

Análisis genético de la subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje (SCN1A) en pacientes pediátricos con epilepsia refractaria

Genetic analysis of the alpha subunit of the voltage-dependent sodium channel (SCN1A) in pediatric patients with refractory epilepsy

Jiménez-Arredondo Ramón Ernesto,* Gutiérrez Moctezuma Juvenal,** Solórzano Gómez Elsa,** Chima Galán María del Carmen,*** Galaviz Hernández Carlos,*** García Silvia,**** Di Silvio López Mauricio,**** Esparza Raúl****

* Neurólogo Pediatra. Adscrito al Servicio de Pediatría del Hospital General de Zona No. 10. IMSS. Delegación Nayarit. Unidad Académica de Medicina de la Universidad Autónoma de Nayarit.

** Departamento de Neurología Pediátrica. Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE. México, D.F.

*** Departamento de Genética. Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE. México, D.F.

**** Departamento de Investigación y Enseñanza. Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE. México, D.F.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La epilepsia refractaria ocupa casi 30% de todos los tipos de epilepsia. Polimorfismos y mutaciones de determinados genes se relacionan con la fisiopatología y respuesta al tratamiento en epilepsia, principalmente en su asociación a canales iónicos. Los canales iónicos tienen funciones como controlar y mantener potenciales de acción en membranas celulares, por lo que mutaciones en genes que codifican para estos canales son factores relacionados con la refractariedad.

OBJETIVO: Analizar el gen de la subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje (SCN1A) en pacientes pediátricos con epilepsia refractaria, tratados en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”.

MÉTODOS: El estudio molecular se realizó mediante el análisis del exón 26 por PCR de punto final y secuenciación directa. Se amplificó el exón 26 en tres fragmentos con los siguientes pares de oligonucleótidos: 26a sentido (AGG ACT CTG AAC CTT ACC TTG G), 26a antisentido (TGT AGA TGT TCA CCA CAA CCA G), 26b sentido (TGT GGG AAC CCA TGT GTT G), 26b antisentido (CCA TGA ATC GCT CCT CGA TC), 26c sentido (TGC TTT TAC AAA GCG GGT TC) y 26c antisentido (GTT TGC TGA CAA GGG GTC AC).

RESULTADOS: El análisis molecular identificó a cinco niños (cuatro varones, una mujer) con una mutación en estado heterocigoto no sinónima en el exón 26: cambio de GAA (normal) por GCC en el codón 1826 de SCN1A, que reemplaza al ácido glutámico (E) por alanina (A).

CONCLUSIONES: Este estudio reporta una mutación no conservadora que puede estar relacionada con la falta de respuesta al tratamiento en estos pacientes, ya que la modificación de la secuencia de aminoácidos puede alterar las características físico químicas y la estructura tridimensional de la subunidad alfa, así como su interacción con la subunidad beta, asociándose a hiperexcitabilidad neuronal. En México no se conoce la prevalencia de esta mutación, sin embargo, nuestros hallazgos invitan a confirmar si este cambio genético se encuentra relacionado con epilepsia refractaria.

Palabras clave: Canales iónicos de sodio, crisis, epilepsia, epilepsia refractaria, gen, gen SCN1A, México, mutación.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Refractory epilepsy represents almost 30% of all types of epilepsy. Polymorphisms and mutations in specific genes are related with the pathophysiology and response to treatment of epilepsy, particularly in its association with ion channels. Ion channels have functions as controlling and maintaining action potentials in cell membranes, so that mutations in genes encoding these channels are factors related with the refractory epilepsy.

OBJECTIVE: To analyze the gene coding for the alpha subunit of the voltage-dependent sodium channel (SCN1A) in pediatric patients with refractory epilepsy, managed at the National Medical Center “20 de Noviembre”.

Correspondencia: Ramón Ernesto Jiménez-Arredondo.

Brasilia 35 Int. 4, Ciudad del Valle, Tepic, Nayarit, C.P. 63157. Correo electrónico: ramonjimenez_a@hotmail.com

Artículo recibido: Junio 2, 2013.

Artículo aceptado: Julio 1, 2013.

