

# **PROTOCOLLO**

## **TITOLO**

**Studio sull'efficacia e la sicurezza dell'acido  $\alpha$ -lipoico somministrato per via orale nella riduzione del dolore in diversi setting clinici: studio clinico monocentrico, controllato, randomizzato, a gruppi paralleli, in doppio cieco.**

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

Cognome e nome	Indirizzo	Telefono
Dott. Gaetano Piccinocchi	Viale Maria Bakunin, 41 Napoli 80126	081/6174566

## Sommario

<u>PREMESSA</u> .....	3
<u>RAZIONALE DELLO STUDIO CLINICO</u> .....	4
<u>OBIETTIVI DELLO STUDIO</u> .....	9
<u>Obiettivo primario</u> .....	9
<u>Obiettivo secondario</u> .....	10
<u>DISEGNO DELLO STUDIO</u> .....	10
<u>CRITERI DI INCLUSIONE</u> .....	12
<u>CRITERI DI ESCLUSIONE</u> .....	12
<u>DIMENSIONE DEL CAMPIONE – POWER ANALYSIS</u> .....	13
<u>DURATA DELLO STUDIO</u> .....	18
<u>TRATTAMENTI IN STUDIO</u> .....	19
<u>METODI</u> .....	19
<u>RANDOMIZZAZIONE</u> .....	20
<u>MASCHERAMENTO (BLINDING)</u> .....	21
<u>METODI CONTRACCETTIVI E GRAVIDANZA</u> .....	21
<u>RACCOLTA DEI DATI</u> .....	22
<u>RISCHI</u> .....	22
<u>EVENTI AVVERSI</u> .....	23
<u>ANALISI STATISTICA</u> .....	23
<u>INFORMAZIONE AL PAZIENTE E CONSENSO INFORMATO</u> .....	23
<u>ASPETTI ETICI E PROTEZIONE DEI PAZIENTI ARRUOLATI</u> .....	24
<u>SPERIMENTATORE PRINCIPALE</u> .....	24
<u>CENTRI PARTECIPANTI</u> .....	24
<u>RISERVATEZZA DEI DATI</u> .....	25

## PREMESSA

L'acido  $\alpha$ -lipoico (acido 1,2-ditiolano-3-pentanoico o acido tiotico - ALA) è una sostanza endogena essendo prodotta nel fegato a livello mitocondriale dall'organismo umano a partire da cisteina, quale fonte di zolfo, e acido ottanoico. Poiché presenta un carbonio chirale, ALA è costituito da due enantiomeri, R ed S, di cui la forma R, presente in natura, a differenza della forma S che è solo di sintesi, risulta quella biologicamente più attiva.

ALA è cofattore in numerose vie metaboliche: 1) interviene nel ciclo di Krebs, catalizzando la decarbossilazione ossidativa del piruvato, come cofattore enzimatico della piruvato deidrogenasi. Inoltre, ALA è cofattore della glutarato deidrogenasi che catalizza la decarbossilazione ossidativa dell' $\alpha$ -chetoglutarato e della catena ramificata di  $\alpha$ -cheto-acidi all'interno del ciclo di Krebs; 2) interviene nel metabolismo dei carboidrati e dei lipidi e, 3) svolge azione antiossidante attraverso la rigenerazione diretta della vitamina C e del glutatione e indiretta della vitamina E. In particolare, ALA, nella forma ridotta, acido diidrolipoico (DHLA), è in grado di donare i suoi due elettroni alle forme ossidate del glutatione (glutatione disulfide) e della vitamina C (radicale della vitamina C), ripristinandone le forme ridotte. A sua volta, la vitamina C in forma ridotta è in grado di riattivare la forma radicalica della vitamina E, riducendola a tocoferolo.

Poiché a quantità di ALA prodotta dal nostro organismo non è sufficiente per soddisfare le esigenze a livello metabolico, tale composto deve essere introdotto con la dieta. Fonti animali di ALA sono rappresentate dagli organi con elevata attività metabolica, quali cuore, fegato e reni; mentre, fonti vegetali di ALA sono per esempio spinaci, broccoli, pomodori, piselli, cavoletti di Bruxelles e crusca di riso. Un articolo, pubblicato nel 2018 sulla rivista *International Journal of Biosciences*, ha determinato ALA mediante cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa, in diverse fonti alimentari prima e dopo cottura. Dai risultati ottenuti è emerso che la concentrazione di ALA negli alimenti prima della cottura variava da 1,270  $\mu\text{g/g}$  a 22,356  $\mu\text{g/g}$  negli alimenti vegetali e da 2,214  $\mu\text{g/g}$  a 13,560  $\mu\text{g/g}$  negli alimenti di origine animale. A seguito del processo di cottura (ebollizione), la concentrazione di ALA variava da 0,204  $\mu\text{g/g}$  a 3,598  $\mu\text{g/g}$  nei vegetali e da 1,245  $\mu\text{g/g}$  a 7,198  $\mu\text{g/g}$  negli alimenti animali. Pertanto, i dati raccolti indicavano che il calore applicato durante il processo di cottura determina un decremento significativo dei livelli di ALA, suggerendo una stabilità maggiore del composto negli alimenti di origine animale, rispetto ai vegetali. [Miturn S, Hasan A, Nikhil CB, et al. Extraction and estimation of alpha lipoic acid content in different food samples by reverse phase HPLC: effect of heat treatment. Int J Biosci. 2018. 13\(5\): 2222-5234](#)

In aggiunta a quanto sopra riportato, va precisato che negli alimenti, l'enantiomero R-ALA si trova legato in modo covalente alla lisina delle proteine. Tale legame diminuisce la biodisponibilità di ALA rispetto a quella registrata a seguito dell'assunzione della sua forma libera, che è invece presente negli integratori o nei farmaci. Alcuni studi hanno riportato, inoltre, un aumento del 40% dell'assorbimento di ALA quando veniva assunta la miscela di entrambi gli isomeri R e S per via orale a digiuno rispetto all'assunzione del solo isomero R per via orale in prossimità dei pasti.

Studi di farmacocinetica hanno indicato che il tempo necessario ad ALA per raggiungere le massime concentrazioni plasmatiche ( $6,86 \pm 1,29 \mu\text{g/ml}$ ) è stato stimato essere pari a circa 60 minuti. Inoltre, è stato osservato che le concentrazioni plasmatiche di enantiomero R sono risultate superiori del 40-50% rispetto all'enantiomero S e che l'enantiomero R è assorbito più rapidamente (Salehi B, Yimaz BY, Anitka G, et al. [Insights on the Use of -Lipoic Acid for Therapeutic Purposes. Biomolecules. 2019. 9: 356](#)). Un recente studio condotto su ratti conferma tali stime, riportando un area sotto la curva (AUC) dell'isomero R superiore di 1,26 volte rispetto al valore di AUC raggiunto con la somministrazione dell'isomero S (Uchida R, Okamoto H, Ikuta N, et al. [Enantioselective Pharmacokinetics of alpha-Lipoic Acid in Rats. Int. J. Mol. Sci. 2015 16: 22781–22794.](#)). È stato inoltre suggerito che la biodisponibilità dell'ALA è notevolmente aumentata quando somministrato per via orale in la forma liquida piuttosto che in forma di dosaggio solida.

