



Serplus: nato da un progetto di ricerca sull'epilessia, per la Ricerca Medica.

| | |
|--|----|
| 1.0 Breve storia della farmacologia dell'epilessia | 2 |
| 2.0 Vengono notificati i nuovi farmaci. | 3 |
| 3.0 Ruolo della serotonina nell'epilessia: la nuova idea? | 4 |
| 3.1 Critiche ai dati pubblicati. | 5 |
| 3.2 Triptofano, unico precursore della serotonina. | 6 |
| 4.0 Come aumentare il trp plasmatico. | 8 |
| 4.1 Identificazione dell'Alfa-lattoalbumina. | 8 |
| 4.2 Evidenze che l'ALAC aumenti il rapporto plasmatico trp/LNAAs e la sintesi di serotonina cerebrale: | 9 |
| 4.3 Evidenze del ruolo protettivo dell'ALAC sulle crisi epilettiche. | 12 |
| 5.0 Risultati degli studi sperimentali e clinici: | 13 |
| 6.0 Oggi | 15 |
| 7.0 Riferimenti bibliografici. | 17 |



Fino ai primi anni '90 erano disponibili sei farmaci principali (carbamazepina, etosuximide, fenobarbital, fenitoina, primidone e acido valproico) per il trattamento dell'epilessia.

Tuttavia, questi farmaci hanno limitazioni farmacocinetiche, potenziale teratogeno e un effetto negativo sulle funzioni cognitive che compromette la qualità della vita dei pazienti e limita l'uso di questi farmaci in alcuni pazienti. Inoltre, il 20-30% dei pazienti è refrattario a questi farmaci.¹

1.0 Breve storia della farmacologia dell'epilessia

Molto probabilmente il limite di efficacia di questi farmaci è dovuto alla loro scoperta casuale:

Il primo farmaco in assoluto può essere considerato il bromuro di potassio, KBr, noto per le sue proprietà sedative, ma in realtà fu proposto nell'epilessia per il suo effetto collaterale di generare impotenza, in quanto allora si era convinti che le crisi fossero dovute ad una eccessiva masturbazione.²

il fenobarbitale (PB) fu registrato nel 1904 come sedativo ipnotico e nel 1912 fu casualmente somministrato come tranquillante ad un epilettico che riportò un inaspettato miglioramento delle crisi, quindi fu proposto come anti-epilettico.

La fenitoina viene presentata come risultato di precisi studi, ma in realtà fu sintetizzata nel 1908 da Biltz, ceduta alla Parke Davis, e nel 1938 fu



causalmente testata in modelli sperimentali da ricercatori esterni alla Parke Davis.

Nel 1962 la carbamazepina fu proposta per la nevralgia del trigemino e solo nel 1965 ci si accorse delle sua capacità antiepilettiche.

Il farmaco che meglio rappresenta la serendipety è l'acido valproico. Nel 1962 fu scoperta la sua azione anti-epilettica dal francese Pierre Eymard per averlo casualmente scelto come solvente, è un liquido, per solubilizzare nuove molecole da testare nei modelli sperimentali di epilessia.

2.0 Vengono notificati i nuovi farmaci.

Negli anni '90, grazie a importanti finanziamenti dell'NIH, si assiste alla registrazione di nuovi farmaci per l'epilessia.

Curiosamente, tra questi, anche il levetiracetam, è stato scoperto essere anticonvulsivo casualmente. Infatti non aveva fornito tali indicazioni agli usuali test di screening, sui quali si era dimostrato non efficace. Infatti non agisce sulle correnti ioniche di membrana, dove abbiamo supposto agiscano gli altri farmaci e, anche se non ne conosciamo minimamente i meccanismi d'azione, lo abbiamo definito il farmaco del futuro.

Comunque, lo sviluppo di dieci nuovi farmaci antiepilettici (vigabatrin, felbamato, gabapentin, lamotrigine, topiramato, tiagabina, oxcarbazepina, levetiracetam, zonisamide e pregabalin) ha ampliato le opzioni di trattamento. I nuovi farmaci possono essere meglio tollerati, avere meno interazioni farmacologiche e sembrano influenzare le funzioni cognitive in misura minore rispetto ai vecchi farmaci, **ma non risolvono il problema della farmacoresistenza**: circa un terzo della popolazione epilettica continua ad



avere crisi nonostante una adeguata terapia. Löscher e Leppik (President ILAE) scrivono che è evidente che **occorrano nuove idee, nuovi modelli**, per risolvere il problema della farmacoresistenza.³

3.0 Ruolo della serotonina nell'epilessia: la nuova idea?

Negli anni '90 si è assistito al capovolgimento del ruolo della serotonina nell'epilessia: passa da essere largamente considerata pro-convulsiva a anti-convulsiva.

