

PROTOCOLLO

TITOLO

Studio di efficacia dell'integratore alimentare a base di S-adenosilmetionina (SAME), e probiotici per il mantenimento del normale tono dell'umore attraverso la riduzione della depressione sottosoglia, quale fattore di rischio di depressione maggiore: studio clinico monocentrico, controllato, randomizzato, a gruppi paralleli, *cross-over*, in doppio cieco

Il sottoscritto conferma che condurrà lo studio secondo le condizioni descritte nel protocollo.

| Cognome e nome | Indirizzo |
|----------------------|--|
| Dott. Agostino Greco | Via Tommaso Picazio, 26 81100 Caserta |

Si precisa che il Dott. Agostino Greco, Medico di Medicina Generale, di cui si allega il CV, è iscritto nel registro istituito dalla ASL di Caserta dei Medici di Medicina Generale abilitati alla sperimentazione clinica, come previsto dall'art. 1, comma 2 del DECRETO 10 maggio 2001 "Sperimentazione clinica controllata in medicina generale ed in pediatria di libera scelta". (GU Serie Generale n.139 del 18-06-2001).

Sommario

| | |
|--|---------------------------------------|
| PREMESSA | 3 |
| S-Adenosil Metionina (SAMe) | 6 |
| Probiotici | 6 |
| OBIETTIVI DELLO STUDIO | 8 |
| Obiettivo primario | 8 |
| Obiettivo secondario | 9 |
| DISEGNO DELLO STUDIO | 9 |
| CRITERI DI INCLUSIONE | 10 |
| CRITERI DI ESCLUSIONE | 11 |
| DIMENSIONE DEL CAMPIONE – POWER ANALYSIS | 11 |
| DURATA DELLO STUDIO | 13 |
| TRATTAMENTO IN STUDIO | 13 |
| Probiotiche | 13 |
| Placebo | Errore. Il segnalibro non è definito. |
| METODI | 14 |
| RANDOMIZZAZIONE | 15 |
| MASCHERAMENTO (BLINDING) | 16 |
| PERIODO DI WASH-OUT | 16 |
| CROSS-OVER | 17 |
| METODI CONTRACCETTIVI E GRAVIDANZA | 17 |
| RACCOLTA DEI DATI | 17 |
| RISCHI E BENEFICI | 17 |
| EVENTI AVVERSI | 17 |
| ANALISI STATISTICA | 18 |
| INFORMAZIONE AL PAZIENTE E CONSENSO INFORMATO | 18 |
| ASPETTI ETICI E PROTEZIONE DEI PAZIENTI ARRUOLATI | 18 |
| SPERIMENTATORE PRINCIPALE | 19 |
| CENTRI PARTECIPANTI | 19 |
| RISERVATEZZA DEI DATI | 19 |
| BIBLIOGRAFIA | 19 |

PREMESSA

Come indicato dalle **“Linee di indirizzo sugli studi condotti per valutare la sicurezza e le proprietà di prodotti alimentari, Ministero, della Salute, DIREZIONE GENERALE IGIENE E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI E NUTRIZIONE - UFFICIO 4, Revisione novembre 2018”**, in campo alimentare è possibile effettuare sperimentazioni sull'uomo finalizzate a dimostrare l'efficacia di prodotti alimentari, tra cui, come è noto, vi sono gli integratori alimentari, i quali, ai sensi del Decreto Legislativo 21 maggio 2004, n. 169, sono definiti *“prodotti alimentari destinati ad integrare la comune dieta e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali le vitamine e i minerali, o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico”*.

Le linee guida sopra menzionate riportano che l'evoluzione della legislazione alimentare in campo europeo ha portato ad un aumento nel numero di studi clinici di efficacia sugli alimenti per dimostrare gli effetti sulla salute ai sensi del Regolamento (CE) n. 1924/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 20 dicembre 2006, relativo alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti alimentari.

Sempre nelle linee guida succitate, per testare gli effetti benefici sulla salute di un prodotto alimentare, ai sensi della normativa vigente devono essere soddisfatti due requisiti:

- 1) ***“il prodotto oggetto dello studio deve essere effettivamente un alimento (quindi rispondere a tutta la legislazione alimentare applicabile)”***;
- 2) ***“lo studio deve essere finalizzato a dimostrare il contributo al mantenimento dell'equilibrio “omeostatico” di una determinata funzione dell'organismo, che non sia deteriorata in senso patologico o a dimostrare la riduzione di un fattore di rischio di malattia”***, secondo il modello definito dal Consiglio d'Europa *“Homeostasis, a model to distinguish between food, including food supplements, and medicinal products, 07/02/2008”* http://www.dgv.min-agricoltura.pt/xeov21/attachfileu.jsp?look_parentBoui=19553032&att_display=n&att_download=y

In quest'ambito regolatorio si colloca il presente studio clinico che soddisfa i due requisiti sopra indicati, e cioè:

1. **è condotto su un integratore alimentare**, notificato come tale al Ministero della Salute (ai sensi del DL. vo 169/2004 secondo la procedura di cui all'art. 7 del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 111 e alla Circolare 6 marzo 2008, n.4075-P.), a base di S-adenosilmetionina (SAME), *Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium longum*, ingredienti ammessi negli integratori alimentari dalla legge vigente;

2. **è finalizzato al mantenimento del normale tono dell'umore**, attraverso la riduzione della depressione sottosoglia che numerosi studi clinici definiscono come importante fattore di rischio di depressione maggiore.

L' Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha pubblicato recentemente uno studio epidemiologico sulla prevalenza e sull'incidenza della depressione maggiore a livello globale. Dai dati presentati si evince che la depressione maggiore risulta essere la maggiore causa di disabilità al mondo, contribuendo al 7,5% degli anni vissuti con disabilità.

È stato stimato che nel 2015, il numero totale di soggetti affetti da depressione maggiore abbia superato i 300 milioni, equivalenti al 4,4% della popolazione mondiale. Di questi, le donne risultano essere le più colpite (5,1%) rispetto agli uomini (3,6%). Il fenomeno è in continua crescita, in quanto è stato registrato un incremento pari al 18,4% della popolazione che soffre di depressione dal 2005 al 2015.

Il rapporto dell'Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT) del 26 luglio 2018 mostra come la depressione maggiore sia il disturbo mentale più diffuso: si stima che in Italia superino i 2,8 milioni di soggetti (5,4% delle persone di 15 anni e più), coloro che ne hanno sofferto nel corso del 2015 e siano 1,3 milioni (2,5%) coloro che hanno presentato i sintomi della depressione maggiore nelle due settimane precedenti l'intervista (https://www.istat.it/it/files/2018/07/Report_Salute_mentale.pdf).

Diversamente dalla depressione maggiore, una flessione dell'umore di lieve entità, che spesso fa seguito ad eventi di vita stressanti, non ha una rilevanza clinica tale da richiedere l'intervento di uno specialista e di un trattamento farmacologico.

Molteplici studi hanno dimostrato che l'alterazione lieve dell'umore, che viene considerata uno stato di depressione sottosoglia, è un fattore di rischio per lo sviluppo di depressione maggiore.

La correlazione tra le alterazioni dell'umore lievi (depressione sottosoglia) e le forme di depressione patologiche è dimostrata da diversi *consensus paper* e studi clinici interventistici (di seguito riportati), i quali indicano chiaramente che la depressione sottosoglia non è una patologia ma un fattore di rischio di malattia.