Per lo scarso apporto con la dieta e per la limitata biodisponibilità di ALA, soprattutto se assunto con la matrice alimentare, solitamente per evitare carenze si consiglia l'assunzione di integratori o farmaci contenenti ALA, a stomaco vuoto, in quanto viene ridotta la concorrenza per l'assorbimento che può verificarsi con altri componenti della dieta e il pH acido dello stomaco ne aumenta ulteriormente la biodisponibilità.

## **RAZIONALE DELLO STUDIO CLINICO**

Nel corso degli anni, ALA è stato oggetto di diversi studi preclinici e clinici, che ne attestano proprietà biologiche interessanti per diversi distretti e funzioni corporee. Tali attività sono attribuibili principalmente all'elevata azione antiossidante e antinfiammatoria del composto. Numerose sono, inoltre, le evidenze che attestano il coinvolgimento di ALA nel metabolismo dei carboidrati. È stato dimostrato nel ratto che ALA aumenta l'uptake di zuccheri nei tessuti muscolari insulino-sensibili e insulino-resistenti attraverso un meccanismo che coinvolge l'attivazione della proteina chinasi attiva dall'AMP (AMPK) (Lee WJ, Song KH, Koh EH, et al. [Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity](#)

by activating AMPK in skeletal muscle. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2005. 332: 885–891).

L'attivazione di AMPK nel muscolo scheletrico aumenta l'assorbimento del glucosio e l'ossidazione degli acidi grassi. AMPK stimola, inoltre, la traslocazione del trasportatore del glucosio GLUT4 sulla membrana plasmatica in modo indipendente dall'insulina, aumentandone l'espressione attraverso il legame potenziato del fattore di trascrizione MEF-2 (fattore di potenziamento dei miociti-2) (Konrad D, Somwar R, Sweeney G, et al. The antihyperglycemic drug alpha-lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation: potential role of p38 mitogen-activated protein kinase in GLUT4 activation. *Diabetes.* 2001. 50: 1464–1471.). Alcuni studi hanno anche dimostrato che AMPK regola il trasporto del glucosio attraverso il trasportatore GLUT1 (Xi X, Han J, Zhang JZ. Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol.Chem.* 2001. 276: 41029–41034.). La sensibilità all'insulina è migliorata anche attraverso la riduzione dell'accumulo di trigliceridi da parte dei muscoli scheletrici (Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways. *Endocr.Rev.* 2002. 23: 599–622.). Tale evento si verifica a seguito della fosforilazione dell'AMPK, e quindi dell'inattivazione dell'acetil-CoA carbossilasi (ACC) (Ruderman N, Flier JS. Cell biology. Chewing the fat ACC and energy balance. *Science.* 2001. 291: 2558–2559.). L'ACC è un importante enzima coinvolto nella sintesi del malonil-CoA, che a sua volta inibisce il trasporto degli acidi grassi nei mitocondri (Beta-ossidazione). L'accumulo di trigliceridi nel muscolo scheletrico contribuisce alla resistenza all'insulina, in condizioni di resistenza all'insulina associata all'obesità e al diabete di tipo 2 (Goodpaster BH, Kelley DE. Skeletal muscle triglyceride: marker or mediator of obesity-induced insulin resistance in type 2 diabetes mellitus? *Curr.Diab.Rep.* 2002. 2: 216–222.). È stato osservato che l'attività dell'AMPK muscolare è inibita nei ratti obesi, che sono predisposti all'insorgenza del diabete. Quando viene somministrato ALA, aumenta l'AMPK muscolare e si verifica un miglioramento dell'uptake del glucosio e dell'ossidazione degli acidi grassi (Lee et al., 2005).

Un altro meccanismo di ALA è rappresentato dalla induzione della sintesi di ossido nitrico (NO). È noto che il recettore dell'insulina tirosin-chinasi, la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI 3-chinasi) e la protein-chinasi B (Akt) sono componenti essenziali delle vie di segnalazione dell'insulina correlate alla produzione di NO nell'endotelio vascolare. La fosforilazione dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) ad opera di Akt è necessaria anche per la sua attivazione da parte dell'insulina (Montagnani M, Ravichandran LV, Chen H, et al. Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. *Mol.*

Endocrinol. 2002. 16, 1931–1942.). Nelle cellule endoteliali ottenute da animali da esperimento di età avanzata, la somministrazione di ALA ripristina in parte la riduzione della fosforilazione di eNOS attraverso l'azione di Akt (Smith AR, Hagen TM. Vascular endothelial dysfunction in aging: loss of Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and partial restoration by (R)-alpha-lipoic acid. Biochem.Soc.Trans. 2003. 31: 1447–1449.). L'ALA induce anche la fosforilazione di Akt nelle cellule endoteliali vascolari ombelicali umane e nella linea cellulare di monociti umani THP-1 (Zhang WJ, Wei H, Hagen T, et al. Alpha-lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 2007. 104: 4077–4082.). Grazie a questo meccanismo, studi preclinici hanno evidenziato la capacità di ALA nel ripristino di alcune funzioni che vengono danneggiate dall'instaurarsi del diabete, quali per esempio la disfunzione endoteliale e mitocondriale (Rochette L, Ghibu S, Muresan A, et al. Alpha-lipoic acid: Molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes I. Can. J. Physiol. Pharmacol. 2015. 93: 1021–1027.).

Gli sforzi della ricerca clinica sul potenziale benefico di ALA a supporto della terapia utilizzata nel diabete si sono rivolti in particolar modo allo studio dell'effetto del composto sulla neuropatia diabetica. I risultati di tali studi forniscono prove di efficacia della supplementazione con ALA, al dosaggio di 600-800 mg/die somministrato per via orale o endovenosa per almeno tre settimane, nella riduzione significativa dei sintomi della neuropatia periferica e della polineuropatia diabetica sensitivo-motoria, nei pazienti diabetici. L'azione di ALA in questo contesto è attribuibile a molteplici meccanismi come la chelazione di ioni metallici, l'inibizione di specie reattive dell'ossigeno e il blocco dei canali del calcio di tipo T, che porta a migliorare la funzione nervosa e il dolore neuropatico (Salehi B, Yimaz BY, Anitka G, et al. Insights on the Use of -Lipoic Acid for Therapeutic Purposes. Biomolecules. 2019. 9: 356).

Tuttavia, di recente, nonostante la pleora di studi clinici che attestano l'azione benefica della supplementazione di ALA nella modulazione del dolore in pazienti affetti da neuropatia diabetica, si osserva che ALA è impiegato nella comune pratica clinica anche a supporto dei soggetti che presentano dolore, acuto o cronico, a eziologia non nota e che non possono assumere farmaci antinfiammatori non steroidei, a causa di intolleranza o nel caso di particolari gruppi di popolazione, quali le donne in gravidanza (per le quali uno studio osservazionale retrospettivo condotto su 610 donne in gravidanza ha dimostrato la sicurezza - Parente E, Colannino G, Picconi O, Monastra G. Safety of oral alpha-lipoic acid treatment in pregnant women: a retrospective observational study.

[European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2017; 21: 4219-4227](#)), donne in allattamento e bambini.

In letteratura sono presenti anche diversi studi clinici che rafforzano il razionale per l'impegno di ALA nei constesti sopracitati, evidenziandone il potenziale benefico in soggetti che soffrono di diverse tipologie di dolore, quali quelle elencate a seguito.

