

ANORMALIDADE GENÉTICA DA CREATINO-FOSFOQUINASE MUSCULAR EM UMA FAMÍLIA COM HIPERPIREXIA MALIGNA

DR. E.K. ZSIGMOND (*)

DR. W.H. STARKWEATHER (**)

DR. G.S. DUBOFF (***)

DR. FLYN K. (****)

AP 2321

Um paciente com história familiar e um episódio de hiperpirexia maligna foi submetido com sucesso a uma anestesia cervical epidural. A atividade da enzima creatina-fosfoquinase sérica, determinada pela reação de Rosalki, foi de 385-683-IU/ml em três ocasiões e o normal é de 0-50 IU/ml para um adulto normal do sexo masculino. A atividade da creatina-fosfoquinase no material de biópsia do músculo peitoral foi 1436 IU/ml, sendo o normal 362 IU/mg de tecido não desidratado. Na eletroforese em gel de amido (starch-gel.electrophoresis) de seu soro, a isoenzima muscular era predominante. Seus três filhos e outros 5 parentes (2 irmãs, 2 sobrinhos e uma sobrinha) tinham atividade da creatina fosfoquinase de 95-330 IU/ml, com predominância das isoenzimas musculares na eletroforese. A atividade da dehidrogenase láctica e as frações 5 da dehidrogenase láctica estavam elevadas somente no paciente e nos três filhos. Estes achados indicam uma labilidade genética da creatinafosfoquinase muscular que pode ser correlacionada com a alta incidência de anormalidades músculo-esqueléticas e hiperpirexia nesta família.

A hiperpirexia maligna tem sido o maior enigma em anestesiologia nos últimos anos. Os pacientes portadores da doença podem desenvolver uma elevação rápida da temperatura logo após indução da anestesia. Em alguns casos, a

(*) Professor de Anestesiologia, Departamento de Anestesiologia, Centro Médico da Universidade de Michigan, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.

(**) Bioquímico Clínico, Laboratórios de Pesquisa Médica, Hospital de Veteranos dos Estados Unidos, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.

(***) Professor de Medicina Experimental, Instituto Simpson Memorial, Faculdade de Medicina da Universidade de Michigan, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.

(****) Assistente em Pesquisa, Laboratórios de Pesquisa em Anestesiologia, Centro Médico da Universidade de Michigan, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.

injeção venosa de succinilcolina provocou fasciculações vigorosas e contração de grupos musculares causando grandes dificuldades na ocasião da intubação traqueal. (2) Em outros casos não foi usado relaxante muscular e, no entanto, houve rigidez após a indução da anestesia (3). A maioria dos agentes anestésicos corretamente usados têm sido implicados na patogênese da hiperpirexia maligna, com a possível exceção do bloqueio regional, inoal e anestesia controlada.

Dois excelentes artigos revisam a sintomatologia e tratamento (4,5).

Apesar de todas as medidas terapêuticas para baixar a temperatura do paciente e para corrigir as alterações metabólicas, a mortalidade permanece excessivamente alta, cerca de 70%. A não ser que os agentes etiológicos e os mecanismos fisiopatológicos sejam esclarecidos e que testes diagnósticos para identificar os indivíduos em risco estejam ao alcance, existe pouca esperança para reduzir este índice de mortalidade excessivamente alto.

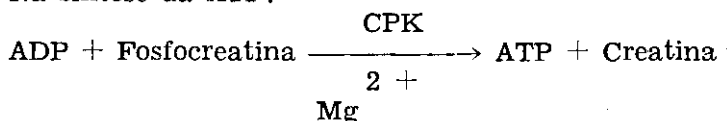
Levantamentos genéticos indicam que a hiperpirexia maligna é uma tendência dominante. Avaliação estatística entre anormalidade músculo-escuelética e hiperpirexia maligna eliminou uma relação casual, todavia têm sido descritos casos bem documentados onde tal correlação pareceu verdadeira. Um artigo sobre anormalidades geneticamente determinadas em enzimas das mitocôndrias, numa miopatia recentemente definida chama a atenção para a necessidade de determinar o tipo e quantidade de enzimas mitocôndricas, em vez de depender somente do diagnóstico clínico e macroscópico das miopatias.

