras liofilizadas.



**Figura 3.** Cromatógrama separación de péptidos por HPLC. Muestra 1P, Muestra 2P. D. Péptido conservado y presente en mayor cantidad en todas las muestras analizadas, puras y disueltas.

**Agradecimientos:** A Eduardo Flórez y Edgar Reyes de la Universidad Nacional, por su asesoría en los procesos realizados. A RubenTorrenegra de Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad De Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, por sus aportes y asesoría y a Raúl Riveros de Corporación Tecnológica de Bogotá C.T.B. por su colaboración en las pruebas realizadas.  
**Conflicto de intereses:** Los autores del presente escrito declaran que no existe conflicto de intereses que pongan en riesgo la validez de los resultados.  
**Financiación:** El presente estudio fue financiado por la Universidad De Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.

## BILBIOGRAFIA

1. BAI, Z.T.; LIU, T.; JIANG, F.; CHENG, M.; PANG, X.Y.; HUA, L.-M.; SHI, J.; ZHOU, J.-J.; SHU, X.-Q.; ZHANG, J.-W.; JI, Y.-H. 2010. Phenotypes and peripheral mechanisms underlying inflammatory pain-related behaviors induced by BmK I, a modulator of sodium channels. *Experimental Neurology*, 226 (1):159-172.
2. BAGDÁANY, M.; BATISTA, F.C.V.; VALDÉZ-CRUZ, N.A.; SOMODI, S.; RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R.C.; LICEA, A.F.; VARGA, Z.; GÁSPÁR, R.; POSSANI, L.D.; PANYI, G. 2005. Anuroctoxin, a new scorpion toxin of the  $\alpha$ -KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Molec. Pharmacol.* 67:1034-1044.
3. BARONA, J.; BATISTA, C.V.F.; ZAMUDIO, F.Z.; GÓMEZ-LAGÚNAS, F.; WANKE, E.; OTERO, R.; POSSANI, L.D. 2006. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochim.Biophys.* 1764:76-84.
4. BARONA, J.; OTERO, R.B.; NÚÑEZ, V. 2004. Aspectos toxicológicos e inmunológicos del veneno del escorpión *Tityuspachyurus* Pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. *Biomédica* 24:42-49.
5. CHEN, H.; LI, S.; LEIPOLD, E.; GORDON, D.; HANSEL, A.; HEINEMANN, S.H. 2002. Differential sensitivity of sodium channels from the central and peripheral nervous system to the scorpion toxins Lqh-2 and Lqh-Eur. *Neurosc.* 16(4):767-770.
6. ESCOBAR, E.; VELÁSQUEZ, L.; RIVERA, C. 2003. Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841)