- **Mal di testa ed emicrania.** Uno studio clinico pubblicato nel 2018 prevedeva la supplementazione di 32 soggetti affetti da emicrania con 400 mg/die di ALA per la durata di sei mesi. I risultati ottenuti indicavano che l'incidenza degli attacchi di mal di testa, registrati al tempo zero e al termine del periodo di trattamento era ridotta di circa il 50% ([Cavestro C, Bedogni G, Molinari F, et al. Alpha-Lipoic Acid Shows Promise to Improve Migraine in Patients with Insulin Resistance: A 6-Month Exploratory Study. J Med Food. 2018.21\(3\):269-273](#)). Nel 2007, la *Belgian Hedache Society* ha pubblicato un trial clinico doppio-cieco, randomizzato e controllato che prevedeva il coinvolgimento di cinque centri per il trattamento dell'emicrania, per un totale di 54 soggetti arruolati. A seguito di un periodo di *run-in* pari a un mese, i pazienti ricevevano placebo o ALA (660 mg/die) per tre mesi. I risultati indicavano che la frequenza mensile degli attacchi era significativamente ridotta al terzo mese di trattamento per il gruppo che riceveva ALA, rispetto al gruppo placebo ( $p = 0,06$ ). L'analisi statistica dei risultati intra-gruppo, ottenuti al tempo zero e al termine del periodo di trattamento, ha evidenziato una riduzione significativa della frequenza degli attacchi ( $p = 0,005$ ), dei giorni di mal di testa ( $p = 0,009$ ) e della severità degli episodi ( $p = 0,03$ ) ([Magis D, Ambrosini A, Sandor P. A randomized double-blind placebo-controlled trial of thioctic acid in migraine prophylaxis. Headache. 2007. 47\(1\):52.57](#)).
- **Mal di schiena lombare.** Battisti e colleghi hanno pubblicato nel 2013 i risultati di uno studio clinico non randomizzato e non controllato, che ha coinvolto 98 adulti con lombalgia cronica (ovvero dolore che permaneva per più di 2 settimane) in assenza di patologie infiammatorie o neoplastiche. La somministrazione di ALA (600 mg/die) in combinazione con superossido-dismutasi (149 UI/die) per 60 giorni ha portato a un miglioramento statisticamente significativo sia per il dolore percepito sia per la disabilità funzionale. Il miglioramento più significativo è stato osservato dopo 40 giorni di terapia. Solo quattro soggetti sono usciti dallo studio prima del termine previsto, in quanto necessitavano di un trattamento con farmaci antidolorifici ([Battisti E, Albanese A, Guerra L, et al. Alpha lipoic acid and superoxide dismutase in the treatment of chronic low back pain. Eur J Phys Rehabil Med. 2013. 49\(5\):659-64](#)).

- ***Dolore emorroidale.*** Un recente trial clinico monocentrico, randomizzato, volto a studiare l'effetto della supplementazione con ALA in soggetti con sintomatologia cronica legata alle emorroidi, ha previsto l'arruolamento di 100 pazienti con emorroidi di secondo o terzo grado, di cui 50 erano trattati con 200 mg/die di ALA per 12 settimane e 50 non ricevevano alcun trattamento. I risultati ottenuti mostravano un significativo miglioramento nel gruppo trattato, rispetto al gruppo controllo, di dolore e fastidi tipici della patologia, come il sanguinamento ( $p < 0,01$ ). Inoltre, il trattamento di tre mesi con ALA ha ridotto significativamente il numero di pazienti con valore positivo della proteina C reattiva (CRP) (CRP sierica  $> 5$  mg / L) dal 18% al tempo zero al 2% dopo il trattamento ( $\chi^2 = 4,65$ ;  $p < 0.01$ ) ([Sabanovic M, Jasic M, Odobasic A. Alpha Lipoic Acid Reduces Symptoms and Inflammation Biomarkers in Patients with Chronic Hemorrhoidal Illness. Int J Vitam Nutr Res. 2018. 88\(5-6\):281-290.](#)).
- ***Fibromialgia.*** Gilron e colleghi hanno pubblicato il disegno di uno studio clinico doppio-cieco, randomizzato, controllato con placebo e cross-over, su 24 soggetti affetti da fibromialgia a cui veniva somministrato ALA 1800 mg/die o placebo, per un periodo pari a quattro settimane. A seguito di un *wash-out* di una settimana, i trattamenti erano invertiti nei due gruppi. Lo studio è attualmente in corso e i risultati ad oggi non sono stati ancora pubblicati ([Gilron I, Tu D, Holden R, et al. Innovations in the Management of Musculoskeletal Pain With Alpha-Lipoic Acid \(IMPALA Trial\): Study protocol for a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Crossover Trial of Alpha-Lipoic Acid for the Treatment of Fibromyalgia Pain. JMIR Res Protoc. 2017. 6\(3\):e41.](#)).
- ***Dolore da sindrome del tunnel carpale.*** Un trial clinico randomizzato, doppio-cieco, controllato con placebo, pubblicato nel 2018 sulla rivista *Journal of Medicinal Foods*, aveva come obiettivo lo studio dell'effetto della supplementazione di ALA sugli esiti di tipo clinico e neurofisiologico a seguito di un intervento per la sindrome del tunnel carpale. Un totale di 20 soggetti arruolati assumevano 600 mg/die di ALA o placebo per un mese prima dell'intervento e per i due mesi successivi. Al termine dell'intero periodo di trattamento i risultati dei punteggi del questionario di Boston, specifico per questa patologia, erano significativamente migliorati nel gruppo trattato, rispetto al gruppo controllo. Inoltre, l'ampiezza delle fibre sensoriali motorie era migliore nel gruppo trattato, rispetto al gruppo controllo ([Monroy G, Garcia BL, Ambriz PAR, et al. Effect of Alpha-Lipoic Acid on Clinical and Neurophysiologic Recovery of Carpal Tunnel Syndrome: A Double-Blind, Randomized Clinical Trial. J Med Food. 2018. 21\(5\):521-526.](#)).

Nell'anno precedente è stato pubblicato uno studio clinico randomizzato, doppio-cieco e controllato su 64 soggetti affetti da sindrome del tunnel carpale, che andava a indagare l'effetto di ALA sul dolore post-operatorio, a seguito di decompressione chirurgica del nervo mediano. I soggetti arruolati erano suddivisi in un gruppo trattato, che riceveva ALA, e un gruppo controllo, a cui veniva somministrato il placebo, per un periodo di 40 giorni a seguito dell'intervento. I risultati raccolti indicavano che, rispetto al gruppo controllo, il gruppo trattato con ALA presentava una riduzione significativa del "pillar pain", dolore caratteristico, che si verifica di frequente nel post-operatorio (Boriani F, Granchi D, Roatti G, et al. *Alpha-lipoic Acid After Median Nerve Decompression at the Carpal Tunnel: A Randomized Controlled Trial. J Hand Surg Am.* 2017. 42(4):236-242).

Queste evidenze recentemente pubblicate indicano una tendenza emergente nella pratica medica che vede un crescente impiego di ALA per diverse tipologie di dolore, al di fuori dalla neuropatia diabetica.

## **OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Lo studio ha come obiettivo la valutazione dell'efficacia e della sicurezza della somministrazione di ALA, a soggetti con dolore neuropatico primitivo, mialgie idiopatiche o artralgie, che non possono o non vogliono assumere farmaci antidolorifici, normoglicemici o che presentano una lieve disglycemia. Nello studio verranno impiegati due dosaggi di ALA (400 mg/die e 800 mg/die) al fine di:

- 1) dimostrare l'efficacia della dose minima (400 mg/die) assunta dai soggetti reclutati e
  - 2) confermare l'efficacia e la sicurezza della dose massima (800 mg/die) assunta dai soggetti reclutati.
- I risultati di tale studio permetteranno di individuare un intervallo di dosi a cui assumere ALA in modo sicuro ed efficace tramite gli integratori alimentari contenenti tale ingrediente e individuare eventualmente una dose minima efficace.

