

**Patomecanismo das mutações do recetor
rianodina e a sua implicação na Hipertemia
Maligna
Revisão da literatura**

Catarina Araújo Borges

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Mestrado Integrado em Medicina
(mestrado integrado)

Orientador: Prof. Doutor Manuel Vico Ávalos
Co-orientador: Doutor Rúben Filipe Monteiro Calaia

Janeiro de 2025

Folha em branco

Declaração de Integridade

Eu, Catarina Araújo Borges, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição 43920 do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o Código de Integridades da Universidade da Beira Interior.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 28 /01 /2025

Assinatura

Catarina Borges

Folha em branco

Dedicatória

À minha família, por me encorajar a nunca desistir.

Ao meu pai e irmão que, apesar de já não se encontrarem comigo, sei que continuam a olhar por mim.

Mas, em especial, à minha mãe, por ser o maior exemplo de perseverança e espírito de sacrifício. Obrigada pelo apoio constante, mesmo nos dias mais difíceis, e por me teres sempre incentivado a ser a minha melhor versão.

Folha em branco

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Manuel Vico Ávalos e ao Doutor Rúben Filipe Monteiro Calaia, por terem aceitado serem os meus orientadores, e pela disponibilidade e toda a ajuda que ofereceram durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Faculdade Ciências da Saúde, por me proporcionar as ferramentas para a concretização deste sonho.

E aos meus amigos, colegas de curso, quero agradecer, por todas as memórias que fizemos juntos ao longo destes 6 anos e que vou guardar comigo.

Folha em branco

Resumo

Introdução: a hipertermia maligna (HM) é uma perturbação farmacogenética autossômica dominante que envolve o músculo esquelético. A mutação associada envolve o recetor rianodina (RyR), nomeadamente a isoforma 1, ao nível do retículo sarcoplasmático (RS). Estas mutações vão provocar um aumento exacerbado na concentração de cálcio intraplasmático, ativando os processos bioquímicos relacionados com a ativação muscular, que vão levar às alterações fisiopatológicas da HM.

Objetivos: pretende-se com este trabalho elaborar uma revisão bibliográfica sobre o papel da isoforma 1 do recetor rianodina (RyR1) na HM, sendo o objetivo principal, descrever o mecanismo de ação do RyR1 e a sua implicação na patologia.

Metodologia: foi realizada uma pesquisa na base de dados eletrónica Pubmed®, considerando apenas artigos escritos em inglês e sem restrições quanto à região e ano de publicação. A data da última pesquisa foi 20 de dezembro de 2024. Apenas foram selecionados artigos que abordassem o patomecanismo da doença ou que identificassem possíveis mutações novas do recetor.

Previamente à pesquisa, foram definidas as palavras-chave: RyR1, patomecanismo, hipertermia maligna, mutações e canalopatias.

Conclusões: as mutações no recetor RyR1 resultam numa fuga constante de cálcio em repouso, num acoplamento defeituoso da contração de excitação e num aumento do stress oxidativo mitocondrial. Estas mutações alteram a cinética do canal e o tornam-no hipersensível a ligantes ativadores de canal, como a cafeína e o halotano.

Palavras-chave

Recetor de Rianodina;Patomecanismo;Hipertermia Maligna;Mutações

Folha em branco

Abstract

Introduction: malignant hyperthermia is an autosomal dominant pharmacogenetic disorder affecting skeletal muscle. The associated mutation involves the ryanodine receptor, namely isoform 1 at the level of the sarcoplasmic reticulum. These mutations cause an exaggerated increase in plasma intra calcium concentration, activating biochemical processes related to muscle activation that lead to the pathophysiological changes of malignant hyperthermia.

Objectives: the aim of this study is to perform a literature review on the RyR1 receptor and malignant hyperthermia. The main objective is to describe the mechanism of action of the ryanodine receptor and its implication in the pathology.

Methodology: a search was performed in the electronic database pubmed, considering only articles written in English and without restrictions on region and year of publication. The date of the last search was December 20, 2024. Only articles that addressed the pathomechanism of the disease or identified possible new mutations in the receptor were selected.

Prior to the search, the following keywords were defined: RyR1, pathomechanism, malignant hyperthermia, mutations and channelopathies.

Conclusions: mutations in the RyR1 receptor result in a constant calcium leak at rest, defective excitation-contraction coupling and increased mitochondrial oxidative stress. These mutations alter the kinetics of the channel and render it hypersensitive to channel-activating ligands such as caffeine and halothane.

Keywords

Ryanodine receptor; Pathomechanisms; Malignant hyperthermia; Mutations

Folha em branco

Índice

Introdução	1
Objetivos	3
Metodologia	3
Capítulo 1: Mecanismo de ação	4
1.1 Grupo 1	5
1.1.1 Recetor de Dihidropiridina	6
1.1.2 <i>FK506-binding protein 12</i>	6
1.1.3 Triadina	7
1.2 Grupo 2	7
1.2.1 Calmodulina	8
1.3 Grupo 3	10
1.3.1 Calsequina	11
1.3.2 Triadina	11
1.4 Grupo 4	12
1.4.1 Proteína Cinase A	13
1.4.2 Fosfodiesterase 4D3 e Proteína Fosfatase 1	14
1.5 Grupo 5	14
1.5.1 S-nitrosilação	14
1.5.2 S-oxidação	16
1.5.3 S-glutationilação	17
1.5.4 S-palmitoilação	19
1.6 Grupo 6	20
1.6.1 Cálcio	22
1.6.2 Adenosina Trifosfato	22
1.6.3 Magnésio	22
Capítulo 2: Outros possíveis patomecanismos	22
2.1 Libertação de cálcio induzida por sobrecarga de armazenamento (SOICR)	22
2.2 Canal de cálcio dependente de voltagem tipo L, subunidade α_1 (CACNA1S e Cav1.1)	23
2.3 RS Ca ²⁺ -ATPase (SERCA)	24
2.4 Magnésio	24
2.5 Interações interdomínio	25
Capítulo 3: Mutações identificadas	26
3.1 Diagnóstico	26
3.2 Classificação	26
3.3 Mutações	26
Capítulo 4: Identificação de possíveis linhas de investigação para o	30

desenvolvimento de novos fármacos no futuro	
4.1 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- β -D-ribofuranosídeo (AICAR)	30
4.2 Carvedilol	31
4.3 Dantroleno	32
Discussão	34
Conclusão	35
Referências	37

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1: Localização das mutações MHS e CCD na proteína RYR1

Figura 2.1: RyR1 fechado: não há libertação de acetilcolina (ACh) estimulada pela junção neuromuscular

Figura 2.2: RyR1 aberto: Ativação do RyR1 em resposta à ativação da DHPR pela libertação de ACh

Figura 3.1: RyR1 fechado: Ca²⁺Cam ligado, resultando no fecho do canal e em elevadas concentrações de Ca²⁺ no RS

Figura 3.2: RyR1 aberto: ApoCaM ligado em resposta à ativação do RyR1 precedida pela ativação da DHPR resultando em elevadas concentrações de Ca²⁺ sarcoplasmático

Figura 4.1: RyR1 fechado: Interação RyR1-junctina devido à interação da junctina com a CSQ no seu estado fosforilado, resultando em concentrações de Ca²⁺ elevadas no RS

Figura 4.2: RyR1 aberto: Interação RyR1-triadina devido à interação da triadina com a CSQ desfosforilada resultando na saída do Ca²⁺ para o sarcoplasma

Figura 5.1: RyR1 fechado: Desfosforilação de RyR1 pela PP1 devido à baixa concentração de cAMP, provocando um aumento da concentração de Ca²⁺ no RS

Figura 5.2: RyR1 aberto: Fosforilação do RyR1 e da Gm pela PKA devido a uma elevada concentração de cAMP, resultando num aumento da concentração de Ca²⁺ sarcoplasmático

Figura 6.1: RyR1 aberto: nitrosilação dos resíduos de cisteína do RyR1 pelo NO em resposta à p(O₂) fisiológica, resultando em Ca²⁺ sarcoplasmático elevado

Figura 6.2: RyR1 aberto: a nitrosilação do RyR1 pelo NO anula o efeito inibitório do Ca-CaM

Figura 7.1: RyR1 aberto: oxidação dos resíduos de cisteína do RyR1 por reação de espécies reativas de oxigénio, em resposta ao aumento da p(O₂) fisiológica, resultando num Ca²⁺ sarcoplasmático elevado

Figura 7.2: RyR1 fechado: não há oxidação do RyR1 quando há diminuição da p(O₂), Ca²⁺-CaM está ligada, resultando num aumento do Ca²⁺ no RS

Figura 8.1: RyR1 aberto: aumento inicial da GSH que estimula a glutationilação dos resíduos de cisteína do RyR1 pelo GSH, diminuindo, por sua vez, a relação GSH:GSSG e reduzindo a sensibilidade do RyR1 à inibição do Mg^{2+} , o que resulta num Ca^{2+} sarcoplasmático elevado

Figura 8.2: RyR1 fechado: não há glutationilação até que a relação GSH:GSSG seja restaurada, resultando numa concentração de Ca^{2+} elevada no RS

Figura 9.1: RyR1 aberto: palmitoilação dos resíduos de cisteína do RyR1 pelo ácido gordo palmitoil-CoA, resultando em Ca^{2+} sarcoplasmático elevado

Figura 9.2: RyR1 fechado: sem palmitoilação, provocando um aumento da concentração de Ca^{2+} no RS

Figura 10.1: RyR1 fechado: Ligação do Ca^{2+} nos locais inibitórios e do Mg^{2+} resultando no fecho do canal

Figura 10.2: RyR1 aberto: ativação pela ligação do Ca^{2+} nos locais de ativação e do ATP resultando na abertura do canal (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

Folha em branco

Lista de Acrónimos

AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-D-ribofuranosídeo
ACh	Acetilcolina
AMPK	Proteína Cinase Ativada pelo AMP
AMP-PCP	Forma não hidrolisável de ATP
ApoCaM	Apocalmodulina
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca ²⁺	Cálcio
CaM	Calmodulina
Ca ²⁺ +CaM	Forma ligada ao Ca ²⁺ da calmodulina
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclica
CACNA 1S	Canal de cálcio dependente de voltagem, do tipo L, subunidade α1S
Cav1.1	Canal de cálcio dependente de voltagem, do tipo L
CHCT	<i>Caffeine-Halothane Contracture Testing</i>
CICR	Libertação de cálcio induzida pelo cálcio
CSQ	Calsequestrina
DHPR	Recetor de Dihidropiridina
DP4	<i>Domain Peptide 4</i>
DPc10	Peptídeo correspondente à região Gly2460-Pro2495 do domínio central
DS	Dantroleno Sódico
DSS	Suspensão nanocristalina intravenosa de DS
EC	Excitação-Contração
EHR	<i>Enhanced heat response</i>
EMHG	Grupo Europeu de Hipertermia Maligna
FKBP12	<i>FK506-binding protein 12</i>
GSH	Glutationa reduzida
GSNO	Derivado s-nitrosado da Glutationa
GSSG	Dissulfureto de Glutationa
HM	Hipertermia Maligna
IVCT	Teste de Contratura in Vitro
L-NAME	Éster metílico da L-NG-nitroarginina
mAKAPs	Proteína de Ancoragem da Cinase A Muscular
Mg ²⁺	Magnésio
MH/CCD	Hipertermia maligna/ <i>Central Core Disease</i>
NAMHG	Grupo Norte-Americano de Hipertermia Maligna
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintetases de Óxido Nítrico
Nox4	NADPH oxidase 4
PDE4D3	Fosfodiesterase 4D3
PKA	Proteína Cínase A
PMCA	Bombas de Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
PP1	Proteína Fosfatase 1
RNS	Espécies Reativas de Azoto
ROS	Espécie de oxigénio reativo
RS	Retículo Sarcoplasmático

RyR	Recetor Rianodina
RyR1	Isoforma 1 do Recetor Rianodiana
RyR2	Isoforma 2 do Recetor Rianodiana
SERCA	RS Ca ²⁺ -ATPase
SOICR	Libertação de Ca ²⁺ induzida por sobrecarga de armazenamento
WT	<i>Wild-type</i>
ZMP	Ribonucleósido 5-aminoimidazol-4-carboxamida

Folha em branco

Introdução

A hipertermia maligna é uma perturbação farmacogenética autossómica dominante, com penetrância incompleta e expressão fenotípica variável, que envolve o músculo esquelético. (1)

A incidência de episódios de HM é 1:10.000-1:250.000 anestésias. Embora seja possível desenvolver a patologia na primeira exposição à anestesia, em média, os doentes necessitam cerca de três exposições antes do desencadeamento. As reações são mais frequentes nos homens do que nas mulheres (2:1). A maior incidência ocorre nos jovens, com uma idade média de todos os doentes a apresentarem reações de 18,3 anos. (1)

Uma das mutações associadas envolve o recetor rianodina, nomeadamente a isoforma 1 ao nível do retículo sarcoplasmático. Os RyR são recetores intracelulares que permitem uma permeabilidade ao Ca^{2+} , do RS para o citoplasma nas células musculares, permitindo a contração muscular esquelética e cardíaca. (2) Existem várias isoformas dos RyR. O RyR1 é a isoforma predominantemente expressa no músculo esquelético, já a isoforma RyR2 é o subtipo exclusivo dos miócitos cardíacos. (2) O RyR3 é expresso nos músculos esqueléticos neonatais embora não esteja expresso no adulto. (3) Por estar envolvido no músculo esquelético, o recetor RyR1 é essencial no acoplamento excitação-contração muscular. A sua função é libertar cálcio do RS necessário para contração muscular. (4)

A mutação no gene que codifica para o recetor RyR1 é o responsável pela maior suscetibilidade para HM. Até ao momento, foram identificadas mais de 400 mutações do gene RYR1, localizado no cromossoma “19q13.1” e, destas mutações, pelo menos 34 causam HM. (1) Quando uma destas mutações está presente, o indivíduo apresenta suscetibilidade para a manifestação da HM quando exposta a determinados agentes farmacológicos, nomeadamente anestésicos halogenados como, por exemplo, o halotano ou o sevoflurano, e à succinilcolina, um relaxante muscular despolarizante. (1) A exposição a estes agentes induz uma resposta hipermetabólica das células musculares. Esta resposta resulta na ativação dos miofilamentos das fibras musculares, devido a um aumento na libertação de cálcio do RS nos miócitos. (5) O aumento exacerbado de cálcio no interior da célula vai ativar os processos bioquímicos relacionados com a ativação muscular, através da utilização exacerbada da adenosina trifosfato (como forma compensatória) que conduz a alterações patofisiológicas potencialmente fatais. (1,6,3) Os sinais clínicos mais comuns incluem: hipercapnia, aumento da frequência cardíaca e rigidez muscular generalizada. Outras manifestações habitualmente presentes são: hipertermia, aumento do consumo de oxigénio, acidémia, hipercaliémia e rabdomiólise. (3) Atualmente, o dantroleno é a primeira linha farmacológica que pode ser usada perante uma manifestação de HM, uma vez que permite restaurar o equilíbrio da concentração de cálcio nos miócitos, através de um mecanismo, ainda não completamente esclarecido, ao nível dos recetores RyR. (1)

Neste momento, é o único fármaco conhecido que consegue tratar especificamente a HM.