Già prima degli anni '90, pochi, ma significativi studi mettevano in evidenza il ruolo protettivo della serotonina nei confronti delle crisi epilettiche:

a) I farmaci anticonvulsivi aumentano la serotonina cerebrale:

E' stato dimostrato che alcuni farmaci anticonvulsivi producono un aumento della serotonina cerebrale. Tale aumento, riscontrabile esclusivamente nel tessuto cerebrale, potrebbe concorrere al controllo delle crisi epilettiche.^{4, 5}

b) Una diminuzione di serotonina cerebrale abbassa la soglia convulsiva sia in animali sia nell'uomo.

Studi su animali dimostrano come pre-trattandoli con reserpina, bloccante della sintesi delle catecolamine cerebrali (dopamina, noradrenalina e serotonina), si abbia una maggiore suscettibilità alle crisi epilettiche indotte da elettroshock.⁶ In modo del tutto analogo si osserva un aumento delle crisi in pazienti epilettici trattati con reserpina.⁷

In generale tutte le molecole capaci di aumentare la serotonina cerebrale riducono il rischio di convulsioni, che viene invece incrementato da quelle che la diminuiscono.⁸



Infatti, i farmaci antidepressivi SSRIs, proposti come serotoninergici cerebrali, riducono le crisi epilettiche in diversi modelli sperimentali. ^{9, 10, 11}

Nel 2005 Jobe et al. evidenziano come il ruolo pro- o anti-convulsivo dipenda dalla dose impiegata: a dosi elevate sono pro-convulsivi, mentre alle dosi più basse sono anti-convulsivi.¹²

Negli anni '90, il dott. Paolo Mainardi partecipa a studi che contribuiscono a confermare l'azione anticonvulsiva dei farmaci SSRIs. ^{13, 14, 15, 16, 17}

3.1 Critiche ai dati pubblicati.

Negli anni '90 i dati riportati a favore di una azione anticonvulsiva della serotonina sono fortemente contestati, anche dalle stesse ditte che producono i farmaci antidepressivi SSRIs, che non gradiscono il potenziale ampliamento di utilizzo rivolto a pazienti epilettici.

Certo della validità dei dati pubblicati, il dott. Paolo Mainardi cerca un modo alternativo per aumentare la sintesi cerebrale della serotonina. Infatti, anche gli stessi SSRIs aumenterebbero il tempo di azione della serotonina sul suo recettore post-sinaptico, ma non ne aumenterebbero la sintesi.



3.2 Triptofano, unico precursore della serotonina.

Dato che la serotonina è sintetizzata esclusivamente dal triptofano (trp), ammino acido essenziale, il modo più semplice sarebbe quello di aumentare il livello plasmatico di trp.

Infatti, studi su animali con somministrazioni in peritoneo di trp hanno mostrato che ha una potente azione anticonvulsiva:

- riduzione delle crisi su topi audiogenici. 18, 19, 20, 21
- riduzione di crisi su topi DBA/2J 22, 23
- riduzione degli arresti respiratori indotte da crisi (sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP)).²⁴ Nelle SUDEP è riportato il ruolo della serotonina.²⁵

Tale efficacia anticonvulsiva non è però confermata da studi clinici con somministrazioni orali di trp. Inoltre il trp, assunto oralmente, risulta anche inefficace nell'atassia, fortemente legata alla serotonina cerebrale,²⁶ in pazienti con epilessia mioclonica progressiva. Risulta infatti che questi pazienti epilettici hanno una incapacità di assorbire il trp dalla dieta. ²⁷

La mancanza di risultati clinici con assunzioni orali di trp, evidenzia come non determini automaticamente un aumento della serotonina cerebrale, in quanto:

- **La serotonina non è l'unico metabolita del trp.**

Il metabolismo del trp è complesso, porta anche a derivati chinurenici e indolici. Infatti, somministrazioni orali di trp possono produrre un aumento anche di altri metaboliti, per esempio gli indolici, come è stato proprio riportato nei pazienti epilettici.²⁸ (In pazienti con epilessia mioclonica progressiva una dose orale di 2 g di L-triptofano ha aumentato significativamente i livelli di indolo, non quelli della serotonina).