- In una **review del 2004, Cuijpers et al.** hanno dimostrato che i soggetti con depressione sottosoglia avevano una probabilità costantemente maggiore di sviluppare depressione maggiore rispetto ai soggetti senza depressione sottosoglia (fino allo 0,58).
- In un successivo **report del 2004, Cuijpers et al.** hanno dimostrato che il rischio di sviluppare la depressione maggiore nei soggetti con alterazioni dell'umore di lieve entità è pari a 8,0% dopo 2 anni.

- I risultati della **review di Hermens et al. del 2004** mostrano che tra le persone con depressione minore, una percentuale compresa tra 2,7 e il 27% sviluppa una forma più grave di depressione.
- **Foegel et al. nel 2006** in un follow-up di 15 anni hanno studiato in 1634 individui la relazione tra la depressione minore e la prima insorgenza del disturbo depressivo maggiore. I risultati mostrano come gli individui con una storia di depressione minore avevano una probabilità superiore a 5 di avere un episodio di depressione maggiore.
- Le **Nice Guideline del 2010** indicano che la depressione sottosoglia rappresenta un fattore di rischio per la depressione maggiore futura.
- **Naber et al. nel 2018** hanno dimostrato che il 25% dei soggetti che presentano depressione sottosoglia, nell'arco da uno a tre anni sviluppano depressione maggiore.

Un tono dell'umore lievemente alterato di carattere episodico, che non corrisponde a un disturbo dell'umore di tipo patologico (che, al contrario, è una alterazione dell'umore duratura nel tempo che interferisce sulle normali funzioni sociali e lavorative della persona), è uno stato comune e molto diffuso nella popolazione, che, per il rapporto di fiducia diretto e continuativo con il paziente, può essere intercettato quasi esclusivamente dal Medico di Medicina Generale (MMG), che può intervenire prima che tale stato evolva in uno stato patologico (Rucci et al., 2003; Fogel et al., 2006).

Poiché dagli studi sopra riportati si evince che una lieve alterazione dell'umore è un fattore di rischio di depressione maggiore, che può essere intercettato dal MMG, l'adozione di misure di prevenzione, quali il miglioramento del tono dell'umore, può evitare che un peggioramento dell'umore sfoci nel instaurarsi di una patologia.

La finalità del presente studio di efficacia è, quindi, quella di dimostrare che l'integratore alimentare oggetto di studio è utile nella riduzione di un fattore di rischio di malattia. **È pertanto una finalità salutistica (non terapeutica) compatibile con quelle potenzialmente ascrivibili ai prodotti alimentari, come previsto dalle "Linee guida Ministeriali di riferimento per gli effetti fisiologici", volti ad ottimizzare le funzioni dell'organismo nell'ambito dell'omeostasi secondo il modello definito dal Consiglio d'Europa (*Homeostasis, a model to distinguish between food, including food supplements, and medicinal products*, 07/02/2008).**

L'integratore alimentare, oggetto del presente studio clinico, è costituito da S-adenosilmetionina (SAME), *Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium longum*.

S-Adenosil Metionina (SAME)

In Italia, la S-adenosil metionina (spesso indicata come SAME) è una sostanza elencata nella lista degli “ALTRI NUTRIENTI E ALTRE SOSTANZE AD EFFETTO NUTRITIVO O FISIOLOGICO” (Revisione settembre 2019) del Ministero della Salute (http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1268_4_file.pdf), quale ingrediente autorizzato negli integratori alimentari.

SAME, molecola composta da adenosina (derivata da ATP) e metionina, è una sostanza endogena naturalmente presente nel corpo umano, principalmente sintetizzata, utilizzata e degradata nel fegato. Fino all'80% della metionina epatica viene convertita in SAME, che è fonte di glutatione, un principio antiossidante necessario per le reazioni di disintossicazione del fegato (Bottiglieri et al., 2002). È stato dimostrato che SAME aumenta il glutatione nel tessuto cerebrale, inibendo la perossidazione lipidica (De La Cruz et al., 2000), e che protegge il cervello di ratti dallo stress ossidativo associato a lesioni da ischemia e successiva riperfusione (Villalobos et al., 2000).

Da un punto di vista biochimico, SAME è il principale donatore di metile (-CH₃) nel metabolismo, che dona un gruppo metilico (metilazione) a molecole come DNA, proteine, fosfolipidi o neurotrasmettitori. La metilazione del DNA è il mezzo di controllo epigenetico dell'espressione genica. La donazione del gruppo metile trasforma SAME in SAH (S-Adenyl Homocysteine), che è un potente inibitore della metilazione. Per questo motivo, il rapporto SAME / SAH può essere utilizzato come indice del potenziale di metilazione in una cellula (Williams et al., 2010). La metilazione del DNA diminuisce con l'età, causando deregolazione cellulare. Una bassa metilazione del DNA può portare a mutazioni e instabilità cromosomica. L'eccessiva metilazione della SAME, d'altra parte, induce la sintesi di metanolo tossico, formaldeide e acido formico nel cervello (Lee, 2008).

È stato dimostrato che SAME risulta essere efficace nel miglioramento del tono dell'umore, senza effetti collaterali significativi (Papakostas et al., 2010, Sarris et al, 2016).

Probiotici

L'impiego in Italia di fermenti lattici nel settore degli integratori alimentari risale a circa 35 anni fa, quando tali prodotti, secondo la normativa vigente, venivano inclusi tra i prodotti dietetici. Oggi i probiotici sono ingredienti sia di alimenti di uso corrente sia di integratori alimentari, in accordo con quanto previsto dalle “**Linee guida su probiotici e prebiotici**” Ministero, della Salute,

DIREZIONE GENERALE IGIENE E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI E NUTRIZIONE - UFFICIO 4, Revisione marzo 2018”.

Il microbiota umano a livello gastrointestinale è costituito dai microrganismi ingeriti e residenti (Leeber et al., 2010). Esso è essenziale per la salute umana e contribuisce alla digestione dei cibi e al funzionamento ottimale del sistema immunitario (FAO, 2001). I microrganismi, riconosciuti come probiotici, sono *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. Tradizionalmente l'applicazione clinica dei probiotici include la prevenzione e il trattamento delle infezioni gastrointestinali (Borcher et al., 2009). I meccanismi di azione con cui i probiotici possono contribuire alla salute umana sono raggruppati in tre categorie; il primo riguarda la capacità dei probiotici di escludere o inibire i patogeni, ed è il meccanismo meglio studiato e con il maggior numero di referenze bibliografiche (Leeber et al., 2008). Un ulteriore meccanismo è l'attivazione della funzione della barriera intestinale con la modulazione dei *pathway* che conducono alla secrezione del muco (Mack et al., 2003), all'attivazione delle *tight junction* (Seth et al., 2008) e alla prevenzione dell'apoptosi. Inoltre, i probiotici possono modulare la risposta immune dell'ospite con un'azione sia locale sia sistemica. Oltre alle cellule epiteliali intestinali, i probiotici possono entrare in contatto con le cellule dendritiche intestinali che hanno un ruolo cruciale nell'immunità innata e adattativa.