O seu mecanismo de ação não é completamente compreendido, mas sabe-se que o fármaco vai inibir o DHPR de uma forma dependente de RyR1. Também foi possível verificar que este se liga a um local específico na proteína RyR1 e reduz a atividade do canal RyR1 em células musculares intactas. (1)

A avaliação dos doentes suscetíveis à HM deverá ser realizada previamente à exposição com agentes que podem despoletar esta entidade clínica. Atualmente, o “*gold standard*” para o diagnóstico de HM é o teste de contratura *in vitro*, que se baseia na contratura das fibras musculares na presença de halotano ou cafeína. Duas formas amplamente utilizadas deste teste foram desenvolvidas; um teste de contratura *in vitro* (IVCT) pelo Grupo Europeu de Hipertermia Maligna (EMHG) e o outro *Caffeine-Halothane Contracture Testing* (CHCT) pelo Grupo Norte-Americano de Hipertermia Maligna (NAMHG). (1)

Com base no protocolo EMHG, um indivíduo é considerado suscetível à HM (MHS) quando os resultados dos testes de cafeína e halotano são ambos positivos. No entanto, se ambos os testes forem negativos, o indivíduo é considerado não suscetível à HM (MHN). Além disso, um indivíduo é também diagnosticado quando é obtido um teste positivo de halotano ou cafeína e estes indivíduos são designados por MHS(h) ou MHS(c), respetivamente. (1)

Atualmente, um dos maiores desafios científicos e clínicos passa pelo desenvolvimento das avaliações genéticas, de forma a esclarecer e a identificar com maior detalhe as mutações responsáveis pela manifestação da HM e identificar o mecanismo de ação específico do dantroleno, para o desenvolvimento de novos fármacos, mas também é necessário determinar com maior detalhe a causa imediata do desenvolvimento da HM para ser possível desenvolver testes de diagnóstico mais eficazes na determinação da suscetibilidade da HM.

Objetivos

Pretende-se com este trabalho elaborar uma revisão bibliográfica sobre o recetor RyR1 e a hipertermia maligna com os seguintes objetivos:

- a) Descrever o mecanismo de ação do RyR1 e a sua implicação na patologia
- b) Descrever outros possíveis patomecanismos implicados na hipertermia maligna
- c) Descrever algumas das mutações já descritas do recetor
- d) Identificar possíveis linhas de investigação para o desenvolvimento de novos fármacos no futuro

Metodologia

Foi realizada uma pesquisa na base de dados eletrónica PubMed®.

Previamente à pesquisa, foram definidas as palavras-chave: RyR1, patomecanismo, HM, mutações e canalopatias.

Os critérios estabelecidos para a pesquisa e seleção de artigos incluíram:

- Idioma: a inclusão de artigos foi restrita a artigos publicados em inglês.
- Data de publicação: sem restrição temporal relativa à data de publicação.
- Conteúdo: apenas foram selecionados artigos que abordassem o patomecanismo da doença ou que identificassem possíveis mutações novas do recetor.

A data da última pesquisa foi 20 de dezembro de 2024.

No total foram analisados 30 artigos, contendo 16 revisões de literatura e 6 artigos de investigação.

O presente trabalho está organizado em 4 capítulos:

O primeiro capítulo aborda o mecanismo de ação do recetor e todos os seus componentes.

O segundo capítulo aborda e descrever outros mecanismos que possam estar envolvidos na patológica, como por exemplo o magnésio ou o *Sarcoplasmic/Endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA)*.

O terceiro capítulo descreve algumas das mutações já identificadas e os critérios que permitem classificar estas mutações.

Por fim, no quarto e último capítulo são identificadas possíveis linhas de investigação para o desenvolvimento de novos fármacos no futuro.

Capítulo 1: Mecanismo de ação

A via do recetor RyR1 é composta por diversas interações proteína-proteína e proteína-ligando, e por modificações pós-translacionais, criando um complexo macromolecular para a ativação e regulação do canal, que vai ser regulado por ligantes endógenos e exógenos. (2,4)

De modo a facilitar a compreensão, estas interações e modificações foram divididas em 6 grupos, no entanto, 3 das proteínas que serão referidas a seguir, nomeadamente a *FK506-binding protein 12* (FKBP12), a triadina e a calmodulina, têm um papel importante em todos os grupos e podem constituir um alvo terapêutico muito importante no tratamento da HM. (3) Além disso, a gravidade da doença depende da atividade das modificações pós-translacionais.

Cada recetor tem mais de 560 Kd, com cerca de 90% da sequência do canal a compreender domínios citoplasmáticos. Cada monómero atravessa a membrana do retículo sarcoplasmático (RS) pelo menos seis a oito vezes. (2) Os canais funcionais de libertação de Ca^{2+} estão organizados em 6 homotetrâmeros (S1-S6), (2,4), sendo que cada canal tetramérico tem uma massa de 2.250.000 Da. (6) Prevê-se que cada monómero seja constituído por uma região citoplasmática N-terminal (~4100 aminoácidos) que corresponde à maioria da proteína, múltiplos domínios que abrangem a membrana (hélices 1-6) e uma pequena porção C-terminal (~800 resíduos). (2,6) As hélices S1-S4 formam uma interface com o outro domínio da subunidade do RyR1 adjacente, ao passo que as hélices S5-S6 e o segmento p vão criar o domínio formador do poro. (4,6)

As mutações estão localizadas principalmente nos “hotspot” 1, 2 e 3 do recetor, conforme esquematizado na Figura 1. Um hotspot é uma região delimitada onde se agrupam as mutações. Estes incluem os resíduos n-terminal 1-614 (sarcoplasma) e os resíduos c-terminal 4136-4973 (formador do poro, lúmen do RS e membrana). (4)

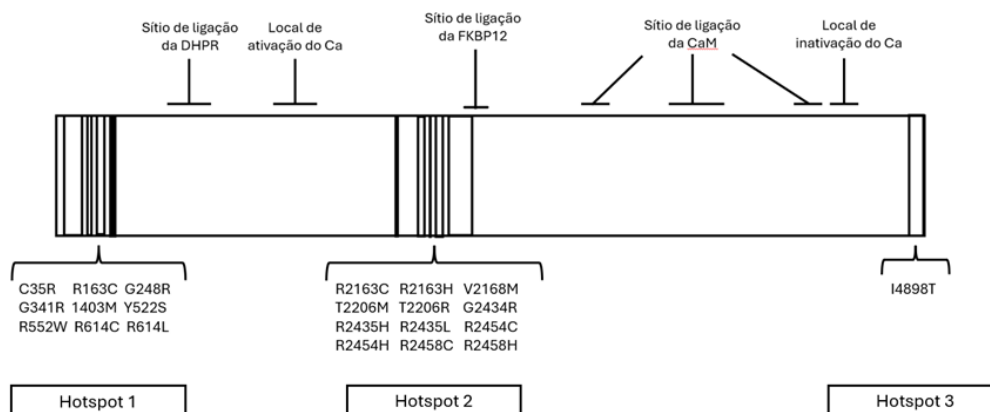


Figura 1: Localização das mutações MHS e CCD na proteína RYR1 (Figura adaptada McCarthy T v, Quane KA, Lynch PJ. Ryanodine Receptor Mutations in Malignant Hyperthermia and Central Core Disease. Vol. 15, HUMAN MUTATION. 2000)

Este capítulo está dividido em seis partes. Cada parte aborda um dos grupos referidos anteriormente, o seu mecanismo de ação e os seus componentes.

Grupo 1

O grupo 1 responde aos potenciais de ação e inicia a libertação de Ca^{2+} , o que vai alterar as concentrações deste ião no interior do RS e no sarcoplasma. Este grupo contribui com a sinalização anterógrada, onde o acoplamento excitação-contração (EC) é iniciado em resposta à estimulação muscular. (4)

O componente “on” envolve principalmente os canais de Ca^{2+} do tipo L dependentes de voltagem do sarcolema (recetores de dihidropiridina -, DHPRs) que estão mecanicamente acoplados a canais de libertação de Ca^{2+} intracelulares (RyR1s) localizados no RS. (8)

Durante o acoplamento EC, a despolarização da membrana induz uma mudança conformacional no DHPR que desencadeia uma alteração na estrutura do RyR1, permitindo as interações interdomínio e a libertação de Ca^{2+} dos RS próximos (acoplamento anterógrado). Este liga-se à troponina C, desinibindo o aparelho contrátil e provocando a contração muscular. (4,8)

O FKBP12 e a triadina vão regular a abertura e o fecho do RyR1 após a ativação do DHPR. (4)

A figura 2 esquematiza o RyR1 e a sua interação com os componentes do grupo 1, demonstrando o recetor no seu estado aberto ou fechado, consoante esteja ou não presente acetilcolina (ACh).

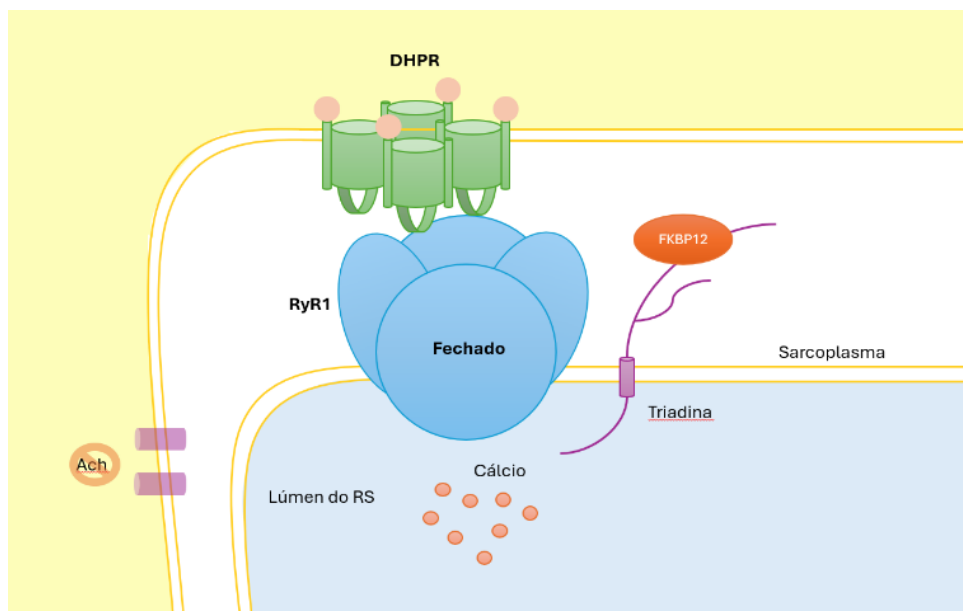


Figura 2.1: RyR1 fechado: não há libertação de ACh estimulada pela junção neuromuscular (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

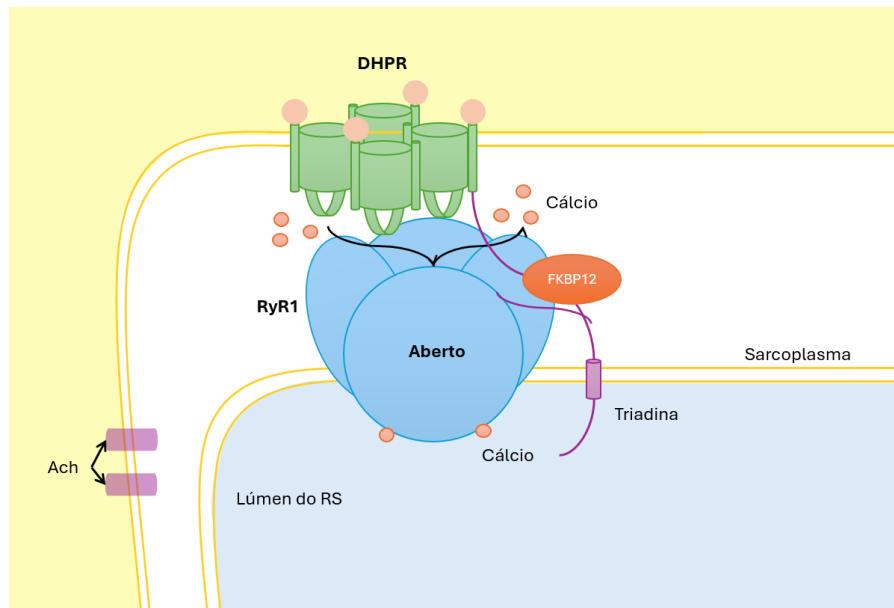


Figura 2.2: RyR1 aberto: Ativação do RyR1 em resposta à ativação da DHPR pela liberação de ACh (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

Recetor de Dihidropiridina

O recetor de dihidropiridina (DHPR) está presente na membrana do túbulo T dos miócitos esqueléticos e está agrupado em tétrades. Cada tétrede interage com um homotetrámero do recetor RyR1 e é ativada pela despolarização do sarcolema. Quando ativado, sofre uma alteração conformacional que leva à libertação de Ca^{2+} . (4,5)

Os DHPRS são compostos por cinco subunidades: α_1 , α_2 , β , γ e δ . A subunidade α_1 do DHPR está complexada com uma subunidade citoplasmática (β), a dois polipeptídeos intramembranares do sistema de túbulos transversos (γ e δ) e a uma subunidade extracelular (α_2) que está ligada via ponte dissulfeto a δ . (9) As subunidades α_1 e β interagem diretamente com o RyR1. A subunidade β é responsável por assegurar a correta posição do DHPR, de modo a permitir que a subunidade α_1 (região Thr-Lys) se ligue ao RyR1 e mantenha o canal aberto na presença de Ca^{2+} e ATP. Entretanto, os níveis fisiológicos de magnésio (Mg^{2+}) inibem a subunidade β , mas o seu efeito é atenuado pela ativação do DHPR, que provoca a dissociação do Mg^{2+} do recetor. O Ca^{2+} e o Mg^{2+} competem pelo mesmo sítio de ligação no recetor, mas o Ca^{2+} reforça a abertura do canal. (4)

A interação proteica também vai gerar um sinal retrógrado do RyR1 para o DHPR, que regula positivamente a corrente do tipo L. A sinalização retrógrada parece ser mediada pelas mesmas regiões do DHPR e do RyR1 responsáveis pela sinalização anterógrada. (4)

FK506-binding protein 12

A FKBP12 é codificada pelo gene calstabin-1 e está localizada no sarcoplasma do músculo esquelético. Existem quatro subunidades que se ligam à proteína. A FKBP12 interage com os

domínios N-terminal (76-619) e central do recetor, mais especificamente, ligando-se aos aminoácidos 619, 2157, 2341 e 2502. (4)

A FKBP12 interage e mantém a estabilidade das isoformas RyR no músculo, diminuindo a sua probabilidade de abertura e evitando estados subcondutores, desempenhando um papel no controlo alostérico. (2,4,10)

Triadina

A triadina é uma glicoproteína juncional da membrana do RS que interage com o DHPR e o RyR1 no sarcoplasma, pelo que desempenha um papel importante na sinalização anterógrada. Entretanto, esta glicoproteína não tem qualquer efeito na sinalização retrógrada. (4) A interrupção da interação entre o RyR1 e a triadina resulta na inibição do canal. Os aminoácidos 18-46 da triadina interagem com o RyR1 em situações de baixos níveis de Ca^{2+} , sendo esta interação inibida em situações de níveis elevados de Ca^{2+} . (4)

Grupo 2

O grupo 2 inclui as interações interdomínio e controla a abertura e o fecho do canal, tanto externamente como internamente (juntamente com o grupo 1 e o grupo 3, respetivamente). Está localizado na região formadora do poro e é composto pelas interações interdomínio do recetor com a calmodulina (CaM). (4)

Este grupo responde à ativação do recetor pelo DHPR e é regulado pela concentração de Ca^{2+} no RS. As alterações conformacionais conduzem a modulações intrínsecas de abertura ou fecho do canal. Esta modulação baseia-se nas interações interdomínios, mais concretamente na interação entre o domínio central do RyR1 (leu2442-pro2477) e o domínio N-terminal. Esta interação é regulada pelo CaM, sendo a concentração de Ca^{2+} responsável pela regulação da função do CaM. (4)

No estado de repouso, os domínios terminais e centrais interagem entre si em vários "subdomínios" numa configuração compactada.