La serotonina cerebrale rappresenta solo una piccola parte della serotonina sintetizzata nel corpo umano, che deriva per il 99% dalle cellule enterocromaffini del tratto gastrointestinale.^{29, 30}

Pertanto, l'aumentato livello di serotonina intestinale ³¹ potrebbe provocare un aumento della motilità, con conseguente diarrea, e aumento della stimolazione vagale, con conseguenza nausea e vomito.^{32, 33} Tali effetti collaterali non sono stati riscontrati negli studi clinici in cui il trp è stato somministrato in acuto o cronico, a dosi orali comprese tra 1 e 15 g die. Dosi molto elevate rispetto al normale apporto giornaliero derivante dalle proteine alimentari. (~100 g di proteine / d (22), ³⁴ che contengono 1–1,5 g di triptofano.³⁵)

● **Assunzioni orali di trp non aumentano il suo livello plasmatico.**

Oltre al complesso metabolismo del trp, si deve considerare anche la scarsa biodisponibilità degli ammino acidi,³⁶ in quanto possono passare la membrana intestinale solo grazie a trasportatori attivi,³⁷ specifici per le diverse classi: acidi, basici, neutri, analogamente a quanto avviene alla barriera emato-encefalica. Quindi, somministrazioni orali di aa non aumentano i relativi livelli plasmatici. Altrettanto succede dopo somministrazioni orali di proteine che precipitano nello stomaco, dove vengono demolite principalmente a singoli ammino acidi, scarsamente assorbiti.³⁸



4.0 Come aumentare il trp plasmatico.

Le sieroproteine non precipitano nell'ambiente acido dello stomaco e sono rapidamente demolite a piccoli-medi peptidi, che passano liberamente la membrana intestinale. Nel sangue, continua la demolizione a singoli amminoacidi. Le sieroproteine risultano, quindi, effettivamente capaci di aumentare i livelli plasmatici degli amminoacidi di cui sono costituite.³⁹ Infatti il Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score delle sieroproteine è uguale ad uno.⁴⁰

Per aumentare la sintesi di serotonina cerebrale è necessario aumentare il rapporto plasmatico trp/LNAA, quindi occorre somministrare una sieroproteina ricca di trp e povera degli altri LNAAs.

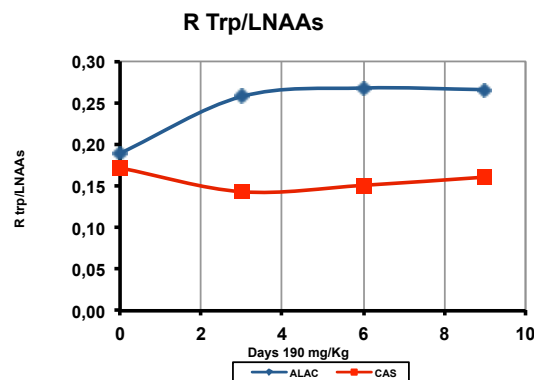
4.1 Identificazione dell'Alfa-lattoalbumina.

Considerando tutti questi fattori, il dott. Paolo Mainardi identifica nella sieroproteina Alfa-lattoalbumina (ALAC) la molecola effettivamente capace di aumentare la sintesi cerebrale di serotonina mediante sue somministrazioni orali. Vengono svolte 8 tesi di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutica, per studiare questa sieroproteina, arrivando anche a simulare la digestione nello stomaco.



4.2 Evidenze che l'ALAC aumenti il rapporto plasmatico trp/LNAAs e la sintesi di serotonina cerebrale:

- Somministrazioni di una dieta arricchita di ALAC (17%) aumentano il rapporto plasmatico trp/LNAAs del 40%, misurato dopo 9 giorni di somministrazioni ripetute. ⁴¹



- Una dieta ricca di ALAC aumenta del 16% il rapporto trp/LNAAs, misurato 90 min dopo la somministrazione. ⁴²

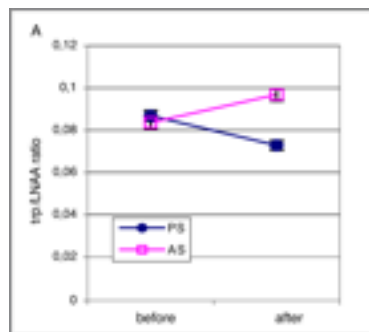


Fig. 1. (A) In 18 healthy men, mean (\pm S.E.M.) changes of plasma Trp-LNAA ratio after α -lactalbumin-enriched supplement (AS) (+16%) were significantly ($P > .001$) different from those after placebo supplement (PS) (-17%) when ingested 60 min after a regular breakfast. (B) In 15



- Una somministrazione serale di ALAC aumenta del 130% il rapporto plasmatico trp/LNAAs misurato al mattino dopo.⁴³ Questo studio correla l'aumento con una migliore qualità del sonno data dall'aumento di serotonina e quindi di melatonina cerebrale.

