

Genetica e farmacoresistenza

Genetic and drug-resistance

P. VEGGIOTTI, F. LONGARETTI, P. AVANTAGGIATO, F. TEUTONICO, E. FAZZI
*Dipartimento di clinica Neurologica e Psichiatrica dell'età evolutiva, Fondazione "Istituto
Neurologico Casimiro Mondino" I.R.C.C.S. Pavia*

PAROLE CHIAVE. — Genetica - Farmacoresistenza
KEY WORDS. — Genetic - Drug-resistance

*Per invito
Invited article*

Summary

One third among the epileptic patients are drug-resistant despite polytherapy. Pharmacogenomics studies the genetic causes of the pharmacoresistance, a condition defined by the recurrence of epileptic seizures despite the introduction of at least three appropriate AEDs at the maximum tolerated dosage. Three hypothesis explaining the neurobiological mechanisms of pharmacoresistance were considered: an over expression of "multidrug transporters", proteins carrying out the drugs from the epileptogenic tissue; a decrease in sensibility of the drug's target and an abnormal metabolism and excretion of the drug.

Multidrug-resistance is considered a multifactorial phenomenon due to both genetic and environmental causes. Genetic studies report the association with an allelic mutation in 1% of the drug-refractory patients and with a single nucleotide polymorphism (SNP) in another 5-8%. These results are often not validated due to methodological limitations. Anyway neurobiological studies show the important role of some proteins in the physiopathology of pharmacoresistance even if the genetists can't confirm this evidence. New strategies are needed to identify new genes or polymorphisms as causal factors in pharmacoresistance.

L'epilessia colpisce circa 50 milioni di persone al mondo ⁴ con valori di prevalenza che vanno dal 4 al 10 per mille ¹⁶. Sebbene l'epilessia sia comunemente ritenuta una condizione cronica con prognosi spesso scadente, tale presupposto è andato gradualmente modificandosi nel corso degli ultimi 30 anni. È

infatti attualmente riconosciuto da tutti gli Autori che l'outcome sia favorevole per la maggior parte dei pazienti epilettici ³⁶; tuttavia circa il 30% dei pazienti non raggiunge la remissione delle crisi, nonostante il ricorso ad associazioni politerapiche ³⁷. La farmacoresistenza (FR) costituisce pertanto un importante problema clinico associato ad un'umentata morbidity. L'epilessia farmacoresistente comporta infatti deficit di memoria, riduzione dei livelli di performance scolastiche e lavorative e depressione, influisce negativamente sul contesto psicosociale ed è associata ad un aumento del tasso di mortalità. Non sorprende quindi che crisi persistenti ed incontrollate siano disabilitanti per il paziente e la sua famiglia e comportino notevoli costi per la società ²⁹. Il presente articolo si concentrerà sugli aspetti prettamente genetici (farmacogenomica) alla base della FR riassumendo i principali contributi della letteratura scientifica.

Definizione di farmacoresistenza

Perucca ³³ osserva che, sebbene termini come “resistente al trattamento”, “farmacoresistente” ed “epilessia refrattaria” siano ubiquitari, solo raramente si è tentato di darne una chiara ed univoca definizione. Le definizioni di FR finora pubblicate sono numerose e non esiste accordo su quanti farmaci dovrebbero essere introdotti prima di decretare che un paziente soffre di epilessia farmacoresistente; analogamente c'è incertezza su quali siano i riferimenti specifici riguardo al dosaggio, alla minima frequenza di crisi e alla minima durata di malattia per poter porre tale diagnosi. La proliferazione di definizioni o, ancor peggio, la loro carenza rappresentano un ostacolo all'interpretazione e alla comparabilità dei risultati degli studi, soprattutto quelli finalizzati a valutare l'efficacia dei farmaci.

Secondo Perucca i criteri di selezione di pazienti potrebbero basarsi su un sistema di classificazione per gradi di FR:

1. *Grado I*: epilessie che non rispondono alla massima dose tollerata di un farmaco di prima scelta;
2. *Grado II*: epilessie non responsive ad un secondo farmaco di prima scelta utilizzato in monoterapia sequenziale (grado IIA) oppure in combinazione (grado IIB);
3. *Grado III*: epilessie che non rispondono a 3 o più farmaci di scelta usati in maniera sequenziale (grado IIIA) oppure in combinazione (grado IIIB).