Esta conformação estabiliza o canal no estado fechado. A estimulação do canal pelo processo de acoplamento EC enfraquece o contacto entre os diferentes domínios, descompactando a configuração e permitindo a abertura do canal com um consumo menor de energia. (6)

No canal aberto, o movimento do S6 para o exterior resulta na dilatação da constrição dos poros. As restantes partes do poro iónico permanecem praticamente inalteradas durante o disparo. Esta abertura está provavelmente associada à troca de um padrão de pontes salinas entre as hélices S6 e em torno da hélice horizontal S4-S5. Esta rede de pontes estabiliza as conformações abertas ou fechadas do canal, minimizando a ocorrência de estados intermédios. (10)

Calmodulina

A CaM liga-se a RyR1 e participa na regulação da atividade do canal dependente de Ca^{2+} . (2)

A CaM existe em duas formas: apocalmodulina, forma livre de Ca^{2+} da calmodulina, e a Ca^{2+} -CaM, forma com ligação ao Ca^{2+} ; ambas se ligam ao recetor, mas a segunda apresenta uma maior afinidade. (4,11)

O efeito da ligação da calmodulina depende da forma em que esta se encontra: o RyR1 é ativado pela ApoCaM, resultando na libertação de Ca^{2+} para o sarcoplasma, e inibido pela Ca^{2+} -CaM, quando há concentrações elevadas de Ca^{2+} , como demonstrado na Figura 3. (4,9,10)

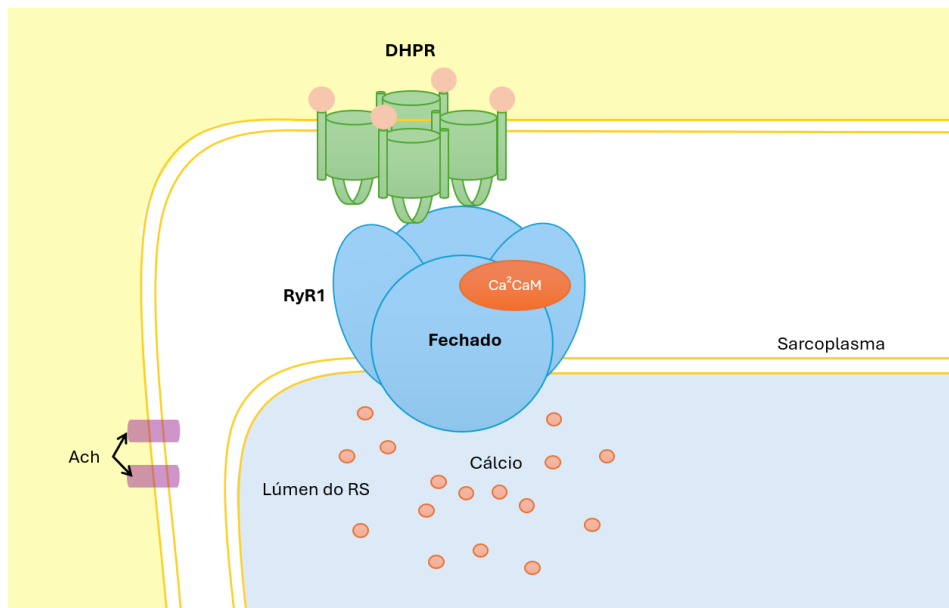


Figura 3.1: RyR1 fechado: Ca^{2+} +CaM ligada, resultando no fecho do canal e em elevadas concentrações de Ca^{2+} no RS (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

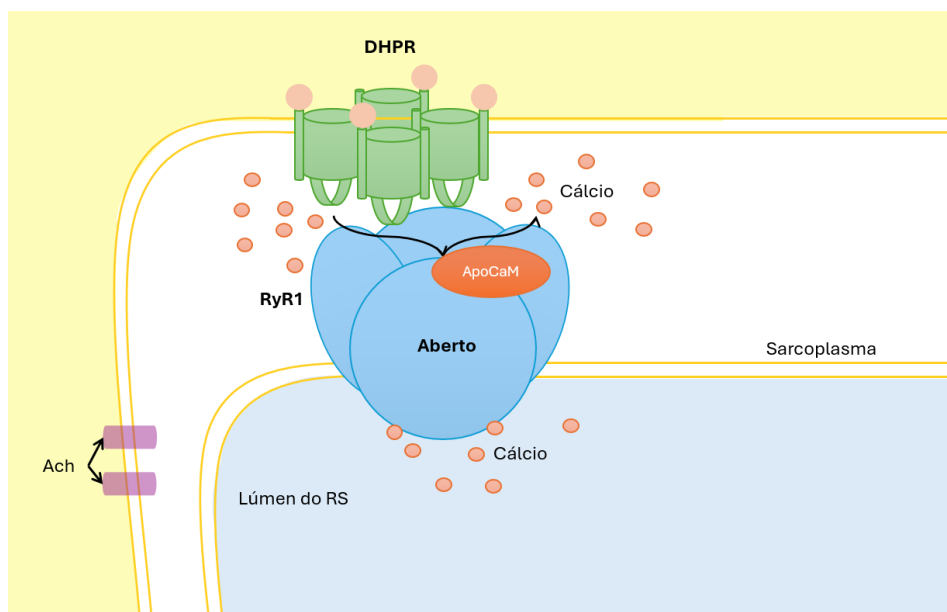


Figura 3.2: RyR1 aberto: Apocalmodulina (ApoCaM) liga-se em resposta à ativação do RyR1 precedida pela ativação da DHPR resultando em elevadas concentrações de Ca^{2+} sarcoplasmático. (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

A ativação da calmodulina resulta na ativação da cinase CaM II, que leva à fosforilação do RyR1 juntamente com a proteína cínase a (PKA), afetando a contração muscular. A hiperfosforilação resulta na dissociação do FKBP12, aumentando a probabilidade de abertura do canal.

Embora a ApoCaM e a Ca^{2+} -CaM tenham funções opostas, ambas previnem as ligações cruzadas entre as subunidades induzidas pela oxidação, em que se formam ligações dissulfureto entre cada subunidade de RyR1, levando à libertação de Ca^{2+} . (4) Postula-se que a CaM protege o RyR1 do stress oxidativo associado ao exercício físico extenuante. (4)

Por outro lado, a oxidação do RyR1 impede a ligação da CaM ao RyR1 em baixas concentrações de Ca^{2+} . O óxido nítrico (NO), que desempenha um papel nas reações de oxidação-redução que envolvem o recetor, não bloqueia apenas as ligações dissulfureto formadas pela oxidação, mas também impede a ligação da ApoCaM, promovendo a abertura do canal. A Ca^{2+} -CaM não é afetada pelo NO, e a sua ligação provoca o encerramento do canal. (4) Além disso, níveis aumentados de CaM também ativam a calcineurina.

A calcineurina é a fosfatase responsável pela diferenciação celular do músculo esquelético, permitindo a regeneração das suas fibras musculares após lesão e a sua hipertrofia. A sua ativação tem um impacto particularmente significativo na hipertrofia das fibras de contração lenta. (4)

Grupo 3

O grupo 3 regula a sinalização retrógrada, que depende da concentração de Ca^{2+} no RS e do estado da calsequestrina (CSQ) de fosforilação/desfosforilação. Está localizado no RS, e é composto pelo RyR1, CSQ, triadina e junctina. (4) As duas formas possíveis da CSQ estão ilustradas na figura 4, juntamente com o resto dos componentes do grupo.

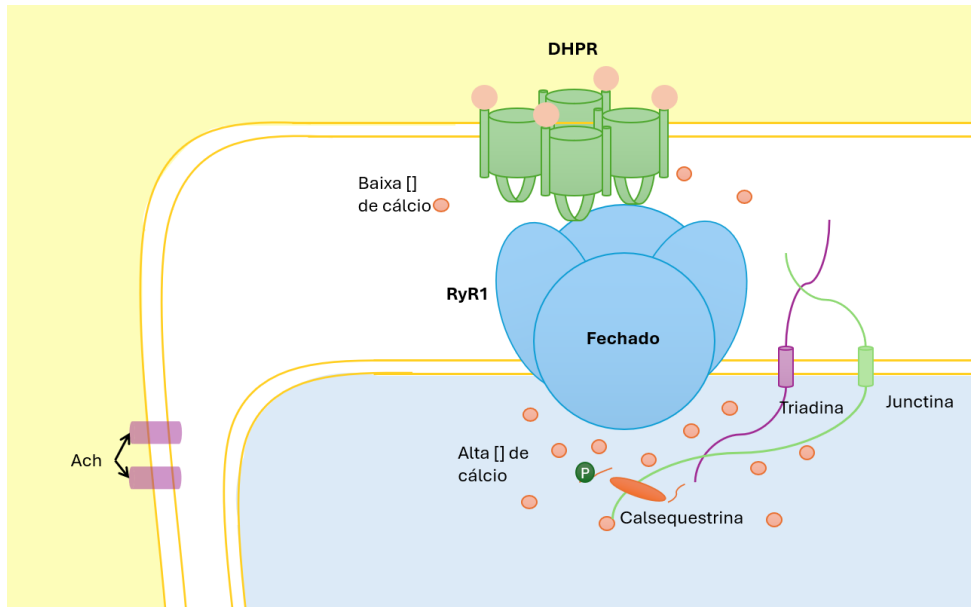


Figura 4: 4.1: RyR1 fechado: Interação RyR1-junctina devido à interação da junctina com a CSQ no seu estado fosforilado, resultando em concentrações de Ca^{2+} elevadas no RS (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

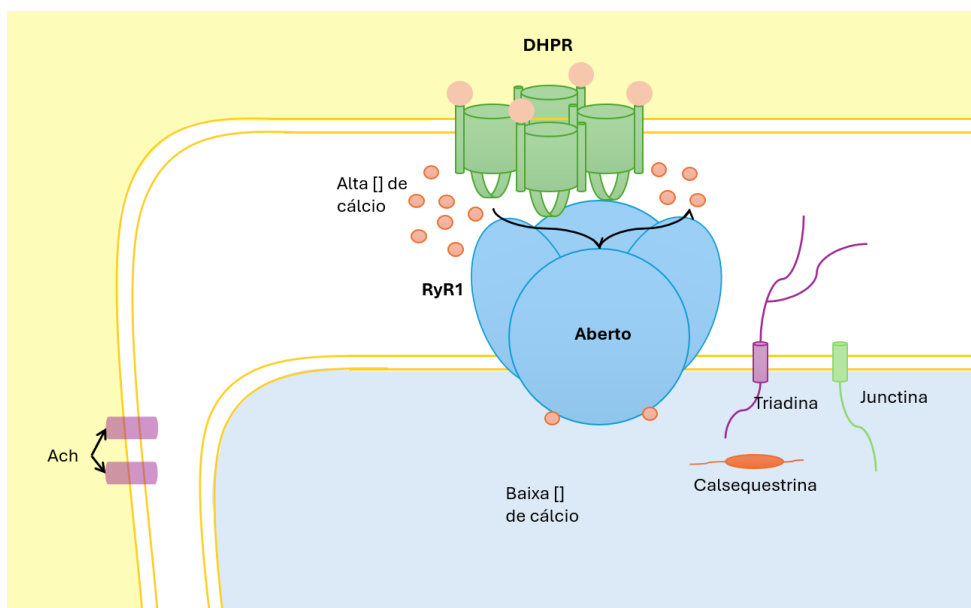


Figura 4.2: RyR1 aberto: Interação RyR1-triadina devido à interação da triadina com a CSQ desfosforilada resultando na saída do Ca^{2+} para o sarcoplasma. (Figura adaptada de Witherspoon JW,

Calsequina

A CSQ é uma glicoproteína armazenadora de Ca^{2+} localizada no lumen do RS, que funciona para diminuir os níveis de Ca^{2+} livre no sarcoplasma, provocando um aumento de Ca^{2+} reticuloplasmático total. (4,12,13)

A CSQ tem duas isoformas: a CSQ1, que interage com o RyR1 no músculo esquelético, e a CSQ2, que interage com o RyR2 no músculo cardíaco. A CSQ polimeriza e regula a atividade do RyR1, mas a sua atividade é dependente de Ca^{2+} . (12) Esta interage indiretamente com o RyR1, através das proteínas ancoradas na membrana, a triadina e a junctina. Estas contêm uma cauda citoplasmática N-terminal curta, uma hélice hidrofóbica que atravessa a membrana do SR e uma cauda C-terminal mais longa localizada no interior do lúmen do SR. (13)

A ligação com o Ca^{2+} provoca uma alteração conformacional na glicoproteína, permitindo a ligação com a junctina e a triadina. A junctina e a triadina formam um grupo quaternário estável com o RyR1 e a CSQ. A CSQ liga-se à junctina e à triadina em baixas concentrações de Ca^{2+} , resultando no encerramento do RyR1. Concentrações elevadas de Ca^{2+} , por outro lado, resultam na dissociação do grupo CSQ, triadina e junctina. (4)

Também foi demonstrado que mudanças conformacionais na CSQ estão acopladas a mudanças conformacionais no RyR1, o que significa que uma mudança conformacional num está associada a uma mudança conformacional no outro. (4)

Triadina

A triadina é uma proteína composta por três regiões responsáveis pela sua localização na membrana sarcoplasmática. Essas regiões incluem as regiões-alvo 1 (18–47, sarcoplasmática), 2 (106–214) e 3 (233–440, 441–729). Pelo menos duas destas três regiões são necessárias para uma localização correta na membrana. As regiões de ligação para o RyR1 foram identificadas na região 3, mais concretamente, a triadina liga-se ao lado luminal do RS do RyR1. (4, 13)

A CSQ parece estar associada à estabilização da triadina na membrana do RS e, mais importante, é um componente fundamental para a formação de um grupo estável entre a triadina e o RyR1. (4,13)

No grupo 1, foi demonstrado que a triadina vai-se ao RyR1 e ao DHPR, potenciando a libertação de Ca^{2+} . A triadina presente no grupo 3 tem como função fechar o canal, enquanto aumenta a afinidade da rianodina ao RyR1. A ligação da rianodina depende de Ca^{2+} . Locais com baixa afinidade para o Ca^{2+} vão inibir a ligação da rianodina e, conseqüentemente, a libertação do mesmo. A depleção da triadina aumenta a ligação da rianodina, mas, quando

disponível, a triadina inibe a ligação da rianodina ao RS e mantém o RyR1 encerrado. O efeito da triadina na ligação da rianodina é o mesmo, mesmo quando a ligação da rianodina é potencializada pela CSQ. (4)

Grupo 4

O grupo 4 responde às alterações na concentração de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), que está elevada devido à libertação de acetilcolina (ACh). O grupo 1 responde ao potencial de ação, já o grupo 4 responde à concentração elevada de cAMP, ambos resultado da libertação de ACh. Por este motivo, ambos os grupos são ativados em simultâneo. (4)

Este grupo inclui a FKBP12, a proteína cínase (PKA), a fosfodiesterase 4D3 (PDE4D3) e a proteína fosfatase 1 (PP1). (4)

Os mecanismos de ação descritos neste grupo encontram-se ilustrados na figura 5.