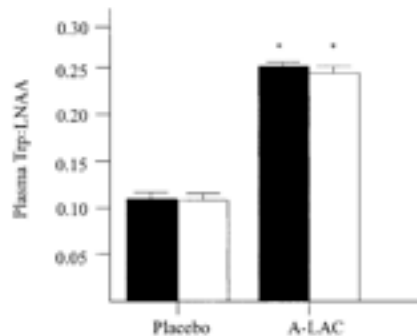


FIGURE 2. Mean (\pm SEM) ratio of total plasma tryptophan to other large neutral amino acids (Trp:LNAAs) 2 h after the evening intake of a tryptophan-rich α -lactalbumin diet (A-LAC) or a casein (placebo) diet in healthy subjects with ($n = 14$; ■) or without ($n = 14$; □) mild sleep complaints. Repeated-measures ANOVA showed a significant main effect of diet ($P < 0.0001$). *Significantly different from placebo, $P < 0.05$. The mean difference between diets was significant ($P < 0.0001$) when both groups were pooled. There were no significant differences between the subjects with or without sleep complaints.

- Somministrazioni giornaliere ripetute di ALAC in topi aumentano il rapporto plasmatico trp/LNAAs del 250% dopo 6-8 giorni si arriva ad un valore asintotico.⁴⁴ Ciò indica la presenza di funzioni di controllo che impediscono a questo rapporto di superare un valore limite.

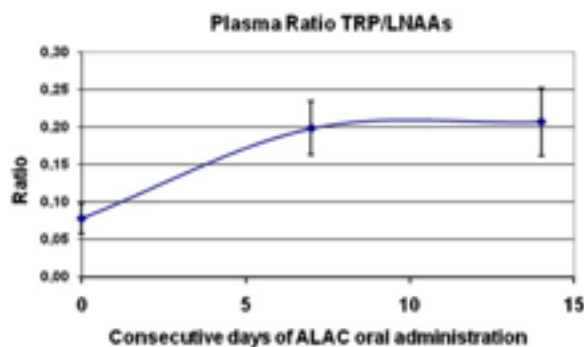


Figure 2 TRP/LNAA ratio in plasma. $n = 7$ in every group. Data are expressed as means \pm SEM. TRP = tryptophan; LNAA = large neutral aminoacids.



Non è però automatico che a questo aumento corrisponda un aumento della sintesi cerebrale di serotonina. Altri fattori potrebbero indirizzare la maggior disponibilità di trp plasmatico verso altre strade metaboliche.

La ricerca continua con importanti ricadute nelle future formulazioni.



4.3 Evidenze del ruolo protettivo dell'ALAC sulle crisi epilettiche.

Il dott. Paolo Mainardi convince il gruppo di ricerca a cui afferisce a testare l'ALAC su un gruppo di pazienti epilettici farmacoresistenti.

Il Comitato Etico impose che l'ALAC venisse notificata come integratore alimentare al Ministero della Salute.

Il **Serplus** compresse fu così notificato al Ministero per poter realizzare il primo studio clinico sull'epilessia da una ditta Srl, di cui il dott. Mainardi era socio e che si occupava di progettazione di strumenti analitici, ma che poteva anche produrre integratori alimentari.

Risultati del primo studio clinico: Somministrazioni di ALAC in 18 pazienti epilettici farmacoresistenti migliorano il controllo delle crisi.^{45, 46, 47} Dopo 3 mesi, la riduzione media delle crisi è stata del 48%, 9 su 18 hanno una riduzione maggiore del 50%, 5 su 18 vanno liberi da crisi.

Questi risultati furono presentati al 7° Congresso Europeo della Lega Internazionale Contro l'Epilessia (ILAE) e mostrati al prof. Emilio Perucca, allora vice presidente della ILAE.

Il prof. Perucca convinse il prof. De Sarro ad effettuare test sperimentali su animali, entrambi rappresentano il top nell'epilessia, il primo sulla farmacologia clinica, il secondo su quella sperimentale.