Una definizione operativa e largamente adattabile è quella di una condizione in cui le crisi ricorrono nonostante l'uso di tre o più farmaci antiepilettici appropriati per quella forma clinica ed utilizzati alla massima dose tollerata. Questa definizione si può riferire a qualsiasi fenotipo epilettico ed è aperta alla possibilità di tentare nuovi farmaci più appropriati nel tempo ⁴¹.

È necessario infine distinguere tra FR e pseudoresistenza, una condizione definita come la persistenza di crisi a causa di una errata diagnosi, di una scar-

sa compliance, di un trattamento non adeguato, di una inappropriata valutazione di risposta, o di un regime di somministrazione non corretti.

Farmacoresistenza: ipotetici meccanismi neurobiologici

Il modello animale di FR più studiato è costituito dal *kindling* sull'amigdala del ratto Wistar. Crisi evocate in questo animale dimostrano una risposta eterogenea ai farmaci antiepilettici: per esempio si è osservata una risposta alla fenitoina molto variabile. Gli Autori^{24 35} considerano questo un buon modello di FR e hanno dimostrato in esperimenti successivi che la stessa variabilità di risposta si osserva per molti altri farmaci²⁵. Esisterebbe una complessa interazione fra fattori genetici ed ambientali a determinare la FR¹⁰ come prova il dato che non tutte le linee di ratti presentano questo fenomeno¹¹. Secondo gli stessi Autori il *kindling* indurrebbe la condizione di FR²⁴ ma non attraverso la modulazione di correnti eccitatorie dipendenti da canali sodio o calcio¹⁹.

Basandosi sugli studi sperimentali e clinici, tre maggiori ipotesi neurobiologiche possono essere formulate:

- A) la rimozione del farmaco antiepilettico dal tessuto epilettogeno attraverso una eccessiva espressione di multidrug transporter;
- B) la riduzione di sensibilità al target del farmaco nel tessuto epilettogeno³⁸;
- C) alterazione del metabolismo ed eliminazione del farmaco.

Queste teorie possono coesistere nell'ipotesi di un'origine multifattoriale del fenomeno.

Ipotesi dei multidrug transporter

Recenti ricerche hanno messo in luce il ruolo di alcuni geni che codificano per sistemi di trasporto dei farmaci nelle cellule (*multidrug transport system*) nella patogenesi della FR⁴⁶. Si tratta di trasportatori localizzati nella barriera emato-encefalica ed emato-liquorale. L'attività di questi trasportatori rimuove in maniera molto efficace i farmaci dal sistema nervoso centrale, limitando così la loro captazione da parte del cervello.

Quattro classi di trasportatori sembrano implicate nell'efflusso dei farmaci dal cervello.

1. Glicoproteina P (Pgp) o MDR1 o ABCB1

Rappresenta il prototipo del *multidrug resistance transporter* (MDR) scoperto in seguito a studi sulla farmacoresistenza alle cellule tumorali. Si tratta di una fosfoglicoproteina transmembrana ATP-legante, detta più correttamente ABC (*ATP binding cassette*), che agisce come una pompa di trasporto di composti nell'ambiente extracellulare. La glicoproteina P sembra essere espressa sulla membrana delle cellule endoteliali capillari sia nei ratti che nell'uomo,

quindi anche a livello dei capillari cerebrali, con un importante ruolo a livello della barriera ematoencefalica. L'espressione in eccesso di questi trasportatori può dar luogo al fenomeno di "multidrug resistance", conosciuto nella chemioterapia del cancro ¹.

2. Famiglia MRP (*multidrug resistance-associated protein*)

È stato il primo trasportatore diverso dalla glicoproteina P ad essere identificato. Si occupa del trasporto attivo fuori dal tessuto cerebrale di un ampio numero di composti, fra i quali la L-carnitina ed il salicilato. Anche questo gruppo di proteine sembra giocare un notevole ruolo a livello sia della barriera ematoencefalica che di quella ematoliquorale. In topi *knock-out*, la sua assenza determina una riduzione di affinità per la pompa glutatione-coniugato degli eritrociti, elevati livelli di glutatione in molti tessuti, ridotta risposta infiammatoria ad un irritante topico ed una aumentata sensibilità ai farmaci antitumorali.