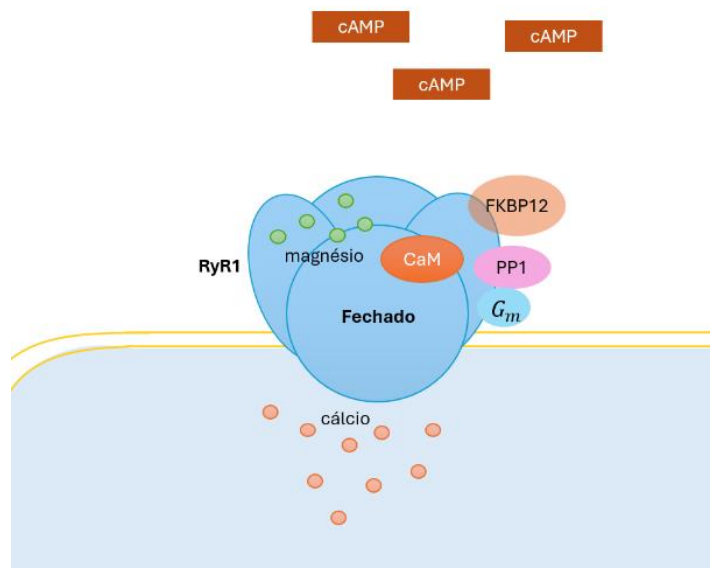


Figura 5.1: RyR1 fechado: Desfosforilação de RyR1 pela PP1 devido à baixa concentração de cAMP, provocando um aumento da concentração de Ca²⁺ no RS (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

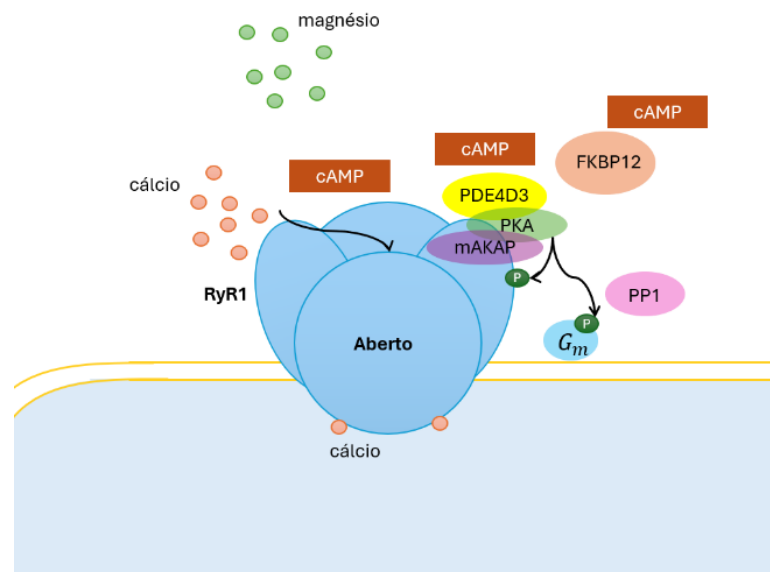


Figura 5.2: RyR1 aberto: Fosforilação do RyR1 e da G_m pela PKA devido a uma elevada concentração de cAMP, resultando num aumento da concentração de Ca²⁺ sarcoplasmático; (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

Proteína Cínase A

A PKA é uma holoenzima com um grupo tetramétrico constituído por duas subunidades catalíticas e um dímero regulador. A adrenalina, que atua no músculo esquelético através da libertação de ACh, aumenta os níveis de cAMP, o que resulta na ativação da PKA, que provoca a fosforilação da subunidade G_m. (4,14)

Quando os níveis de cAMP estão baixos, a subunidade C liga-se ao dímero regulador da PKA, tornando-a inativa. Por outro lado, quando os níveis de cAMP estão elevados, o cAMP liga-se à subunidade reguladora e a sua afinidade pela subunidade C diminui, libertando assim as subunidades C e ativando a PKA. (4)

As proteínas de ancoragem da cinase A muscular (mAKAPs) localizam-se no RyR1 e permitem a ligação da PKA ao RyR1 na presença de níveis elevados de cAMP. Em resposta, a PKA fosforila o resíduo de serina S2843 nas subunidades do RyR1, provocando a contração do músculo esquelético e aumentando a força muscular. (4,15) A fosforilação dependente de PKA impede a ligação do Mg²⁺ ao canal, aumentando a sua probabilidade de abertura. (4)

Adicionalmente, a glutatiónilação regula a atividade da PKA. Esta não pode ser glutatiónilada na ausência de cAMP, pelo que está protegida da oxidação. Na presença de cAMP, a PKA torna-se ativa. Uma vez ativa, a glutatiónilação torna a PKA mais suscetível à desfosforilação e, portanto, à sua inibição. (4)

Fosfodiesterase 4D3 e Proteína fosfatase 1

Tal como a PKA, a PDE4D3 também se liga ao RyR1 através das mA-KAPs, sendo específica para o cAMP. A PDE4D3 é responsável pela redução dos níveis locais de cAMP e pela limitação da quantidade de cAMP que se pode difundir para fora do invólucro nuclear. (4,14)

A fosforilação do aminoácido serina na posição 54 aumenta a atividade catalítica da PDE4D3 em 2 a 3 vezes. Portanto, a fosforilação deste sítio favorece a inibição da atividade da PKA, devido à diminuição da concentração de cAMP. (14)

A PP1 desfosforila o RyR1, o que resulta na ligação da FKBP12 ao RyR1. A PP1 é uma serina/treonina cinase com uma subunidade catalítica e várias subunidades de *targeting*. Mais especificamente, a subunidade *Gm targeting* do PP1 liga-se e direciona o PP1 para as partículas de glicogénio e para o RS. A PP1 liga-se ao terminal N do Gm e o RS ao seu terminal C. No entanto, a fosforilação de Gm pela PKA dissocia o PP1 do domínio de ligação e, subsequentemente, liberta-o tanto do glicogénio como do RS. (4)

Grupo 5

O grupo 5 responde a alterações na concentração de oxigénio no músculo e na proporção de glutatona (GSH/GSSG). (4)

Este grupo abrange as modificações pós-traducionais de proteínas, incluindo a S-nitrosilação, a S-oxidação, a S-glutationilação e a S-palmitoilação, bem como as moléculas de óxido nítrico (NO), S-nitrosoglutatona (GSNO), glutatona reduzida (GSH), glutatona oxidada (GSSG) e peróxido de hidrogénio (H₂O₂). Neste grupo, o RyR1 atua como um sensor de oxidação-redução, onde certos resíduos de cisteína sofrem reações *redox* pelas modificações pós-transducionais. Cada uma destas modificações ocorre com base nos níveis de oxigénio e variam conforme a necessidade do músculo ativo por oxigénio. (4)

Estas modificações funcionam como um interruptor de ligar e desligar da função proteica. Cada uma ativa o RyR1 por mecanismos diferentes, no entanto, em conjunto, regulam a atividade do canal ao longo de um intervalo específico de pO₂ no músculo esquelético. (4)

Cada uma destas modificações e os seus mecanismos de atuação estão ilustradas nas figuras 6, 7, 8 e 9.

S-nitrosilação

Os níveis fisiológicos de pO₂ do músculo esquelético controlam o estado de redução-oxidação dos tiois nas subunidades do RyR1, mantendo-o num estado de prontidão. O NO, quando a concentração de pO₂ é de cerca de 10 mmHg, ativa o RyR1 pela nitrosilação dos resíduos de cisteína. Tanto as espécies de oxigénio reativo (ROS) como as de azoto alteram a função do canal, aumentando a libertação de Ca²⁺. (4)

O NO exerce efeitos bifásicos na atividade do canal que são dependentes da concentração. Em níveis baixos, o NO parece prevenir a oxidação das sulfidrilas reguladoras e, assim, limitar a ativação do canal. Em concentrações mais elevadas, o NO estimula a ativação oxidativa que é idêntica à ação do H₂O₂. (11) O derivado s-nitrosado da glutatona (GSNO) não só ativa o RyR1 pela nitrosilação, como também pela oxidação. (2)

Acredita-se que a mitocôndria atue como um sinalizador de oxidação-redução ao converter o sinal do NO num sinal de ROS. Este fenômeno apenas ocorre em condições fisiológicas de NO. No músculo esquelético, o NO é produzido pelas sintetases de óxido nítrico (NOS), que estão principalmente localizadas na estrutura submembranar do sarcolema, mais especificamente no complexo distrofina/sintrofina. (4,16) As NOS inibem ativamente a respiração mitocondrial na presença de elevadas concentrações de cálcio. (4)

Os sinais de NO são libertados pelas células musculares em contração e estão associados à diminuição da geração de força e da atividade da ATPase da actomiosina no músculo esquelético. (16)

Em resposta ao exercício, as NOS ligam-se à CaM, aumentando a sua atividade. A CaM atua como um interruptor molecular que ativa a transferência de elétrons que resulta na produção de NO. Além disso, a ligação no sítio Cys3635 é afetada pela s-nitrosilação, revertendo o seu efeito inibitório e provocando a ativação do RyR1. (4)

A figura 6 ilustra o processo de s-nitrosilação do recetor.

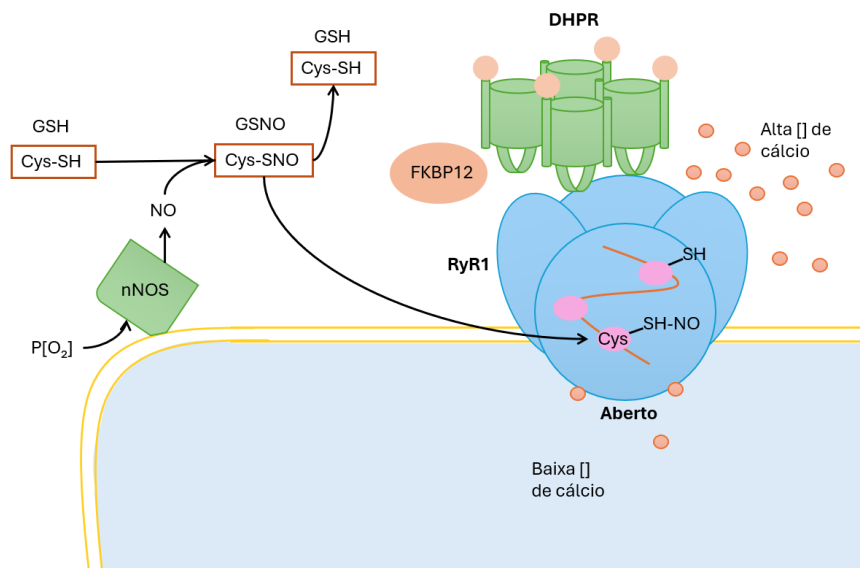


Figura 6.1: RyR1 aberto: nitrosilação dos resíduos de cisteína do RyR1 pelo NO em resposta à p(O₂) fisiológica, resultando em Ca²⁺ sarcoplasmático elevado (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

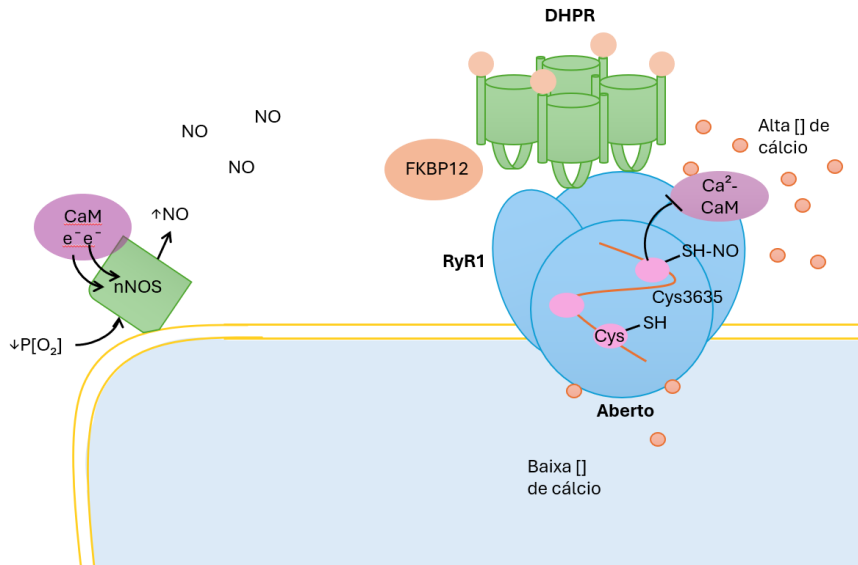


Figura 6.2: RyR1 aberto: a nitrosilação do RyR1 pelo NO anula o efeito inibitório do Ca-CaM (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

S-oxidação

A s-oxidação está acoplada à s-nitrosilação. A alteração dos níveis de oxigênio no músculo provoca uma transição da nitrosilação para a oxidação e vice-versa.

A sinalização baseada no O_2 é mediada pela reversibilidade da oxidação/redução do RyR1, juntamente com a produção de H_2O_2 pela NADPH oxidase 4 (Nox4), presente no RS, que resulta na ativação/desativação do canal. A Nox4 é considerada um sensor de O_2 no músculo esquelético. As espécies reativas de oxigênio (ROS, aniões superóxido e H_2O_2) são produzidas pela Nox4 e são geradas em proporção com o pO_2 no RS. Por este motivo, a oxidação ocorre primariamente a concentrações elevadas de oxigênio. (4)

Os oxidantes regulam a atividade do RyR1 de uma forma direta, alterando as interações subunidade-subunidade, o que forma ligações dissulfeto, e de maneira indireta, impedindo a ligação da Ca^{2+} -CaM ou da apoCaM. A CaM protege o RyR1 da oxidação. No entanto, quando há concentrações elevadas de oxidantes (stress oxidativo), vai ocorrer uma disrupção da ligação CaM-RyR1, durante a qual a pessoa pode experimentar cansaço. (4,11)

Em relação ao H_2O_2 , este aumenta a probabilidade de abertura do canal, e estimula a formação de dímeros entre as subunidades. (11)

A figura 7 ilustra o processo de s-oxidação do recetor.

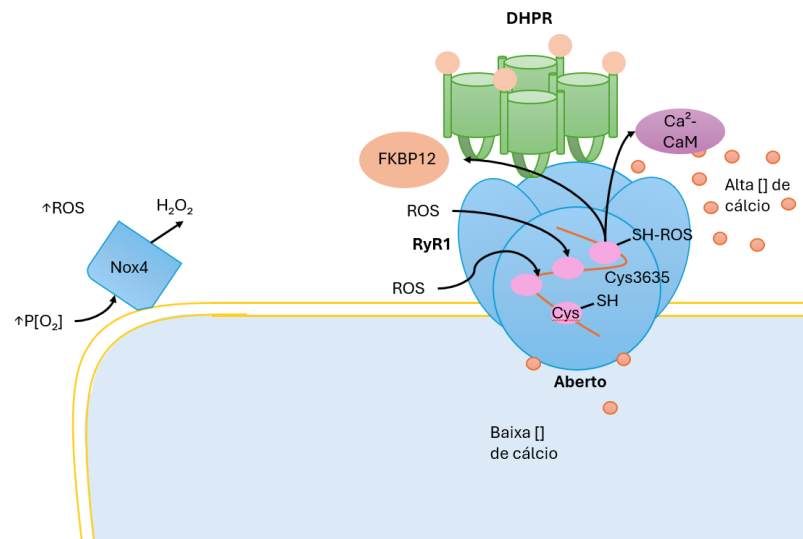


Figura 7.1: RyR1 aberto: oxidação dos resíduos de cisteína do RyR1 por reação de espécies reactivas de oxigénio em resposta ao aumento da p(O₂) fisiológica, resultando num Ca²⁺ sarcoplasmático elevado (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

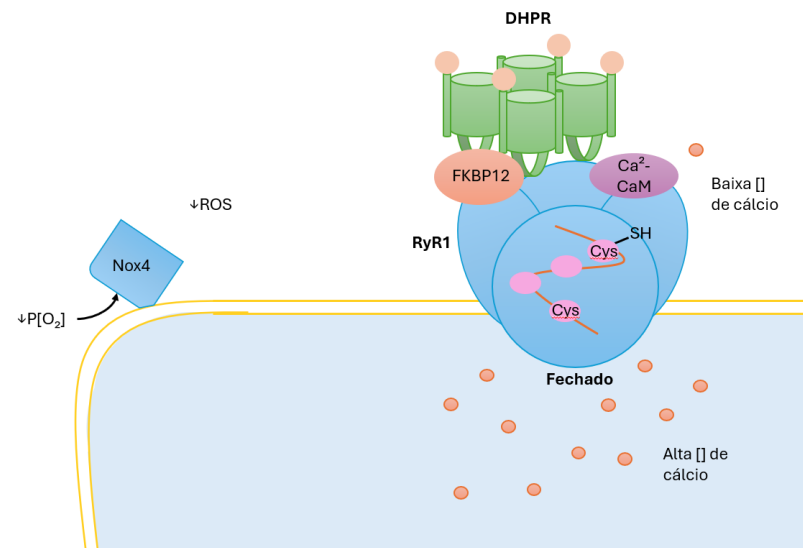


Figura 7.2: RyR1 fechado: não há oxidação do RyR1 quando há diminuição da p(O₂), Ca²⁺-CaM está ligada, resultando num aumento do Ca²⁺ no RS (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

S-glutationilação

Durante o exercício físico, a glutatona endógena é modulada pelo consumo elevado de oxigénio e pela produção de ROS. A proporção de glutatona dita o potencial redox celular.