Sabe-se que as fasciculações e o trauma muscular podem resultar em lesão das fibras musculares (7,8), que por sua vez liberam algumas enzimas na circulação, como por exemplo creatino fosfoquinase (CPK) (7), aldolase e desidrogenase láctica (LDH). Relaxantes musculares e agentes anestésicos também podem alterar a permeabilidade das membranas (11), permitindo que constituintes celulares entrem no plasma (12). Na distrofia muscular de Duchênne, portadores desta doença apresentam valores anormais da isoenzima desidrogenase láctica sérica; isto é atribuído à uma alteração nas características da membrana, permitindo a enzima entrar no plasma (13). Portanto, a determinação da atividade das enzimas musculares em pacientes com hiperpirexia fulminante e posteriormente nos parentes dos indivíduos portadores, pareceu uma medida racional e promissora para destacar as anormalidades enzimáticas, genéticas ou induzidas por drogas que podem ser relacionadas à etiopatogenia da hiperpirexia ma-

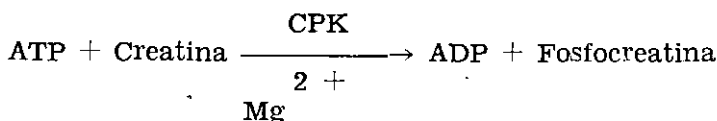
ligna. A função da atividade normal da creatina fosfoquinase era de interesse primário porque sua integridade é essencial para a manutenção das reservas de ATP no músculo normal (¹⁴). A conversão de ADP para ATP é uma reação reversível. Se a reversibilidade desta reação é induzida por um agente anestésico, a depleção de ATP muscular resultará em rigor cadavérico (^{14,15}).

Função enzimática da CPK:

1 — Na síntese da ATP:



2 — Na síntese de fosfocreatina:



A primeira suspeita de uma possível relação entre atividade anormal de creatina fosfoquinase e hiperpirexia maligna surgiu quando um paciente com um episódio anterior de hipertemia foi encaminhado ao nosso serviço para ser anestesiado. A história anestésica revelou que dois de seus filhos tinham falecido de hipertermia após administração de anestesia. Esta pessoa tinha altos níveis séricos de creatina fosfoquinase. Este trabalho descreve os resultados de estudos bioquímicos no sêro e músculo do paciente e no sêro de seus parentes.

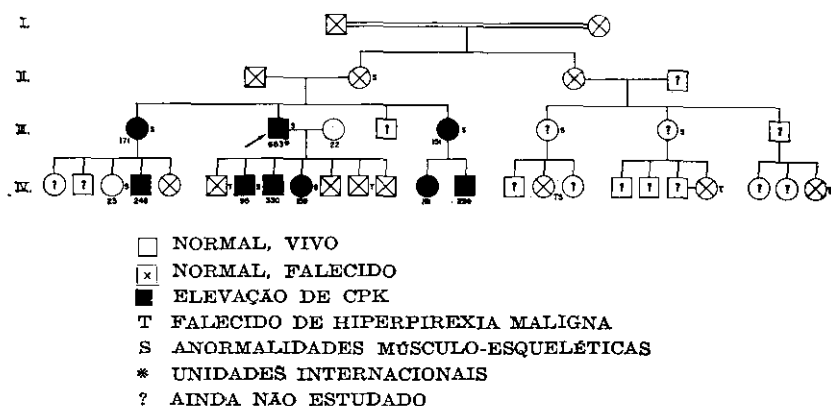
RELATO DO CASO

S.C., idade 36 anos, masculino, musculoso, bem desenvolvido, antigo jogador de futebol americano, foi admitido no Instituto Simonsen Memorial para avaliação e diagnóstico de um possível linfoma. Ele nos foi encaminhado no dia 14 de dezembro de 1969 para consulta devido à história de hiperpirexia durante a administração de um agente anestésico desconhecido, quando tinha a idade de 5 (cinco) anos. As tentativas para obter informações mais detalhadas foram mal sucedidas.

História Clínica — Sintomas de fraqueza muscular, fadiga, mal-estar, perda de peso, edema nos tornozelos e dispnéia

com exercícios leves; gânglios linfáticos dolorosos no pescoço, axilas e regiões inguinais há um ano.

FIGURA 1
CPK SÉRICO ANORMALMENTE ELEVADO E ÓBITOS DE
HIPERPIREXIA NA FAMÍLIA DE S.C.