METHODS: The molecular study was performed by analysis of exon 26 using end-point PCR and direct sequencing. The exon 26 was amplified in three fragments with the following primer pairs: 26a sense (AGG CTT CTG ACC ACT TTG AAC G), 26a antisense (TGT AGA TGT CAA TCA CCA CCA G), 26b sense (TGT GGG AAC CCA TGT GTT G), 26b antisense (CCA TGA ATC CCT CGA GCT TC), 26c sense (AAA TAC GCG TGC TTT GGT TC) and 26c antisense (GTT GTC GGG CAA TGA TGC AC).

RESULTS: Molecular analysis identified 5 children (4 males, 1 female) with a nonsynonymous mutation in heterozygous state in exon 26: change from GAA (normal) to GCC in codon 1826 of SCN1A, replacing the glutamic acid (E) by alanine (A).

CONCLUSIONS: This study reports a non-conservative mutation which may be related to the lack of response to treatment in these patients, since the modification of the amino acid sequence can alter the physical and chemical characteristics and the three-dimensional structure of the alpha subunit of sodium channel, also altering its interaction with the beta subunit and as a consequence, possibly causing neuronal hyperexcitability. In Mexico do not know the prevalence of this mutation, however our invite hhalazgos confirm whether this genetic change is associated with refractory epilepsy. In Mexico do not know the prevalence of this mutation, however our findings warrant the confirmation whether this genetic change is associated with refractory epilepsy.

Key words: Sodium ion channels, epilepsy, gene, Mexico, mutation, refractory epilepsy, SCN1A gene, seizures.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las variaciones determinadas genéticamente y su asociación con la respuesta farmacológica se define como farmacogenética.^{1,2} Vogel, en 1959, fue el primero en proponer el término, sin embargo, desde el año 1909, Garrod fue el primero en sugerir que las variaciones en el metabolismo de los fármacos eran dependientes de características heredables a los descendientes.³⁻⁵

Se estima que a nivel mundial 10.5 millones de niños menores de 15 años cursan con epilepsia, lo que representa casi 25% de la población global con epilepsia. En México se ha calculado que afecta a 1.8 millones de personas, siendo de éstas más de 70% niños.⁶⁻⁸ La epilepsia es un síntoma complejo causado por una variedad de procesos patológicos a nivel cerebral que se caracteriza por la presencia de descargas neuronales ocasionales, excesivas y desordenadas que pueden ser detectadas por manifestaciones clínicas, video o electroencefalograma.⁹⁻¹¹

La definición de epilepsia refractaria es arbitraria, se refiere tanto a la severidad como a la frecuencia de las crisis para cada niño de manera individual. Berg define la epilepsia intratable como una falla en el control de las crisis a pesar del empleo de dos o más fármacos antiepilepticos de primera línea a dosis máxima con un promedio de más de una crisis mensual por 18 meses y no más de tres meses consecutivos libre de crisis durante este intervalo.¹² Kwan, et al., en el año 2010, la han definido como una falla en el control de las crisis a pesar del empleo de dos esquemas terapéuticos tolerados y apropiadamente elegidos y empleados ya sea en monoterapia o en terapia de combinación. El término "libre de crisis" se ha definido como el periodo sin presencia de cualquier tipo de crisis por 12 meses o tres veces el intervalo más largo intercrisis antes del tratamiento.¹³

La fisiopatología y mecanismos de la epilepsia refractaria aún no son bien conocidos, sin embargo, se considera que es un proceso multifactorial donde influyen determinantes genéticos, como las variaciones genéticas en los canales iónicos, factores relacionados con la misma enfermedad como el tipo de crisis y su progresión a pesar del tratamiento; así como factores bioquímicos del paciente como