### **Obiettivo primario**

Il presente studio clinico, si pone l'obiettivo primario di valutare, prima e dopo due mesi di trattamento orale con ALA:

- L'effetto della somministrazione orale di dosi crescenti di ALA nella riduzione del dolore tramite questionari validati, quali:
  1. La **Numerical Rating Scale** (NRS) o scala di valutazione numerica, è una scala di misurazione in cui la persona assistita indica l'intensità del proprio dolore verbalmente

(Breivik H et al., 2008) o disegnando un cerchio sul numero che meglio la descrive. Nella maggioranza dei casi lo strumento è rappresentato da una linea o barra orizzontale su cui è indicato un intervallo compreso tra i valori 0 e 10, corrispondenti rispettivamente a “nessun dolore” e a “peggior dolore immaginabile”. (Breivik H, Borchgrevink PC, Allen SM et al. (2008) Assessment of pain. *British Journal of Anesthesia*, 101, 17-24).

2. La **Visual Analogue Scale** (VAS), strumento di valutazione del dolore, utilizzata per diversi scopi e nella valutazione del dolore generico nei pazienti che accedono al pronto soccorso. Consiste in una striscia di carta di 10 cm, che alle due estremità presenta i due end points "nessun dolore" e "peggior dolore che possa immaginare", il paziente deve segnare sulla striscia il livello di dolore percepito.

- L'effetto sulla glicemia a digiuno nei soggetti normoglicemici o con lieve disglycemia.

### **Obiettivo secondario**

L'obiettivo secondario riguarderà:

- La valutazione, dopo esame ematico, di un'eventuale tossicità epatica e renale derivante della somministrazione orale di ALA.
- La valutazione di possibili reazioni avverse attraverso la compilazione del modulo appositamente allestito secondo quello utilizzato dall'Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute, per la segnalazione di sospette reazioni avverse (AR) che si possono verificare dopo l'assunzione di integratori alimentari (allegato 1). Tali effetti verranno segnalati allo sperimentatore dal soggetto reclutato nel momento in cui essi si dovessero verificare.

Nel caso, lo sperimentatore valuterà:

- la gravità dell'evento avverso (EA),
- il rapporto di causalità tra la somministrazione orale di ALA e/o una eventuale terapia concomitante e l'EA o AR.

### **DISEGNO DELLO STUDIO**

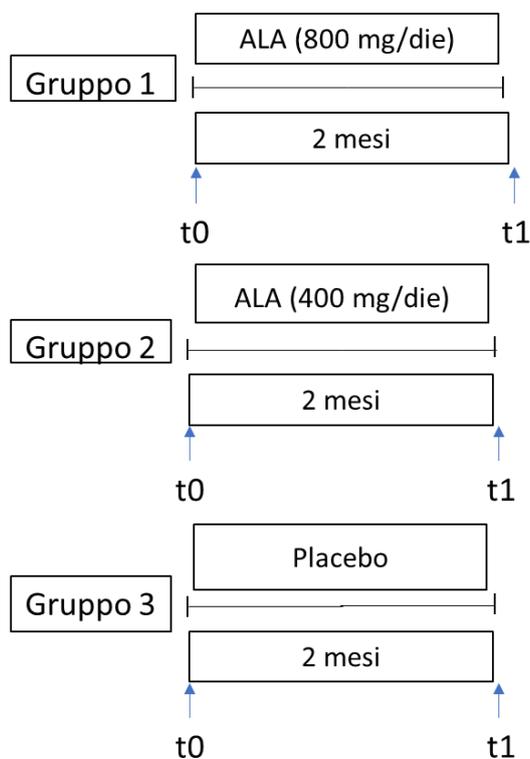
Verrà condotto uno studio clinico monocentrico, randomizzato, controllato, a gruppi paralleli, in doppio cieco. Lo studio prevede di reclutare 210 soggetti (70 soggetti per ogni gruppo). I gruppi sperimentali saranno i seguenti:

**GRUPPO 1** → soggetti che dovranno assumere la dose giornaliera 800 mg/die di ALA, quale dose comunemente consumata con gli integratori alimentari in commercio, per confermarne l'efficacia e la sicurezza.

**GRUPPO 2** → soggetti che dovranno assumere 400 mg/die di ALA, quale dose minima potenzialmente efficace.

**GRUPPO 3** → soggetti che dovranno assumere il placebo.

Ad ogni soggetto dei tre gruppi sperimentali prima ( $t_0$ ) e dopo ( $t_1$ ) la somministrazione di **ALA (800 mg/die)**, **ALA (400 mg/die)** o, **di placebo**, sarà prelevato un campione di sangue, come indicato nello schema 1. Ad ogni soggetto verrà consegnato al  $t_0$  un modulo appositamente allestito secondo quello utilizzato dall'Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute, per la segnalazione di sospette reazioni avverse che si possono verificare dopo l'assunzione di integratori alimentari.



## Schema 1.

**Di seguito si riportano le indagini laboratoristiche che saranno effettuate al t0 e t1.**

**t0** → Glicemia a digiuno,  
Tossicità epatica: SGOT, SGPT,  
Tossicità renale: Creatinina

**t1** → Glicemia a digiuno,  
Tossicità epatica: SGOT, SGPT,  
Tossicità renale: Creatinina

### **CRITERI DI INCLUSIONE**

Soggetti che:

- hanno firmato il Consenso Informato
- presentano età compresa tra 18-75 anni
- glicemia plasmatica a digiuno inferiore a 110 mg/dl
- presentano artralgie
- presentano dolore neuropatico primitivo e che non possono o non vogliono assumere FANS
- presentano mialgia idiopatica e che non possono o non vogliono assumere FANS
- sono capaci di comprendere e rispettare i requisiti del protocollo
- accettano di utilizzare metodi contraccettivi adeguati dal momento della firma del modulo di consenso informato, per tutta la durata dello studio e per 3 mesi dopo l'assunzione dell'ultima dose di ALA

### **CRITERI DI ESCLUSIONE**

- glicemia plasmatica a digiuno  $\geq 110$  mg/dl
- obesi ( $BMI > 30 \text{ kg/m}^2$ )
- soggetti esposti ad un elevato rischio di eventi cardiovascolari in base a 8 fattori di rischio (sesso, età, diabete, abitudine al fumo, pressione arteriosa sistolica, colesterolemia totale

HDL-colesterolemia e trattamento anti-ipertensivo) in accordo ai parametri del progetto Cuore dell'Istituto Superiore di Sanità (<http://www.cuore.iss.it/sopra/calc-rischio.asp>)

- in terapia farmacologia o assunzione di integratori per il diabete anche a bassi dosaggi
- assunzione di antidolorifici e antinfiammatori per la durata dello studio
- assunzione di integratori nelle due settimane precedenti al reclutamento
- donne in gravidanza, sospetta gravidanza o in previsione di gravidanza
- donne in fase di allattamento
- donatori di sangue nei tre mesi precedenti al reclutamento
- non autosufficienti
- che non mostrano propensione alla collaborazione
- che hanno difficoltà a recarsi presso la struttura di riferimento nei tempi previsti
- che non sono ritenuti idonei dal medico sperimentatore per la presenza di altre patologie ritenute incompatibili con l'arruolamento.