In virtù dei benefici apportati nell'ospite, i bifidobatteri sono considerati uno dei più importanti gruppi microbici probiotici. Il loro effetto probiotico è dovuto a svariati meccanismi. Uno dei principali effetti benefici dei bifidobatteri consiste nell'abbassamento del pH del tratto ascendente del colon. Infatti, il metabolismo dei carboidrati ad opera dei *Bifidobacterium* produce principalmente acido acetico e acido lattico che inibiscono lo sviluppo di molte specie microbiche acido sensibili potenzialmente patogene, favorendone l'eliminazione. *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* sono tra i patogeni sensibili all'azione inibitoria dei bifidobatteri. Un ulteriore beneficio apportato da alcune specie i bifidobatteri consiste nella secrezione di aminoacidi e vitamine che saranno disponibili per l'utilizzo da parte del microbiota intestinale o dell'ospite. In particolare, la produzione di acido folico da parte di alcuni ceppi di *Bifidobacterium* risulta di particolare utilità nel prevenire l'insorgenza di forme neoplastiche dei colonociti (Crittenden et al., 2003).

Uno dei principali meccanismi attraverso i quali i probiotici possono influenzare positivamente la salute dell'ospite si basa sulla loro capacità di interagire con il sistema immunitario suscitando risposte sia a livello locale sia a livello sistemico (Taverniti e Guglielmetti, 2011). Numerosi studi hanno riportato la capacità dei ceppi appartenenti alla specie *L. helveticus* di esercitare effetti immunostimolatori, sia da soli sia in combinazione con altri ceppi batterici. Ad esempio, il ceppo *L. helveticus* R0052 è stato utilizzato in associazione con *B. longum* per fermentare sia una bevanda a

base di soia sia una miscela a base di latte. Quando queste miscele sono state aggiunte alle linee cellulari epiteliali intestinali HT29 e T84 prima della stimolazione con il fattore di necrosi tumorale (TNF)- α , hanno ridotto significativamente l'espressione delle chemochine interleuchina (IL)-8 (Wagar et al., 2009).

La somministrazione di latte fermentato dai ceppi di *L. helveticus* rappresenta un potenziale trattamento alternativo per la prevenzione delle infezioni enteriche, probabilmente mediato dalla produzione di composti bioattivi. È stato dimostrato che i peptidi derivati dall'elevata attività proteolitica di *L. helveticus* sulle proteine alimentari stimolano il sistema immunitario dell'ospite (Leblanc et al., 2004). I probiotici, oltre a intervenire nelle risposte immunitarie, intervengono anche in alcuni aspetti della funzionalità del nostro cervello. Esiste, infatti, un asse intestino-cervello (*gut-brain axis*) che lascia ipotizzare la potenzialità dell'impiego dei probiotici nella prevenzione e nel controllo di specifiche malattie mentali.

Per quanto sopra riportato, si ipotizza che la combinazione SAME e probiotici veicolata attraverso un integratore alimentare, possa svolgere un ruolo positivo nel mantenimento del normale tono dell'umore, apportando giovamento al soggetto che assume tale integratore.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Obiettivo primario

Un tono dell'umore lievemente alterato e di carattere episodico, che non corrisponde a un disturbo dell'umore di tipo patologico (depressione maggiore), è uno stato comune e molto diffuso nella popolazione, che, per il rapporto di fiducia diretto e continuativo con il paziente, può essere intercettato quasi esclusivamente dal Medico di Medicina Generale (MMG), che può intervenire prima che tale stato si aggravi evolvendo in uno stato patologico (Rucci et al., 2003; Fogel et al., 2006).

Questo stato, pertanto, non essendo una patologia, non richiede necessariamente l'intervento di uno specialista e di trattamenti farmacologici ed è quindi una situazione nella quale si può intervenire con **gli integratori alimentari che, come già riportato, essendo alimenti, per la legislazione vigente in Europa e in Italia, non possono svolgere effetti terapeutici, ma possono avere effetti salutistici quali di mantenimento delle normali funzioni fisiologiche e la riduzione dei fattori di rischio di malattia** (Regolamento (CE) n. 1924/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 20 dicembre 2006).

l'obiettivo primario del presente studio clinico è valutare l'efficacia dell'integratore alimentare PROBIOSITIVE, a base di S-adenosilmetionina (SAME), *Lactobacillus helveticus* e

Bifidobacterium longum nel **mantenimento del normale tono dell'umore, attraverso la riduzione della depressione sottosoglia che numerosi studi clinici definiscono come importante fattore di rischio di depressione maggiore.**

Tale valutazione sarà misurata attraverso la somministrazione ai soggetti reclutati del questionario validato “*Patient Health Questionnaire-9*” (PHQ-9), un breve questionario utilizzato in Medicina Generale (Spitzer et al, 1999), adatto sia per lo *screening* sia per il *case finding* e dell’*Hamilton Depression Rating Scale*” (HAM-D). In breve, **PHQ-9 è un questionario di autovalutazione che esplora segni e sintomi che il soggetto ha presentato nel corso delle ultime 2 settimane e, che fanno riferimento ai sintomi somatici di più frequente osservazione della pratica dei MMG, quali l’assunzione di cibo, il sonno, la sensazione di stanchezza e l’irritabilità.** Il punteggio del PHQ-9 ha un range compreso tra 0 e 27, suddivisi nei seguenti cinque livelli (Biggio et al., 2017):

- 0-4: soggetto in salute non depresso;
- 5-9: depressione sottosoglia subsindromica, con sintomi depressivi minimi;
- 10-14: depressione lieve;
- 15-19: depressione moderata;
- ≥ 20 : depressione severa.

Obiettivo secondario

L’obiettivo secondario del presente studio è valutare se l’integratore alimentare PROBIOSITIVE, a base di S-adenosilmetionina (SAME), *Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium longum*, può essere efficace nel ripristino delle concentrazioni di cortisolo ed epinefrina nelle urine, essendo questi parametri biologici associati alle risposte acute dello stress psicologico.

I risultati di tali analisi, qualora siano promettenti, potrebbero essere utilizzati come prova di supporto per una valutazione oggettiva del mantenimento del normale tono dell’umore.

DISEGNO DELLO STUDIO

Verrà condotto uno studio clinico monocentrico, randomizzato, controllato, a gruppi paralleli, *cross-over*, in doppio cieco, secondo lo schema riportato in Figura 1.

I gruppi sperimentali saranno i seguenti:

Gruppo 1 → soggetti che assumeranno il trattamento quotidianamente.

Gruppo 2 → soggetti che assumeranno il placebo quotidianamente.

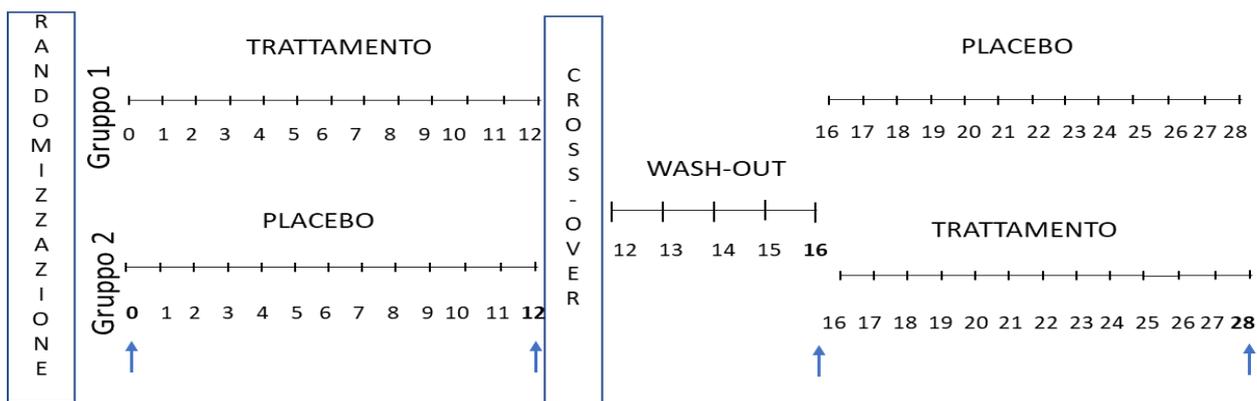


Figura 1.