alteración en los sitios de acción farmacológica, alteración en el transporte hasta llegar a nivel cerebral e incluso factores relacionados a los fármacos *per se*, como el desarrollo de tolerancia o mecanismos inefectivos de acción de las drogas administradas.¹⁴ Sin embargo, por sí solos o de manera independiente, ninguno de estos factores explican en su totalidad esta entidad. Una de las principales teorías es la Hipótesis del Blanco de Drogas (Drug Target), la cual hace alusión a que la falta de respuesta farmacológica se debe a la pérdida intrínseca o adquirida de la sensibilidad de los blancos terapéuticos a nivel cerebral.¹⁵⁻¹⁷ La hipótesis está basada principalmente en estudios con carbamazepina (CBZ) sobre los canales de sodio voltaje dependientes en neuronas hipocampales. Remy, et al., en el 2003, ampliaron los trabajos iniciales de Vreugdenhil, mostrando que el bloqueo de los canales de Na⁺ voltaje dependiente está perdido en pacientes resistentes a CBZ, además que la recuperación rápida de la inactivación de Na⁺ era sensible a CBZ en pacientes farmacorresistentes, mientras que la recuperación es marcadamente más lenta en células de pacientes con respuesta a CBZ; basado en lo anterior se sugirió que la pérdida de la sensibilidad de los fármacos en los canales iónicos, particularmente en los de sodio podría explicar el desarrollo de epilepsia refractaria a tratamiento.^{18,19}

Los canales iónicos forman una amplia familia de macromoléculas cuyas funciones son controlar y mantener los potenciales de acción a través de las membranas celulares y transducción de señales.¹⁹ Un canal iónico que representa un punto crucial en el desarrollo de la epileptogénesis es el canal de sodio dependiente de voltaje.²⁰ El canal de sodio está formado por una subunidad alfa grande, compuesta por cuatro dominios homólogos que forman la estructura tridimensional del canal de Na⁺. Cada dominio está formado por seis segmentos transmembrana, el cuarto de los cuales actúa como sensor de voltaje y los segmentos quinto y sexto de los cuatro dominios forman el poro del canal. La subunidad B1 de los canales de sodio dependientes de voltaje es una proteína integral de membrana que tiene una región simple transmembrana y un dominio amino terminal extracelular prominente (*Figura 1*).²¹

Escayg, et al., en el 2000, analizaron la secuencia de codificación del gen SCN1A en el ser humano determinando la presencia de 26 exones, siendo este último el que codifica princi-

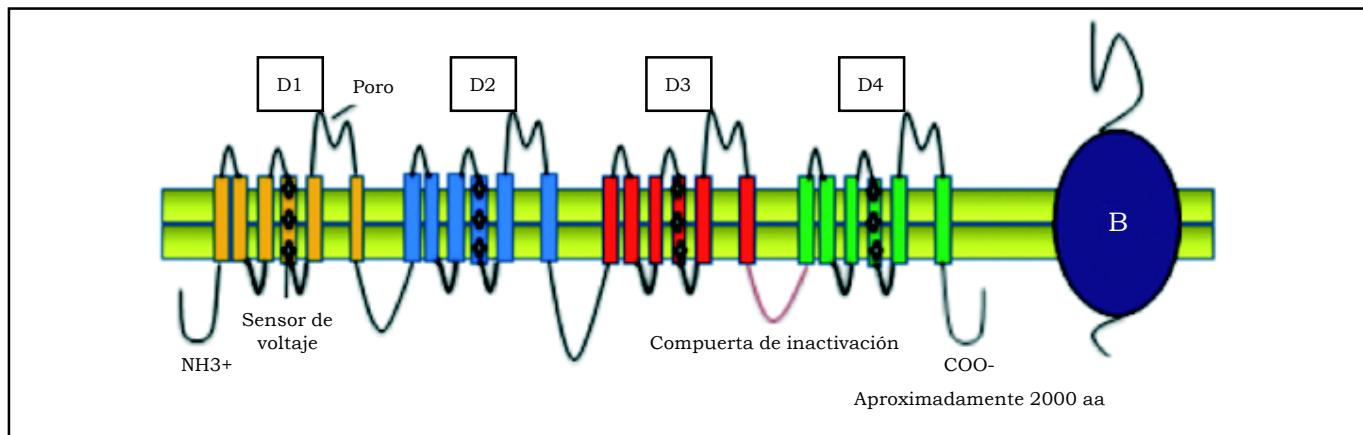


Figura 1. Proteínas transmembranales del canal iónico de sodio. Adaptado de Meisler M & Kearney J, et al. J Clin Invest 2005.²¹

palmente el segmento 5 y 6 del dominio IV y el extremo carboxiterminal de la subunidad alfa del canal de sodio. La subunidad alfa 1 se encuentra codificada en el gen SCN1A en el locus 2q24.3.²²