L'incrementata espressione di trasportatori come la Pgp e la famiglia MRP è stata riscontrata nella barriera ematoencefalica e nel parenchima cerebrale di modelli murini di epilessia del lobo temporale. È stato inoltre dimostrato che queste proteine sono espresse in eccesso nel tessuto cerebrale epilettogeno di soggetti sottoposti a resezione chirurgica per epilessia intrattabile ^{23 27}.

3. Trasportatori di acidi monocarbossilici

I trasportatori di acidi monocarbossilici (MCT) sono espressi in maniera ubiquitaria e servono per il trasporto di piruvato, lattato ed altri metaboliti in doppia direzione attraverso la membrana cellulare. Essi sembrano implicati nell'afflusso e nell'efflusso di composti attraverso la membrana ematoencefalica. MCT1 è espresso sulle cellule dell'endotelio dei capillari cerebrali, sulle cellule ependimali, sugli astrociti e a livello dei plessi corioidei. I trasportatori da MCT3 a MCT8 sono stati clonati a partire da tessuto umano.

4. Trasportatori di ioni organici (OAT)

Sono state identificate 4 famiglie, ciascuna delle quali è stata descritta in base alla sua funzione sul rene e sul fegato, gli organi dove maggiormente ha luogo l'eliminazione di ioni organici. Attualmente è stata dimostrata la presenza di questi trasportatori anche nel cervello. I membri di ciascuna famiglia trasportano attivamente fuori dal cervello specifici tipi di farmaci.

L'azione di questi diversi sistemi di trasportatori permette di minimizzare efficacemente la penetrazione dei farmaci con target specifici sul sistema nervoso centrale e può spiegare la minima o nulla efficacia di alcuni farmaci specifici sul SNC per alcune patologie, tra cui, oltre alla demenza da HIV, le meningiti, i tumori cerebrali ed anche l'epilessia. Inoltre l'espressione stessa di questi trasportatori può essere modificata dall'età, dal tipo di patologia o dai farmaci utilizzati nel contesto di un regime terapeutico. Esiste infine un ampio

overlapping di substrati fra i trasportatori descritti tanto che sostanze che modulano la funzionalità di questi sistemi risultano poco specifici, proprio perché modificano il trasporto dal cervello di numerosi composti contemporaneamente. Pertanto, la possibilità di modulare l'efflusso di questi trasportatori, per mezzo di sostanze che abbiano per essi una affinità specifica, migliorerebbe teoricamente l'efficacia del trattamento farmacologico.

Ipotesi del target

Per avere un effetto antiepilettico, un farmaco deve agire su uno o più molecole target nel cervello. Queste comprendono canali ionici, recettori neurotrasmettitoriali, enzimi di trasporto coinvolti nel rilascio, captazione e metabolismo dei neurotrasmettitori³⁴. Sulla base degli specifici target coinvolti nei loro meccanismi d'azione, i farmaci antiepilettici possono essere suddivisi in composti che agiscono attraverso: 1) modulazione di canali ionici a dipendenza di potenziale, soprattutto canali sodio (Carbamazepina, Oxcarbamazepina, Etosuccimide, Acido Valproico, Fenitoina, Lamotrigina), canali calcio e potassio; 2) aumento dell'inibizione sinaptica (in particolare attraverso la mediazione dei recettori GABA A (Benzodiazepine, Tiagabina, Vigabatrin, Fenobarbital, Gabapentin, Topiramato, Felbamato); 3) inibizione dell'eccitazione sinaptica (ad esempio attraverso il blocco dei recettori del Glutamato).

Il fatto che molti farmaci antiepilettici agiscono attraverso più di uno di questi meccanismi, spiega l'ampio spettro della loro efficacia clinica.