Ad ogni mese (dal t0), ai soggetti reclutati verrà consegnato l'integratore alimentare o il placebo (a seconda del gruppo di appartenenza), in dosaggio pari a un mese di assunzione.

I soggetti reclutati →

- **Compileranno il questionario *Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9)* e *l'Hamilton Depression Rating Disease (HAM-D)* nello studio medico del Dott. Agostino Greco ad ogni visita di controllo (t0 t12 t16 t28)**
- **Effettueranno le analisi delle urine (t0 t12 t28) per la determinazione di:**
 - **Cortisolo**
 - **Epinefrina**

CRITERI DI INCLUSIONE

- Consenso informato firmato
- Età compresa tra 18-65 anni
- Soggetti che lamentano un'alterazione del tono dell'umore
- Soggetti che non sono eleggibili per l'assunzione di farmaci antidepressivi
- Soggetti capaci di comprendere e rispettare i requisiti del protocollo

CRITERI DI ESCLUSIONE

- Soggetti che al momento del reclutamento, sono in remissione o hanno sofferto di depressione maggiore negli ultimi anni.
- Soggetti che hanno assunto nelle 12 settimane precedenti al reclutamento prodotti, farmaci o integratori alimentari con attività sulla funzione psicologica.
- Soggetti affetti da patologie che coinvolgono il sistema cardiovascolare, epatico, renale, respiratorio, nervoso o linfatico.
- Soggetti affetti da ipotiroidismo.
- Donne in gravidanza.
- Soggetti che hanno assunto farmaci inibitori delle monoamminossidasi nei 14 giorni precedenti al reclutamento

DIMENSIONE DEL CAMPIONE – POWER ANALYSIS

L'analisi più appropriata per un disegno *cross-over* come quello proposto per questo studio è una analisi della varianza per misure ripetute entro soggetto in cui si valuta il cambiamento del punteggio del questionario tra il gruppo controllo e il gruppo trattato, tenendo conto che ogni paziente ha risposto a entrambi. Le assunzioni per la power analysis sono state le seguenti:

- 1) **disegno bilanciato** (lo stesso numero di pazienti per ciascun gruppo sperimentale, garantito dal fatto che il disegno *cross-over* tratta ciascun soggetto sia con il placebo, sia con l'integratore);
- 2) La stima dell'**effect size** è stata effettuata tenendo presente che in base allo studio di Saccarello et al. (2020) in cui la somministrazione di integratori ha determinato un miglioramento del tono dell'umore dei soggetti reclutati superiore del 7,7% rispetto al trattamento con il placebo. Tali dati fanno pensare che l'effect size per lo studio in questione possa essere ritenuto medio, secondo quanto proposto da Cohen (1969, *Statistical power analysis for the behavioural sciences*. New York: Academic Press). Tenendo presente che Cohen ha suggerito di utilizzare valori di effect size pari a $f = 0.25$ per effetti medi, si è deciso per il presente studio di adottare valori di effect size pari a $f=0.20$, $f=0.25$ e $f=0.30$;
- 3) la **correlazione delle misure entro soggetto** è stata fissata a $r=0.5$;
- 4) sono stati scelti tre **valori di potenza** ($1-\beta$) pari a 0.80, 0.95 e 0.99;
- 5) il **livello di significatività** (α) è stato scelto pari a 0.05.

Nella seguente tabella si riportano le dimensioni campionarie complessive (**trattamento+controllo**). Tenendo conto del **disegno cross-over**, i valori indicati in tabella devono essere dimezzati.

| Effect size | (1- β)= 0.80 $\alpha =0.05$ | (1- β)= 0.95 $\alpha =0.05$ | (1- β)= 0.99 $\alpha =0.05$ |
|------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| f=0.30 (grande) | 68 | 110 | 154 |
| f=0.25 (medio) | 98 | 158 | 224 |
| f=0.20 (piccolo) | 150 | 246 | 348 |

In considerazione della tipologia di studio previsto, e, in particolare delle accortezze che saranno utilizzate per ridurre l'effetto placebo, fra cui il disegno *cross-over*, è possibile ridurre la numerosità campionaria della popolazione da 158 a **80 soggetti (40 soggetti a gruppo)**.

DURATA DELLO STUDIO

Lo studio inizierà dopo parere positivo del Comitato Etico, e terminerà dopo che sarà stato arruolato l'ultimo soggetto e che saranno state eseguite le ultime analisi.

I soggetti potranno, in qualsiasi momento, ritirarsi dallo studio senza dare alcuna motivazione.

I soggetti dovranno essere esclusi dallo studio nel caso si verificano i seguenti casi:

- ritiro del consenso da parte del soggetto;
- quando si verifica un criterio di esclusione clinicamente rilevante che può influenzare la salute del soggetto;
- decisione dello sperimentatore principale.

I soggetti non aderenti al protocollo (assunzione del trattamento o del placebo in modalità errata/sovraddosaggio/mancata assunzione e/o mancata presenza alle visite di controllo), in accordo con il principio dell'*intention to treat* saranno inclusi nell'analisi finale dei dati. Infatti, come riportato nel punto 16 del CONSORT, il numero dei partecipanti in ciascun gruppo di assegnazione è un elemento fondamentale per l'analisi dei dati, e, al fine di preservare integralmente i benefici della randomizzazione saranno inclusi nell'analisi tutti i pazienti randomizzati, ovvero tutti quelli originariamente presenti nei gruppi di assegnazione.

Se il soggetto non si attiene alle indicazioni dello studio, lo sperimentatore dovrà determinarne le ragioni e le circostanze in modo accurato e completo.

TRATTAMENTO IN STUDIO

Probiotive

Integratore alimentare a base di S-Adenosil-L-Metionina (SAME), Miscela di fermenti lattici, Magnesio ossido e Vitamina B6 sotto forma di granulato orosolubile in stick-pack.

Entrambi gli interventi (trattamento e placebo) saranno forniti a ciascun partecipante in forma esclusivamente gratuita. Lo studio clinico non prevede che vengano svolti altri trattamenti con integratori alimentari o alimenti funzionali con comprovata azione sul tono dell'umore.

Si specifica che il placebo, in quanto tale, è privo dei componenti bioattivi oggetto di studio, e pertanto ad esso non possono essere attribuiti effetti migliorativi sul tono dell'umore.