Nuestro objetivo fue el de determinar el análisis genético de la subunidad alfa del canal iónico de sodio dependiente de voltaje (SCN1A) en pacientes pediátricos con epilepsia refractaria, tratados en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

MÉTODOS

Este es un estudio descriptivo y transversal, con muestreo no aleatorio, donde se estudiaron pacientes pediátricos con diagnóstico de epilepsia refractaria a tratamiento que se encuentran en manejo por parte del Servicio de Neurología Pediátrica del CMN 20 de Noviembre, que cumplieron con los siguientes criterios: Pacientes de 18 meses a 19 años de edad, con epilepsia refractaria de acuerdo con la definición de Berg. Se excluyeron aquellos pacientes con lesión anatómica estructural en cerebro evidenciada por tomografía axial computada de cráneo, resonancia magnética de cráneo o algún otro método de imagen complementario, así como pacientes con antecedente de traumatismo craneoencefálico y con esclerosis hipocampal o alguna otra patología comórbida que traduzca lesión en sistema nervioso central y afecte la respuesta al tratamiento. De manera inicial se contemplaron 98 pacientes con diagnóstico de epilepsia refractaria a tratamiento, todos provenientes de la Consulta Externa y del Servicio de Hospitalización en el Servicio de Neurología Pediátrica, de los cuales al aplicar los criterios estrictos referidos previamente se incluyeron un total de cinco pacientes únicamente.

A los padres de los pacientes seleccionados se les invitó a participar en el estudio y se les solicitó su consentimiento informado por escrito, el cual cumple con las normas éticas en materia de investigación en seres humanos.^{23,24} Los datos demográficos se obtuvieron a través de un cuestionario y los datos clínicos del expediente médico de los pacientes.

Para el estudio molecular se tomaron 3 mL de sangre periférica en un tubo con EDTA, de la que se extrajo DNA genómico con método salino, previa identificación de las muestras con los datos del paciente. Se analizó la calidad e integridad del DNA extraído mediante electroforesis y espectrofotometría, respectivamente. El análisis genético de la subunidad alfa del canal iónico de sodio dependiente de voltaje se realizó mediante el análisis del exón 26 por PCR de punto final, corrimiento electroforético y secuenciación directa. Se amplificó el exón 26, por ser como se ha mencionado, principalmente el que codifica para el segmento 5 y 6 del dominio IV, y el extremo carboxiterminal de la subunidad alfa del canal de sodio del gen SCN1A en tres fragmentos, con los siguientes pares de oligonucleótidos: 26a (AGG ACT CTG AAC CTT ACC TTG G), 26a antisentido (TGT AGA TGT TCA CCA CAA CCA G), 26b sentido (TGT GGG AAC CCA TGT GTT G), 26b antisentido (CCA TGA ATC GCT CCT CGA TC), 26c sentido (TGC TTT TAC AAA GCG GGT TC) y 26c antisentido (GTT TGC TGA CAA GGG GTC AC). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: Previó calentamiento a 95 °C por 3 minutos, desnaturización a 94 °C durante un minuto, 35 ciclos con una alineación a 60 °C por un minuto, elongación a 72 °C durante un minuto y medio, y extensión final a 72 °C durante 7 minutos. Los productos de PCR se colocaron en un gel de agarosa al 2% y fueron separados con base en el desplazamiento de la molécula (DNA) cargada en un campo eléctrico, cada corrimiento estuvo acompañado por un marcador de peso molecular de 100 pb. A través de este método fue posible observar, en un transiluminador de luz ultravioleta, la amplificación de las tres porciones del exón 26 del gen SCN1A de acuerdo con el tamaño esperado (fragmento a: 589 pb, fragmento b: 418 pb y fragmento c: 592 pb, respectivamente). Se purificaron los fragmentos amplificados por elución, con el kit QIAquick QIAGEN. Se cuantificó la concentración del producto purificado de la PCR por electroforesis con ayuda de un marcador de masa molecular para continuar con la reacción de secuencia de acuerdo con las sugerencias del proveedor del Kit DTCS (Beckman-Coulter) y finalmente las muestras fueron analizadas por secuenciación directa.