## DIMENSIONE DEL CAMPIONE – POWER ANALYSIS

<b>End point primario</b>	Misura degli effetti della somministrazione orale di dosi crescenti di ALA nella riduzione del dolore.  Misura della glicemia a digiuno.
<b>End point secondari</b>	Valutazione degli effetti avversi derivanti dalla compilazione del modulo appositamente allestito secondo quello utilizzato dall'Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute, per la segnalazione di sospette reazioni avverse che si possono verificare dopo l'assunzione di integratori alimentari.  Misura della tossicità epatica e renale della somministrazione orale di ALA (misura effettuata tramite esame ematico).
<b>Disegno sperimentale</b>	Tre bracci: <b>trattamento con placebo (PLACEBO)</b> , <b>trattamento con ALA a 800 mg/die (TRATTATO 1)</b> e <b>trattamento con ALA a 400</b>

	<p><b>mg/die (TRATTATO 2)</b> con misurazione delle variabili di risposta all'inizio (t0) e dopo 2 mesi di trattamento (t1).</p> <p>Variabili di risposta:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentrazione della glicemia a digiuno (end point primario)</li> <li>• Effetto antidolorifico valutato tramite due questionari NRS e VAS (end point primario). Nello studio saranno utilizzati entrambi i questionari poichè tra i due non c'è unanimità nei giudizi. Alla fine dello studio sarà poi ricercata una correlazione tra NRS e VAS.</li> <li>• Effetti avversi valutati tramite modulo appositamente allestito secondo quello utilizzato dall'Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute, per la segnalazione di sospette reazioni avverse che si possono verificare dopo l'assunzione di integratori alimentari (end point secondario).</li> <li>• Tossicità epatica (end point secondario)</li> <li>• Tossicità renale (end point secondario)</li> </ul>
<p><b>Analisi statistica</b></p>	<p>L'analisi statistica più adatta per il disegno sperimentale adottato è un modello di <b>analisi della varianza per misure ripetute</b> con effetti entro soggetto e tra soggetti (<i>F test - ANOVA repeated measures, within-between effects</i>)</p> <p>I fattori utilizzati nell'analisi sono:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Effetto tra soggetti (<i>between effect</i>): trattamento (fattore a 3 livelli: PLACEBO, TRATTATO 1, TRATTATO 2)</li> <li>• Effetto entro soggetto (<i>within effect</i>): misurazione (fattore a 2 livelli: t0 e t1)</li> </ul>
<p><b>Obiettivi della power analysis</b></p>	<p><b>LA POWER ANALYSIS CONDOTTA SI PONE DUE OBIETTIVI:</b></p>

**Il primo consiste nel calcolo della numerosità del campione di popolazione da reclutare:**

**individuare la dimensione campionaria** (numero di soggetti ottimale) per valori prestabiliti di significatività ( $\alpha$ ), potenza ( $1-\beta$ ) ed entità dell'effetto (*effect size*,  $f$ );

**il secondo obiettivo è quello di calcolare la potenza dello studio supponendo che le differenze tra il placebo e i gruppi trattati con ALA NON siano statisticamente significative** (misura della potenza post-hoc).

Questa seconda parte della power analysis è stata condotta in quanto ALA è un composto ritenuto sicuro, utilizzato comunemente alle dosi del presente studio clinico, per il quale si suppone che non induca effetti negativi per la salute e quindi non provochi un calo di glicemia a digiuno statisticamente significativo nella popolazione normoglicemica. Pertanto tale secondo obiettivo si propone di:

**definire la potenza raggiunta in caso di risultati statisticamente non significativi** per valori prestabiliti di significatività ( $\alpha$ ), effect size ( $f$ ) e dimensione campionaria ( $n$ ).

Questa seconda valutazione è necessaria in quanto la previsione dello studio è quella di non trovare effetti tossici del trattamento, ossia, nessuna differenza tra PLACEBO e TRATTATO 1 e 2 nelle variabili di interesse misurate ai tempi  $t_0$  e  $t_1$ .

**La definizione della dimensione campionaria ottimale deve quindi tenere conto del rischio di falsi negativi** (cioè che il trattamento abbia effetti tossici ma che tali effetti non siano stati individuati a causa di un campione troppo piccolo).

	<p><b>La misura della potenza post-hoc permette di stimare questo rischio a seguito del p-value ottenuto e della dimensione campionaria utilizzata.</b></p>
<p><b>PRIMO OBIETTIVO:</b></p> <p><b>dimensione campionaria</b></p>	<p>Il calcolo della dimensione campionaria è stato condotto con le seguenti assunzioni:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) <b>disegno bilanciato</b> (lo stesso numero di pazienti per PLACEBO e TRATTATO 1 e 2);</li> <li>2) La stima dell'<b>effect size</b> è stata effettuata tenendo presente che (1) non sono attese differenze significative tra PLACEBO e TRATTATO per la presenza di effetti collaterali e per la tossicità epatica e renale e (2) la glicemia potrebbe diminuire nel TRATTATO rispetto al PLACEBO, ma con un effetto molto limitato. Si è quindi deciso di impostare l'analisi assumendo che la differenza tra le medie tra PLACEBO e TRATTATO 2 (cioè quella più difficile da individuare) al tempo t0 e t1 non sia inferiore al 5%. Per calcolare l'effect size corrispondente è necessario avere informazioni sulla accuratezza (deviazione standard <math>\sigma</math>) delle medie delle variabili di interesse misurate nei gruppo PLACEBO e TRATTATO 1 e 2. In assenza di informazioni si è deciso di fissare i valori di <math>\sigma</math> nell'ordine del 10% della media che fornisce una stima di effect size pari a <math>f=0.14</math>. In assenza di informazioni pregresse, Cohen (1969, <i>Statistical power analysis for the behavioural sciences</i>. New York: Academic Press) ha suggerito di utilizzare valori di <math>f=0.10</math> per effetti piccoli e <math>f=0.25</math> per effetti medi. Le stime della dimensione campionaria saranno quindi condotte utilizzando 3 valori di effect size: <math>f=0.10</math>, <math>f=0.14</math> e <math>f=0.25</math>;</li> <li>3) la <b>correlazione entro soggetto</b> è stata fissata a <math>r=0.5</math>;</li> <li>4) sono stati scelti tre <b>valori di potenza</b> (<math>1-\beta</math>) pari a 0.80, 0.95 e 0.99;</li> <li>5) il <b>livello di significatività</b> (<math>\alpha</math>) è stato scelto pari a 0.05.</li> </ol>

Nella seguente tabella si riportano le dimensioni campionarie complessive (PLACEBO + TRATTATO 1 + TRATTATO 2) per le diverse ipotesi di potenza ed effect size.