METODI

Prima di descrivere i metodi impiegati nel presente studio clinico, si specifica quanto segue:

1) in base all'art. 1 comma 2 del **D.M 10 maggio 2001** "Sperimentazione clinica controllata in Medicina Generale ed in Pediatria di libera scelta": "*Le sperimentazioni di cui al presente decreto si riferiscono alle affezioni non richiedenti ricovero ospedaliero largamente diffuse sul territorio nei riguardi delle quali si ritengano opportune sperimentazioni controllate da condurre completamente o parzialmente in sede extra ospedaliera con il coinvolgimento dei MMG e dei PLS*".

2) **sempre lo stesso D.M.** recita che: "*I MMG e i PLS, inclusi negli appositi registri delle ASL, sono autorizzati dal direttore generale della stessa azienda ASL, previo parere del proprio Comitato Etico o di quello di riferimento individuato dalla regione, a condurre le sperimentazioni di cui al punto 1.1. Il direttore generale autorizza la sperimentazione ove non sia in contrasto o di ostacolo alle priorità assistenziali e programmatiche della propria azienda.*"

3) **Al punto 1.4. del sopra citato D.M.** si riporta che "*Le attività di sperimentazione possono essere condotte presso gli ambulatori dei medici singoli e/o associati dotati delle caratteristiche (logistica, strumentazione, ecc.) minime necessarie alla conduzione della sperimentazione nel rispetto del protocollo di studio, dei principi di Buona Pratica Clinica (ICH-GCP).*"

4) **Infine, sempre lo stesso D.M. recita al punto 3. Ruolo e compiti delle ASL nella sperimentazione in MG e PLS,** comma 3.1 "*che sarà compito di ogni ASL.....verificare la sussistenza delle caratteristiche di cui al punto 1.4.*" sopra riportato

Stante la legge vigente sopra riportata,

si comunica che i soggetti saranno reclutati dal dott. **Agostino Greco, Medico di Medicina Generale abilitato alla sperimentazione clinica finalizzata al miglioramento della pratica clinica, quale parte integrante dell'assistenza sanitaria e il cui nominativo è incluso nell'apposito Registro**

dell'ASL di Caserta come previsto dall'art. 1 comma 2 del **D.M 10 maggio 2001** “Sperimentazione clinica controllata in medicina generale ed in pediatria di libera scelta”

Relativamente al luogo dove si svolgerà lo studio, si precisa che, come prescritto al punto 1.4 del **D.M 10 maggio 2001 sopra citato, lo studio clinico si svolgerà presso lo studio medico del Dott. Agostino Greco, sito in via Tommaso Picazio, 26 81100 Caserta**, che possiede le caratteristiche minime necessarie per la conduzione della presente sperimentazione nel rispetto dei principi di Buona Pratica Clinica (GCP- ICH) e nel pieno rispetto della legislazione vigente.

I soggetti reclutati assumeranno durante lo studio una bustina al mattino dopo il primo pasto giornaliero dell'integratore alimentare PROBIOSITIVE prodotto dallo stabilimento autorizzato dal **Ministero della Salute secondo le disposizioni di cui all'art. 10 del Decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 111, TRUFFINI & REGGE' FARMACEUTICI S.R.L.**

Tale integratore alimentare è notificato al Ministero della Salute, ai sensi del DL. vo 169/2004 secondo la procedura di cui all'art. 7 del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 111 e alla Circolare 6 marzo 2008, n.4075-P.

Prima di essere inseriti nello studio, ai soggetti consenzienti, sarà consegnato:

- 1) il foglio informativo, allegato alla presente documentazione, con chiare informazioni riguardanti lo studio clinico, gli obiettivi e le modalità di realizzazione;
- 2) il consenso informato, allegato alla presente documentazione, che verrà compilato con i dati dei soggetti, da essi firmato e controfirmato dallo sperimentatore.

I soggetti reclutati si recheranno presso il Laboratorio Sanitario San Carlo Srl, Via S. Carlo, 18, 81100 Caserta, per effettuare le analisi delle urine (secondo i tempi riportati nel paragrafo DISEGNO DELLO STUDIO).

A questo proposito si segnala che il laboratorio è certificato UNI EN ISO 9002 e dal 2002 UNI EN ISO 9001:2000 e dispone di un locale dove verranno appositamente conservati i campioni di urina, che saranno conservati per 2 mesi dalla conclusione dello studio. Si specifica che i suddetti campioni di urina saranno conservati per l'obiettivo secondario e, trascorso tale periodo di tempo, saranno distrutti.

RANDOMIZZAZIONE

La sequenza di randomizzazione sarà generata da uno statistico utilizzando il *software* STATA 16 (*Stata Statistical Software: Release 16*. College Station, TX: StataCorp LLC), e i soggetti saranno assegnati a ciascuno dei due gruppi di trattamento (integratore alimentare a base di S-adenosilmetionina (SAME), *Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium longum*; o placebo) in maniera casuale ed imprevedibile mediante una randomizzazione semplice (rapporto di allocazione 1:1). Tale procedura consentirà di minimizzare il “*selection bias*”, ossia differenze sistematiche tra le caratteristiche di base dei gruppi a confronto (sbilanciamento prognostico e di risposta al trattamento). L’occultamento della lista di randomizzazione proteggerà la sequenza di allocazione sino all’assegnazione, e sarà conservata in un luogo inviolabile dello studio medico del dott. Agostino Greco. Sia la generazione della sequenza di allocazione, sia la lista di randomizzazione, saranno separate dall’implementazione della lista ai gruppi di intervento attraverso l’utilizzo di buste chiuse. Tali buste saranno preparate da una segretaria del dott. Agostino Greco non coinvolta nel trial da un punto di vista clinico, dovranno essere opache, sigillate, pinzate e numerate in ordine conforme a quello della lista di randomizzazione, e successivamente conservate in un armadio sigillato. Lo sperimentatore che arruolerà i soggetti, e che consegnerà loro uno dei due trattamenti a confronto aprendo di volta in volta la busta successiva, resterà all’oscuro della lista di randomizzazione.

MASCHERAMENTO (BLINDING)

Lo studio sarà in *double-blind* in quanto né il medico sperimentatore, né il soggetto arruolato, sarà a conoscenza di quale sia l’integratore alimentare PROBIOSITIVE e quale sia il placebo.

I due trattamenti saranno resi irriconoscibili in quanto il packaging sarà identico, e il granulato orosolubile sarà uguale per colore, forma e sapore.

PERIODO DI WASH-OUT

Al termine del primo trattamento, i soggetti appartenenti a entrambi i bracci dello studio saranno sottoposti a un periodo di 4 settimane, in cui non riceveranno alcun trattamento, al fine di evitare l’incorrere dell’effetto *carry-over*, definito come l’effetto del trattamento del periodo di tempo precedente sulla risposta del periodo di tempo corrente. Il fenomeno del *carry-over* produrrebbe delle distorsioni nell’analisi statistica che influirebbero negativamente sulla veridicità del risultato.

CROSS-OVER

I soggetti assegnati al gruppo trattato saranno riassegnati al gruppo controllo e viceversa, secondo un disegno *cross-over*.

METODI CONTRACCETTIVI E GRAVIDANZA

Per tutta la durata dello studio e per almeno quattro settimane dopo l'ultima dose dell'integratore alimentare PROBIOSITIVE, tutti i pazienti in età fertile e sessualmente attivi dovranno utilizzare un metodo contraccettivo durante i rapporti sessuali, e durante questo periodo sarà consigliato sia alle donne sia agli uomini di non donare rispettivamente ovuli o sperma.