Alterazione del metabolismo ed eliminazione del farmaco

Sono stati descritti molti polimorfismi di sequenze genetiche codificanti enzimi farmaco-metabolizzanti (DME: *drug-metabolizing enzymes*) appartenenti alla famiglia del citocromo P-450. Altri sistemi comprendono enzimi idrolizzanti e glucuronizzanti. Polimorfismi nei DME influenzano i livelli plasmatici del farmaco e la sua tossicità. Esempio è il riscontro di varianti alleliche (polimorfismi CYP2C9 e CYP2C19) del gene che codifica il P-450 che comportano un'importante variabilità nel metabolismo della fenitoina^{2 48 50}.

Farmacoresistenza: eziologia

La FR in epilessia è molto probabilmente un fenomeno multifattoriale. Le cause di farmacoresistenza possono essere raggruppate in due grosse categorie: ambientali e genetiche⁴¹.

Le *cause ambientali* comprendono alterazioni acquisite dei recettori o dei targets farmacologici, con possibile effetto sull'epilettogenesi. I fattori ambientali risultano spesso difficili da determinare e quindi da prevenire. Al contrario i fattori genetici possono essere in teoria più facilmente identificabili e permet-

terebbero una predizione circa la FR, con la possibilità di intervenire con un trattamento razionale.

Le *cause genetiche* possono essere monogeniche, oligogeniche o poligeniche. Nelle famiglie con epilessia a trasmissione monogenica mendeliana descritte in letteratura raramente è documentata FR che segrega fedelmente con il fenotipo epilettico. Per questo è probabile che la FR sia il risultato di una combinazione di fattori ambientali e poligenici complessi.

Le cause genetiche di FR attualmente note sono rappresentate da:

- 1) mutazione genetica come causa di FR in meno dell'1% della popolazione;
- 2) polimorfismo di un singolo nucleotide (SNP: *single nucleotide polymorphism*), che occorre in una percentuale variabile fra il 5 e l'8% della popolazione.

Mutazioni genetiche come causa di farmacoresistenza

La rara e grave forma di sindrome epilettica conosciuta come epilessia mio-clonica severa dell'infanzia (SMEI) è causata in una percentuale di casi da una mutazione in uno dei geni codificanti per una subunità dei canali sodio, espresso a livello cerebrale (SCN1A). Tali canali a turno generano l'eccitazione neuronale attraverso un rapido flusso transmembrana di sodio e costituiscono i target primari di alcuni farmaci antiepilettici.

Un ampio numero di mutazioni SCN1A è oggi noto^{8,30}. Due diversi fenotipi clinici sono stati descritti nel caso di tali mutazioni genetiche (SMEI/GEFS+: *generalized epilepsy with febrile seizure plus*)¹² ed emerge un quadro di variabilità fenotipica che è difficilmente correlabile ad una alterazione monogenica. Appare perciò più probabile che tale mutazione del gene SCN1A sia da interpretare come un gene di suscettibilità e che altri fattori siano coinvolti.

Rare condizioni causate da singole mutazioni geniche e caratterizzate da un fenotipo clinico farmacoresistente continuano ad essere identificate^{21,28}.

Polimorfismi genetici associati a farmacoresistenza

Attualmente gli studi genetici caso-controllo di associazione dominano il quadro della letteratura sulla genetica umana. Questi studi esaminano la variabilità allelica di selezionati loci polimorfi paragonando fra loro coorti di pazienti il cui fenotipo clinico differisce per un solo tratto di interesse.

Tuttavia, all'interno dello spettro della patologia umana, solo un esiguo numero di questi studi è stato in grado di dimostrare validità dopo una ripetizione della procedura, processo che costituisce una parte fondamentale del processo di validazione dei risultati¹⁸. I problemi che ostacolano il successo nella replicazione di questi studi sono stati recentemente rivisitati in un eccellente articolo di Berkovic et al.⁴⁴.

Fra le molteplici possibili ragioni di questi fallimenti la più frequente consiste nel fatto che il risultato riportato per la prima volta in realtà è un falso positivo. La ricorrenza di questi fattori complicanti appare evidente anche nella letteratura sugli studi genetici di associazione sulla FR in campo epilettologico.