Effect size	(1-β)= 0.99	(1-β)= 0.95	(1-β)= 0.80
	α =0.05	α =0.05	α =0.05
f=0.10 (piccolo)	540	390	246
f=0.14 (5%)	276	<b><u>201</u></b>	126
f=0.25 (medio)	90	66	42

In conclusione, ipotizzando che l'entità dell'effetto della somministrazione di ALA sulla glicemia plasmatica sia di tipo medio (f=0,14), reclutando un numero di soggetti pari a 201, **la potenza dello studio risulta elevata e pari al 95%.**

**SECONDO  
OBIETTIVO:**

Potenza a posteriori  
(post-hoc)

**il secondo obiettivo è quello di calcolare la potenza dello studio supponendo che le differenze tra il placebo e il trattato con ALA NON siano statisticamente significative (misura della potenza post-hoc).**

Assunzioni:

- 1) **disegno bilanciato** (lo stesso numero di pazienti per PLACEBO e TRATTATO 1 e 2);
- 2) **effect size MEDIO** utilizzando il solo valore di f=0.14;
- 3) **livello di significatività (α):** quattro valori: α=0.05, α=0.10 e α=0.20 ;
- 4) **correlazione entro soggetto** pari a r=0.5;

5) **dimensione campionaria** (PLACEBO + TRATTATO 1 +TRATTATO 2): n=150, n=210 e n=300

Nella seguente tabella si riportano le potenze raggiunte ( $1-\beta$ ) per le diverse ipotesi di significatività  $\alpha$  e dimensione del campione.

Livello di signif. $\alpha$	n=150	n=210	n=300
0.05	0.86	<b>0.96</b>	0.98
0.10	0.92	<b>0.98</b>	0.99
0.20	0.97	<b>0.99</b>	0.99

in conclusione, dalla tabella sopra riportata si evince che sia che la differenza nell'end point primario sia statisticamente significativa ( $p=0,05$ ), oppure non sia statisticamente significativa ( $p=0,1$  o  $0,2$ ),

**con circa 210 soggetti la potenza dello studio rimane sempre elevata e cioè pari al 96, 98 e 99% rispettivamente.**

## 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;

- non-compliance del soggetto con il protocollo;
- decisione dello sperimentatore principale.

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

## TRATTAMENTI IN STUDIO

I soggetti reclutati, per la durata di due mesi, dovranno:

- assumere 800 mg/die di ALA (quale dose comunemente consumata con gli integratori alimentari attualmente in commercio), in forma di due compresse filmate da 400 mg l'una, per confermarne l'efficacia e la sicurezza,

oppure

- assumere 400 mg/die di ALA (quale dose minima potenzialmente efficace), in forma di una compressa filmata a cui verrà aggiunta la somministrazione di una compressa identica per colore, forma e, sapore di placebo.

Per questo studio non è prevista assunzione di integratori alimentari oltre ad ALA.

## METODI

I soggetti reclutati da **Comegen, Viale Maria Bakunin, 41 (Parco S. Paolo), 80126 – Napoli, (081.6174566)** assumeranno per due mesi:

**GRUPPO 1**→ due compresse filmate al giorno contenenti ognuna 400 mg di ALA (800,0 mg/die di ALA), da assumere 45 minuti prima dei pasti oppure, un'ora dopo i pasti.

**GRUPPO 2**→ una compressa filmata contenente 400 mg di ALA e una compressa filmata contenente 400 mg di eccipienti inerti al giorno, da assumere 45 minuti prima dei pasti oppure, un'ora dopo i pasti.

**GRUPPO 3**→ due compresse filmate di placebo contenenti 400 mg di eccipienti inerti, da assumere 45 minuti prima dei pasti oppure, un'ora dopo i pasti.

**Sia l'integratore alimentare a base di ALA, sia il placebo, verranno forniti gratuitamente da FederSalus, Associazione Nazionale Aziende Prodotti Salutistici, Via Brenta, 2 A, 00144 Roma (RM) e saranno prodotti in uno stabilimento autorizzato alla produzione di integratori alimentari dal Ministero della Salute secondo le disposizioni di cui all'art. 10 del Decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 111.**

Nello studio saranno coinvolti 10 studi medici, presso i quali quotidianamente afferiscono circa 10 pazienti, pertanto, sarà possibile arruolare tutti i 210 soggetti previsti dalla *Power analysis*.

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

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

Sui campioni di sangue saranno valutati:

- Glicemia a digiuno,
- Tossicità epatica: SGOT, SGPT,
- Tossicità renale: Creatinina

I prelievi del sangue verranno eseguiti in ambiente ambulatoriale (laboratorio di analisi cliniche certificato) sui soggetti arruolati a digiuno da 12 ore. I campioni di sangue saranno prelevati nelle ore mattutine e, successivamente saranno conservati a una temperatura di -20 °C.

Si specifica che i suddetti campioni di sangue saranno conservati per valutare l'endpoint dello studio, 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 tre gruppi di trattamento (ALA (800 mg/die), ALA (400 mg/die) e, placebo) in maniera casuale e imprevedibile mediante una randomizzazione semplice (rapporto di allocazione

1:1:1). 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 del Dipartimento di Farmacia dell’Università Federico II di Napoli. 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 un ricercatore del Dipartimento di Farmacia non coinvolto 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 saranno a conoscenza del tipo di trattamento somministrato (ALA 800 mg/die; ALA 400 mg/die; e, placebo). I tre trattamenti saranno resi irriconoscibili in quanto il packaging sarà identico, e le compresse filmate saranno uguali per colore, forma e sapore. Il sapore delle compresse filmate sarà identico in quanto queste verranno deglutite e l’involucro esterno usato sarà lo stesso.

## **METODI CONTRACCETTIVI E GRAVIDANZA**

Per tutta la durata dello studio e per almeno quattro settimane dopo l’ultima dose di ALA, tutti i pazienti in età fertile e sessualmente attivi dovranno utilizzare un metodo contraccettivo durante i rapporti sessuali, e durante questo periodo sarà conigliato 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'assunzioni di eventuali farmaci concomitanti, e al gruppo di trattamento (ALA o placebo), e dovrà essere compilata al momento dell'arruolamento. Invece, la seconda sezione riguarderà:

- la misura dell'effetto, dopo la somministrazione orale di dosi crescenti di ALA, nella riduzione del dolore, valutato tramite questionari validati, quali:
  - il **Numerical rating scale (NRS)**,
  - la **Visual Analogue Scale (VAS)**,
- i risultati delle analisi effettuate sui campioni di sangue prelevati come riportato nello schema 1, per la valutazione della:
  - Glicemia a digiuno,
  - Tossicità epatica → SGOT, SGPT,
  - Tossicità renale → Creatinina
- eventuali effetti avversi valutati tramite modulo appositamente allestito secondo quello utilizzato dall'Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute, per la segnalazione di sospette reazioni avverse che si possono verificare dopo l'assunzione di integratori alimentari.

## RISCHI

I soggetti saranno continuamente monitorati e, nel caso si verificano:

1. modificazioni dei parametri plasmatici tali da richiedere a parere del Medico curante un intervento farmacologico,
2. effetti indesiderati,

il soggetto dovrà uscire dallo studio.

## **EVENTI AVVERSI**

Per l'uso consolidato da circa due decenni dell'acido lipoico, alle dosi che verranno impiegate nel presente studio clinico, non è prevista nessuna reazione avversa grave legata all'assunzione di ALA. Tuttavia, nell'ipotesi si dovessero verificare sospette reazioni avverse gravi inattese (SUSAR - *suspected unexpected serious adverse reaction*) nel corso della sperimentazione clinica, queste saranno trasmesse, oltre ad essere incluse nel CRF saranno comunicate al Comitato Etico che ha espresso il parere unico favorevole.

Inltre, sarà annotato l'eventuale uso di farmaci del soggetto.