RACCOLTA DEI DATI

La raccolta dei dati sarà eseguita attraverso degli appositi moduli (Case Reporting Form - CRF) divisi in due sezioni principali. Una prima sezione sarà relativa ai dati personali, all'anamnesi del paziente, all'assunzione di eventuali farmaci concomitanti, e al gruppo di trattamento (integratore alimentare PROBIOSITIVE o placebo), e dovrà essere compilata al momento dell'arruolamento (t0). Invece, la seconda sezione dovrà essere compilata durante le visite di controllo, e riguarderà la compliance al trattamento, le eventuali variazioni di dosaggio, i questionari di autovalutazione, ed eventuali eventi avversi verificatisi durante il periodo di studio. Il medico riporterà nel CRF anche il risultato delle analisi delle urine riguardante i livelli di cortisolo ed epinefrina.

RISCHI E BENEFICI

I soggetti saranno continuamente monitorati e, nel caso si verificassero durante lo studio effetti indesiderati in base alle attuali conoscenze non prevedibili, dato che l'integratore alimentare è costituito da ingredienti ammessi in questa tipologia di alimenti, il soggetto dovrà uscire dallo studio.

Si ipotizza, invece, una ottimizzazione del tono dell'umore dei soggetti arruolati.

EVENTI AVVERSI

Sarà annotato l'eventuale uso di farmaci del soggetto e gli eventuali effetti avversi manifestati.

Ad ogni visita di controllo il medico annoterà sulla scheda del paziente anamnesi, patologie remote e prossime, e il punteggio del questionario di valutazione.

ANALISI STATISTICA

Per ognuna delle misurazioni nei due gruppi sperimentali sarà dapprima effettuata un'analisi descrittiva con il calcolo di media, mediana, deviazione standard, intervallo min-max e intervallo di confidenza al 95% per tutte le variabili di risposta prese in esame. L'identità del paziente sarà utilizzata come fattore random per tenere conto di eventuali differenze riconducibili esclusivamente alla soggettività del paziente e di eliminarle dal modello, aumentandone potenza e precisione. Per ciascuna variabile di risposta sarà condotta una analisi indipendente.

INFORMAZIONE AL PAZIENTE E CONSENSO INFORMATO

I soggetti, prima di essere arruolati nello studio clinico, verranno informati circa le finalità del progetto. L'informazione al paziente verrà fornita con apposito modulo in forma comprensibile per poter esprimere un consenso informato scritto e firmato. Lo sperimentatore, controfirmato il modulo stesso, dovrà dare una copia del consenso informato al soggetto e conservare l'originale. Il foglio di informazione per il soggetto e il modulo di consenso verranno valutati e approvati dal Comitato Etico durante l'esame del protocollo di studio.

A ogni soggetto arruolato sarà sottoposto un consenso informato scritto preceduto da una chiara descrizione dell'obiettivo dello studio.

Il soggetto compilerà con i propri dati e firmerà il modulo del consenso, che verrà controfirmato dallo sperimentatore.

La firma del consenso informato avverrà come previsto dal Regolamento (UE) 2016/679.

ASPETTI ETICI E PROTEZIONE DEI PAZIENTI ARRUOLATI

Lo sperimentatore principale si assicurerà che la ricerca sia condotta secondo il protocollo seguendo le procedure e le istruzioni fin qui descritte.

Lo sperimentatore principale coordinerà gli aspetti clinici e verificherà che lo studio clinico sia condotto secondo le Norme di Buona Pratica Clinica della Unione Europea (Direttiva 2001/20/EEC) in conformità con la corrente Dichiarazione di Helsinki concernente la ricerca medica sugli umani (Helsinki 1964, modificata da: Tokyo 1975, Venezia 1983, Hong Kong 1989, Somerset West 1996 ed Edinburgo), e le linee guida per la buona pratica clinica (CPMP/ICH/ 135/95).

Al fine di garantire la conformità al protocollo, alla buona pratica clinica (GCP) e ai requisiti normativi, verrà assicurato un monitoraggio continuo, sia durante lo studio sia al suo termine.

SPERIMENTATORE PRINCIPALE

| |
|--|
| Agostino Greco |
| Via Tommaso Picazio, 26 81100 Caserta |

CENTRI PARTECIPANTI

Studio medico sito in via Tommaso Picazio, 26 81100 Caserta.

RISERVATEZZA DEI DATI

I dati clinici saranno trattati secondo le disposizioni vigenti in materia di *privacy* e i dati clinici dei singoli pazienti saranno trattati anonimamente. I dati dello studio immessi in computer saranno conservati osservando le leggi vigenti sulla *privacy* come previsto dal Regolamento (UE) 2016/679. Gli sperimentatori conserveranno una lista dei pazienti in modo che sia possibile la loro identificazione (D.L. 52/2008). I dati clinici saranno oggetto di pubblicazioni scientifiche e relazioni congressuali.

Per l'elaborazione dei dati il data-base sarà affidato a un biometrista che provvederà alla produzione di un report statistico con i dati ottenuti dallo studio clinico.

BIBLIOGRAFIA

- Biggio, G. et al. Depressione dell'anziano nell'ambulatorio del medico di medicina generale: dai sintomi alla terapia. Rivista Società Italiana di Medicina Generale N.1, 1-19, 2017.
- Borchers, AT, Selmi C, Meyers FJ et al. Probiotics and immunity. J. Gastroenterol. 2009. 44: 26-46.
- Bottiglieri, T. S-Adenosyl-L-methionine (SAME): From the Bench to the Bedside--Molecular Basis of a Pleiotrophic Molecule. Am J Clin Nutr. 200276(5):1151S-7S.
- Crittenden RG , Martinez NR , Playne MJ. Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria International Journal of Food Microbiology. 2003. 80: 217–222.
- Cuijpers P, Smith F. Subthreshold depression as a risk indicator for major depressive disorder: a systematic review of prospective studies. Acta Psychiatr Scand. 2004. 109:325-331
- Cuijpers, P., De Graaf, R., Van Dorsselaer, S., 2004. Minor depression: risk profiles, functional disability, health care use and risk of developing major depression. J. Affect. Disord. 79, 71–79.
- De La Cruz JP, Pavía J, González-Correa JA, et al. Effects of chronic administration of S-adenosyl- L-methionine on brain oxidative stress in rats Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2000. 361:47-52.
- Fogel J, Eaton WW, Ford DE. Minor depression as a predictor of the first onset of major depressive disorder over a 15-year follow-up. Acta Psychiatr Scand. 2006;113:36-43.