Fisiologicamente, o sarcoplasma é um ambiente redutor onde o estado redox proteico depende da proporção GSH/GSSG (glutathiona reduzida/dissulfureto de glutathiona), sendo que uma proporção elevada cria um buffer redox no citosol. Um valor superior a 100 promove a s-glutathionilação, bem como a oxidação da GSH em pequenas doses. A s-glutathionilação do RyR1 diminui a sensibilidade do recetor ao magnésio, mantendo a probabilidade de abertura do canal. (4,17)

O anião superóxido, H_2O_2 , foi identificado como a molécula oxidante principal para a glutathionilação do RyR1. Na presença de GSH, o H_2O_2 reage com a sensibilidade *redox* do RyR1 para a glutathionilação, aumentando o processo. O H_2O_2 oxida os aniões de tiolato do RyR1, criando uma proteína de ácido sulfénico instável que funciona como intermediário. O ácido sulfénico sofre então glutathionilação e forma uma ligação de dissulfeto com a GSH. (4,17)

Na presença de stress oxidativo, as proteínas são alvo de s-glutathionilação. A GSH esgota-se e há um aumento dos derivados oxidados (GS-GSNO e GSSG), que também são responsáveis pela glutathionilação proteica, resultando numa diminuição da proporção GSH/GSSG. Quando a proporção é restaurada, a s-glutathionilação é revertida. (4)

Foi comprovado que o NO promove a glutathionilação do RyR1. Em condições fisiológicas, os níveis de NO são mais baixos que o rácio GSH/GSSG; no entanto, quando a produção de NO aumenta, a enzima responsável pela síntese de glutathiona é inibida. Por este motivo, foi sugerido que o stress nitrosativo diminui o rácio GSH/GSSG. (4)

A figura 8 ilustra o processo de s-glutathionilação.

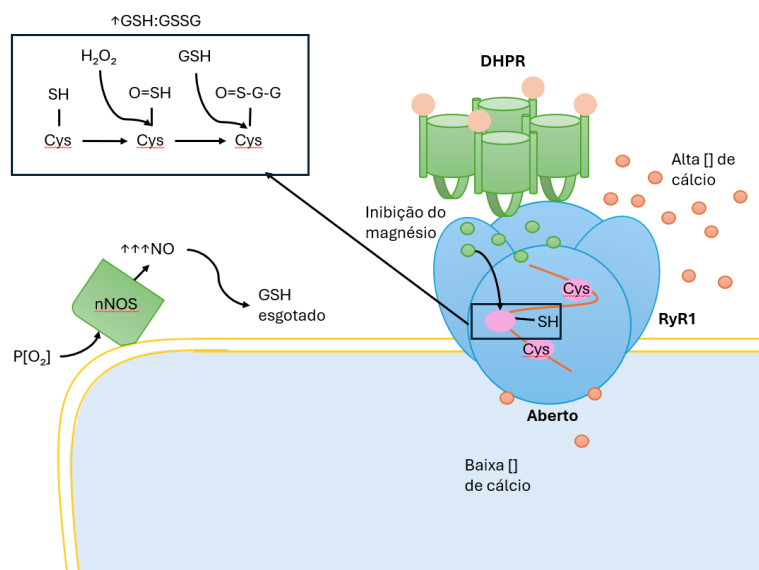


Figura 8.1: RyR1 aberto: aumento inicial da GSH que estimula a glutathionilação dos resíduos de cisteína do RyR1 pelo GSH, diminuindo, por sua vez, a relação GSH:GSSG e reduzindo a sensibilidade do RyR1 à inibição do Mg^{2+} , o que resulta num Ca^{2+} sarcoplasmático elevado (Figura adaptada de Witherspoon JW,

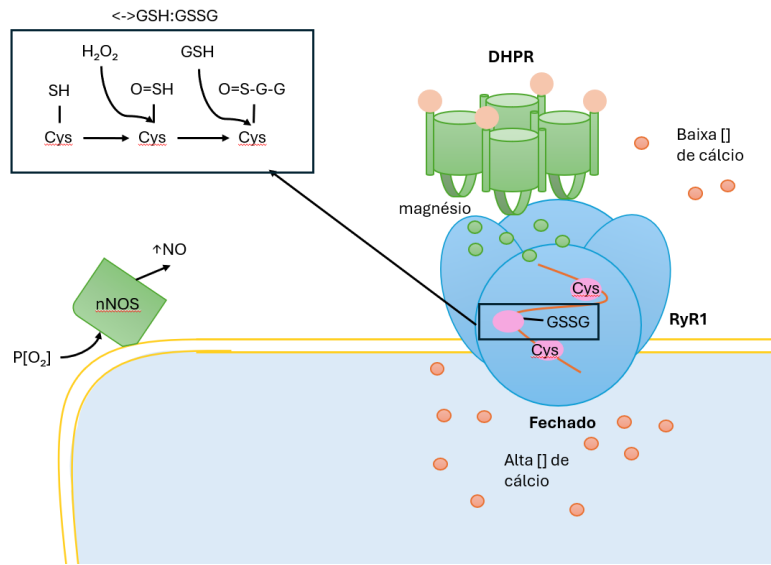


Figura 8.2: RyR1 fechado: não há glutatilonilação até que a relação GSH:GSSG seja restaurada, resultando numa concentração de Ca²⁺ elevada no RS (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016, p. 121)

S-Palmitoilação

A palmitoilação é um processo reversível no qual o ácido gordo de palmitato saturado forma uma ligação tioéster. A remoção do palmitato do RyR1 diminui a libertação de Ca²⁺, uma vez que este é removido de dois sítios de ligação (CaM e FKBP12), que contribuem para o encerramento do canal. Esta reação envolve a modificação de, pelo menos, 18 resíduos do RyR1. Estes resíduos foram identificados nas regiões de interação com o DHPR, o CaM e o FKBP12. (4)

A figura 9 ilustra este processo no RyR1.

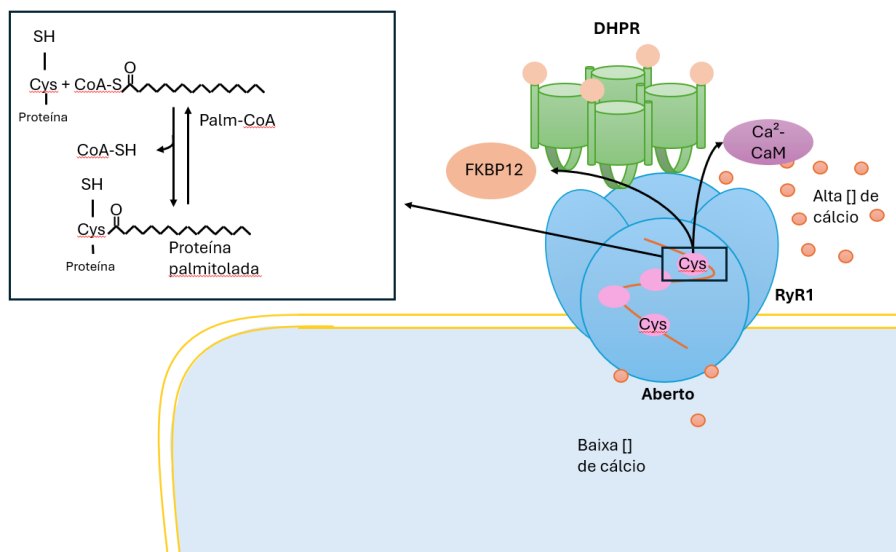


Figura 9.1: RyR1 aberto: palmitoilação dos resíduos de cisteína do RyR1 pelo ácido gordo palmitoil-CoA, resultando em Ca^{2+} sarcoplasmático elevado (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

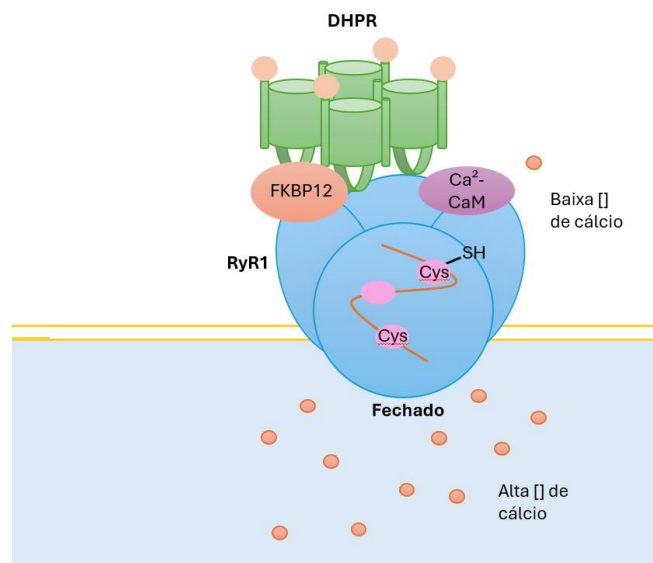


Figura 9.2: RyR1 fechado: sem palmitoilação, provocando um aumento da concentração de Ca^{2+} no RS (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

Grupo 6

O grupo 6 responde à concentração de cálcio. Este grupo inclui o cálcio, o ATP e o magnésio, que são ligantes extracelulares que regulam a atividade do RyR1. (4)

O RyR1 inclui dois tipos de locais para formar ligações: locais de ativação ou de inibição do recetor. Os locais de ativação são designados por *A-sites*, enquanto os locais de inibição são

denominados *I-sites*. O ATP liga-se aos *A-sites*, aumentando a probabilidade de abertura do canal, ao passo que o Mg^{2+} se liga aos *I-sites*, promovendo o estado fechado. O Ca^{2+} liga-se a ambos os locais. A afinidade dos catiões aos *I-sites* não é afetada pelo ATP, ao passo que o Ca^{2+} tem um efeito diferente, ligando-se aos *A-sites*. (4)

Na figura 10 estão esquematizados esses locais de ligação.

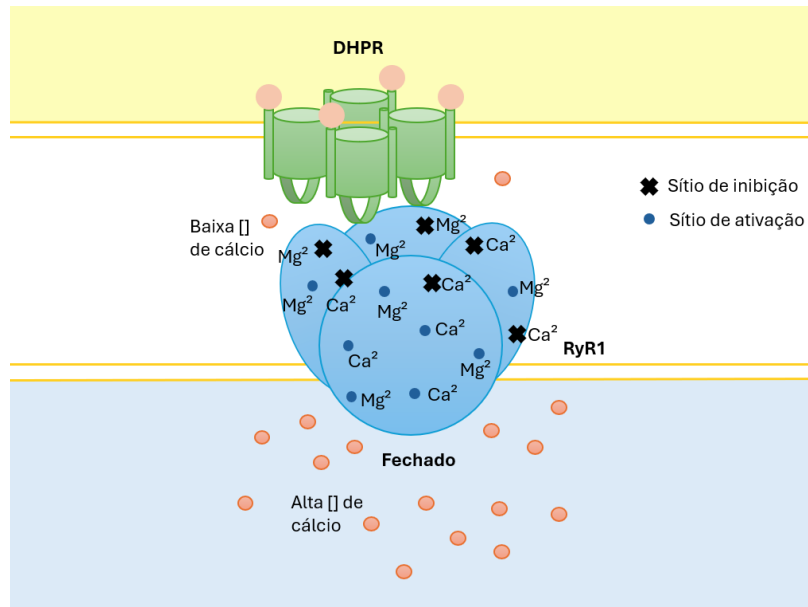


Figura 10.1: RyR1 fechado: Ligação do Ca^{2+} nos locais inibitórios e do Mg^{2+} resultando no fecho do canal (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

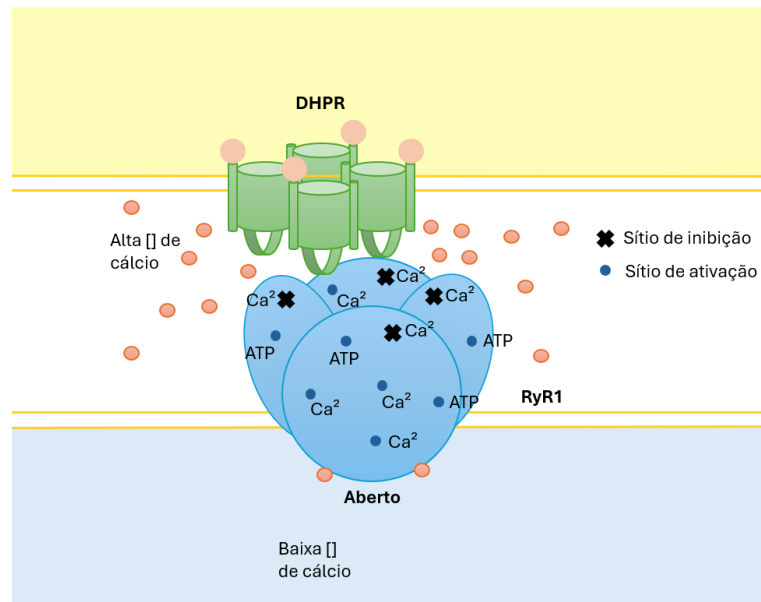


Figura 10.2: RyR1 aberto: ativação pela ligação do Ca^{2+} nos locais de ativação e do ATP resultando na abertura do canal (Figura adaptada de Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, Acta neuropathologica communications. 2016. p. 121)

Cálcio

O recetor apresenta uma reação bifásica ao Ca^{2+} livre. Geralmente, a ativação ocorre a concentrações de cálcio de $\sim 0.3-10 \mu\text{M}$, no entanto, se estivermos na presença de concentrações milimolares de cálcio, o canal vai ser inibido. Esta sensibilidade ao Ca^{2+} assegura que o canal está normalmente fechado quando está sob concentrações de cálcio citosólicas de repouso (50-150 nM) e também pode ajudar a prevenir a ativação sustentada do RyR quando há concentrações elevadas de cálcio. (2)

Foi demonstrado que o RyR1 possui uma estrutura onde existem domínios de ligação Ca^{2+} -*M-like* referidos como o domínio putativo de ligação ao Ca^{2+} que servem como sensores de Ca^{2+} . Como as hélices S2 e S3 estão localizadas próximas aos supostos domínios de ligação do Ca^{2+} e ao C-terminal, acredita-se que estas contribuam para a transmissão de alterações conformacionais do RyR1, mediadas pelo Ca^{2+} , para a formação citosólica do poro. (4)

Adenosina Trifosfato

Quando ligado ao ATP, o RyR1 é ativado, no entanto, esta interação é afetada pelo Ca^{2+} e pelo Mg^{2+} e por agentes farmacológicos, incluindo o dantroleno. (4)

Na presença de cálcio que está ligado aos locais de ativação, a afinidade de ligação ao ATP diminui, mas, se estivermos na presença de cálcio que se encontra ligado aos locais de inativação, a afinidade aumenta, mas o número de locais para esta possível ligação diminui.

