

Bases Genéticas da Hipertermia Maligna *

Cora P Hors¹, Bernardo Garicochea²

Hors CP, Garicochea B - Bases Genéticas da Hipertermia Maligna

Hors CP, Garicochea B - Genetic Basis of Malignant Hyperthermia

UNITERMOS – COMPLICAÇÕES: hipertermia maligna

KEY WORDS – COMPLICATIONS: malignant hyperthermia

A hipertermia maligna (HM) é uma disfunção farmacogênica do músculo esquelético, potencialmente letal, de caráter hereditário, geralmente autossômico dominante, e de penetrância incompleta. Descrições clínicas de HM datam do início do século, mas somente em 1962 foi identificada a base genética da doença, quando Denborough e col¹ descreveram uma família na qual a clínica da HM segregava de forma autossômica dominante. A HM se manifesta em indivíduos saudáveis mas geneticamente susceptíveis, que respondem à administração de agentes desencadeantes, como a inalação de anestésicos halogenados e bloqueadores neuromusculares comumente usados (ex. halotano e succinilcolina), manifestando rigidez muscular, rabdomiólise, labilidade da pressão arterial, taquicardia, disritmias, hiperventilação, hipóxia, acidose láctica e respiratória além de aumento na temperatura corpórea^{1,2}. No entanto, existem evidências de que o estresse físico ou emocional, assim como mudanças bruscas na temperatura do ambiente, podem desencadear os sintomas³.

A HM constitui a principal causa de morte ocasionada por anestesia⁴. A incidência é de aproximadamente 1:50.000 adultos e de 1:15.000 crianças³. A redução da incidência com o passar da idade pode ter duas explicações: diminuição da penetrância da doença ou a morte de indivíduos susceptíveis antes que atinjam a idade adulta. Se os sintomas não são diagnosticados corretamente e tratados de forma imediata com a administração de dantrolene sódico, o episódio pode ocasionar danos nos tecidos e conduzir o paciente à morte⁵. O uso de dantrolene e a detecção precoce de HM a partir de biópsia muscular prévia ao uso de anestésicos (pelo teste da contratura *in vitro* com halotano e cafeína) reduz a in-

cidência de morte devida a estes episódios de 80% para menos de 7%, mas este índice poderá ainda ser diminuído com o diagnóstico pré-sintomático da HM, baseado na caracterização molecular dos genes afetados em indivíduos de risco⁶⁻⁸. A HM ocorre também em animais, tendo sido primeiramente identificada e estudada em suínos como *Síndrome do Estresse Porcino* (Porcine Stress Syndrome, PSS), onde a mesma condição é desencadeada por situações de estresse. Este achado tem importância econômica, já que suínos com PSS apresentam carne de menor qualidade e morrem mais precocemente. Os animais homocigotos para PSS (que é recessiva nesta espécie), respondem ao estresse da mesma forma que os humanos heterocigotos respondem à anestesia⁹. Em suínos, no entanto, a HM traz consigo alguns benefícios para a produção, como a hipertrofia muscular, contribuindo para o aumento de peso. A incidência de PSS é variável, podendo superar os 10-15% de heterocigotos e 1-2% de homocigotos em alguns sítios de criação⁶. Estas frequências são muito superiores às encontradas em humanos.