- Hermens, M.L.M., Van Hout, H.P.J., Terluin, B., Van Der Windt, D.A.W.M., Beekman, A.T.F., Van Dyck, R., De Haan, M., 2004. The prognosis of minor depression in the general population: a systematic review. *Gen. Hosp. Psychiatry* 26, 453–462.
- Validation and utility of a self-report version of PRIMEMD: the PHQ primary care study. *Primary Care Evaluation of Mental Disorders. Patient Health Questionnaire. JAMA* 1999;282:1737-44
- LeBlanc J, Fliss I, Matar C. Induction of a Humoral Immune Response following an Escherichia coli O157:H7 Infection with an Immunomodulatory Peptidic Fraction Derived from Lactobacillus helveticus-Fermented Milk. *Clinical and Diagnostic laboratory Immunology* . 2004:1171–1.
- Lee ES, Chen H, Hardman C, et al. Excessive S-Adenosyl-L-Methionine-Dependent Methylation Increases Levels of Methanol, Formaldehyde and Formic Acid in Rat Brain Striatal Homogenates: Possible role in S-adenosyl-L- methionine-induced Parkinson’s disease-like disorders *Life Sci.* 2008. 83: 821–827.
- Mack DR, Ahrne S, Hyde L, et al. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut.* 2003. 52: 827–833.
- Marlous Tuithof, Margreeten Have, Saskiavan Dorsselaer, Marloes Kleinjan, Aartjan Beekman, Ronde Graafa. Course of subthreshold depression into a depressive disorder and its risk factors. *J Affect Disord.* 2018 Dec 1;241:206-215.
- Naber D, Bullinger M. Should antidepressants be used in minor depression? *Dialogues in Clinical Neuroscience.* 2018. 20(3): 223-229
- National Collaborating Centre for Mental Health (UK) and British Psychological Society. *Depression in Adults with a Chronic Physical Health Problem: Treatment and Management. NICE Clinical Guidelines.* 2010. N. 91
- Papakostas GI, Mischoulon D, Shyu I, et al. S-Adenosyl Methionine (SAME) Augmentation of Serotonin Reuptake Inhibitors for Antidepressant Nonresponders With Major Depressive Disorder: A Double-Blind, Randomized Clinical Trial. *Am J Psychiatry* 2010; 167:942–948.
- Rucci P, Gherardi S, Tansella M, et al. Subthreshold psychiatric disorders in primary care: prevalence and associated characteristics. *J Affect Disord.*2003;76: 171–181
- Sarris J, Murphy J, Mischoulon D, Papakostas GI, Fava M, Berk M, et al. Adjunctive Nutraceuticals for Depression: A Systematic Review and Meta-Analyses. *Am J Psychiatry.* 2016 Jun 1;173(6):575-87.
- Saccarello A, Montarsolo P, Massardo I, et al. Oral Administration of S-Adosylmethionine (SAME) and Lactobacillus Plantarum HEAL9 Improves the Mild-To-Moderate Symptoms of Depression: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Prim Care Companion CNS Disord.* 2020;22(4).
- Seth A, Yan F, Polk DB, Rao RK. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2008. 294: G1060-G1069.
- Spitzer RL, Kroenke K, Williams JB. Validat.
- Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr.* 2011. 6:261–274.
- Villalobos MA, DeLaCruz JP, Cuerda MA. Effect of S-adenosyl-L-methionine on rat brain oxidative stress damage in a combined model of permanent focal ischemia and global ischemia-reperfusion. *Brain Res.* 2000. 883: 31–40.

- Wagar LE, Champagne CP, Buckley ND, Raymond Y, Green-Johnson JM. Immunomodulatory properties of fermented soy and dairy milks prepared with lactic acid bacteria. *J Food Sci.* 2009. 74(8): M423-430.
- Williams KT. Homocysteine metabolism and its relation to health and disease. 2010. 36(1):19-24.

PROTOCOL

TITLE

Double-blind, randomized, parallel-group, monocentric, placebo-controlled cross-over clinical trial on the effect of a food supplement based on S-adenosyl methionine and probiotics to promote normal mood by reducing subthreshold depression as a risk factor for major depression

The undersigned, as shown below, confirms that this study will be carry out in according to following protocol.

| Surname and name | Address |
|--------------------|--|
| Dr. Agostino Greco | Via Tommaso Picazio, 26 81100 Caserta Italy |

BACKGROUND

Subthreshold depression (SD) is defined by the presence of two or more depressive symptoms for 2 weeks and does not meet the criteria for diagnosis of major depressive disorder (MDD) and /or dysthymia (a milder but long-lasting form of depression), although it may have a significant impact on the quality of life. S-adenosylmethionine (SAME) has a significant mood enhancing potential. Its effectiveness as an antidepressant has been shown by a number of clinical studies where it was used alone to combat mild to moderate depressive symptoms or in combination with traditional antidepressant medications in a moderate to severe course of disease. Differently from the other antidepressant drugs, SAME is not associated with sexual and cognitive/memory dysfunction. In the light of available evidence, it is best to use SAME in patients with mild to moderate depression, rather rely on conventional antidepressant medicines, which may increase the risk of toxicity in such patients. Probiotics are health-promoting live microorganisms and are used to balance gut dysbiosis (bacteria imbalance), which may be associated with several intestinal and extraintestinal disorders. Certain probiotic species have been proved in clinical studies to have considerable antidepressant effects. The aim of this study is to find out whether supplementation with SAME and probiotics is an effective treatment for depressive symptoms in patients with SD.

PRIMARY AND SECONDARY OUTCOMES

Primary outcome measure

Subthreshold depression as a risk factor for major depression, measured by the Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) and Hamilton Depression Rating Scale (HAM-D21) at t0, t12, t16, t28.

Secondary outcome measures

Urinary cortisol and epinephrine concentration assessed by urine analysis at t0, t12, t28.

Baseline = t0, after 12 weeks of treatment = t12, after 16 weeks (4 weeks of wash-out) = t16 and after 28 weeks of the other treatment = t28

STUDY DESIGN

A monocentric, randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over clinical trial will be performed as reported in figure 1.

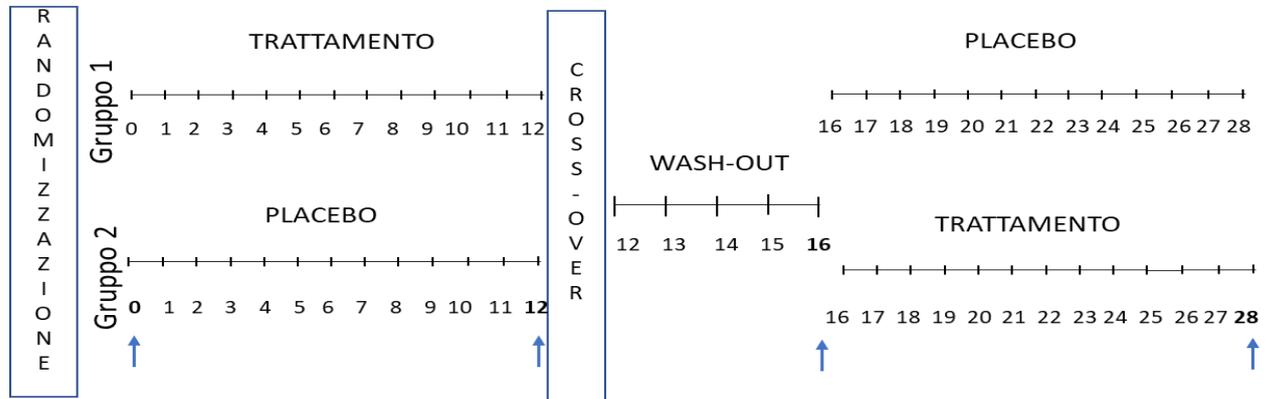


Figura 1. Study design

POPULATION AND NUMBER OF SAMPLES

Sample sizes

The sample size calculation was made using three $1-\beta$ power values and a significance level $\alpha = 0.05$.

| Effect size | $(1-\beta)= 0.80$ | $(1-\beta)= 0.95$ | $(1-\beta)= 0.99$ |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | $\alpha =0.05$ | $\alpha =0.05$ | $\alpha =0.05$ |
| f=0.30 (grande) | 68 | 110 | 154 |
| f=0.25 (medio) | 98 | 158 | 224 |
| f=0.20 (piccolo) | 150 | 246 | 348 |

Taking into account the cross-over design, the values indicated in the table must be halved.