Il medico annoterà sulla scheda del paziente anamnesi, patologie remote e prossime, e il risultato delle analisi ematiche effettuate.

## **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**

<b>PICCINOCCHI Gaetano</b>
<b>Comegen</b>
<b>Viale Maria Bakunin, 41 (Parco S. Paolo), 80126 – Napoli</b>
<b>081.6174566</b>

## **CENTRI PARTECIPANTI**

**Comegen, Viale Maria Bakunin, 41 (Parco S. Paolo), 80126 – Napoli**

## **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.

L'elaborazione dei dati avverrà presso il Dipartimento di Farmacia dell'Università di Napoli Federico II e, in particolare, il data-base sarà affidato a un biometrista che provvederà alla produzione di un report statistico con i dati ottenuti dallo studio clinico.

## ALLEGATO 1.

Modulo appositamente allestito secondo quello utilizzato dall'Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute, per la segnalazione di sospette reazioni avverse che si possono verificare dopo l'assunzione di integratori alimentari.

Iniziali Paziente

Peso (kg)

Altezza (cm)

Sesso

Maschio

Femmina

Data di nascita

 /  / 

Compilare la data di nascita oppure l'età del paziente

Età (numero)

Fascia d'età del paziente

- Adulto (da 18 anni a 65 esclusi)
- Anziano (da 65 anni in su)

Storia clinica rilevante

Inserire malattie precedenti, procedure mediche, fattori di rischio solo se relativi al caso. Indicare anche un'eventuale allattamento.

## Reazione avversa dopo la somministrazione di ALA

Data di inizio

 /  / 

Descrizione della reazione avversa

**Se la reazione è grave, compilare una o più delle seguenti opzioni:**

Ha causato o prolungato l'ospedalizzazione

Sì

No

Invalidante

Sì

No

Pericolo di vita

Sì

No

Ha causato il decesso del paziente

Sì

No

Anomalia congenita

Sì

No

Esito

- non noto
- guarito
- in guarigione
- non guarito
- guarito con complicazioni

## Trattamenti concomitanti

Qualifica del Prodotto

- Prodotto naturale
- Farmaco

Nome del prodotto

Nome del produttore

Informazioni aggiuntive / Contenuto

Motivo d'uso

Indicazione terapeutica

Azioni intraprese

- non note
- dose ridotta
- dose aumentata
- dose invariata
- non applicabile
- prodotto sospeso

Data di inizio

 /  /

# **PROTOCOL**

## **TITLE**

**Study on the efficacy and safety of an oral  $\alpha$ -lipoic acid food supplement in the reduction of pain in different clinical settings: a monocentric, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial.**

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

Surname and name	Address	Phone
Dr. Gaetano Piccinocchi	Viale Maria Bakunin, 41 Napoli 80126, Italy	081/6174566

## Summary

<b>INTRODUCTION</b> .....	31
<b>BACKGROUND</b> .....	31
<b>STUDY OBJECTIVE</b> .....	33
<b>PRIMARY AND SECONDARY OUTCOMES</b> .....	33
<b>STUDY DESIGN</b> .....	33
<b>POPULATION AND NUMBER OF SAMPLES</b> .....	34
<b>STATISTICAL ANALYSIS</b> .....	34
<b>BLINDING</b> .....	34
<b>DURATION OF STUDY</b> .....	34
<b>INCLUSION CRITERIA</b> .....	35
<b>EXCLUSION CRITERIA</b> .....	35
<b>METHODS</b> .....	35
<b>BENEFIT</b> .....	36
<b>PRINCIPAL INVESTIGATOR</b> .....	37
<b>PARTECIPATING CENTERS</b> .....	38

## INTRODUCTION

$\alpha$ -lipoic acid (ALA), also known as thioctic acid (1,2-dithiolol-3-pentanoic acid) is endogenous substance produced by human gut at mitochondrial level from cysteine and octanoic acid. ALA is composed of chiral carbon therefore has two enantiomers R and S thus, the R form is present in nature, instead, the S form, is only synthetic. The R form is more active than the S form biologically [Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 1149-60].

## BACKGROUND

During these years were demonstrated different biological activities thanks especially to antioxidant and anti-inflammatory activities. ALA is a cofactor involved in different metabolic pathways, e.g. Krebs' cycle as a cofactor of pyruvate dehydrogenase (PDH), in the metabolism of carbohydrates and lipids, and in antioxidant activity regenerating vitamin C, glutathione and vitamin E, through his reduced form (DHLA) transferring his two electrons [From lipoic acid to multi-enzyme complexes. - L. J. Reed - *Protein Sci.* 1998 Jan; 7(1): 220–224].

In literature are present different clinical studies that highlighted the benefic effect and activity of ALA in subjects suffering of different kinds of pain. In fact, is reported the use of ALA in patients that have acute and chronic pain, with unknown etiology and cannot assume nonsteroidal anti-inflammatory (intolerant and allergic people, pregnant and breastfeeding women, some children etc.) [Safety of oral alpha-lipoic acid treatment in pregnant women: a retrospective observational study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2017; 21: 4219-4227].

In a study published in 2018, 32 patients with migraine, the supplementation of ALA (400mg/die) for six months lead to a reduction of 50% of migraine attacks [Cavestro C, Bedogni G, Molinari F, et al. Alpha-Lipoic Acid Shows Promise to Improve Migraine in Patients with Insulin Resistance: A 6-Month Exploratory Study. *J Med Food.* 2018.21(3):269-273]. In another clinical study 98 subjects with chronic low back pain take ALA (600mg/die) in combination with superoxide-dismutase (SOD), per 60 days. The results indicated a decrease of pain after 40 days [Battisti E, Albanese A, Guerra L, et al. Alpha lipoic acid and superoxide dismutase in the treatment of chronic low back pain. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2013. 49(5):659-64]. In a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial, published in 2018, the enrolled patients take 600mg/die of ALA after a carpal tunnel surgery to investigate the decrease of pain after this intervention. At the end of the study the patients assuming ALA had an improvement of symptomatology respect to the placebo group [Monroy G, Garcia BL, Ambriz PAR, et al. Effect of Alpha-Lipoic Acid on Clinical and Neurophysiologic Recovery of Carpal Tunnel Syndrome: A Double-Blind, Randomized Clinical Trial. *J Med Food.* 2018. 21(5):521-526].

Many studies on the efficacy of ALA are focused on the reduction of the peripheral neuropathy and diabetic polyneuropathy symptoms in the diabetic patients.

The action of ALA in these pathologies is due to the chelation of metal ions, inhibition of oxygen reactive species (ROS) and the inactivation of the calcium channel T. All this leads to an improvement of nervous function and neuropathic pain [Salehi B, Yimaz BY, Anitka G, et al. *Insights on the Use of -Lipoic Acid for Therapeutic Purposes. Biomolecules.* 2019. 9: 356].

Regarding the safety some researchers found different adverse effects after the supplementing of ALA in the diet. In fact, different studies reporting adverse effects such as allergic skin reactions (including hives and itchiness), gastrointestinal symptoms (such as stomachache, nausea, vomiting and diarrhea) and dizziness [Han T et al. (1012) *A systematic review and meta-analysis of  $\alpha$ -lipoic acid in the treatment of diabetic peripheral neuropathy. European Journal of Endocrinology* 167:465-471; Koh EE et al. (2011) *Effects of Alpha-Lipoic Acid on Body Weight in Obese Subjects. The American Journal of Medicine* 124, 85.e1-85.e8].