História Familiar — O paciente teve sete filhos (Fig. 1). Atualmente 3 estão vivos e 4 faleceram. Dos quatro falecidos, três faleceram após cirurgia e anestesia. Dêstes três, somente foi obtida uma história detalhada de S.C. Este menino de 13 anos foi operado para corrigir uma catarata traumática. A anestesia e a operação duraram 45 minutos. A anestesia foi induzida com 200 mg de tiamilal (Surital) e 40 mg de succinilcolina foram administrados para entubação traqueal. Fasciculações musculares violentas e rigidez surgiram imediatamente após a injeção de succinilcolina. Várias tentativas de entubação foram realizadas após repetidas doses de succinilcolina. Ventilação espontânea retornou logo após a última dose de succinilcolina.

Dez minutos após a indução, a temperatura do paciente se elevou. Em vinte minutos, a temperatura alcançara 43.3°C. O paciente foi colocado num cobertor frio e sacos de gelo foram aplicados. Ele foi mantido com ventilação artificial. O paciente passou a apresentar tremores, desenvolveu acentuada rigidez e convulsões tônico-clônicas. O eletrocardiograma revelou ondas T ponteadas, logo após ter sido colocado no cobertor frio. Um catéter foi introduzido na bexiga, a urina era de coloração âmbar escuro. A acidose (pH 7.19) foi corrigida com hidratação endovenosa. Durante

êste período o $p\text{CO}_2$ se elevou para 80 mmHg, na presença de $p\text{O}_2$ normal. O paciente nunca recuperou a consciência e faleceu trinta horas após. Durante dois dias, o paciente desenvolveu uma coagulopatia consumptiva. A necrópsia revelou como único achado relevante hemorragia gástrica maciça.

ANESTESIA DO PACIENTE S.C.

Primeira admissão: Para a biópsia dos gânglios axilares e músculo peitoral para estudo das enzimas musculares foi empregada anestesia local com 1% de lidocaína, sem adrenalina. A cirurgia decorreu sem complicações e o paciente teve alta. Os achados laboratoriais estão resumidos na Tabela I. O hemograma, exame de urina, Raios X de tórax e eletrocardiograma foram normais.

TABELA I
ACHADOS LABORATORIAIS PERTINENTES A S.C.

Admissões	Primeira em 14/12/69	Segunda em 4/3/69
Bilirrubina	0.5 mg% total	0.3 mg% total
Fosfatase alcalina	6.6 U	6.7 U
B.S.P.	--	3.5% Retenção
Colesterol	--	157 mg%
SGOT	71 U	92 U
SGPT	39 U	50 U
LDH	82 U	127 U
Dehidrogenase Isocítrica	--	84 U
CPK	350 U	358 U
Aldolase	10 U	--
LDH Isoenzimas	--	Elevação em frações , 3 e 5
PCHE	D. N. = 74 97 $\mu\text{moles/1hr./1ml.}$	--

Segunda admissão: No dia 2 de março de 1970, o paciente foi readmitido para investigação complementar, que incluía novos estudos hematológicos e repetição de biópsias que indicaram melanoma maligno. Como orientação terapêutica foi indicada resseção dos linfáticos da axila. Em vista da história, foi realizada uma anestesia cervical epidural. A anestesia e cirurgia decorreram sem complicações. A temperatura durante as primeiras 24 horas após a intervenção, oscilou entre 36,3-37,6°C. Os achados laboratoriais estão resumidos na Tabela I.

MATERIAIS E MÉTODOS

Determinações da dehidrogenase láctica no sôro e músculo foram realizadas segundo o método descrito por Starkweather et al. (16). Isoenzimas da dehidrogenase láctica foram separadas em agar gel e medidas quantitativamente (10). Os níveis de creatina fosfoquinase no sôro e músculo foram determinadas pela técnica de Rosalski (17). Os diversos tipos desta enzima foram separados usando eletroforése em agar gel. As isoenzimas da creatina fosfoquinase foram reveladas cobrindo o gel para eletroforése com três ml. de agar liquefeito contendo ADP, fosfocreatina, glicose, hexoquinase, glicose-6-fosfato-dehidrogenase e NADP. Após solidificação deste gel, os dois géis combinados (eletroforético e substrato) foram observados num espectrofotômetro Beckman DU modificado a 340 m μ . Após uma hora a leitura foi repetida. As áreas de atividade enzimática apareceram como discretos picos causados pela formação de NADPH.