RESULTADOS

Se identificó a un total de cinco pacientes: cuatro varones y una mujer. En cuanto a la edad de los pacientes, encontramos una mínima de 113 meses (9.4 años) y un máximo de 229 (19 años), con media de 148.2 meses (12.3 años). De los cinco pacientes participantes ninguno cuenta con antecedentes heredo familiares de epilepsia o síndrome epiléptico. Respecto al tipo de epilepsia se encontró que dos pacientes tienen diagnóstico de epilepsia parcial motora secundariamente generalizada, uno epilepsia de lóbulo temporal, y, finalmente, dos pacientes con epilepsia tónico clónico generalizada.

El análisis mediante PCR de los fragmentos a, b y c del exón 26 del gen SCN1A mostró amplificación normal del DNA de los pacientes y el control. Posteriormente, a través de secuenciación directa, se identificó en los cinco pacientes una mutación en el exón 26 consistente en un cambio de GCC por GAA en el codón 1826 del DNA codificante que reemplaza al ácido glutámico (E) por alanina (A) (*Figura 2*). Este cambio es una mutación en estado heterocigoto, no sinónima, ya que se sustituye un aminoácido por otro; además, es una mutación no conservadora porque la modificación en la secuencia, reemplaza un aminoácido polar ácido por otro no polar neutro (*Tabla 1*).

DISCUSIÓN

La epilepsia es un padecimiento de etiología compleja, en la que interaccionan factores ambientales y factores genéticos, donde ya se han descrito mutaciones en genes que codifican canales iónicos (Ca⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻), receptores de acetilcolina, receptores GABA A, cistatina B, entre otros, relacionados cada uno con diferentes tipos de epilepsia; estos resultados han servido para entender la fisiopatología de la enfermedad, no así la falta de respuesta farmacológica.^{25,26}

La causa de la epilepsia refractaria se desconoce, aunque se han propuesto teorías para explicarla como la expresión incrementada de los transportadores de fármacos y la reducida sensibilidad de éstos en sus blancos de acción.²⁷ Investigaciones recientes han identificado mutaciones en los genes MDR1 (multitransportador de drogas), SCN1A (canal de sodio), CACNA1A (canal de calcio) y GABRG2 (receptor 2 del ácido

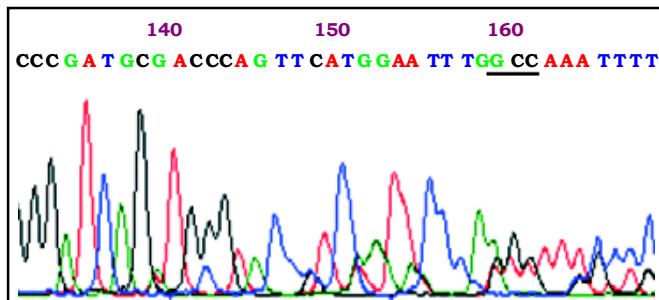


Figura 2. Cambio en la secuencia en el codón 1826, del exón 26 del gen SCN1A. El electroferograma muestra la posición en que se presenta la sustitución del codón GCC por GAA (codón normal).

Tabla 1. Comparación de la secuencia silvestre (normal) de aminoácidos con la encontrada en los pacientes analizados.

Secuencia de aminoácidos de SCN1A		
Normal	...VWEKFDPDAT	QFMEFEKLSQ ...
Pacientes	1811 ...VWEKFDPDAT	↑ 1826 QFMQFAKLSQ ...

En rojo el cambio aminoacídico producido por la mutación. Secuencia normal obtenida de la base de datos del GeneBank.

gamma amino butírico). El estudio del gen SCN1A ha reportado datos de interés, ya que es uno de los blancos terapéuticos más importantes en la epilepsia, se han encontrado múltiples mutaciones asociadas con una actividad anormal del canal iónico en la epilepsia mioclónica severa de la infancia y en las crisis febriles secundariamente generalizadas; las mutaciones localizadas en las secuencias que codifican el sensor de voltaje y el poro iónico, se han correlacionado con un fenotipo severo y de difícil control.²⁸

En este trabajo presentamos una mutación de sentido equivocado, no sinónima y no conservadora, que sustituye el ácido glutámico (aminoácido polar ácido) por alanina (amoniácido no polar), en el codón 1826 que se encuentra localizado dentro de la secuencia que codifica el extremo carboxiterminal de la subunidad α del canal de sodio, el cual contribuye a la inactivación de éste (*Figura 3*).