5.0 Risultati degli studi sperimentali e clinici:

- Somministrazioni giornaliere ripetute di ALAC aumentano il controllo delle crisi indotte farmacologicamente in modelli sperimentali di epilessia.⁴⁸
- topi audiogenici GEPR-9s: topi modificati geneticamente per produrre crisi epilettiche in seguito a stimolo acustico. Una singola somministrazione di ALAC, a tutte le dosi orali proclino esplorate (0, 250, 500, 700, 1000 mg/kg), non produce nessun controllo delle crisi, stimulate ogni ora dopo la somministrazione. Cinque giorni di somministrazioni ripetute producono un significativo controllo delle crisi, stimulate dopo ogni ora dall'ultima somministrazione, non dose dipendente che scompare 48 ore dopo l'ultima somministrazione. Dodici giorni di somministrazioni ripetute producono risultati sovrapponibili ai primi. Dopo 15 giorni di somministrazioni il controllo delle crisi indotte con stimolazione acustica persiste fino ad almeno un mese dall'ultima somministrazione (dato non pubblicato). Questo risultato mostra un'azione specifica non tanto sulle crisi, ma sull'epilettogenesi, suggerisce quindi un'azione di innalzamento della soglia convulsiva.
- crisi indotte da pilocarpina: La pilocarpina genera crisi in risposta immediata (acute) e l'animale continua a presentare una attività epilettica a vita (crisi croniche). L'ALAC controlla le crisi acute in modo analogo alla Carbamezipina (farmaco che produce il massimo controllo su questo tipo di crisi), ma mentre la Carbamazepina non controlla minimamente quelle croniche, l'ALAC produce un significativo controllo (table 2):



Table 2 Effects of ALAC (15-day oral treatment) and carbamazepine (CBZ, single dose) against pilocarpine-induced seizures.

(A) Seizure protection: number of animal experiencing a stage 4 seizure after the injection of various doses of pilocarpine on total number of treated animals

| Animal group and dose | 250 mg/kg | 270 mg/kg | 300 mg/kg |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|
| Control | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| CBZ 20 mg/kg | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| CBZ 40 mg/kg | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| CBZ 80 mg/kg | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| ALAC 125 mg/kg | 4/10 | 6/10 | 9/10 |
| ALAC 250 mg/kg | 0/10 | 3/10 | 9/10 |
| ALAC 500 mg/kg | 0/10 | 8/10 | 10/10 |

Soprattutto grazie a questo risultato, l'ALAC entra nei programmi di screening nuovi farmaci dell'NIH, poi fermati in quanto disponibili solo a somministrazioni in peritoneo.

- somministrazioni ripetute di ALAC per 15 giorni producono un significativo controllo delle crisi indotte da PTZ in topi.⁴⁹

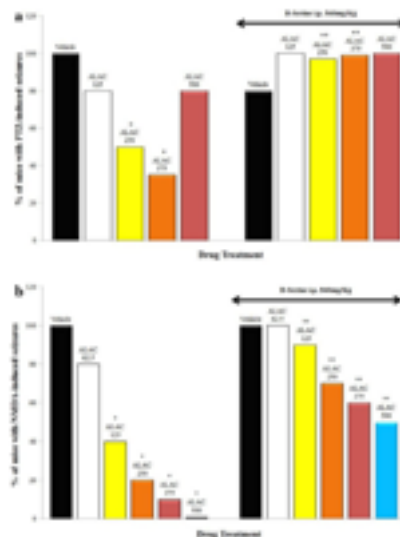


Fig. 2. Effects of ALAC orally administered for 15 consecutive days at the doses indicated in mg/kg/day and its combined administration with *o*-serine (360 mg/kg i.p. left) on chemically induced seizures by PTZ (A) and NMDA (B). *N* = 10 for every group. **P* < 0.05 in comparison to vehicle only treated group; ***P* < 0.05 in comparison to respective ALAC group without *o*-serine administration.

Arriva al Gaslini, stesso dipartimento universitario del dott. Mainardi, il dott. Pasquale Striano, con il quale inizia una proficua collaborazione.



- Un studio “proof of concept” sull’ALAC condotto su 13 pazienti epilettici farmacoresistenti, 6 dei quali affetti dalla Unverricht-Lundborg, una delle forme più gravi e farmacoresistenti, dove è riportato un ruolo della serotonina,⁵⁰ mostra un significativo miglioramento della qualità del sonno, fortemente disturbato in questo tipo di epilessia, mentre il controllo delle crisi non raggiunge la significatività statistica.⁵¹

6.0 Oggi

Nasce un gruppo di ricerca composto da Paolo Mainardi, Pasquale Striano, Emilio Russo (che sostituisce De Sarro, diventato rettore dell’Università magna Grecia di Catanzaro), Paolo Carta, biologo nutrizionista di Genova.

L’oggetto dello studio è il microbiota, le cui conoscenze rivoluzionano sia la medicina che la nutrizione.