RESULTADOS

Como a Tabela I indica, a creatina fosfoquinase sérica estava acentuadamente elevada na primeira hospitalização do paciente S. C., quando comparada com os valores normais de 0 — 50 IU/ml. Na segunda admissão foi notada novamente uma acentuada elevação da creatina fosfoquinase sérica na ausência de aldolase elevada e na presença de dehidrogenase láctica discretamente elevada.

TABELA II

CORRELAÇÃO DA CPK SÉRICA * E ATIVIDADE DE SLDH + COM ENFERMIDADES MUSCULOESQUELÉTICAS NA FAMÍLIA DE S. C.

Caso	Grau de Parentesco	Idade	CPK *	LDH +
S. C.	Paciente	38	683	130
Sra. S. C.	Espôsa	28	22	72
Scott S.	Filho	10	95	96
Tracey S.	Filho	9	330	96
Sandra S.	Filha	13	159	96

* Variação Normal = 0 — 50 IU/ml

+ Variação Normal = 38 — 80 IU/ml

Devido à excessiva elevação da creatino fosfoquinase a família do paciente S.C. foi estudada mais detalhadamente. Com exceção de sua esposa, todos os filhos tinham atividade da creatina fosfoquinase elevada, em presença de desidrogenase láctica discretamente elevada, como mostra a Tabela II.

FIGURA 2
PORCENTAGEM DAS FRAÇÕES DAS ISOENZIMAS DO LDH SÉRICO
NA FAMÍLIA DE S.C.

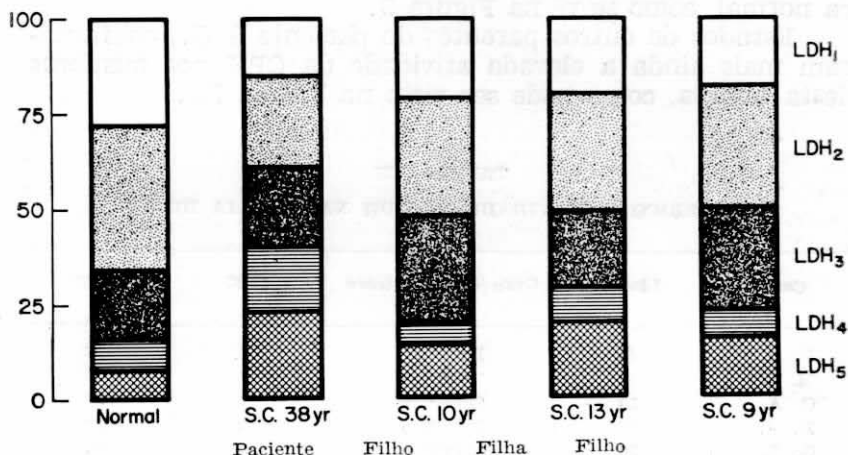
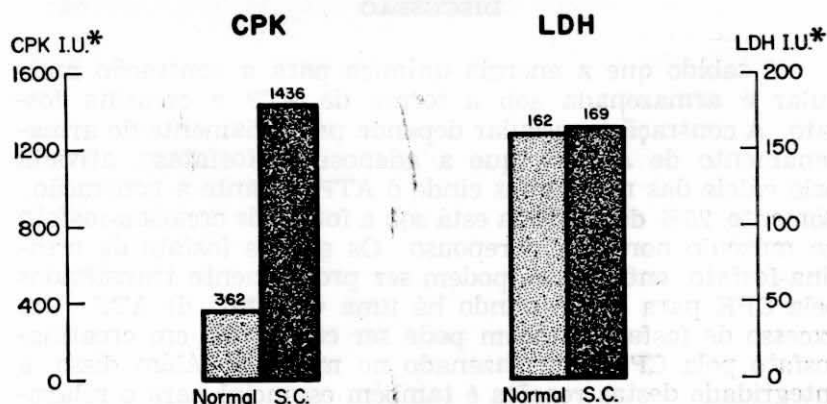


FIGURA 3
COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE DA CPK E LDH DO MÚSCULO DO
PACIENTE S.C. COM MÚSCULO NORMAL



* Atividade em Unidades Internacionais/mg de músculo (pêso não dessecado).