El ácido glutámico tiene una propiedad hidrofílica, mientras que la alanina la tiene hidrofóbica, propiedad que favorece se modifique la estructura tridimensional de la proteína y, por lo tanto, la función del canal iónico. Se han reportado mutaciones en el dominio COOH- de la subunidad alfa de la proteína, en pacientes con epilepsia mioclónica severa de la infancia y se ha comprobado que éstas causan hiperexcitabilidad neuronal.^{28,29}

Es importante mencionar que de los cinco pacientes analizados, todos presentaron la misma mutación. Esto puede deberse en primer lugar a que los niños fueron seleccionados de manera muy estricta, y en segundo lugar porque se excluyeron a todos los que presentaron una causa definida de epilepsia y/o síndromes epilépticos. Sin embargo, los resultados nos obligan a ampliar el análisis genético en una muestra mayor de pacientes con epilepsia refractaria, así como la búsqueda de dicha alteración en pacientes epilépticos con buena respuesta farmacológica e incluso en población sana, para hacer una correlación genotipo-fenotipo más amplia. También consideramos que debemos realizar estudios funcionales de electrofisiología para corroborar los efectos de la mutación encontrada.

CONCLUSIONES

El análisis genético de la subunidad alfa del canal iónico de sodio dependiente de voltaje en nuestros pacientes reportó una mutación en estado heterocigoto no conservadora, un cambio de GAA por GCC en el codón 1826 que condiciona una sustitución de ácido glutámico por alanina en el extremo

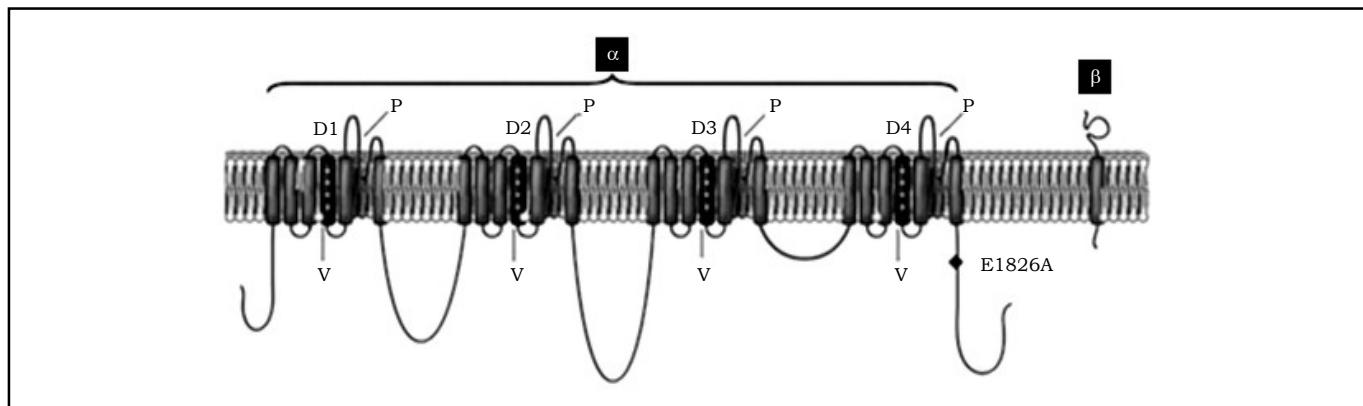


Figura 3. Localización de la sustitución aminoacídica en canal iónico de sodio. E1826A se encuentra en el extremo carboxiterminal, que participa en la unión con la subunidad β del canal de sodio. **A:** subunidad alfa. **β:** subunidad beta. **D1-D4:** dominios de la subunidad alfa. **P:** poro de selectividad iónica. **V:** sensor de voltaje.

carboxiterminal. Consideramos que este hallazgo puede estar asociado a la falta de respuesta al tratamiento en estos pacientes, ya que la modificación de las características físico químicas por la secuencia de aminoácidos, puede alterar la estructura tridimensional de la subunidad alfa de la proteína y su interacción con la subunidad beta, ocasionando alteraciones en su función, lo que lleva a hiperexcitabilidad neuronal, como se ha reportado en otros estudios, y una falla en este blanco de acción farmacológica. Estos resultados brindan un precedente para estudios posteriores, como búsqueda de mutaciones en el resto de los exones del gen, principalmente los que codifican dominios funcionales.