ABCB1, il gene codificante per la P-glicoproteina

Una comune variazione del gene ABCB1, che come abbiamo visto codifica per un ampio spettro di proteine non specifiche trasportatrici di farmaci, le P-glicoproteine, è stata associata con numerosi fenotipi nell'ambito della patologia umana. La variante più comunemente studiata in questo gene è il polimorfismo C3435T. In uno studio su pazienti con epilessia farmacoresistente paragonati a soggetti con epilessia farmacosensibile, è stata rilevata una associazione con questo polimorfismo ³⁹. Tuttavia l'associazione non è stata confermata da uno studio successivo applicato ad un campione più ampio ⁴⁵ ed è stata confermata solo parzialmente da una ricerca su una popolazione molto più esigua ⁵¹.

Gene per la apolipoproteina E

Una comune variazione nel gene per la apolipoproteina E è stata associata anch'essa con un ampio range di fenotipi di patologie umane, comprendenti l'esordio precoce del Morbo di Alzheimer. Uno studio australiano ha riportato una possibile associazione fra tale alterazione genetica e la durata dell'intervallo di latenza in pazienti con tipica epilessia farmacoresistente del lobo temporale ³³. Tuttavia questo dato che sembrava aprire la possibilità di un intervento precoce e preventivo durante il periodo di latenza è stato replicato ⁷.

Gene per la proteina prionica (PRNP gene)

È stato riportato che topi mancanti del gene per una proteina prionica sono più sensibili ai farmaci convulsivanti ⁴⁹. In uno studio effettuato su 100 pazienti con epilessia del lobo temporale farmacoresistente trattata chirurgicamente è stata riscontrata una forte associazione fra un particolare polimorfismo del gene PRNP ed il fenotipo farmacoresistente con prognosi scadente anche dopo l'intervento. Comunque anche questi dati non sono stati in seguito confermati ⁷.

Gene per il recettore 1 GABA(B)

I recettori GABA sono ampiamente implicati nei meccanismi di epilettogenesi. In una coorte di pazienti europei un polimorfismo di singolo nucleotide (SNP) che comporta la sostituzione di un singolo aminoacido, è stato riscontrato con maggiore frequenza in pazienti con epilessia temporale severa che in pazienti con una forma non farmacoresistente della stessa epilessia ¹³.

Ancora una volta questa associazione non è stata validata da studi successivi ⁷.

Gene per la prodinorfina

Un potente inibitore delle crisi epilettiche è il peptide prodinorfina, del quale un polimorfismo funzionale è stato identificato a livello del gene promoter. In uno studio europeo è stata evidenziata una significativa associazione fra questa variante genetica ed il fenotipo di epilessia del lobo temporale “a rischio familiare”, comparata con quella “non familiare”. I pazienti in entrambi i gruppi di studio erano candidati alla valutazione pre-chirurgica e quindi presumibilmente farmacoresistenti⁴³. Tre studi di replicazione non hanno supportato i dati iniziali, ma gli Autori ritengono che un ruolo di questa alterazione nel determinare FR non possa essere esclusa con certezza^{7 14 47}.

Gene per l'interleuchina IL-1 β

L'interleuchina IL-1 β è una citochina proinfiammatoria il cui recettore è rappresentato anche nell'ippocampo. Uno studio giapponese ha dimostrato una associazione fra un SNP a livello del gene promoter per questa interleuchina e il fenotipo epilessia del lobo temporale con sclerosi ippocampale, comparato con quello di pazienti con epilessia senza sclerosi oppure senza epilessia temporale²². La maggior parte degli studi condotti successivamente non hanno confermato questi dati^{6 17 20 32}.

In sintesi gli studi di associazione fra le più comuni variazioni genetiche ed il fenotipo epilessia farmacoresistente, non permettono di confermare alcuna associazione fra fattori genetici e FR.

Prospettive future

Studi di immunistoichimica hanno dimostrato un eccesso della rappresentazione di P-glicoproteina nel tessuto cerebrale umano epilettogeno sia gliale che neuronale. Alcuni lavori suggeriscono che alla iperespressione locale di questi trasportatori contribuiscono anche fattori genetici. Inoltre studi condotti in vitro e su modelli animali hanno evidenziato che la P-glicoproteina ed alcuni trasportatori ad essa correlati sono in realtà in grado di trasportare alcuni farmaci antiepilettici^{26 40}. L'effetto finale è una riduzione della concentrazione locale attiva dei farmaci soprattutto nel loro sito di azione sulla superficie o all'interno dei neuroni.