Os estudos eletroforéticos confirmaram que a fonte da creatina fosfoquinase era o músculo, pois somente a isoenzima muscular da creatina fosfoquinase era responsável pela atividade aumentada. A fração 5 (MH) da desidrogenase láctica também estava elevada com se vê na Figura 2. Esta isoenzima é predominante na maioria dos músculos humanos. Estudo do espécime da biópsia muscular do paciente S.C. realizado no dia 14 de dezembro de 1969 também demonstrou uma atividade de CPK, por mg de tecido, acentuadamente elevada, na presença de uma atividade de desidrogenase láctica normal, como se vê na Figura 3.

Estudos de outros parentes do paciente S.C., confirmaram mais ainda a elevada atividade da CPK nos membros desta família, como pode ser visto na Tabela III.

TABELA III
CPK SÉBICO E ATIVIDADE DE LDH NA FAMÍLIA DE S.C.

Caso	Idade	Grau de parentesco	CPK	LDH
P. A.	45	Irmã	171	73
M. S.	43	Irmã	151	59
C. A.	19	Sobrinha	23	51
M. A.	16	Sobrinho	248	58
G. S.	20	Sobrinho	299	66
A. S.	18	Sobrinha	191	63

* Variação normal = 0 - 50 IU./ml.

+ Variação normal = 32 - 80 IU./ml.

DISCUSSÃO

É sabido que a energia química para a contração muscular é armazenada sob a forma de ATP e creatina fosfato. A contração muscular depende primariamente do armazenamento de ATP já que a adenosinotri-fosfatase, ativada pelo cálcio das miofibrilas cinde o ATP durante a contração. Somente, 20% da creatina está sob a forma de creatina-fosfato no músculo normal em repouso. Os grupos fosfato da creatina-fosfato, entretanto, podem ser prontamente transferidos pela CPK para ADP quando há uma demanda de ATP. Um excesso de fosfato também pode ser convertido em creatina-fosfato pela CPK e armazenado no músculo. Além disso, a integridade destas reações é também essencial para o relaxamento dos músculos esqueléticos e portanto a CPK é consi-

derada como um dos "fatôres de relaxamento". Fasciculação vigorosa ou contratura da musculatura esquelética requer um aumento na utilização de ATP. Produção ulterior de ATP requer reações catalizadas pela CPK. Portanto, a perda da CPK da musculatura esquelética resultará não somente em resíntese deficiente de ATP, mas também numa falta do assim chamado "fator de relaxamento". Conseqüentemente surgirá "rigor mortis".

A possível função da produção de CPK genéticamente anormal na patogênese da hiperpirexia maligna é sugerida ainda mais por alguns achados interessantes. Recentemente foi demonstrado que porcos Landrace desenvolviam hiperpirexia maligna depois de expostos a halotano e succinilcolina (15). Uma depleção rápida e espontânea do conteúdo de ATP no músculo destes porcos, incubado em Krebs-Ringer bicarbonato "in vitro" por 30 minutos a 38°C, foi observada em contraste à falta de depleção em porcos normais. Após exposição a halotano uma depleção ulterior de ATP muscular ocorreu nos porcos susceptíveis. Além disso, Satnick (16) observou que quando um torniquete era aplicado numa extremidade dum paciente que desenvolvera hiperpirexia maligna, não havia aparecimento de rigidez. Sua observação apóia ainda mais a suposição que tanto a succinilcolina, como o halotano ou a combinação dos dois, em indivíduos genéticamente anormais pode induzir rigidez muscular com trauma microscópico ao sarcolema e liberação de enzimas. Estas por sua vez, podem superpor-se ao metabolismo do fígado, hemácias e sistema nervoso central. Foi descrito recentemente um síndrome hipermetabólico de origem extratireoideia em pacientes com anormalidade das enzimas respiratórias das mitocôndrias da musculatura esquelética (10). Além disso, várias outras formas de miopatias foram associadas com hiperatividade das enzimas mitocôndricas (6). Em vista destas correlações, é razoável assumir que os níveis elevados de CPK encontrados no paciente aqui descrito e em membros de sua família podem estar envolvidas na patogênese da hiperpirexia maligna.