Os diferentes locais a onde o ATP se liga ainda estão por determinar. No entanto, já foram identificados potenciais locais: aa699-704; 701-706; 1081-1084; 1195-2000; estes encontram-se localizados próximos às regiões *hotspot*. (4)

Magnésio

No músculo esquelético, o Mg^{2+} exerce um duplo efeito inibitório sobre o RyR1, além de competir com o Ca^{2+} para o sítio de ativação (*A-sites*), também se liga a um sítio inibitório de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (*I-sites*) de baixa afinidade. (18) Apesar de se ligar aos *A-sites* não vai haver ativação do recetor, na verdade, vai provocar um efeito inibitório através da diminuição da sensibilidade do RyR1 ao cálcio. Sob condições normais, a ligação do magnésio aos *I-sites* inibe a ativação do recetor tanto pelo cálcio como pelo ATP. (4)

Capítulo 2: Outros possíveis patomecanismos

Libertação de Ca^{2+} induzida por sobrecarga de armazenamento (SOICR)

A libertação espontânea de Ca^{2+} ocorre durante a sobrecarga de Ca^{2+} do RS, um processo também conhecido como libertação de Ca^{2+} induzida por sobrecarga de armazenamento (SOICR). (3,19) Este é um mecanismo intracelular pelo qual, quando a concentração ou

quantidade de Ca^{2+} no RS atinge um determinado limite, a abertura dos RyR é desencadeada. (19)

As alterações no limiar do SOICR ocorrem através de modificações crônicas ou agudas do RyR. É importante realçar que a ativação da propagação do SOICR está associada a uma despolimerização da CSQ, o tampão RS Ca^{2+} , e a uma subsequente redução do poder do RS para impedir a fuga de Ca^{2+} . (20)

Foram propostos dois modelos principais para ativar o canal. O primeiro é uma ativação citosólica em que um aumento de Ca^{2+} no citoplasma pode ativar os canais de libertação de Ca^{2+} . O segundo é uma ativação intracelular em que um aumento das concentrações de Ca^{2+} dentro do RS desencadeia a abertura dos canais. (19)

Foi demonstrado que os anestésicos voláteis, como o halotano potenciam a libertação espontânea de Ca^{2+} do RS, reduzindo o limiar para o SOICR. Uma vez que as mutações RyR1 associadas à Hipertermia maligna/*Central Core Disease* (MH/CCD) também reduzem o limiar para SOICR, os indivíduos portadores de mutações RyR1 associadas à MH/CCD seriam mais sensíveis aos anestésicos voláteis e aos SOICR induzidos pela cafeína, em comparação com os indivíduos normais. (21)

Por conseguinte, os anestésicos voláteis vão desencadear a libertação espontânea de Ca^{2+} , a contração muscular descontrolada e uma crise de HM em indivíduos com mutações no RyR1, diminuindo ainda mais um limiar de SOICR já reduzido devido à mutação. (21)

Canal de cálcio dependente de voltagem, do tipo L, subunidade $\alpha_1\text{S}$ (CACNA1S e Cav1.1)

Um estudo recente identificou um novo mecanismo de regulação do recetor pelo Cav1.1, a subunidade formadora de poro do canal de Ca^{2+} tipo L CACNA1S.

O CACNA1S é necessário para a função normal do músculo esquelético. O CACNA1S codifica a subunidade alfa 1 do canal DHPR. O gene que codifica o recetor encontra-se no braço longo do cromossoma 1 (1q32.1) e contém 44 exões. Os exões sofrem *splicing* alternativo, resultando em várias isoformas diferentes do Cav. (22)

A isoforma predominantemente expressa no músculo esquelético é a Cav1.1.

O Cav1.1 ativa o RyR1 durante o acoplamento excitação-contração e suprime a libertação de cálcio mediada pelo RS enquanto o RyR1 está em repouso. A interrupção desta regulação inibitória do Cav1.1 representa um novo mecanismo molecular para aumentar a sensibilização das células musculares aos estímulos de HM. (3)

Além de mediar a libertação de cálcio, o RyR1 também está implicado no processo de entrada de Ca^{2+} no RS. Um desses processos é conhecido como entrada de cálcio acoplada à

excitação, na qual o Ca^{2+} entra na célula através dos canais Cav1.1 na membrana do túbulo T em resposta à despolarização da membrana. A entrada de Ca^{2+} não só está significativamente aumentada em miotubos que expressam mutações do RyR1, como também é suprimida após exposição ao dantroleno. (3)

Atualmente, foram identificadas seis variantes clinicamente significativas do CACNA1S com associação com a HM, estas variantes vão produzir canais Cav1.1 defeituosos, destacando-se a mutação p.R1086H, que interrompe o acoplamento excitação-contração, e a mutação p.R174W, que elimina a corrente do tipo L sem afetar o acoplamento excitação-contração. (22)

RS Ca^{2+} -ATPase (SERCA)

Durante o relaxamento mediado pelo ATP, os íons Ca^{2+} livres são bombeados de volta para o RS, através da ação da RS Ca^{2+} -ATPase (SERCA), através da captação mitocondrial de cálcio e remoção do mesmo da periferia pelas bombas de Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA). Além disso, a bomba permutadora $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ também contribui para a diminuição da concentração de Ca^{2+} fora das células. (8)

Os recetores de rianodina também auxiliam neste processo, pois quando estamos perante concentrações elevadas de cálcio no mioplasma, estes terminam automaticamente a libertação de Ca^{2+} . (23)

A concentração de Ca^{2+} citosólico é determinada pela libertação sarcoplasmática de Ca^{2+} e pela sua recaptção via SERCA. (8;23)

Devido às mutações associadas à HM, os agentes desencadeantes da patologia provocam uma libertação excessiva de Ca^{2+} do RS, que pode levar à exaustão energética do SERCA. (23) Teoricamente, uma atividade reduzida da SERCA pode resultar num nível elevado de Ca^{2+} citosólico, devido a um efluxo lento e persistente de Ca^{2+} para fora do RS, que, de outra forma, estaria equilibrado pela recaptção. Um limiar crítico de Ca^{2+} citosólico pode então ser excedido, levando ao desenvolvimento de uma crise de HM em doentes suscetíveis. Por este motivo, a modulação desta ATPase pode desempenhar um papel significativo no desenvolvimento da HM. Os doentes com elevada atividade da SERCA podem compensar o aumento da concentração de Ca^{2+} , ao passo que os doentes com baixa atividade não o conseguem fazer. (23)

Magnésio

Há cada vez mais evidências que sugerem que alterações na regulação do RyR1 pelo Mg^{2+} conferem suscetibilidade à hipertermia maligna. A nível molecular, as interações entre os subdomínios críticos do RyR1 podem explicar o agrupamento de mutações no RyR1 e os respetivos efeitos na regulação do Mg^{2+} . (18)

A ativação da DHPR pode influenciar a ação do Mg^{2+} citosólico no RyR1: a região C (725Phe Pro742) da subunidade α_1 do DHPR vai interagir com o RyR1 para iniciar a liberação de Ca^{2+} durante a contração. Experiências com RyR1 isolado mostraram que os peptídeos da região C diminuem a inibição do Mg^{2+} , facilitando a ativação por outros moduladores citosólicos, incluindo o Ca^{2+} e o ATP. Estes resultados sugerem que o evento inicial na liberação de Ca^{2+} é a diminuição da afinidade do Mg^{2+} nos sítios reguladores do RyR1, desencadeada pelo DHPR ativado. (18)

O Mg^{2+} citosólico também pode estar envolvido na regulação do RyR1 pelo Ca^{2+} . Nos canais isolados de Ca^{2+} , o aumento da concentração de Ca^{2+} induz um aumento da probabilidade de abertura. Este aumento da carga torna o RyR1 mais sensível a agonistas como a cafeína. O mecanismo preciso subjacente a esta regulação não é totalmente compreendido, mas pensa-se que pode envolver a ligação do Ca^{2+} a um sítio regulador no RyR, ou uma ação indireta envolvendo proteínas acessórias como a calsequestrina, a triadina e/ou a junctina. (18)

Além disso, variações patológicas na concentração de Mg^{2+} podem influenciar a probabilidade de desenvolver HM. Sob condições fisiológicas, a maior parte do Mg^{2+} está ligado ao ATP. Dadas as constantes de afinidade publicadas para a ligação do Mg^{2+} ao ATP, pode-se calcular que uma diminuição de 15% no Mg^{2+} total seria suficiente para aumentar a probabilidade de desenvolvimento de HM ou de aumentar a gravidade da crise. (18)

Interações interdomínio

As mutações enfraquecem as interações entre domínios no RyR1, diminuindo a barreira energética para a abertura do canal e aumentando a liberação de cálcio. (3)

No músculo esquelético, tem-se utilizado um peptídeo correspondente a uma região no domínio central do RyR onde ocorrem certas mutações (*DP4-domain peptide 4*: peptídeo correspondente aos resíduos Leu2442-Pro2477 do domínio central que produz desestabilização do canal RyR1) para estudar a função do RyR no músculo esquelético. Em vesículas RS isoladas, o DP4 melhorou a ligação do RyR e tornou o mecanismo de liberação de Ca^{2+} mais sensível à ativação pelo Ca^{2+} . Nas fibras musculares expostas ao DP4, a resposta à depleção de cafeína ou Mg^{2+} foi potencializada, sem que o mecanismo fisiológico de liberação de Ca^{2+} induzido pela despolarização dos túbulos T fosse afetado. Consequentemente, o DP4 imita o fenótipo HM. (18)

Foi demonstrado que outro peptídeo correspondente à região Gly2460-Pro2495 do domínio central (DPC10) aumenta a atividade de ligação à rianodina e a sensibilidade do canal à ativação de Ca^{2+} em vesículas do RS. O DPC10 também diminuiu o limiar para liberação espontânea de Ca^{2+} . (18)

A diminuição das interações interdomínio provoca uma diminuição na capacidade do Mg^{2+} em inibir o canal, conferindo maior sensibilidade aos agonistas e aumentando o CICR (liberação de cálcio induzida pelo Ca^{2+}). (18)

Capítulo 3: Mutações identificadas

Diagnóstico

O IVCT (Teste de contratura *in vitro*) é o teste *gold standard* para estabelecer o risco de HM de um indivíduo, mas é invasivo, pois necessita de uma biópsia muscular. (24)

Com base na resposta do músculo à estimulação *in vitro* com halotano e cafeína, os indivíduos são classificados como MHS (ou MHS_{hc}) se os seus músculos responderem anormalmente ao halotano e à cafeína, MHS_h se os seus músculos responderem anormalmente ao halotano, MHS_c se os seus músculos responderem anormalmente à cafeína ou MHN. (2,24)

Além de ser invasiva, as biópsias musculares podem ser realizadas em adultos sob anestesia local regional, o que não desencadeia HM, mas não em crianças, devido a isso, as biópsias musculares diagnósticas geralmente não são realizadas antes dos dez anos de idade. (24)

Por esta razão, os testes genéticos moleculares não invasivos tendem a ser preferidos, embora a heterogeneidade genética e o número relativamente pequeno de mutações funcionalmente caracterizadas em relação ao grande número de variantes potencialmente patogénicas relatadas até à data, limitam severamente esta abordagem. (24)

Classificação

Para serem classificadas como patogénicas, as mutações precisam cumprir critérios específicos definidos pelo EMHG, incluindo evidência científica de uma relação causal direta entre a presença da mutação e a alteração da libertação de cálcio. (24)

De acordo com as diretrizes do EMHG, existem três categorias de classificação das variantes patogénicas: forte (PSa, PSb), moderada (PMa, PMb) e de suporte (PPa, PPb, PPc) e três categorias de classificação das variantes benignas: *stand-alone* (BAa, BAb, BAc), forte (BSa, BSb) e de apoio (BPa).

Uma variante patogénica é definida por pelo menos 1 critério PS e 2 critérios PP e uma provável variante patogénica é definida por pelo menos 1 critério PM e 2 critérios PP.

Uma variante benigna é definida por pelo menos um critério BA ou 2 critérios BS e uma provável variante benigna é definida por um critério BS e um critério BP.

Uma variante que não atende a nenhum dos critérios acima é definida como VUS. (24)

Mutações

O papel do gene RYR1 na doença foi comprovado pela primeira vez pela identificação da mutação R615C em suínos. As estreitas semelhanças entre as doenças suínas e humanas são adequadamente ilustradas pelo fato de que a mesma mutação (1840C>T; R614C) foi a primeira mutação genética identificada na HM humana. (7)

A maioria das mutações detetadas são alterações *missense*. A maioria das mutações ocorrem nas sequências de dinucleotídeos CpG na cadeia codificadora ou *antisense*, e presumivelmente surgiram através da “fixação” de pré-mutações de incompatibilidade T:G decorrentes da desaminação de resíduos 5-metil-citidina. Quase todas as mutações ocorrem no estado heterozigoto, já o estado homozigotos é muito mais raro. (2,6,7)

Em contraste, apesar da abundância de alterações *missense* descritas, foram identificadas sete mutações envolvendo deleções de um ou mais nucleotídeos em associação com a HM. A nível proteico, apenas uma deleção resulta numa mutação *frameshift* que se prevê resultar no término prematuro do produto proteico (p.Gln4837fsX4838) e que vai afetar o acoplamento excitação-contração. (6)

A substituição no intrão 101, c.146461 2,99KbA4G, gera um local de *splice* que resulta numa inserção de 119 pb e no término prematuro do produto proteico com 94 aminoácidos a jusante do local de inserção. O produto truncado compreende 4.976 resíduos de aminoácidos, com uma região C-terminal modificada e desprovida do último domínio transmembranar codificado pelo exão 102. (6)

O canal RYR1 possui vários locais de ligação para ligantes e proteínas. No entanto, as mutações RYR1 descritas até agora para a MH e a CCD não se sobrepõem diretamente a nenhum dos sítios de ligação. (7) A análise funcional das diversas mutações mostra que estas produzem anormalidades no RYR1 que alteram a cinética do canal para a inativação do cálcio e tornam o canal hipersensível aos ligantes ativadores de canal, como a cafeína e o halotano, e pouco sensível aos inativadores de canal, como o magnésio e a calmodulina, indicando um ganho de função. (2,7)

Estudos realizados em fibras musculares biopsadas de indivíduos suscetíveis à HM revelaram um aumento de três vezes na taxa de pico máximo de libertação de cálcio, em relação ao músculo normal, enquanto nem a cinética nem a libertação dependente da voltagem foram afetadas. (7)

O aumento da sensibilidade à libertação de cálcio induzida pelo halotano e pela cafeína foi demonstrado em células HEK-293 transfectadas (ou geneticamente modificadas) com 15 construções mutantes MH/CCD RYR1 localizadas no terminal N/central. Na mesma linha celular, a expressão de RYR1 mutado revelou uma maior concentração de Ca²⁺ em repouso, menores reservas de Ca²⁺ no retículo sarcoplasmático e uma libertação máxima de Ca²⁺ reduzida em comparação com o tipo selvagem (7).