FISIOPATOLOGIA DA HIPERTERMIA MALIGNA

A sintomatologia e a patogênese da HM foram descritas a partir de estudos realizados em humanos e suínos que sugeriram a relação entre a HM e uma disfunção no canal de liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplásmico, também denominado RYR1 (Ryanodine Receptor) devido a sua afinidade pelo alcalóide vegetal rianodina^{5,10}. No músculo esquelético, tanto a contração muscular quanto o metabolismo glicolítico são regulados pela concentração intracelular de Ca²⁺, determinada pelo receptor de rianodina RYR1. Anormalidades neste receptor ou em outras moléculas reguladoras do Ca²⁺ na célula muscular, manifestadas sob condições de anestesia ou estresse, podem inibir a saída e facilitar a entrada de Ca²⁺ através do canal, produzindo aumento da concentração intracelular desse íon. Isto resulta numa contração muscular contínua e aumento do metabolismo glicolítico e aeróbio, produzindo-se excesso de CO₂, ácido láctico e calor, tendo sido relatados casos de pacientes que atingiram temperaturas de até 47°C³. O antídoto dantrolene sódico age diretamente no músculo esquelético, modulando a concentração intracelular de Ca²⁺, e sua utilização tem sido muito eficiente no tratamento de crises de HM⁷. No entanto, nem todos os indivíduos susceptíveis à HM desenvolverão os sintomas após a anestesia, o que sugere que outros fatores, além dos

* Trabalho realizado no Departamento de Biotecnologia do ICB2-USP e Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo e Disciplina de Hematologia/Hemoterapia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP

1. Bióloga; Pós graduanda da Universidade de São Paulo

2. Médico Pesquisador - Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo

Apresentado em 14 de dezembro de 1998

Aceito para publicação em 23 de fevereiro de 1999

Correspondência para Dra. Cora Pereira Hors
Rua Carlos Comenale, 68/73 - Bela Vista
01332-030 São Paulo, SP

© 1999, Sociedade Brasileira de Anestesiologia

genéticos, podem influir na probabilidade de uma crise fulminante de HM nos indivíduos heterozigotos para essa predisposição. Estes fatores podem ser o estado fisiológico dos músculos e o nível de ativação do sistema nervoso simpático no momento da anestesia⁸.

DIAGNÓSTICO BIOLÓGICO DA HIPERTERMIA MALIGNA (TESTE DA CONTRATURA *IN VITRO*)

O diagnóstico pré-sintomático disponível na atualidade para indivíduos pertencentes à famílias de risco com HM consiste num teste realizado *in vitro*, onde uma biópsia de músculo esquelético vivo isolado é ligada a um transdutor de força e submetida a uma tensão em presença de concentração única ou crescente de halotano, cafeína ou ambos. O protocolo europeu adotado desde 1984 pelo *The European Malignant Hyperthermia Group* (EMHG), o IVCT (*in vitro contracture test*)¹¹, difere do americano, *caffeine-halothane contracture test* (CHCT)¹² tanto no procedimento como no critério de definição de susceptibilidade à hipertermia maligna, estando a sensibilidade de ambos testes próxima de 100%. Fibras musculares de indivíduos normais ou com HM reagem de forma diferente em seu limite de tensão induzida, ou em sua sensibilidade a estas drogas. No grupo europeu, os pacientes são classificados em três categorias: susceptíveis, quando a resposta é anormal tanto para o halotano como para a cafeína; ambíguo, quando a resposta é anormal para o halotano ou para a cafeína; e normal, quando a resposta é normal tanto ao halotano como à cafeína. Para o grupo americano, uma resposta anormal para o halotano ou para a cafeína é considerada MHS, fazendo com que o número de diagnósticos falso-positivos seja de 15-20%. No Brasil, tanto o Centro de Biópsia Muscular da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em atividade desde 1993, como o CEDHIMA (Centro de Estudo, Diagnóstico e Investigação de Hipertermia Maligna) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mais recentemente em funcionamento, utilizam o protocolo americano para o diagnóstico de HM. Recentemente foi demonstrada experimentalmente uma boa correlação entre o limiar de cafeína no IVCT e os valores de tensão da fibra muscular, enquanto que não se encontrou uma correlação significativa quando utilizado o limiar de halotano. Estes dados sugerem uma conexão entre o limiar de cafeína e a intensidade da tensão provocada com o fenótipo da hipertermia maligna^{13,14}. As desvantagens do teste da contratura *in vitro* são o caráter invasivo, a possibilidade de um diagnóstico falso-negativo, assim como os falso-positivos, e o alto custo, tornando-se necessário o aperfeiçoamento de métodos alternativos.