CONFLICTOS DE INTERÉS

No existen potenciales conflictos de intereses qué declarar.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Los autores no han declarado fuente alguna de financiamiento para este informe científico.

REFERENCIAS

1. Lares-Asseff I, Trujillo F. La farmacogenética y su importancia en la clínica. Gac Med Mex 2001; 137: 227-36.
2. Vogel F. Moderne probleme der humangenetik. Ergeb Inn Med Kinderheilkd 1959; 12: 52-125.
3. Garrod AE. Inborn errors of metabolism. London: Oxford University Press Reprint; 1963.
4. Motulsky AG. Drug reaction, enzymes and biochemical genetics. J Am Med Assoc 1957; 165: 835-7.
5. Vesell ES. Advances in pharmacogenetics. Prog Med Genet 1973; 9: 291-367.
6. Meyer UA. Genotype or Phenotype. The Definition of a Pharmacogenetic Polymorphism. Pharmacogenetics. 1991;1:66-7.
7. Vogel F, Motulsky AG. Human genetics, problems and approaches. New York: Springer ;1986, p. 435.
8. Lara TH. Análisis epidemiológico de la epilepsia en el INNN. 2000. XXV (4): 177-82
9. Guerrini R. Epilepsy in children. Lancet 2006; 367: 499-524.
10. Browne T, Holmes G. Epilepsy: Definitions and Background. Handbook of Epilepsy. 3rd. Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 1-20.
11. Engel J, Pedley TA. What is epilepsy? Epilepsy. Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
12. Arzimanoglou A, Guerrini R, Aicardi J. Epilepsy: Overview and definitions. Aicardi's epilepsy in children. 3rd. Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 1-6.
13. Kwan P, et al. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc task force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. Epilepsia 2010; 516: 1069-77.
14. Berg AT, Shinnar S, Levy SR, Testa FM, Smith-Rapaport S, Beckerman S. Early development of intractable epilepsy in children: a prospective study. Neurology 2001; 56: 1445-52.
15. Löscher W, Potschka H. Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2002; 301: 7-14.
16. Arroyo S, et al. Is refractory epilepsy preventable? Epilepsia 2002; 43: 437-44.
17. Bazil CW. New antiepileptic drugs. Neurologist 2002; 8: 71-81.
18. Begley DJ. ABC Transporters and The Blood-Brain Barrier. Curr Pharm Design 2004; 10: 1295-312.
19. Remy S, et al. A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. Ann Neurol 2003; 53: 469-79.
20. Campos-Castelló J, Canelón M, García-Fernández M. Aspectos clínicos de las canalopatías epilépticas. Rev Neurol 2000; 30: S42-S46.

21. Meisler M, Kearney J. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J Clin Invest* 2005; 115: 2010-17.
22. Köhling R. Voltage-Gated Sodium Channels in Epilepsy. *Epilepsia* 2002; 43: 1278-95.
23. Recommendations Guiding Physicians in Biomedical Research Involving Human Subjects. World Medical Association Declaration of Helsinki. Junio 1999; 42: 635-97.
24. Declaración internacional sobre los datos genéticos humanos. Octubre 2003. <http://www.unesco.org>
25. Kaneko S, et. al: Genetic Identifiers of epilepsy. *Epilepsia*, 2004, 43:16-20.
26. Hirose S, et al. Genetic of idiopathic epilepsies. *Epilepsia* 2005, 46: 38-43.
27. Schmidt D, et al. Drug resistance in epilepsy. *Epilepsia* 2005, 46: 858-77.
28. Kanai K, et al. Mutations in SCN1A and epilepsy phenotype severity. *Neurology* 2004, 63: 329-34.
29. Spamanaton S, et al. A novel epilepsy mutation in the sodium Channel SCN1a gene. *J Neuroscience* 2004; 24: 10022-34.