Il recente ruolo dell’infiammazione cerebrale, proposta come causa fisiopatogenetica delle crisi, e il ruolo del microbiota nella risposta infiammatoria consentono di rivalutare le diete del passato,⁵² inoltre consentono di individuare quale sia la dieta ottimale per la salute.⁵³

Si prova a correlare le capacità disinfiammanti intestinali di ALAC, Acido valproico (farmaco per epilessia), Acido Butirrico e Mesalazina con le loro capacità a controllare le crisi epilettiche in modelli sperimentali.⁵⁴

Nel 2018 si svolge a Genova un workshop internazionale al quale partecipano ricercatori internazionali sull’asse microbiota-intestino-cervello,⁵⁵ si progettano studi clinici, sperimentali, raccolte dati, partecipazioni e congressi,...



7.0 Riferimenti bibliografici.

- ¹ Beghi E. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs: comparison of two recent guidelines. *Lancet Neurol.* 2004 Oct;3(10):618-21.
- ² Goodman; Gilman (**1970**). "chapter 10: Hypnotics and Sedatives". *The Biological Basis of Therapeutics* (4th ed.). London: MacMillan. pp. 121–2
- ³ W. Löscher, I.E. Leppik. *Epilepsy Research* 50 (2002) 17–20
- ⁴ BONNYCASTLE DD, GIARMAN NJ, PAASONEN MK. Anticonvulsant compounds and 5-hydroxytryptamine in rat brain. *Br J Pharmacol Chemother.* 1957;12(2):228–231.
- ⁵ Milovanovic DD, Stevanovic HL, Jovic N. Plasma tryptophan levels in children with epilepsy before and after antiepileptic treatment. *Adv Exp Med Biol.* 1996;398:103-6.
- ⁶ G.R. Wenger, R.E. Stitzel, C.R. Craig. The role of biogenic amines in the reserpine-induced alteration of minimal electroshock seizure thresholds in the mouse. *Neuropharmacology*, Volume 12, Issue 7, 1973, Pages 693-703,
- ⁷ Maynert EW, Marczyński TJ, Browning RA. The role of the neurotransmitters in the epilepsies. *Adv Neurol.* 1975;13:79-147.
- ⁸ W.O. Boggan, SEROTONIN AND CONVULSIONS, Editor(s): Jack Barchas, Earl Usdin, Serotonin and Behavior, Academic Press, 1973, Pages 167-172,
- ⁹ Leander JD. Fluoxetine, a selective serotonin-uptake inhibitor, enhances the anticonvulsant effects of phenytoin, carbamazepine, and ameltolide. *Epilepsia.* 1992 May-Jun;33(3):573-6.
- ¹⁰ Pasini A, Tortorella A, Gale K. Anticonvulsant effect of intragranial fluoxetine. *Brain Res.* 1992 Oct 16;593(2):287-90.
- ¹¹ Prendiville S, Gale K. Anticonvulsant effect of fluoxetine on focally evoked limbic motor seizures in rats. *Epilepsia.* 1993 Mar-Apr; 34(2): 381-4.
- ¹² Jobe PC, Browning RA. The serotonergic and noradrenergic effects of antidepressant drugs are anticonvulsant, not proconvulsant. *Epilepsy Behav.* 2005 Dec;7(4):602-19.
- ¹³ Favale E, Rubino V, **Mainardi** P, Lunardi G, Albano C. Anticonvulsant effect of fluoxetine in humans. *Neurology.* 1995 Oct;45(10):1926-7
- ¹⁴ Favale E, Audenino D, Cocito L, Albano C. The anticonvulsant effect of citalopram as an indirect evidence of serotonergic impairment in human epileptogenesis. *Seizure.* 2003 Jul;12(5):316-8.
- ¹⁵ Cupello A, Favale E, Audenino D, Scarrone S, Gastaldi S, Albano C. Decrease of serotonin transporters in blood platelets after epileptic seizures. *Neurochem Res.* 2005 Apr;30(4):425-8.
- ¹⁶ Albano C, Cupello A, **Mainardi** P, Scarrone S, Favale E. Successful treatment of epilepsy with serotonin reuptake inhibitors: proposed mechanism. *Neurochem Res.* 2006 Apr;31(4):509-14. *Epub 2006 May 13*