BIOLOGIA MOLECULAR DA HIPERTERMIA MALIGNA

O *locus* da HM em suínos e o gene codificante do receptor de ryanodina RYR1 (ou MHS1 locus, por *malignant hyperthermia susceptibility*), canal de liberação de Ca²⁺ no músculo

esquelético, foram localizados no cromossoma 6p11-q2¹⁵. A seqüência de aminoácidos da proteína RYR1 do suíno normal e do suíno com PSS difere em um único aminoácido; no suíno com PSS a arginina é substituída pela cisteína na posição 615 (Arg615Cys). No DNA, esta substituição ocasiona a perda da seqüência de restrição reconhecida pela endonuclease *HinPI* e origina uma nova seqüência, reconhecida especificamente pela endonuclease *HgiAI*. Isto propicia um método simples de detecção da mutação no DNA genômico de animais susceptíveis PSS¹⁶, baseado na digestão diferencial do segmento gênico amplificado por PCR por uma enzima de restrição específica.

Em humanos, assim como em suínos, todos os sintomas da HM estão relacionados à disfunção no metabolismo do Ca²⁺. A clonagem do DNA codificante do canal de liberação de Ca²⁺¹⁷ permitiu a localização do gene RYR1 no cromossomo 19q13.1^{18,19} numa região análoga à 6p11-q21 encontrada em suínos, e a determinação de uma correlação entre polimorfismos e marcadores genéticos do gene RYR1 com a HM²⁰⁻²². O mapeamento físico e a análise citogenética do gene RYR1 foram posteriormente realizados por Garcia e col²³ em 1995. Um estudo detalhado da organização estrutural de RYR1 revelou grande complexidade. O gene RYR1 está composto por 106 exons compreendidos em 158 Kb²⁴. A proteína codificada pelo gene, constituída por 5038 aminoácidos, foi caracterizada como um homotetrâmero, onde cada sub-unidade tem massa molecular aproximada de 564 kD, constituindo um dos maiores canais iônicos descritos²⁵.

A primeira mutação que segregava junto com a HM identificada em humanos foi a Arg614Cys²⁶, resultante da transição C1840T e que corresponde à mutação Arg615Cys responsável por todos os casos de HM em suínos. No entanto, esta alteração genética é responsável apenas por alguns casos de HM em humanos^{26,27}, indicando que outras mutações no gene ou em outros genes poderiam alterar a regulação do Ca²⁺ nas células do músculo esquelético e ocasionar HM. Posteriormente outras mutações foram descritas no gene RYR1 em diversas famílias, onde alguns membros apresentavam também a doença do Central Core (*Central Core Disease, DCC*), uma miopatia hereditária intimamente associada à HM, na qual os núcleos centrais são áreas das fibras musculares isentas de enzimas fosforilativas e de mitocôndrias. Já foram identificadas 17 mutações em famílias com HM (tabela I), através de técnicas como *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP), *Heteroduplex analysis* (HA) e seqüenciamento direto. As mutações encontradas até o momento estão localizadas entre os exons 2 e 18, no exon 39, 40 e 45, agrupando-se em duas regiões do gene que correspondem à região amino-terminal e à região central da proteína, entre os resíduos aminoacídicos 35 e 614 e entre os resíduos 2163 e 2458 respectivamente^{24,14}. As quatro mutações adjacentes identificadas nos exons 39 e 40, por Manning e col, responsáveis pelo 11% dos casos de HM, identificam o segmento gênico 6400-6700 como um sítio freqüente de mutações. Coletivamente, as mutações encontradas no gene RYR1 são responsáveis por aproximadamente 50% dos casos de HM da população caucasiana¹³, indican-

do a provável existência de outras mutações ainda não caracterizadas no gene RYR1 e/ou outros genes relacionados à HM.