Baseado na discussão acima e nos resultados laboratoriais, um possível mecanismo patogênico para hiperpirexia maligna pode ser proposto: Em indivíduos genéticamente anormais, o microtrauma do músculo pode resultar na liberação de enzimas lábeis, como CPK, para o interior da corrente sanguínea. Microtrauma do músculo pode ser causado por fasciculações induzida pela succinilcolina, por contrações involuntárias de grandes grupos musculares ou hipóxia muscular causada por hipoxemia, hipocapnia e hipotensão du-

rante anestesia. CPK é uma enzima chave na manutenção de reservas altas de energia sob a forma de fosfato nos músculos esqueléticos. Conseqüentemente, a perda de CPK na sua forma combinada, no músculo, resulta na depleção de ATP e relaxamento inadequada, em último caso levando ao "rigor mortis". Alterações na função hepática e na membrana das hemácias pode resultar em alterações no mecanismo de coagulação⁽²⁰⁾ e hemólise espontânea⁽²¹⁾. Recentemente foi publicado que o aproveitamento de creatina pelos eritrócitos está associado com a disponibilidade de 2,3-difosfoglicerato das hemácias. Foi demonstrado que a creatina se origina da defosforilação da creatina-fosfato muscular da CPK. A depleção de creatina plasmática pela reação de fosforilação na hiperpirexia maligna poderia resultar em decréscimo de 2,3-DPG dos eritrócitos e concomitante perda de ATP, assim explicando a hemólise observada nas fases finais da hiperpirexia⁽²²⁾. A mioglobínúria que acompanha a lesão muscular, em combinação com hemoblobinúria e proteinúria^(3,7,8,19), pode causar dano tubular e conseqüentemente insuficiência renal.

Ainda que o papel etiológico da atividade anormalmente elevada da CPK na síndrome clínica da hiperpirexia maligna não tenha sido definitivamente provada neste trabalho, uma correlação parece mais do que coincidência. Outros estudos sobre a especificidade do substrato, afinidade inibidora, propriedades eletroforéticas e atividade específica da CPK extraída da biópsia muscular deste paciente e seus parentes estão sendo realizados. Para estabelecer uma relação causa-efeito definitiva, a determinação de níveis enzimáticos durante episódios hipertérmicos, em pacientes comprometidos, é mandatória.

CONCLUSÕES

- 1 — Uma anomalia da CPK como possível fator etiológico da hiperpirexia maligna, é sugerida com base na atividade anormalmente elevada de CPK no soro e músculo de um paciente com um episódio anterior de hiperpirexia maligna em combinação com uma discreta elevação da fração muscular da LDH. A atividade da aldolase era normal.
- 2 — Uma anomalia enzimática geneticamente determinada, com transmissão dominante, foi corroborada pela CPK acentuadamente elevada e pela discreta elevação da izoenzima muscular do LDH no soro de seus filhos.
- 3 — Os pacientes que desenvolveram hiperpirexia maligna deveriam ser investigados procurando-se uma atividade

- excessivamente elevada da CPK e LDH durante o episódio hipertérmico, para estabelecer uma relação causal.
- 4 — A determinação de CPK antes da anestesia pode servir como teste seletivo para identificar os pacientes suscetíveis e portanto, deveria ser mandatório.
 - 5 — Se uma elevação rápida da temperatura ocorre durante anestesia, com uma concomitante elevação da CPK, a anestesia deverá ser imediatamente suspensa para prevenir sequelas fatais.

ADENDO

Durante a preparação deste trabalho para publicação, Jones, E. M., Burnap, T. K., Nelson, T. E., Anderson, I. L. e Kerr, D. D. apresentaram uma conferência intitulada "Estudos Preliminares da Hiperpirexia Fulminante em uma Família de Suínos", na Reunião Anual da Sociedade Americana de Anestesiologistas, em 19 de outubro de 1971 em Nova Iorque, Nova Iorque, Estados Unidos. Aquêl trabalho confirma nossos achados, de que a atividade excessivamente elevada de CPK, está associada com o aparecimento da hiperpirexia maligna em pessoas geneticamente predispostas.

SUMMARY

A GENETIC ABNORMALITY OF MUSCULAR CREATINEPHOSPHOKINASE IN A FAMILY WITH A CLINICAL HISTORY OF MALIGNANT HYPERTHERMIA

A 36 year old patient had a familial and a past history of malignant hyperthermia. He was submitted to surgery using cervical epidural anesthesia. His creatinephosphokinase was determined three times and values over 385 units were always observed (normal in male adult less than 50 units). Also his muscle biopsy specimen showed an increased amount of creatine phosphokinase. Three sons, two sisters and 3 nephews showed the same seric creatinephosphokinase abnormality. Three of his 4 children who died, succumbed shortly after anesthesia and surgery.