- ¹⁷ Cupello A, Audenino D, Scarrone S, Fornaro M, Gatta E, Fornaro P, Albano C. Epileptic seizures but not pseudoseizures are associated with decreased density of the serotonin transporter in blood platelet membranes. *Neurochem Res.* 2008 Nov;*33*(11):2263-8. Epub 2008 Apr 22
- ¹⁸ Truscott TC. Effects of phenylalanine and 5-hydroxytryptophan on seizure severity in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1975 Sep-Oct;*3*(5):939-41.
- ¹⁹ Alexander GJ, Kopeloff LM. Additive effect of 5-hydroxytryptophan and p-chloro-phenylalanine in preventing audiogenic seizures in inbred mice *Psychopharmacol Commun.* 1976;*2*(5-6):379-90.
- ²⁰ Kostowski W, Bidzinski A, Hauptmann M, Malinowski JE, Jerlicz M, Dymecki J. Brain serotonin and epileptic seizures in mice: a pharmacological and biochemical study. *Pol J Pharmacol Pharm.* 1978 Jan-Feb;*30*(1):41-7.
- ²¹ Jobe P. C. Picchioni A. L. and Chin L. (1973) Role of brain 5-hydroxytryptamine in audiogenic seizure in the rat. *Life Sci.* 13, 1–13.
- ²² Brennan T. J., Seeley W. W., Kilgard M., Schreiner C. E. and Tecott L. H. (1997) Sound-induced seizures in serotonin 5-HT_{2C} receptor mutant mice. *Nat. Genet.* 16, 387–390.
- ²³ Tecott L. H., Sun L. M., Akana S. F., Strack A. M., Lowenstein D. H., Dallman M. F. and Julius D. (1995) Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2C} serotonin receptors. *Nature* 374, 542–546.
- ²⁴ Zhang H, Zhao H, Yang X, Xue Q, Cotten JF, Feng HJ. 5-Hydroxytryptophan, a precursor for serotonin synthesis, reduces seizure-induced respiratory arrest. *Epilepsia.* 2016;*57*(8):1228–1235.
- ²⁵ Striano P, D'Amato E, Pezzella M, **Mainardi P**, Zara F, Striano S. Sudden death in Unverricht-Lundborg patients: is serotonin the key? *Neurol Sci.* 2010 Feb;*31*(1):115-6.
- ²⁶ Pranzatelli MR, Tate E, Galvan I, Wheeler A. A controlled trial of 5-hydroxy-L-tryptophan for ataxia in progressive myoclonus epilepsy. *Clin Neurol Neurosurg.* 1996 May;*98*(2):161-4.
- ²⁷ Koskiniemi ML. Deficient intestinal absorption of L-tryptophan in progressive myoclonus epilepsy without Lafora bodies. *J Neurol Sci.* 1980 Jul;*47*(1):1-6.
- ²⁸ Koskiniemi M, Laakso J, Kuurne T, Laipio M, Härkönen M. Indole levels in human lumbar and ventricular cerebrospinal fluid and the effect of L-tryptophan administration. *Acta Neurol Scand.* 1985 Feb;*71*(2):127-32.
- ²⁹ Gershon MD 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2013;*20*:14–21.
- ³⁰ Sikander A, Rana SV, Prasad KK Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clin Chim Acta* 2009;*403*:47–55.
- ³¹ Yuwiler A, Brammer GL, Morley JE, Raleigh MJ, Flannery JW, Geller E Short-term and repetitive administration of oral tryptophan in normal men: effects on blood tryptophan, serotonin, and kynurenine concentrations. *Arch Gen Psychiatry* 1981;*38*:619–26.
- ³² Bertrand PP, Bertrand RL Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci* 2010;*153*:47–57