Das 17 mutações caracterizadas no gene RYR1, 15 foram estudadas recentemente do ponto de vista da alteração funcional ocasionada no receptor de rianodina. A caracterização da alteração foi realizada mediante a introdução individual das mutações a um sistema de expressão. Esta metodologia consiste em manipular células de modo a introduzir alterações em seu complemento genético, cujo efeito se deseja estudar, por exemplo, pela incorporação de um plasmídeo que contenha o gene de interesse mutado. As células alteradas são cultivadas permitindo a expressão do gene, que então é transcrito e traduzido. Pode-se então realizar o estudo na proteína, comparando-se a produzida por uma célula normal não modificada com a sintetizada pela célula geneticamente alterada. Pode-se, ainda, estudar o efeito funcional das mutações introduzidas ao sistema, realizando-se ensaios específicos. Esta técnica permitiu comprovar que proteínas mutadas RYR1 são mais sensíveis à cafeína e ao halotano do que a proteína RYR1 normal¹⁴.

Tabela I - Mutações no Gene RYR1 Identificadas em Famílias Suscetíveis à HM e DCC

Mutação	Exon	Famílias com a mutação	Referência
Cys35Arg	2	1 família	Lynch e col ²⁸
Arg163Cys ^a	6	2%	Quane e col ²⁹
Gly248Arg	9	2%	Gillard e col ³⁰
Gly341Arg	11	10%	Quane e col ³¹
Ile403Met ^a	11	1 família	Quane e col ²⁹
Tyr522Ser ^a	14	1 família	Quane e col ³²
Arg552Trp	15	1 família	Keating e col ⁴
Arg614Cys	18	4%	Gillard e col ²⁶
Arg614Leu	18	2%	Quane e col ³³
Arg2163Cys	39	4%	Manning e col ¹³
Arg2163His ^a	39	1 família	Manning e col ¹³
Val2168Met	39	7%	Manning e col ¹³
Thr2206Met	40	1 família	Manning e col ¹³
Gly2434Arg	45	4%	Keating e col ³⁴
Arg2435His ^a	45	1 família	Zhang e col ³⁵
Arg2458Cys	45	4%	Manning e col ¹³
Arg2458His	45	4%	Manning e col ¹³

^a Associadas à doença do Central Core

HETEROGENEIDADE GENÉTICA DA HM

Em diversos trabalhos de rastreamento de mutações nas famílias com HM não foi possível identificar a alteração genética causal no gene RYR1³⁶⁻⁴⁰. Em outros, onde a alteração foi identificada, foi visto que não era responsável pela anomalia funcional do canal de liberação de Ca²⁺, sugerindo resultado errôneo do teste da contratura *in vitro* e/ou a existência de uma segunda mutação no gene ou em outro gene responsável pelo fenótipo da HM^{27,41,42}. Além disso, o resultado dos

eventos de recombinação que permitem analisar a associação entre marcadores do gene RYR1 com a HM de alguns indivíduos, tem demonstrado a heterogeneidade genética da doença^{27,36,43,44}.

Loci alternativos relacionados com a HM foram propostos nos cromossomos 17q11.2-q24⁴⁵ e 7q11.23-q21.1⁴⁶, mas os resultados das análises de ligação (linkage) destas regiões com a HM ainda não é conclusivo. Outros estudos de ligação sugeriram a presença de genes candidatos em 3q13⁴⁷ e em 1q⁴⁴. Nesta última região, detectaram-se alterações no gene CACNL1A3 em uma família. O gene CACNL1A3 codifica para a subunidade $\alpha 1$ do receptor da dihidropiridina, que interage com o receptor RYR1 na regulação da concentração de Ca²⁺ nas fibras do músculo esquelético⁴⁸ e é, portanto, um forte candidato para explicar pelo menos parte dos casos de HM não associados a mutações no RYR1.

Uma característica curiosa da HM é sua relação com outras doenças. É bem documentado que o fenótipo de susceptibilidade à HM, detectado pelo teste da contratura *in vitro*, pode manifestar-se secundariamente em pacientes com doenças neuromusculares como Distrofia Miotônica, Miotonia Congênita, Distrofias Muscular de Duchenne e Becker, Síndrome de King, além da Doença do Central Core (DCC)⁷. Estas condições são clinicamente diferentes uma da outra, apesar do *locus* DCC também mapear no cromossomo 19q13.1⁴⁹ e apresentar alterações genéticas no gene RYR1^{29,35}.