L'esempio illustra come siano degni di considerazione gli studi biologici, e non solo quelli genetici, che dimostrano il ruolo di un dato fattore nella genesi della FR. In presenza di tale evidenza, il rigore nella valutazione dei dati genetici assume una minore importanza⁹. Altri polimorfismi genetici non ancora identificati potrebbero avere un ruolo importante e sono necessarie ulteriori strategie per identificare altri possibili geni o polimorfismi candidati come varianti causali⁴².

Conclusioni

Al momento attuale relativamente poche sindromi epilettiche note vedono un'eziologia genetica con trasmissione mendeliana. Inoltre non sono state dimostrate alterazioni genetiche frequenti che contribuiscono alla FR in epilessie a trasmissione non mendeliana. Il ruolo dei geni già studiati o delle proteine da essi codificate non può essere escluso con certezza, ma attualmente mancano marker genetici per la FR in campo epilettologico.

Studi biologici su campioni patologici e su modelli animali e futuri studi di farmacogenetica potranno dimostrare un ruolo causale di geni codificanti proteine che influenzano la cinetica dei farmaci, trasportatori e target per i farmaci¹⁵.

È indubbiamente necessaria per gli studi genetici di associazione in campo epilettologico una più chiara metodologia che permetta una definitiva validazione dei risultati³¹.

La collaborazione fra diversi centri è necessaria per disporre di coorti numerose di pazienti con fenotipi epilettici ben definiti di soggetti di controllo.

Nella loro complessità, gli studi di genetica sulla FR potrebbero fornire nuovi elementi di comprensione del meccanismo di epilettogenesi e aprire nuove prospettive di intervento farmacologico su target specifici nei pazienti con epilessia grave.

Riassunto

Un terzo dei pazienti epilettici è farmacoresistente nonostante il ricorso a numerosi farmaci. La farmacogenomica è la disciplina che si occupa delle basi geneticamente determinate della farmacoresistenza (FR), che può essere definita quando le crisi ricorrono nonostante l'introduzione di tre o più farmaci antiepilettici appropriati alla massima dose tollerata. Tre principali teorie spiegherebbero la base neurobiologica della FR senza escludersi a vicenda: la rimozione del farmaco dal tessuto epilettogeno attraverso una eccessiva espressione di "multidrug transporters", la riduzione di sensibilità al target del farmaco nel tessuto epilettogeno e l'alterazione del metabolismo ed eliminazione del farmaco. Probabilmente si tratta di un fenomeno multifattoriale che vede una compresenza di cause ambientali e genetiche. Queste ultime comprendono rari casi (< 1%) di mutazioni note che comportano epilessia FR e nel 5-8% della popolazione l'associazione di FR con polimorfismi di un singolo nucleotide (SNP). I risultati degli studi genetici caso-controllo di associazione sono raramente validati per difficoltà metodologiche attualmente non completamente risolte. Tuttavia gli studi neurobiologici confermano il ruolo di fattori proteici nella genesi della FR anche in assenza di conferma fornita dagli studi di farmacogenomi-

ca. Sono necessarie ulteriori strategie per identificare altri possibili geni o polimorfismi candidati come varianti causali.