- ³³ Hagbom M, Istrate C, Engblom D, Karlsson T, Rodriguez-Diaz J, Buesa J, Taylor JA, Loitto VM, Magnusson KE, Ahlman H, et al. Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002115.
- ³⁴ Austin GL, Ogden LG, Hill JO Trends in carbohydrate, fat, and protein intakes and association with energy intake in normal-weight, overweight, and obese individuals: 1971–2006. *Am J Clin Nutr* 2011;93:836–43.
- ³⁵ Panel on Macronutrients, Protein and Amino Acids. Dietary Reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Washington (DC): National Academies Press; 2002
- ³⁶ Wolfe RR. Branched-chain amino acids and muscle protein synthesis in humans: myth or reality?. *J Int Soc Sports Nutr*. 2017;14:30. Published 2017 Aug 22. doi:10.1186/s12970-017-0184-9
- ³⁷ Alvarado F. Transport of sugars and amino acids in the intestine: evidence for a common carrier. *Science*. 1966 Feb 25;151(3713):1010-3.
- ³⁸ Frenhani PB, Burini RC. Mechanism of action and control in the digestion of proteins and peptides in humans. *Arq Gastroenterol*. 1999 Jul-Sep;36(3):139-47.
- ³⁹ Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, Hunziker P, von Fellenberg R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Feb 2;1426(3):439-48.
- ⁴⁰ Hoffman JR, Falvo MJ. Protein - Which is Best?. *J Sports Sci Med*. 2004;3(3):118–130. Published 2004 Sep 1.
- ⁴¹ Fuerte S et al. Plasma Trp/LNAA ratio increases during chronic ingestion of an alpha-lactalbumin diet in rats. *Nutr Neurosci*. 2001;4(5):413-8.
- ⁴² Beulens JW, Bindels JG, de Graaf C, Alles MS, Wouters-Wesseling W. Alpha-lactalbumin combined with a regular diet increases plasma Trp-LNAA ratio. *Physiol Behav*. 2004 Jun;81(4):585-93.
- ⁴³ Markus CR, Jonkman LM, Lammers JH, Deutz NE, Messer MH, Rigtering N. Evening intake of alpha-lactalbumin increases plasma tryptophan availability and improves morning alertness and brain measures of attention. *Am J Clin Nutr*. 2005 May;81(5):1026-33.
- ⁴⁴ Citraro R, Scicchitano F, De Fazio S, Raggio R, **Mainardi P**, Perucca E, De Sarro G, Russo E. Preclinical activity profile of α -lactoalbumin, a whey protein rich in tryptophan, in rodent models of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res*. 2011 Jun;95(1-2):60-9.
- ⁴⁵ Albano C, **Mainardi P**. 7^o European Congress on Epileptology. Helsinki 2-8 July 2006
- ⁴⁶ Leonardi A, **Mainardi P**, Albano C, . XXX Congresso LICE, Reggio Calabria. 29 maggio- 1 giugno 2007
- ⁴⁷ **Mainardi P**, Leonardi A, Albano C. Potentiation of brain serotonin activity may inhibit seizures, especially in drug-resistant epilepsy. *Med Hypotheses*. 2008;70(4):876-9.



- 48 Citraro R, Scicchitano F, De Fazio S, Raggio R, **Mainardi P**, Perucca E, De Sarro G, Russo E. Preclinical activity profile of α -lactoalbumin, a whey protein rich in tryptophan, in rodent models of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* 2011 Jun;95(1-2):60-9.
- 49 Russo E, Scicchitano F, Citraro R, Aiello R, Camastra C, **Mainardi P**, Chimirri S, Perucca E, Donato G, De Sarro G. Protective activity of α -lactoalbumin (ALAC), a whey protein rich in tryptophan, in rodent models of epileptogenesis. *Neuroscience.* 2012 Dec 13;226:282-8.
- 50 Striano P, D'Amato E, Pezzella M, **Mainardi P**, Zara F, Striano S. Sudden death in Unverricht-Lundborg patients: is serotonin the key? *Neurol Sci.* 2010 Feb;31
- 51 Errichiello L, Pezzella M, Santulli L, Striano S, Zara F, Minetti C, **Mainardi P**, Striano P. A proof-of-concept trial of the whey protein alfa-lactalbumin in chronic cortical myoclonus. *Mov Disord.* 2011 Dec;26(14):2573-5
- 52 **Mainardi P**, Carta P, Montinari M, Striano P et al. From the Ancient Diets to the Recent Acquisitions on the Role of Brain Inflammation in Epilepsy, Are there Any Links? *J Neurol Neurophysiol* 2015, 6:3
- 53 **P.Mainardi**, P.Carta, P.Striano. How Knowledge on Microbiota may be Helpful to Establish an Optimal Diet for Health Maintenance. *Int J Nutrition*, 2018.
- 54 1. De Caro C, Leo A, Nesci V, Ghelardini C, di Cesare Mannelli L, Striano P, Avagliano C, Calignano A, **Mainardi P**, Constanti A, Citraro R, De Sarro G, Russo E. Intestinal inflammation increases convulsant activity and reduces antiepileptic drug efficacy in a mouse model of epilepsy. *Sci Rep.* 2019 Sep 27;9(1):13983
- 55 1. Iannone LF, Preda A, Blottière HM, Clarke G, Albani D, Belcastro V, Carotenuto M, Cattaneo A, Citraro R, Ferraris C, Ronchi F, Luongo G, Santocchi E, Guiducci L, Baldelli P, Iannetti P, Pedersen S, Petretto A, Provasi S, Selmer K, Spalice A, Tagliabue A, Verrotti A, Segata N, Zimmermann J, Minetti C, **Mainardi P**, Giordano C, Sisodiya S, Zara F, Russo E, Striano P. Microbiota-gut brain axis involvement in neuropsychiatric disorders. *Expert Rev Neurother.* 2019 Oct;19(10):1037-1050.