In this regard, Gatti et al. in a recent study of 2021 [Gatti M, Ippoliti I, Poluzzi E, Antonazzo IC, Moro PA, Moretti U, Menniti-Ippolito F, Mazzanti G, De Ponti F, Raschi E. *Assessment of adverse reactions to  $\alpha$ -lipoic acid containing dietary supplements through spontaneous reporting systems. Clin Nutr.* 2021 Mar;40(3):1176-1185] assessed the safety profile of ALA-containing products by analysing spontaneous reports of suspected adverse reactions (ARs).

Clinical trials reporting the administration of ALA at different doses (from 400mg/die to 1200mg/die) with subsequent development of insuline autoimmune syndrome (IAS) was related to a polymorphism found in the subjects. In fact the high presence of the gene HLA-DR4 was advocated as the determinant of the higher incidence of IAS and after the suspension of administration of ALA this hypoglycaemic condition finish as demonstrated by Gullo and colleagues [Gullo, D., Evans, J.L., Sortino, G., Goldfine, I.D. and Vigneri, R. (2014), *Insulin autoimmune syndrome (Hirata Disease) in European Caucasians taking  $\alpha$ -lipoic acid. Clin Endocrinol,* 81: 204-209].

ALA is involved in the uptake of carbohydrates increasing the insulin-sensitive and insulino-resistant muscle tissues, following a mechanism involving the active protein kinase from AMP (AMPK) [Lee WJ, Song KH, Koh EH, et al. *Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle. Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2005. 332: 885–891]. The activation of AMPK promotes the traslocation of the trasportor of glucose (GLUT4) on the cell membrane independently of the insuline, increasing its expression, through the bond with the transcription factor MEF-2 [Konrad D, Somwar R, Sweeney G, et al. *Theanti-hyperglycemic drug  $\alpha$ -lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation:potential role of p38 mitogen-activated proteinkinase in GLUT4 activation. Diabetes.* 2001. 50: 1464–1471]. Other studies have demonstrated that AMPK regulate the transport of glucose across the GLUT1 transporter [Xi X, Han J, Zhang JZ. *Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. J. Biol.Chem.* 2001. 276: 41029–41034].

The insulin-sensitive is improved also through the reduction of the skeletal muscles triglycerides accumulation [Evans JL, Goldfine ID, Mad-dux BA, et al. *Oxidative stress and stress-activated signaling pathways. Endocr.Rev.* 2002. 23: 599–622].

## STUDY OBJECTIVE

Considering these scientific evidences, the aim of the our study is to evaluate the efficacy of ALA treatment, administered orally, in the reduction of pain in different clinical settings at two doses (800 and 400 mg/day) by a monocentric, randomised double-blind placebo-controlled clinical trial.

## PRIMARY AND SECONDARY OUTCOMES

### Primary Outcome

The primary outcome regarding:

- the pain using validated questionnaires, such as the Numerical Rating Scale (NRS) and the Visual Analogue Scale (VAS) at baseline (t0) and after 2 months (t1);
- effect on fasting blood glucose in normoglycemic or mildly dysglycaemic subjects at t0 and t1.

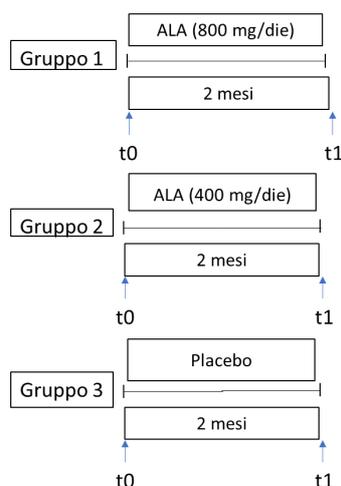
### Secondary Outcome

The secondary outcome regarding:

- evaluation of possible hepatic and renal toxicity resulting from oral administration of ALA at t0 and t2.
- evaluation of possible adverse reactions through the compilation of the form specifically prepared according to the Italian Phytovigilance System (IPS) at t0 and t2.

## STUDY DESIGN

A monocentric, randomized, double-blind, placebo-controlled 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  $\alpha = 0.05$ . The sample size was determined to be 210 subjects.

Effect size	(1- $\beta$ )= 0.99 $\alpha =0.05$	(1- $\beta$ )= 0.95 $\alpha =0.05$	(1- $\beta$ )= 0.80 $\alpha =0.05$
f=0.10 (piccolo)	540	390	246
f=0.14 (5%)	276	<u>201</u>	126
f=0.25 (medio)	90	66	42

### 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 (3 levels: PLACEBO, GROUP 1, GROUP 2) and effect within subject (2 levels: t0 and t1).

### BLINDING

The study will be double-blind as neither the investigating physician nor the enlisted subject will know which ALA 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 patient 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**

Patients of both sexes, aged 18-75, were considered eligible for enrolment if they suffered of arthralgia, primitive neuropathic pain, idiopathic myalgia, who not can or want to take analgesic drugs (FANS), who have fasting glycemia below 110 mg/dl and signed informed consent.

## **EXCLUSION CRITERIA**

Pregnant women, women suspected of being pregnant, women who hoped to become pregnant, breastfeeding women, patients with allergies, congenital or acquired immunodeficiency syndrome, fasting glycaemia above 110 mg/dl, obese (BMI>30kg/m<sup>2</sup>), pharmacology therapy for the diabetes, cardiovascular diseases, systemic chronic disease, therapy of analgesic, anti-inflammatory or food supplements for the pain, and those considered unsuitable for the participation by the physician were excluded from the study.

## **METHODS**

Subjects enrolled by Dott. Gaetano Piccinocchi, operating in Naples ASL area, will be divided in three groups (70 subjects for group). In particular, subjects assuming the daily dose of 800 mg/day of ALA (two tablets of 400 mg) to confirm the efficacy and safety (group 1); subjects assuming 400 mg/day of ALA (one tablet of ALA and one tablet of placebo), to confirm minimal dose potentially effective (group 2); subjects assuming placebo (two tablets of placebo) (group 3).

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 be subjected two visits (baseline = t0 and after 2 months=t1) in an outpatient setting. After each clinical visit, all data are filled in the CRF by physicians. In detail:

**Baseline visit (t0):** information on the sociodemographic, clinical and symptomatologic characteristics of the subjects; numerical rating scale (NRS) and visual analogue scale (VAS) results; fasting blood glucose assessment; renal and hepatic toxicity assessment by blood test for the evaluation of creatinine level, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST).

**After 2 months (t1):** assessment of possible adverse reaction after the ingestion of the food supplement by a specific form based on the one used by the Italian Phytovigilance System (IPS), National Institute of Health; numerical rating scale (NRS) and visual analogue scale (VAS) results; fasting blood glucose assessment; renal and hepatic toxicity assessment by blood test for the evaluation of creatinine level, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST).

## **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 (ALA-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 pain. Subjects will be continuously monitored and their liver and kidney function assessed before and after two months.

## 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](http://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

<b>Dott. Gaetano Piccinocchi</b>
<b>Address:</b> Maria Bakunin street, 80126

Naples, Italy.
<b>Phone:</b> +39 3331116150
<b>e-mail:</b> <a href="mailto:piccinocchi.gaetano@simg.it">piccinocchi.gaetano@simg.it</a>

## PARTECIPATING CENTERS

Comegen, medical office of Dott. Gaetano Piccinocchi, operanting in Napoli 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.