Abordando agora algumas das mutações já descritas acerca do recetor.

As mutações N-terminais **R164C** e **Y523S** causam uma fuga grave de Ca²⁺ do RS, levando a uma depleção significativa das reservas de Ca²⁺ e a níveis elevados de Ca²⁺ citosólico em repouso. (21)

A elevação da concentração de Ca^{2+} levou a um aumento gradual e sustentado do Ca^{2+} citosólico nas células que expressam R164C e Y523S. O aumento sustentado de Ca^{2+} citosólico após a elevação de Ca^{2+} extracelular nestas células mutadas resultou provavelmente da libertação excessiva do ião, levando à depleção de Ca^{2+} armazenado e à ativação da entrada do mesmo operada pelo armazenamento que excede a capacidade de remoção de Ca^{2+} . (21)

Os estudos funcionais do RyR1 recombinante no sistema heterólogo HEK293 sugerem que as variantes **p.R2336H**, **p.R2355W**, **p.E3104K**, **p.G3990V** e **p.V4849I** do RYR1 produzem uma proteína RyR1 com sensibilidade aumentada ao agonista cafeína. Estes efeitos de ganho de função são consistentes com um papel patogénico na hipertermia maligna. (25) A variante **p.R2355W** já é considerada uma variante patogénica.

As variantes **p.Leu13Arg**, **p.Thr214Met**, **p.Gly341Arg**, **p.Asn2342Ser**, **p.Glu2348del** e **Val4849Ile** também demonstraram ser hipersensíveis ao agonista em células HEK293-T. (5)

Além destas, outras quatro variantes, **p.Tyr1711Cys**, **p.Val2280Ile**, **p.Asn2634Lys** e **p.Arg4737Gln**, exibem hipersensibilidade ao agonista 4cmc, consistente com um fenótipo suscetível a MH. No entanto, outras duas variantes testadas, a **p.Glu2348Gly** e a **p.Arg3629Trp** já se parecem comportar como o tipo selvagem. (5)

Das quatro variantes que exibem hipersensibilidade, três (**p.Tyr1711Cys**, **p.Val2280Ile** e **p.Arg4737Gln**) foram classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas para HM. Em relação à variante **p.Asn2634Lys**, esta permanece classificada como de significância incerta, pois faltam dados de segregação. (5)

Em relação às mutações **V2461G** e **V2461I**, estas vão interromper a ligação de FKBP12, provocando uma diminuição da libertação de Ca^{2+} -dependente de voltagem. (4)

A mutação **Y522S** no RyR1, embora não esteja localizada no sítio de ligação RyR1-DHPR, esta altera a inativação do DHPR durante a sinalização retrógrada, onde se verifica um aumento da libertação de Ca^{2+} . Esta mutação está localizada no *hotspot* 1 e resulta na libertação não controlada de Ca^{2+} , o que leva a um aumento da produção de espécies reativas de azoto (RNS). A S-nitrosilação, após a produção excessiva de RNS, resulta num aumento da sensibilidade à temperatura para a ativação do RyR1, produzindo contrações musculares após exposição a temperaturas elevadas. (4)

A mutação **R163C** provoca um aumento dos níveis de Ca^{2+} sarcoplasmático em repouso. A taxa de diminuição do Ca^{2+} é retardada de tal forma que a sinalização retrógrada do RyR1 é alterada, resultando numa inativação retardada do DHPR. A oxidação anormal dos cisteis do RyR1 pode estar ligada à desregulação da S-nitrosilação, que leva a uma perda do Ca^{2+} do RS, resultando em várias patologias musculares, incluindo a HM. (4)

A mutação **E2880K** está localizada no domínio Bsol, na camada citosólica (CS, resíduos 1-3613) do recetor. A substituição do glutamato pela lisina provoca uma alteração da carga e resulta em dois conflitos: um com Y2908 e outro com E2876. A estrutura vai acomodar o aminoácido anfipático recentemente introduzido e vai provocar uma alteração nas interações globais do recetor. (24)

A mutação **R3772W** está localizada no canal e no domínio de ativação do recetor (CAC, resíduos 3614-5027), mais precisamente no domínio Csol, em proximidade com o domínio c-terminal, que contém o local de ligação do cálcio. Este local é constituído primariamente por cinco aminoácidos: E3893, E3967, T5001, H3895 e Q3970, e mutações neste local ou na zona circundante podem influenciar a atividade do canal. O resíduo R3772, que é afetado pela mutação, fica a aproximadamente 24 aminoácidos do local de ligação. Enquanto a sua natureza anfipática se mantiver, o espaço tridimensional da cadeia lateral do triptofano poderá determinar possíveis conflitos com o resíduo His3699 próximo. (24)

Já a mutação que afeta o resíduo **G3806R** também se encontra no domínio Csol, mas, neste caso, está localizada mais próxima do local de ligação do cálcio, a 10 aminoácidos do sítio. A substituição de um aminoácido pequeno e neutro, como a glicina, por um resíduo maior e mais hidrofílico, como a arginina, também vai influenciar o ambiente em volta do local de ligação. (24)

Por outro lado, a mutação **K4876R** já reside na porção inferior do domínio formador do poro. A substituição da cadeia lateral de lisina por um aminoácido com carga positiva e hidrofílico, como a argina, pode provocar conflitos com os resíduos F4885 e K4865, que se encontram próximos. Este conflito pode levar a um rearranjo dos aminoácidos. (24)

A mutação **I4938T** está presente na parte central do domínio formador de poro e provoca a substituição de um resíduo de isoleucina, sem carga e hidrofóbico, com a treonina hidrofílica, que resulta em uma possível ligação H com o resíduo Q4933. O aminoácido mutado está posicionado entre G4934 e G4941, que são os dois resíduos que compõem a hélice de revestimento dos poros S6 e são essenciais para o controlo da flexibilidade de S6, muito importante durante os estados aberto ou fechado do canal. O aumento de resíduos hidrofílicos do poro juntamente com a desestabilização feita pela introdução de ligações H poderia provocar uma transição para a conformação aberta e/ou um estado de maior condutância. (24)

Por último, abordamos a variante **p.Arg3629Trp**. Embora esta tenha respondido a concentrações mais baixas de 4cmc do que WT, a CE50 não atingiu níveis de significância. Esta variante reside perto de uma região do RyR1, que interage com o DHPR. Como o RyR1 é expresso em células HEK293-T isoladamente das outras proteínas do músculo esquelético, é possível que o RyR1 que possui esta variante exija a presença da DHPR ou de outras proteínas reguladoras para exibir hipersensibilidade funcionalmente significativa. (5)

Capítulo 4: Identificação de possíveis linhas de investigação para o desenvolvimento de novos fármacos no futuro

Estão a ser investigados novos tratamentos alternativos para a HM aguda e crises relacionadas, nomeadamente: 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-D-ribofuranosídeo (AICAR), derivados do carvedilol, formulações alteradas para o dantroleno. (3)

5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-D-ribofuranosídeo (AICAR)

O AICAR é um ativador da proteína cinase ativada pelo AMP (AMPK), uma cinase que funciona como um sensor de energia celular ativado pelo aumento da relação AMP/ATP. O AICAR é convertido em ribonucleósido 5-aminoimidazol-4-carboxamida (ZMP) na célula, onde mimetiza o AMP para ativar a AMPK e melhorar a resistência muscular sem exercício físico. A ligação do AMP à AMPK aumenta a sua fosforilação na treonina 173, o que leva a uma ativação prolongada. (26)

Se não forem tratados, os ratos morrem após exposição a 37 °C durante mais de 15 minutos. A administração aguda de AICAR evita esta morte induzida pelo calor. A administração da mesma dose de AICAR, após o início das contrações musculares induzidas pelo calor, impediu a morte em quatro de cinco ratos expostos a 37 °C. (26)

Em relação ao seu mecanismo de ação, o ATP é um ativador conhecido dos RyRs, ao passo que outros nucleótidos de adenina (ADP, AMP, cAMP, adenosina e adenina) funcionam como agonistas parciais menos potentes. Uma vez que o AICAR é um precursor do ZMP, este também pode interagir com o RyR1 no local de ligação do ATP. No entanto, o AICAR vai inibir a atividade do RyR1 na presença de AMP-PCP (uma forma não hidrolisável de ATP). (26)

O efeito inibitório do AICAR na ligação da rianodina sugere que o seu efeito protetor pode dever-se a uma diminuição da libertação não controlada de Ca²⁺ dos canais RyR1 mutados na presença de ATP. Para testar esta possibilidade, foi determinada a atividade do canal na presença de 1 mM de AMP-PCP e de AICAR. Os canais foram inibidos pelo AICAR na presença de AMP-PCP. O AICAR reduziu significativamente a probabilidade de abertura (Po) dos canais, sobretudo através da diminuição do tempo médio de abertura dos canais. Estes resultados demonstram que o AICAR reduz a atividade do canal RyR1 na presença de AMP-PCP. (26)

Também se procedeu à avaliação dos efeitos do AICAR na ativação do recetor dependente de cálcio. O Ca²⁺ regula a atividade do RyR1 de forma bimodal: em baixas concentrações, ativa o canal; em altas concentrações, inibe a sua atividade. O AICAR não altera a sensibilidade ao Ca²⁺, o que sugere que este não impede a EHR (*enhanced heat response*) diminuindo a

afinidade do RyR1 ao Ca^{2+} . O AICAR não teve qualquer efeito na ligação da FKBP12 ou na sensibilidade do recetor à cafeína. (26)

Além disso, também se explorou a possibilidade de o AICAR impedir a libertação não controlada de Ca^{2+} induzida pelo aumento da temperatura através do RyR1. O tratamento com 1 mM de AICAR durante 10-20 minutos diminuiu a magnitude da libertação dependente da temperatura e evitou uma diminuição do "pool de Ca^{2+} do RyR1 facilmente libertável". Estes resultados são consistentes com um papel do AICAR na redução da fuga de Ca^{2+} do RyR1 na presença de ATP celular. (26)

Para avaliar os efeitos do AICAR na sinalização Cav1.1-RyR1 durante o acoplamento EC, foi determinado o efeito de 1 mM de AICAR nas correntes de Ca^{2+} do tipo L e na libertação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático dependente de voltagem em miotubos WT (*wild-type*). Embora o pré-tratamento com 1 mM de AICAR tenha produzido um aumento modesto na condutância máxima do canal de Ca^{2+} do tipo L, não houve efeito na dependência de voltagem dessa condutância ou na magnitude da libertação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático mediada por RyR1. Assim, concluímos que o AICAR normaliza as propriedades de libertação de Ca^{2+} aumentadas dos canais RyR1 mutados. (26)

Em relação à produção de radicais livres devido ao aumento da temperatura, o aumento tanto dos RNS como dos ROS foram evitados com 1 mM de AICAR.

Ambas as isoformas do óxido nítrico sintetase, eNOS e nNOS, são ativadas pelo Ca^{2+} através da calmodulina no músculo esquelético, sugerindo que o aumento do Ca^{2+} mioplasmático é responsável pelo aumento da produção de ROS e RNS. Existem várias fontes potenciais de produção de ROS no músculo, incluindo as mitocôndrias, a NADPH as oxidases (NOX) e a xantina oxidase. A inibição da NOX ou da NOS pelo peptídeo gp91ds-TAT ou pelo éster metílico da L-NG-nitroarginina (L-NAME), respetivamente, impediu o aumento da produção de tanto dos ROS como dos RNS. (26)

No entanto, o pré-tratamento com AICAR (600 mg kg^{-1} de peso corporal) não conseguiu evitar a morte dos ratos após a exposição a anestésicos voláteis, o que sugere que os anestésicos voláteis são um estímulo mais forte do que o calor ou que o mecanismo induzido pelo calor é diferente da resposta induzida pelos anestésicos. (26)

Carvedilol

O carvedilol é um dos fármacos mais eficazes na prevenção de arritmias em doentes com insuficiência cardíaca. Curiosamente, o carvedilol, um β -bloqueador não seletivo comumente utilizado, suprime o SOICR mediado por RyR2 e também inibe o SOICR nestas células HEK293 mutantes RyR1. (19, 21)

Recentemente, foi relatado que o carvedilol inibe eficazmente o SOICR em células HEK293 e em células cardíacas que expressam a mutação RyR2 R4496C, causadora da doença, e suprime as taquiarritmias ventriculares induzidas pelo stress e evocadas pelo SOICR. (21)

Também foi demonstrado que o carvedilol suprime o SOICR mediado pelo RyR2, interagindo diretamente com o canal RyR2 e reduzindo a sua duração de abertura. (21)

Para avaliar se o carvedilol também é eficaz na supressão do SOICR mediado pelo RyR1, determinou-se o impacto do carvedilol no SOICR em células que expressavam mutações do RyR1 associadas à MH/CCD (R2163H, R2435H e Y4796C). Foi demonstrado que o carvedilol (30 μ M) inibiu substancialmente o SOICR nessas células mutadas. (21)

Além disso, o carvedilol também pode suprimir a libertação de Ca^{2+} pela cafeína. Além da ação sobre os RyR, também se observou a inibição da libertação de Ca^{2+} induzida pelo inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) pelo carvedilol, o que sugere um mecanismo comum a estes canais de libertação de Ca^{2+} evolutivamente relacionados e conservados. (19)

Em conjunto, estas observações sugerem que o carvedilol pode ser potencialmente utilizado como tratamento a longo prazo para a MH/CCD e outras doenças musculares associadas a um aumento da SOICR mediada por RyR1. (21)

Dantroleno

Atualmente, o dantroleno é o tratamento farmacológico de primeira linha para o tratamento de HM, uma vez que permite restaurar o equilíbrio da concentração de cálcio nos miócitos ao nível dos recetores RyR. (1)

O dantroleno sódico (DS) foi inicialmente introduzido como um medicamento antiespasmódico oral. No entanto, em 1975, foi demonstrado que o DS era eficaz no tratamento da hipertermia maligna (HM) e passou a ser o principal fármaco terapêutico após administração intravenosa. Mais recentemente, tem também sido utilizado no tratamento da síndrome neuroléptica maligna, da espasticidade, da insolação e da intoxicação por ecstasy. (27)

O DS foi originalmente descrito como inibidor do acoplamento excitação-contração dos músculos esqueléticos. O DS suprime a libertação de Ca^{2+} pelos RyR1 e RyR3. Por conseguinte, o DS apresenta efeitos benéficos não só na HM, mas também em várias patologias causadas pela quebra da homeostase do cálcio (como o acidente vascular cerebral, a lesão por isquemia/reperfusão e as doenças neurodegenerativas). (27)

Sabe-se que o fármaco vai inibir o DHPR de uma forma dependente de RyR1 e que também suprime substancialmente o SOICR em células HEK293 que expressam mutações MH/CCD RyR1 localizadas nas regiões central e C-terminal. Além disso, foi demonstrado que o dantroleno em reduzidas concentrações inibe diretamente o canal RyR1, e esta inibição

requer a presença da calmodulina. O dantroleno também consegue suprimir parcialmente a libertação de Ca^{2+} do RS induzida por voltagem. (1)

O DS está disponível sob a forma de injeção intravenosa e de administração oral. O DS oral é muito menos dispendioso do que uma preparação intravenosa e é geralmente administrado para tratar a espasticidade. No entanto, o DS demora demasiado tempo a preparar no contexto clínico devido às suas propriedades químicas. (27)

Para compensar este inconveniente, foram introduzidas novas preparações de DS, tais como azomolene, Revonto® e Ryanodex®.