IDENTIFICAÇÃO PRÉ-SINTOMÁTICA DE HIPERTERMIA MALIGNA

Frente a um caso de HM é muito importante abordar o paciente sobre sua história familiar, lembrando que as manifestações clínicas da doença podem variar dentro da mesma família. Ou seja, indivíduos da mesma família podem apresentar desde um quadro clínico grave de HM até uma doença de manifestações tão brandas que pode passar despercebida.

Desconhece-se a taxa de novas mutações em HM. Portanto, pode ser importante acompanhar com cuidado os descendentes de indivíduos com HM, mesmo que a história familiar seja negativa ou não informativa para HM.

A disponibilidade de testes de DNA capazes de identificar mutações que causam HM deve revolucionar o diagnóstico de HM e a identificação de famílias e indivíduos em risco para a doença.

Os métodos moleculares permitem a identificação pré-sintomática sem a necessidade de biópsias, e na atualidade já pode realizá-los em cerca de 50% dos casos. Uma vez identificada a mutação em um caso de HM, todos os membros da família poderão ser testados para aquela mutação exclusiva a partir de uma amostra de sangue. Se bem que a identificação de uma mutação em RYR1 ainda seja trabalhosa e restrita a apenas alguns laboratórios especializados, a tendência para os próximos anos é que estes testes tornem-se cada vez mais acessíveis e de fácil execução.

Naquelas famílias com histórico de HM onde não se identificam mutações no gene RYR1, é possível que outros genes

ainda não identificados estejam envolvidos. Esta é a situação presente em 50% dos casos de HM com clara história de hereditariedade para a síndrome. A rápida progressão do projeto genoma deve solucionar estes casos em futuro próximo, por meio da caracterização de mutações novas. Estes estudos permitirão também a elucidação da heterogeneidade genética da HM, já que as variações fenotípicas da síndrome devem ser causadas por interação de diversos genes, ainda desconhecidos, com o gene RYR1.

É evidente o benefício da identificação pré-sintomática mutacional. Mesmo indivíduos que nunca foram submetidos à cirurgia poderão ser preparados no caso de ser necessária uma intervenção, providenciando anestésicos e bloqueadores neuromusculares alternativos e dantrolene na sala de operação, evitando assim qualquer risco. O conhecimento das mutações e genes envolvidos com a HM e doenças relacionadas permitirá que o diagnóstico genético realizado a partir de uma amostra de sangue, confiável e de baixo custo, passe a ser realizado em número crescente de famílias.