Bibliografia

- ¹ Begley DJ. *ABC transporters and the blood brain barrier*. *Curr Pharm Des* 2004;10:1295-312.
- ² Brandolese R, Scordo MG, Spina E. *Severe phenytoin intoxication in a subject homozygous for CYP2C9*3*. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:391-4.
- ³ Briellmann RS, Torn-Broers Y, Busuttill BE, Major BJ, Kalnins RM, Olsen M, et al. *APOE epsilon 4 genotype in associated with an earlier onset of chronic temporal lobe epilepsy*. *Neurology* 2000;55:435-7.
- ⁴ Brodie MJ, Shorvon SD, Canger R. *Commission on European Affairs: appropriate standards of epilepsy care across Europe: ILEA*. *Epilepsia* 1997;38:1245-50.
- ⁵ Brodie MJ. *Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy*. *Epilepsia* 2005;46:224-35.
- ⁶ Buono RJ, Ferraro TN, O'Connor MJ, Sperling MR, Ryan SG, Scattergood T, et al. *Lack of association between an IL-1beta gene variation and refractory temporal lobe epilepsy*. *Epilepsia* 2001;42:782-4.
- ⁷ Cavalleri G, Lynch JM, Depondt C. *Failure to replicate previously reported genetic associations with sporadic temporal lobe epilepsy: where to from here?* *Brain* 2005;128:1832-40.
- ⁸ Ceulemans BP, Claes LR, Lagae LG. *Clinical correlation of mutations in the SCN1A gene: from febrile seizure to severe myoclonic epilepsy in infancy*. *Pediatr Neurol* 2004;30:236-43.
- ⁹ Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. *Problems of reporting genetic associations with complex outcomes*. *Lancet* 2003;361:865-72.
- ¹⁰ Cramer S, Ebert U, Loscher W. *Characterization of phenytoin resistant kindled rats, a new model of drug-resistant partial epilepsy: comparison of inbred strains*. *Epilepsia* 1998;39:1046-53.
- ¹¹ Ebert U, Loscher W. *C of phenytoin-resistant kindled rats, a new model of drug-resistant partial epilepsy: influences of genetic factors*. *Epilepsy Res* 1999;33:217-26.
- ¹² Escayg A, MacDonald BT, Maisler MH. *Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFs*2*. *Nat Genet* 2000;24:343-5.
- ¹³ Gambardella A, Manna I, Labate A. *GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy*. *Neurology* 2003;60:560-3.
- ¹⁴ Gambardella A, Manna I, Labate A, Chifari R, Serra P, La Russa A, et al. *Prodynorphin gene promoter polymorphism and temporal lobe epilepsy*. *Epilepsia* 2003;44:1255-6.
- ¹⁵ Goldstein DB, Tate SK, Sisodyia SM. *Pharmacogenetics goes genomic*. *Nat Rev Genet* 2003;4:937-47.
- ¹⁶ Hauser WA, Hesdorffer DC. *Epilepsy: frequency, causes and consequences*. Landover MD: Epilepsy Foundation of America Publications 1990.
- ¹⁷ Heils A, Haug K, Kunz WS. *IL-1 beta gene polymorphism and susceptibility to temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis*. *Ann Neurol* 2000;48:948-50.
- ¹⁸ Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. *A comprehensive review of genetic association studies*. *Genet Med* 2002;4:45-61.
- ¹⁹ Jeub M, Beck H, Siep E. *Effect of phenytoin on sodium and calcium currents in hippocampal CA1 neurons of phenytoin resistant kindled rats*. *Neuropharmacology* 2002;42:107-16.
- ²⁰ Jin L, Jia Y, Zhang B, Xu Q, Fan Y, Wu L, Shen Y. *Association analysis of a polymorphism of IL-1 beta gene with temporal lobe epilepsy in a Chinese population*. *Epilepsia* 2003;44:1306-9.
- ²¹ Kamyk K, Kaneda M, Sugawara T. *A nonsenses mutation of the sodium channel gene SCN2A in a patient with intractable epilepsy and mental decline*. *J Neurosci* 2004;24:2690-8.
- ²² Kanemoto K, Kawasaki J, Miyamoto T, Obayashi H, Nishimura M. *IL-1beta, IL-1alpha, and IL receptor antagonist gene polymorphism in patients with temporal lobe epilepsy*. *Ann Neurol* 2000;47:571-4.