The ethyology of malignant hyperthermia in the light of these abnormal enzyme value in a family are discussed.

REFERÊNCIAS

1. Denborough M A and Lowell R R H — Anaesthetic Deaths in a Family. *Lancet*, 2:45, 1960.
2. Thut W H and Davenport H T — Hyperpyrexia Associated with Succinylcholine induced muscle rigidity: A Case Report, *Canad Anaesth Soc J* 13:419, 1966.
3. Britt B A and Kalow W — Hyper-rigidity and hyperthermia associated with anesthesia, *Ann N Y Acad Sci* 151:947, 1968.

4. Britt B A, Locker W G and Kalow W — Hereditary aspects of malignant hyperthermia, *Can Anaes Soc J*, 16:89, 1969.
5. Wilson R D, Dent R E, Traber D L, McCoy N R and Allen C R — Malignant hyperpyrexia with anesthesia, *J A M A*, 202:183, 1967.
6. Coleman R F, Nienhuis A W, Brown W J, Munsat T L and Pearson C M — New myopathy with mitochondrial enzyme hyperactivity, *J A M A*, 199:624, 1967.
7. Tammisto T and Airaksinen M — Increase of creatinine kinase activity in serum as a sign of muscular injury caused by intermittently administered suxamethonium during halothane anesthesia, *Brit J Anaesth*, 38:510, 1966.
8. Bennike K A and Jarnum S — Myoglobinemia with acute renal failure induced by suxamethonium, *Brit J Anaesth*, 36:730, 1964.
9. Isaacs H and Barlow M B — Malignant hyperpyrexia during anesthesia: Possible association with sub-clinical myopathy, *Brit Med J* 1:275, 1970.
10. Starkweather W H, Green R A, Spencer H H and Schock H K — Alterations of serum lactate dehydrogenase isozymes during therapy directed at lung cancer, *J Lab Clin Med*, 68:314, 1966.
11. Fredrickson E L — Electrophysiological changes in cardiac muscle incident to anesthetics, em fink, B R; *Toxicity of Anesthetics*, Baltimore, The Williams and Wilkins Co, U S A, pg. 142-152, 1968.
12. Paton W D M — The effects of muscle relaxants other than muscular relaxation, *Anesthesiology*, 20:453, 1959.
13. Dados não publicados de Starkweahter, W H.
14. Szentgyörgyi A — Studies on muscle, *Acta Physiol Scand*, 9: Supp XXV, 1944.
15. Harrison G G, Sanders S J, Biebuyck J F, Hickman R, Dent D M, Weaver V and Terblanche J — Anesthesia-induced malignant hyperpyrexia and a method for its prediction, *Brit J Anaesth*, 41:844, 1969.
16. Starkweather W H, Spencer H H, Schwartz E L and Schock H K — The electrophoretic separation of lactate dehydrogenase isoenzymes and their evaluation in clinical medicine, *J Lab Clin Med*, 67:329, 1966.
17. Rosalki S B — An improved procedure for serum creatinine phosphokinase determination, *J Lab Clin Med* 69:696, 1967.
18. Satnick J H — Hypothermia under anesthesia with regional muscle flaccidity, *Anesthesiology*, 30:472, 1969.
19. Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L and Afzelius B — A case of severe hypermetabolism of non-thyroid origin with a deficit in mitochondrial respiratory control: A correlated clinical biochemical and morpprological study, *J Clin Invest*, 41:1776, 1962.
20. Purkis I E, Horreitt O de Young C G, Fleming R A P and Langley G R — Hyperpyrexia during anesthesia in a second member of a family with associated coagulation defect due to increased intravascular coagulation. *Canad Anaesth Soc J*, 14:183, 1967.
21. Meyer-Betz F — Beobachtungen an einem mit Muskel-Lahmungen verbundenen Fall von Haemoglobinurie, *Dtsch Arch Klin Med*, 101:85, 1910.
22. Valeri C R — Oxyhaemoglobin dissociation curves and levels of ATP, 2,3-DPG and creatine preserved red cells and in pathologic red cells. Apresentado em um Simpósio sobre «Metabolismo dos Glóbulos Vermelhos e Transporte do Oxigênio» no XIII Congresso Internacional de Hematologia, em Munique, República Federal da Alemanha, em 2-8 de agosto de 1970.