REFERÊNCIAS

- Denborough M, Foster J, Lovell R et al - Anaesthetic deaths in a family. *Br J Anaesth*, 1962; 34: 395-396.
- Britt B, Kalow W - Malignant hyperthermia - a statistical review. *Can Anaesth Soc J*, 1970;17: 293-315.
- MacLennan DH - The genetic basis of malignant hyperthermia. *Trends Pharmacol Sci*, 1992;13:330-334.
- Keating KE, Giblin L, Lynch PJ et al - Detection of a novel mutation in the ryanodine receptor gene in Irish malignant hyperthermia pedigree: correlation of the IVCT response with the affected and unaffected haplotypes. *J Med Genet*, 1997;34: 291-296.
- Britt BA - Dantrolene. *Can Anaesth Soc J*, 1984;31:61-75
- MacLennan DH, Phillips MS - Malignant hyperthermia. *Science*, 1992;256:789-794.
- Ball SP, Johnson KJ - The genetics of malignant hyperthermia. *J Med Genet*, 1993;30:89-93.
- Fagerlund TH, Islander G, Twetman ER et al - Malignant hyperthermia susceptibility, an autosomal dominant disorder? *Clin Genet*, 1997;51:365-369.
- Smith C, Bampton PR - Inheritance of reaction to halothane anaesthesia in pigs. *Genet Res*, 1977;29:287-292.
- O'Brien PJ - Etiopathogenetic defect of malignant hyperthermia: Hypersensitive calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Vet Res Commun*, 1987;11:527-559.
- The European Malignant Hyperpyrexia Group. A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. *Br J Anesth*, 1984;56:1267-1269.
- Larach MG - Standardization of the caffeine halothane muscle contracture test. *Anesth Analg*, 1989;69:511-515.
- Manning BM, Quane KA, Ording H et al - Identification of novel mutations in the ryanodine-receptor gene (RYR1) in malignant hyperthermia: genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet*, 1998;62:599-609.
- Tong J, Oyamada H, Demareux N et al - Caffeine and halothane sensitivity of intracellular Ca²⁺ release is altered by 15 calcium release channel (ryanodine receptor) mutations associated with malignant hyperthermia and/or central core disease. *J Biol Chem*, 1997;272:26332-26339.
- Harbitz I, Chowdary B, Thomsen P et al - Assignment of the porcine calcium release channel gene, a candidate for the malignant hyperthermia locus, to the 6p11-q21 segment of chromosome 6. *Genomics*, 1990;8:243-248.
- Fujii J, Otsu K, Zorzato F et al - Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 1991;253:448-451.
- Zorzato F, Fujii J, Otsu K et al - Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1990;265:2244-2256.
- MacKenzie AE, Korneluk RG, Zorzato F et al - The human ryanodine receptor gene: its mapping to 19q13.1, placement in a chromosome 19 linkage group, and exclusion as the gene causing myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet*, 1990;46: 1082-1089.
- McCarthy TV, Healy JM, Heffron JJ et al - Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12 13.2. *Nature*, 1990;343:559-561.
- MacLennan DH, Duff C, Zorzato F et al - Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature*, 1990;343:562-564.
- Ball SP, Dorkins HR, Ellis FR et al - Genetic linkage analysis of chromosome 19 markers in malignant hyperthermia. *Br J Anaesth*, 1993;70:70-75.
- Wolz W, Wendelmuth U, Rouquier S et al - A complex satellite DNA polymorphism flanking the human ryanodine receptor gene (RYR1). *Cytogenet Cell Genet*, 1996;72:215-216.
- Garcia E, Elliott J, Gorvad A et al - A continuous high-resolution physical map spanning 17 megabases of the q12, q13.1, and q13.2 cytogenetic bands of human chromosome 19. *Genomics*, 1995;27:52-66.
- Phillips MS, Fujii J, Khanna VK et al - The structural organization of the human skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. *Genomics*, 1996;34:24-41.
- Shoshan-Barmatz V, Ashley RH - The structure, function, and cellular regulation of ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels. *Int Rev Cytol*, 1998;183:185-270.
- Gillard EF, Otsu K, Fujii J et al - A substitution of cysteine for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. *Genomics*, 1991;11:751-755.
- Deufel T, Sudbrak R, Feist Y et al - Discordance, in a malignant hyperthermia pedigree, between in vitro contracture-test phenotypes and haplotypes for the HMS1 region on chromosome 19q12-13.2, comprising the C1840T transition in the RYR1 gene. *Am J Hum Genet*, 1995;56: 1334-1342.
- Lynch PJ, Krivosic-Horber R, Reyford H et al - Identification of heterozygous and homozygous individuals with the novel RYR1 mutation Cys35Arg in a large kindred. *Anesthesiology*, 1997;86: 620-626.
- Quane KA, Healy JMS, Keating KE et al - Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia. *Nat Genet*, 1993;5:51-55.
- Gillard EF, Otsu K, Fujii J et al - Polymorphisms and deduced amino acid substitutions in the coding sequence of the ryanodine receptor (RYR1) gene in individuals with malignant hyperthermia. *Genomics*, 1992;13:1247-1254.
- Quane KA, Keating KE, Manning BM et al - Detection of a novel common mutation in the ryanodine receptor gene in malignant hyperthermia: implications for diagnosis and heterogeneity studies. *Hum Mol Genet*, 1994;3:471-476.
- Quane KA, Keating KE, Healy JMS et al - Mutation screening of the RYR1 gene in malignant hyperthermia: detection of a novel Tyr to Ser mutation in a pedigree with associated central cores. *Genomics*, 1994;23:236-239.