- ²³ Kwan P, Loscher W, Rundfeldt C. *Kindling as a model of drug-resistant partial epilepsy: selection of phenytoin-resistant and nonresistant rats*. J Pharmacol Exp Ther 1991;258:483-9.
- ²⁴ Loscher W, Reissmuller E, Ebert U. *Kindling alters the anticonvulsant efficacy of phenytoin in Wistar rats*. Epilepsy Res 2000;39:211-20.
- ²⁵ Loscher W. *Animal models of drug resistant epilepsy*. Novartis Found Symp 2002;243:149-59.
- ²⁶ Loscher W, Potschka HR. *Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs*. J Pharmacol Exp Ther 2002;301:7-14.
- ²⁷ Loscher W, Potschka H. *Blood-brain barrier active efflux transporters; ATP-binding cassette (ABC) gene family*. NeuroRx 2005;2:86-98.
- ²⁸ Molinari F, Rotschild A, Rio M. *Impaired mitochondrial glutamate transport in autosomal recessive-neonatal myoclonic epilepsy*. Am J Hum Genet 2005;76:334-9.
- ²⁹ Morrell MJ, Pedley TA. *"The Scarlet E": epilepsy is still a burden*. Neurology 2000;54:1882-3.
- ³⁰ Nabbout R, Gennaro E, Dalla Bernardina B, Dulac O, Madia F, Bertini E, et al. *Spectrum of SCN1A mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy*. Neurology 2003;60:1961-7.
- ³¹ Neale BM, Sham PC. *The future of association studies: gene-based analysis and replication*. Am J Hum Genet 2004;75:353-62.
- ³² Peltola J, Keranen T, Rainesalo S. *Polymorphism of the IL-1 beta gene complex in localization-related epilepsy*. Ann Neurol 2001;50:275-6.
- ³³ Perucca E. *Pharmacoresistance in epilepsy*. CNS Drugs 1998;10:171-9.
- ³⁴ Rogawski MA, Loscher W. *The neurobiology of antiepileptic drugs*. Nat Rev Neurosci 2004;5:553-64.
- ³⁵ Rundfeldt C, Honack D, Loscher W. *Phenytoin potently increases the threshold for focal seizures in amygdala-kindled rats*. Neuropharmacology 1990;29:845-51.
- ³⁶ Sander JWS. *Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review*. Epilepsia 1993;34:1007-16.
- ³⁷ Schmidt D, Gram L. *Monotherapy vs. polytherapy in epilepsy; a reappraisal*. CNS Drugs 1995;3:194-208.
- ³⁸ Schmidt D, Loscher W. *Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms*. Epilepsia 2005;46:858-77.
- ³⁹ Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein DB, et al. *Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1*. N Engl J Med 2003;348:1442-8.
- ⁴⁰ Sisodiya SM. *Mechanism of antiepileptic drug resistance*. Curr Opin Neurol 2003;16:197-201.
- ⁴¹ Sisodiya SM. *Genetics of Drug Resistance*. Epilepsia 2005;46(Suppl 10):33-8.
- ⁴² Soranzo N, Cavalleri G, Wood NW. *Identifying candidate causal variants responsible for altered activity of the ABCB1 multi-drug resistance gene product*. Genome Res 2004;14:1333-44.
- ⁴³ Stogmann E, Zimprich A, Baumgartner C, Aull-Watschinger S, Holtt V, Zimprich F. *A functional polymorphism in the prodynorphin gene promoter is associated with temporal lobe epilepsy*. An Neurol 2002;51:260-3.
- ⁴⁴ Tan NC, Mulley JC, Berkovic SF. *Genetic association studies in epilepsy: "the truth out there"*. Epilepsia 2004;45:1429-42.
- ⁴⁵ Tan NC, Heron SE, Scheffer IE. *Failure to confirm association of polymorphism in ABCB1 with multidrug-resistant epilepsy*. Neurology 2004;63:1090-2.
- ⁴⁶ Taylor EM. *The impact of efflux transporters in the brain on the development of drugs for CNS disorders*. Clin Pharmacokinet 2002;41:81-92.
- ⁴⁷ Tilgen N, Rebstock J, Horvath S, Propping P, Elger CE, Heils A. *Prodynorphin gene promoter polymorphism and temporal lobe epilepsy*. Ann Neurol 2003;53:280-1.
- ⁴⁸ Van Der WJ, Steijns LS, van Weelden M. *The effect of genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement*. Pharmacogenetics 2001;11:287-91.
- ⁴⁹ Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, Roesler R, Izquierdo I, Cavalheiro EA, et al. *Increased sensitivity to seizure in mice lacking cellular prion protein*. Epilepsia 1999;40:1679-82.
- ⁵⁰ Watanabe M, Iwahashi K, Kugoh T. *The relationship between phenytoin pharmacokinetics and the CYP2C19 genotype in Japanese epileptic patients*. Clin Neuropharmacol 1998;21:122-6.
- ⁵¹ Zimprich F, Sunden-Plassmann R, Stogmann E, et al. *Association of an ABCB1 aploptype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy*. Neurology 2004;63:1087-9