O Revonto® tem uma semi-vida de 36 meses, é facilmente administrado em 20 segundos e trata-se de uma formulação estéril, não pirogénica e liofilizada de DS para injeção. (27)

O Ryanodex® é uma suspensão nanocrystalina intravenosa de DS (DSS). As nanosuspensões de fármacos são dispersões coloidais submicrónicas de partículas puras de fármaco, estabilizadas por tensioativos, e prevê-se que ofereçam novas soluções para os fármacos inovadores do futuro. (27,29)

As nanopartículas dissolvem-se em questão de segundos após a administração intravenosa, proporcionando uma entrega muito mais rápida do dantroleno ao organismo. Os testes laboratoriais do DSS demonstraram que as partículas se dissolvem rapidamente no plasma a uma temperatura de 37 °C. (29)

Foi demonstrado que o DSS é tão potente e eficaz quanto o dantroleno padrão no tratamento da crise de HM em suínos suscetíveis. Em contrapartida, a preparação e a administração do DSS foram significativamente mais rápidas. Além disso, não foram descritos efeitos secundários relevantes. (29, 30)

O Azomolene é um análogo do dantroleno, sintetizado através da substituição do grupo para-nitrofenilo do DS por um grupo para-bromofenilo. Estas alterações químicas aumentam a solubilidade em água. O azomolene é equipotente ao DS no tratamento e prevenção das manifestações clínicas de uma crise de HM secundária a anestésicos inalatórios ou relaxantes musculares despolarizantes em doentes suscetíveis de desenvolver esta patologia. A principal vantagem do Azomolene é a sua elevada solubilidade em água. (27)

Foi também desenvolvida uma nova formulação intravenosa de dantroleno, NPJ5008, utilizando diferentes excipientes, nomeadamente 2-hidroxi-propil-beta-ciclodextrina (HP-β-CD) e polietilenoglicol (PEG), de modo a reduzir o tempo de preparação e administração e facilitar intervenções rápidas em situações de emergência. Com o NPJ5008, é possível reconstituir a mesma dose de dantroleno mais rapidamente e em volumes mais pequenos do que com o Dantrium1 (observações não publicadas). (28)

A melhoria da solubilidade do NPJ5008 permite uma preparação e administração mais rápidas com um volume total de fluido mais pequeno, o que pode reduzir a taxa e a gravidade das complicações nos doentes com hipertermia maligna, incluindo as taxas de mortalidade. Por conseguinte, o NPJ5008 apresenta uma vantagem clinicamente relevante em relação ao Dantrium1 no tratamento da hipertermia maligna em doentes de todas as idades. (28)

Discussão

Neste trabalho, foram analisados e compilados vários estudos sobre o recetor RyR1 e os patomecanismos relacionados com o objetivo de descrever o seu mecanismo de ação e a sua implicação na patologia. Este trabalho englobou no total 30 artigos, dos quais 16 eram revisões e 6 eram artigos de investigação.

A principal limitação foi o facto de que este tema ainda é uma área em investigação. Dado que existe pouca informação acerca da estrutura e do patomecanismo deste recetor, seria importante, para obter uma melhor compreensão e conhecimento clínico desta patologia rara, seria benéfico a realização de mais estudos que permitissem uma melhor descrição do recetor.

Além disso, é importante destacar que o agrupamento das mutações em 3 *hotspots* pode refletir um viés de descodificação, uma vez que, devido ao grande tamanho do gene, a sua descodificação foi mais focada na região N-terminal (onde a primeira mutação MHS foi descrita) e numa segunda região central (onde uma série de mutações foram identificadas subsequentemente).

Como referido anteriormente, a incidência de episódios de HM é 1:10.000-1:250.000 anestésias. Apesar de ser uma doença rara, se não diagnosticada e tratada com antecedência pode ser fatal. É importante que os serviços de anestesiologia e os blocos operatórios estejam preparados para abordar esta patologia, sendo obrigatório a existência de protocolos de atuação, que especifiquem os sinais de alerta e as recomendações referentes ao tratamento.

Atualmente, o dantroleno é o único fármaco conhecido que consegue tratar especificamente a HM. O seu mecanismo de ação ainda não é completamente compreendido, mas sabe-se que o fármaco vai inibir o DHPR de uma forma dependente de RyR1 e que também suprime substancialmente o SOICR em células HEK293 que expressam mutações MH/CCD RyR1 localizadas nas regiões central e C-terminal. Além disso, foi demonstrado que o dantroleno em reduzidas concentrações inibe diretamente o canal RyR1, e esta inibição requer a presença da calmodulina. O dantroleno também consegue suprimir parcialmente a libertação de Ca²⁺ do RS induzida por voltagem. O efeito do dantroleno na libertação de Ca²⁺ do RS induzida por voltagem pode também contribuir para os seus benefícios efeitos terapêuticos.

Neste momento, encontram-se em investigação novos tratamentos alternativos para a HM aguda e crises relacionadas (AICAR e derivados do carvedilol).

Já foi demonstrado que a administração aguda de AICAR evita a morte induzida pelo calor em ratos expostos a 37 °C. No entanto, o pré-tratamento com AICAR não conseguiu evitar a morte dos ratos após a exposição a anestésicos voláteis, o que sugere que os anestésicos voláteis são um estímulo mais forte do que o calor ou que o mecanismo induzido pelo calor é diferente da resposta induzida pelos anestésicos. Por este motivo, é necessário investir no estudo deste fármaco para perceber se de facto é possível tratar crises de Hipertermia Maligna induzidas pelos anestésicos com este medicamento ou não.

Em relação ao carvedilol, este é um dos fármacos mais eficazes na prevenção de arritmias em doentes com insuficiência cardíaca. O carvedilol suprime o SOICR mediado por RyR2 e também inibe o SOICR nestas células HEK293 mutantes RyR1. Este facto sugere que o carvedilol pode ser potencialmente utilizado como tratamento a longo prazo para a MH/CCD e outras doenças musculares associadas a um aumento da SOICR mediada pelo RyR1.

Conclusão

De forma sintetizada, as mutações no recetor RyR1 resultam numa libertação constante de cálcio em repouso, num acoplamento defeituoso da contração e excitação e num aumento do stress oxidativo mitocondrial.

Este recetor é composto por diversas proteínas, mas de forma a permitir uma melhor compreensão, foi dividido em 6 grupos, cujo resumo se apresenta.

O grupo 1 responde aos potenciais de ação e altera as concentrações de cálcio no interior do RS e no sarcoplasma, e é composto pelo DHPR pela FKBP12 e a triadina.

O grupo 2 controla a abertura e fecho do canal externamente e internamente, responde à ativação do recetor pelo DHPR, é regulado pela concentração de cálcio no RS. É composto pelas interações interdomínio do recetor com a calmodulina.

O grupo 3 regula a sinalização retrógrada dependendo da concentração de cálcio no RS e do estado da calsequestrina de fosforilação/desfosforilação.

O grupo 4 responde às alterações na concentração do cAMP, que está elevada devido à libertação de acetilcolina. Este grupo inclui o FKBP12, a PKA, a PDE4D3 e a PP1.

O grupo 5 responde a alterações na concentração de oxigénio no músculo e no ratio GSH/GSSG. Este grupo abrange as modificações pós-transducionais (S-nitrosilação, S-oxidação, S-glutationilação e S-palmitoilação). Estas modificações servem como um *on-off switch* da função proteica.

O grupo 6 responde à concentração de cálcio. É composto pelo cálcio, o ATP e o magnésio. O ATP aumenta a probabilidade de abertura do canal, já o magnésio promove o estado fechado. No entanto, o cálcio tanto pode provocar a abertura como o fecho do canal.

A maioria das mutações detetadas são alterações *missense*. A maioria destas ocorrem nas sequências de dinucleotídeos CpG na cadeia codificadora ou *antisense*, e presumivelmente surgiram através da “fixação” de pré-mutações de incompatibilidade T:G decorrentes da desaminação de resíduos 5-metil-ci-tidina. Quase todas as mutações ocorrem no estado heterozigoto. A análise funcional mostra que estas mutações alteram a cinética do canal para a inativação do cálcio e o tornam hipersensível a ligantes ativadores de canal, como a cafeína e o halotano, e pouco sensíveis a ligantes inativadores de canal, como o magnésio e a calmodulina, indicando um ganho de função.

Em suma, numa perspetiva futura, é importante investir nas investigações desta patologia e do recetor RyR1, de maneira a serem desenvolvidos novos fármacos que permitam tratar a HM. Além disso, a perceção completa do mecanismo do recetor também será útil para outras patologias que o envolvam, como, por exemplo, a *Central Core Disease*.

Referências

1. Rosenberg H, Pollock N, Schiemann A, Bulger T, Stowell K. Malignant hyperthermia: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2015 Aug 4;10(1):1–19.
2. Betzenhauser MJ, Marks AR. Ryanodine receptor channelopathies. Vol. 460, *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 2010. p. 467–80.
3. Riazi S, Kraeva N, Muldoon SM, Dowling J, Ho C, Petre MA, et al. Malignant hyperthermia and the clinical significance of type-1 ryanodine receptor gene (RYR1) variants: proceedings of the 2013 MHAUS Scientific Conference. *Canadian Journal of Anesthesia*. 2014 Oct 11;61(11):1040–9.
4. Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. Vol. 4, *Acta neuropathologica communications*. 2016. p. 121.
5. White R, Schiemann AH, Burling SM, Bjorksten A, Bulger T, Gillies R, et al. Functional analysis of RYR1 variants in patients with confirmed susceptibility to malignant hyperthermia. *British Journal of Anaesthesia*. 2022 Dec 1;129(6):879–88.
6. Robinson R, Carpenter D, Shaw MA, Halsall J, Hopkins P. Mutations in RYR1 in malignant hyperthermia and central core disease. Vol. 27, *Human Mutation*. 2006. p. 977–89.
7. McCarthy T v, Quane KA, Lynch PJ. Ryanodine Receptor Mutations in Malignant Hyperthermia and Central Core Disease. Vol. 15, *HUMAN MUTATION*. 2000.
8. Lyfenko AD, Goonasekera SA, Dirksen RT. Dynamic alterations in myoplasmic Ca²⁺ in malignant hyperthermia and central core disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004 Oct 1;322(4):1256–66.
9. Melzer W, Dietze B. Malignant hyperthermia and excitation-contraction coupling. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2001 Mar;171(3):367–78.
10. Willegems K, Efremov RG. Structural details of the ryanodine receptor calcium release channel and its gating mechanism. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2017. p. 179–204.
11. Hamilton SL, Reid MB. Forum Minireview RyR1 Modulation by Oxidation and Calmodulin. Vol. 2, *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*. Mary Ann Liebert, Inc; 2000.
12. Chen W, Kudryashev M. Structure of RyR1 in native membranes. *EMBO reports*. 2020 May 6;21(5).

13. Beard NA, Wei L, Dulhunty AF. Ca²⁺ signaling in striated muscle: The elusive roles of triadin, junctin, and calsequestrin. Vol. 39, *European Biophysics Journal*. 2009. p. 27–36.
14. Dodge-Kafka KL, Kapiloff MS. The mAKAP signaling complex: Integration of cAMP, calcium, and MAP kinase signaling pathways. Vol. 85, *European Journal of Cell Biology*. Elsevier GmbH; 2006. p. 593–602.
15. Danila CI, Hamilton SL. Phosphorylation of Ryanodine Receptors. *Biological Research* [Internet]. 2004;37(4):521–5. Available from: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-97602004000400005&lng=en&nrm=iso&tlng=en
16. Salanova M, Schiffl G, Rittweger J, Felsenberg D, Blottner D. Ryanodine receptor type-1 (RyR1) expression and protein S-nitrosylation pattern in human soleus myofibres following bed rest and exercise countermeasure. *Histochemistry and Cell Biology*. 2008 Jul;130(1):105–18.
17. Pastore A, Piemonte F. S-Glutathionylation signaling in cell biology: Progress and prospects. Vol. 46, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012. p. 279–92.
18. Steele DS, Duke AM. Defective Mg²⁺ regulation of RyR1 as a causal factor in malignant hyperthermia. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2007 Feb 1;458(1):57–64.
19. Morgan AJ, Bampali K, Ruas M, Factor C, Back TG, Chen SRW, et al. Carvedilol Inhibits cADPR- and IP₃-Induced Ca²⁺ Release. *Messenger*. 2017 May 11;5(1):92–9.
20. Cully TR, Launikonis BS. Leaky ryanodine receptors delay the activation of store overload-induced Ca²⁺ release, a mechanism underlying malignant hyperthermia-like events in dystrophic muscle. *AJP Cell Physiology*. 2016 Jan 30;310(8):C673–80.
21. Chen W, Koop A, Liu Y, Guo W, Wei J, Wang R, et al. Reduced threshold for store overload-induced Ca²⁺ release is a common defect of RyR1 mutations associated with malignant hyperthermia and central core disease. *Biochemical Journal*. 2017 Aug 15;474(16):2749–61.23
22. Beam TA, Loudermilk EF, Kisor DF. Pharmacogenetics and pathophysiology of CACNA1S mutations in malignant hyperthermia. *Physiol Genomics* [Internet]. 2017;49:81–7. Available from: www.physiolgenomics.org
23. Schuster F, Müller R, Hartung E, Roewer N, Anetseder M. Inhibition of sarcoplasmic Ca²⁺-ATPase increases caffeine- and halothane-induced contractures in muscle bundles of malignant hyperthermia susceptible and healthy individuals. *BMC Anesthesiology*. 2005 Jun 9;5.

24. Noda Y, Miyoshi H, Benucci S, Gonzalez A, Bandschapp O, Girard T, et al. Functional characterization of RYR1 variants identified in malignant hyperthermia susceptible individuals. *Neuromuscular Disorders*. 2023 Dec 1;33(12):951–63.
25. Merritt A, Booms P, Shaw MA, Miller DM, Daly C, Bilmen JG, et al. Assessing the pathogenicity of RYR1 variants in malignant hyperthermia. *British Journal of Anaesthesia*. 2017 Apr 1;118(4):533–43.
26. Lanner JT, Georgiou DK, Dagnino-Acosta A, Ainbinder A, Cheng Q, Joshi AD, et al. AICAR prevents heat-induced sudden death in RyR1 mutant mice independent of AMPK activation. *Nature Medicine*. 2012 Feb;18(2):244–51.
27. Yang HS, Choi JM, In J, Sung TY, Kim YB, Sultana S. Current clinical application of dantrolene sodium. Vol. 18, *Anesthesia and Pain Medicine*. Korean Society of Anesthesiologists; 2023. p. 220–32.
28. Ng Kwet Shing RH, Clayton LB, Smith SL, Watson MJ, McKenzie LM, Chalmers DP, et al. The novel rapid formulation of intravenous dantrolene (NPJ5008) versus standard dantrolene (DantriumW) A clinical part-randomised phase 1 study in healthy volunteers. *European Journal of Anaesthesiology*. 2024 May 1;41(5):381–90.
29. Just KS, Gerbershagen MU, Grensemann J, Wappler F. Do we foresee new emerging drugs to treat malignant hyperthermia? Vol. 20, *Expert Opinion on Emerging Drugs*. Informa Healthcare; 2015. p. 161–4.
30. Schütte JK, Becker S, Burmester S, Starosse A, Lenz D, Kröner L, et al. Comparison of the therapeutic effectiveness of a dantrolene sodium solution and a novel nanocrystalline suspension of dantrolene sodium in malignant hyperthermia normal and susceptible pigs. *European Journal of Anaesthesiology*. 2011 Apr;28(4):256–64.