- (Scorpiones : Buthidae). Rev. Perú. Biol. 10(2):217-220.
7. FLÓREZ D., E. 2001. Escorpiones de la Familia Buthidae (Chelicerata: Scorpiones) de Colombia. Biota Colomb. 2:25-30.
  8. GÓMEZ, J.P.; OTERO, R. 2007. Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. Rev.Fac.Nal de Salud Pública. 25(1):50-60.
  9. GUERRERO-VARGAS, J.A.; MOURÃO, C.B.F.; QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; POSSANI L.D.; SCHWARTZ, E.F. 2012. Identification and phylogenetic analysis of *Tityuspachyurus* and *Tityusobscurus* novel putative Na<sup>+</sup>-channel scorpion toxins. PLoS ONE. 7(2):e30478.
  10. HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. 1990. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Editorial Oxford; New York: Oirl Press, Oxford University Press. 345p.
  11. JENWAY. 2009. Protocol:P09-002A. Bibby Scientific. Disponible en [http://www.jenway.com/adminimages/p09\\_002a\\_biuret\\_protein\\_assay.pdf](http://www.jenway.com/adminimages/p09_002a_biuret_protein_assay.pdf)(acceso octubre 2009).
  12. LABCONCO. 2004. A guide to freeze drying for the laboratory. An Industry service publication.
  13. LOURENÇO, W.R., CUELLAR, O., MENDEZ, F. 1996. Variation of reproductive effort between parthenogenetic and sexual populations of the scorpion *Tityuscolumbianus*. J.Bioge. 23: 681-686.
  14. LEE, C.W.; LEE, E.H.; TAKEUCHI, K.; TAKAHASHI, H.; SHIMADA, I.; SATO, K.; SHIN S.Y.; KIM, D.H.; KIM J.I.L. 2004. Molecular basis of the high-affinity activation of type 1 ryanodine receptors by imperatoxin A. Biochem. J. 377:385-394.
  15. LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folinphenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
  16. MAERTENS, C.; CUYPERS, E.; AMININASAB, M.; JALALI, A.; VATANOUR, H.; TYTGAT, J. 2006. Potent modulation of the voltage-gated sodium channel Nav1.7 by OD1, a toxin from the scorpion *Odonthobuthusdoricae*. Mol. Pharmacol. 70(1):405-414.
  17. NASCIMIENTO, D.G.; RATES. B.; SANTOS, D.M.; VERANO-BRAGA. T.; BARBOSA-SILVA, A.; DUTRA, A.A.A.; BIONDI, I.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; DE LIMA, M.E.; PIMIENTA, A.M.C. 2006. Movingpieces in a taxonomic puzzle: Venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to inferphylogeneticrelationship in some scorpion from the Buthidaefamily (Scorpiones). Toxicon. 47(6):628-639.
  18. NORMAN, R.I.; SCHMID, A.; LOMBET, A.; BARHANIN, J.; LAZDUNSKI, M. 1983. Purification of binding protein for *Tityus* y toxin identified with the gating component of the voltage-sensitive Na<sup>+</sup> channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:4164-4168.
  19. PETRICEVICH, V.L. 2010. Review article. Scorpion venom and the inflammatory response. Hindawi Publ. Co. Mediators of Inflammation. 2010:Article ID 903295, 16p.
  20. PETRICEVICH, V.L., LEBRUN, I. 2005. Immunomodulatory effects of the *Tityusserrelatus* venom on murine macrophage functions in vitro. Mediators of Inflammation. 2005(1):39-49.
  21. POSSANI, L.D.; MARTIN, B.M.; SVENDSEN.; RODE, G.S.; ERICKSON, B.W. 1985. Scorpion toxins from *Centruroidesnoxius* and *Tityusserrulatus* primary structures and sequence comparison by metric analysis. Biochem. J. 229:739-750.
  22. ROWE, A.H.; XIAO, Y.; SCALES, J.; LINSE, K.D.; ROWE, M.P.; CUMMINS, T.R.; ZAKON, H.H. 2011. Isolation and characterization of CvIV4: apain inducing  $\alpha$ -Scorpion toxin. PLoS ONE. 6(8):e23520.
  23. SALDARRIAGA, M.M.; OTERO, R. 2000. Los escorpiones: aspectos ecológicos, biológicos y toxicológicos. MEDUNAD. 3(7):17-23.
  24. SCHIAVON, E.; SACCO T.; RESTANO-CASSULINI, R.; GÜRROLA, G.; TEMPIA, F.; POSSANI, L.D.; WANKE, E. 2006. Resurgent current and voltage sensor-trapping enhanced activation by a  $\beta$ -Scorpion toxin solely in Nav1.6 channel: significance in mice purkinje neurons. J. Biol.Chem. 28: (29): 20326-20337. Disponible en <http://hwmaint.jbc.org/cgi/reprint/M600565200v1>(acceso septiembre 2012).
  25. THOMPSON, C.H.; OLIVETTI, P.R.; FULLER, M.D.; FREEMAN, C.S.; MCMASTER, D.; FRENCH, R.J.; POHL, J.; KUBANEK, J.; MCCARTY, N.A. 2009. Isolation and characterization of a high affinity peptide inhibitor of CIC-2 chloride channels. J. Biol. Chem. 284(38):26051-26062.

26. VALDIVIA, H.H.; KIRBYF, M.S.; LEDERER, W.J.; CORONADO, R. 1992. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:12185-12189.
27. YU, K.; FU, W.; LIU, H.; LUO, X.; CHEN, K.X.; DING, J.; SHEN, J.; JIANG, H. 2004. Computational simulations of interactions of scorpion toxins with the voltage-gated potassium ion channel. *Biophys. J.* 86:3542-3555.
28. ZAMUDIO, F.Z.; CONDE, R.; ARÉVALO, C.; BECERRIL, B.; MARTIN, B.M.; VALDIVIA, H.H.; POSSANI, L.D. 1997. The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *J. Biol. Chem.* 272(18):11886-11894.