The sample size was determined to be 80 subjects (40 subjects per group).

STATISTICAL ANALYSIS

The statistical analysis used for the study was the F test – ANOVA repeated measures, within-between effects. The factors used in the analysis were: effect between subject (2 levels: PLACEBO, TREATMENT) and effect within subject.

BLINDING

The study will be double-blind as neither the investigating physician nor the enlisted subject will know which treatment and which placebo.

The two treatments will be made unrecognizable, in fact the packaging will be identical, and the treatments will be the same in color and taste.

DURATION OF STUDY

The clinical trial will be submitted to the local Ethics Committee for approval. The beginning of study is possible after approval of Ethics Committee and it will be closed after the enrollment of all patients and the conclusion of all analysis.

The subjects involved, at any time, can withdraw from the study without providing a motivation.

The subjects enrolled in study will be excluded if the following cases occur:

- subjects withdrawal their consent
- when a clinically relevant exclusion criterion occurs, which may influence the health of the subject;
- non-compliance of the subject with the protocol;
- decision of the principal investigator;

If the subject is not relevant to the indications of the study, the investigator will determine the reasons and circumstances accurately and completely.

INCLUSION CRITERIA

1. Male and female in the age range 18 to 65 years

2. Subjects who present altered mood tone
3. Subjects not eligible for antidepressant drugs
4. Subjects capable of understanding and complying with the requirements of the protocol

EXCLUSION CRITERIA

1. Subjects with major depression remission or who have suffered from major depression in recent years
2. Individuals who have taken products, drugs or dietary supplements with psychological function activities in the 12 weeks prior to recruitment
3. Subjects suffering from diseases involving the cardiovascular, hepatic, renal, respiratory, nervous or lymphatic system
4. Subjects suffering from hypothyroidism
5. Pregnant women and those who have taken monoamine oxidase inhibitors in the 14 days prior to the recruitment

METHODS

Subjects enrolled by Dott. Agostino Greco, operating in Caserta ASL area, will be divided in two groups. In particular, subjects assuming the daily dose of a food supplement containing SAME and probiotics (group 1) and subjects assuming placebo (group 2).

Subjects will be enrolled for the study following inclusion and exclusion criteria, previously described.

Before being included in the study, the consenting subjects will be delivered:

- 1) information sheet, with clear information regarding the clinical study, objectives and methods of implementation;
- 2) informed consent, which will be filled in with the subjects' data, signed by them and countersigned by the investigator.

Participants will undergo four visits (baseline = t0, after 12 weeks = t12, after 16 weeks (4 weeks of wash-out) = t16 and after 28 weeks = t28, in an outpatient setting. After each clinical visit, all data are filled in the CRF by physicians.

In detail, the data acquired are:

Baseline visit (t0): signature of informed consent; information on the sociodemographic, clinical and symptomatologic characteristics of the participants; PHQ-9 questionnaire; HAM-D questionnaire, urine analysis for the determination of cortisol and epinephrine.

After 12 weeks of treatment (t12): assessment of possible adverse reaction; PHQ-9 questionnaire; HAM-D questionnaire, urine analysis for the determination of cortisol and epinephrine.

After 16 weeks - t16 (4 weeks of wash-out)): PHQ-9 questionnaire; HAM-D questionnaire.

After 28 weeks of the other treatment (t28): assessment of possible adverse reaction; PHQ-9 questionnaire; HAM-D questionnaire, urine analysis for the determination of cortisol and epinephrine.

RANDOMISATION

The randomization sequence will be generated by a statistician using STATA 16 software (Stata Statistical Software: Release 16. College Station, TX: StataCorp LLC), and subjects (compliant to the inclusion and exclusion criteria) will be assigned to each of the two treatment groups (ALA and placebo) randomly and unpredictably by simple randomization (1:1 allocation ratio). The randomization code will consist of a three-digit number as indicated in the respective Case Report Form (CRF).

DATA COLLECTION

The data collection will be carried out through the appropriate forms (Case Reporting Form - CRF) divided into two main sections. A first section will be related to personal data, the patient's medical history, the intake of any concomitant drugs, and the treatment group (food supplement or placebo) and must be completed at the enrolment. Instead, the second section should be completed at the control visit.

BENEFIT

Participants taking part in this study should have a benefit regarding their mood. Subjects will be continuously monitored during the entire study.

SAFETY

The safety will be evaluated by reports of suspected AEs collected within the form based on the schedule used by of the Italian National Institute of Health, Ministry of Health (www.vigierbe.it), and by the determination of a possible hepatic and/or renal toxicity.

INFORMATION TO THE PATIENT AND INFORMED CONSENT

The subjects, before being enrolled in the clinical study, will be informed about the aims of the project. The information to the patient will be provided with an appropriate form in a comprehensible form in order to express an informed written and signed consent. The investigator, countersigned the form itself, should give a copy of the informed consent to the subject and keep the original. The subject information sheet and consent form will be evaluated and approved by the Ethics Committee during the examination of the study protocol. Each person enrolled will be given informed written consent preceded by a clear description of the purpose of the study. The subject will fill in their data and sign the consent form, which will be countersigned by the investigator.

Informed consent will be signed in accordance with Regulation (EU) 2016/679.

ETHICAL ASPECTS AND PROTECTION OF PATIENTS ENROLLED

The principal investigator shall ensure that the research is conducted according to the protocol following the procedures and instructions described above. The principal investigator will coordinate the clinical aspects and verify that the clinical trial is conducted in accordance with the European Union's Good Clinical Practice Standards (Directive 2001/20/EEC) in accordance with the current Helsinki Declaration on Human Medical Research (Helsinki 1964, as amended by: Tokyo 1975, Venice 1983, Hong Kong 1989, Somerset West 1996 and Edinburgh), and guidelines for good clinical practice (CPMP/ICH/ 135/95). In order to ensure compliance with the protocol, good clinical practice (GCP) and regulatory requirements, authorized personnel of the Department of Pharmacy will ensure continuous monitoring, both during and after the study.

PRINCIPAL INVESTIGATOR

| |
|--|
| Dott. Agostino Greco |
| Address: Via Tommaso Picazio, 26 81100 Caserta, Italy. |
| e-mail: agostino.greco@alice.it |

PARTECIPATING CENTERS

Comegen, medical office of Dott. Agostino Greco, operanting in CASERTA ASL area.

CONFIDENTIALITY OF DATA

Clinical data will be processed in accordance with current privacy regulations and clinical data of individual patients will be processed anonymously. The study data entered into the computer will be stored in accordance with applicable privacy laws as provided in the Regulation (EU) 2016/679. The investigators will keep a list of patients so that they can be identified (D.L. 52/2008). The clinical data will be report in scientific publications and conference reports. The data processing will take place at the Department of Pharmacy of the University of Naples Federico II and the database will be entrusted to a biometrician who will produce a statistical report with the data obtained from the clinical study.