33. Quane KA, Ording H, Keating KE et al - Detection of a novel mutation at amino acid position 614 in the ryanodine receptor in malignant hyperthermia. *Br J Anaesth*, 1997;79:332-337.
34. Keating KE, Quane KE, Manning BM et al - Detection of a novel RYR1 mutation in four malignant hyperthermia pedigrees. *Hum Mol Genet*, 1994;3:1855-1858.
35. Zhang Y, Chen HS, Khanna VK et al - A mutation in the human skeletal muscle ryanodine receptor gene associated with central core disease. *Nat Genet*, 1993;5:46-50.
36. Deufel T, Golla A, Iles D et al - Evidence for genetic heterogeneity of malignant hyperthermia susceptibility. *Am J Hum Genet*, 1992;50:1151-1161.
37. Fagerlund T, Ording H, Bendixen D et al - Search for three known mutations in the RYR1 gene in 48 Danish families with malignant hyperthermia. *Clin Genet*, 1994;46:401-404.
38. Fagerlund TH, Islander G, Twetman ER et al - A search for three known RYR1 gene mutations in 41 Swedish families with predisposition to malignant hyperthermia. *Clin Genet*, 1995;48:12-16.
39. Fagerlund T, Ording H, Bendixen D et al - RYR1 mutation G1021A (Gly341Arg) is not frequent in Danish and Swedish families with malignant hyperthermia susceptibility. *Clin Genet*, 1996;49: 186-188.
40. Adeokun AM, West SP, Ellis FR et al - The G1021 substitution in the RYR1 gene does not cosegregate with malignant hyperthermia susceptibility in a British pedigree. *Am J Hum Genet*, 1997;60:833-841.
41. Isaacs H, Badenhorst M - False-negative results with muscle caffeine halothane contracture testing for malignant hyperthermia. *Anesthesiology*, 1993;79:5-9.
42. Serfas KD, Bose BS, Patel L et al - Comparison of the segregation of the RYR1 C1840T mutation with segregation of the caffeine/halothane contracture test results for malignant hyperthermia susceptibility in a large Manitoba Mennonite family. *Anesthesiology*, 1996;84:322-329.
43. Fagerlund TH, Islander G, Ranklev-Twetman E et al - Recombination between the postulated CCD/MHE/HMS locus and RYR1 gene markers. *Clin Genet* 1996;50:455-458.
44. Robinson R, Curran JL, Hall WJ et al - Genetic heterogeneity and HOMO analysis in British malignant hyperthermia families. *J Med Genet*, 1998;35:196-201.
45. Levitt RC, Olckers A, Meyers S et al - Evidence for the localization of a malignant hyperthermia susceptibility locus (MHS2) to human chromosome 17q. *Genomics*, 1992;14:562-566.
46. Iles DE, Lehmann-Horn F, Scherer SW et al - Localization of the gene encoding the α 2/ δ -subunits of the L-type voltage-dependent calcium channel to chromosome 7q and analysis of the segregation of flanking markers in malignant hyperthermia susceptible families. *Hum Mol Genet*, 1994;3: 969-975.
47. Sudbrak R, Procaccio V, Klausnitzer M et al - Mapping of a further malignant hyperthermia susceptibility locus to chromosome 3q13.1. *Am J Hum Genet*, 1995;56:684-691.
48. Monnier N, Procaccio V, Stieglitz P et al - Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the α -subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am J Hum Genet*, 1997;60:1316-1325.
49. Mulley JC, Kozman HM, Phillips HA et al - Refined genetic localization for central core disease. *Am J Hum Genet*, 1993;52: 398-405.