

# Sperimentazioni Cliniche

---

## Pianificazione e conduzione delle sperimentazioni cliniche:

### *Rapporto del Sottocomitato Sperimentazioni Cliniche del Workshop Internazionale dell'Occhio Secco (2007)*

**ABSTRACT.** Questo rapporto riassume alcuni concetti universali riguardanti le sperimentazioni cliniche in generale e altri argomenti relativi alle sperimentazioni cliniche con particolare riferimento allo studio di interventi terapeutici nella malattia dell'occhio secco.

Il rapporto fornisce inoltre delle indicazioni per la pianificazione logistica e la messa in opera di tali sperimentazioni. Identifica le peculiarità della malattia dell'occhio secco che complicano la pianificazione della sperimentazione clinica, come la mancanza di correlazione di segni e sintomi e la possibilità di gruppi di controllo con effetto lubrificante (placebo).

Le strategie per le sperimentazioni ambientali e quelle in ambiente avverso controllato sono state riviste.

**PAROLE CHIAVE.** Sperimentazioni cliniche, DEWS, occhio secco, Workshop dell'occhio secco.

#### **I. INTRODUZIONE**

Le sperimentazioni cliniche nella malattia dell'occhio secco rappresentano una sfida per clinici, epidemiologi, biostatistici e per coloro che richiedono l'approvazione ufficiale per farmaci o altre terapie<sup>(1)</sup>. Questo rapporto riassume alcuni concetti universali riguardanti le sperimentazioni cliniche in generale e rivolge l'attenzione ad altri argomenti relativi alle sperimentazioni cliniche finalizzate allo studio di interventi terapeutici nella malattia dell'occhio secco. Il livello di evidenza che supporta i dati derivanti dalle sperimentazioni cliniche è indicato nella bibliografia, secondo le linee guida modificate dell'*American Academy of Ophthalmology Preferred Practices*. Il rapporto fornisce inoltre delle indicazioni per la pianificazione logistica e la messa in opera di tali sperimentazioni.

#### **II. OBIETTIVI DEL SOTTOCOMITATO SPERIMENTAZIONI CLINICHE**

Gli obiettivi del Sottocomitato Sperimentazioni Cliniche erano: rivedere in modo sistematico la letteratura, le procedure e i concetti relativi alle sperimentazioni cliniche in generale, considerare argomenti particolari inerenti le sperimentazioni cliniche che implicavano interventi terapeutici nell'occhio secco e presentare le linee guida per la buona conduzione delle sperimentazioni cliniche.

#### **III. LINEE GUIDA PER LE SPERIMENTAZIONI CLINICHE IN GENERALE**

Prima di iniziare una sperimentazione clinica, deve sussistere un rationale. In altre parole, deve esserci un sufficiente dubbio riguardo l'efficacia del particolare intervento preso in considerazione, per giustificare la sua interruzione da una porzione di soggetti studiati, e, allo stesso tempo, ci deve essere sufficiente convinzione del potenziale terapeutico dell'intervento per giustificare la sua applicazione alla restante porzione di partecipanti allo studio. Se sussistono queste condizioni, allora bisogna considerare una serie di altre questioni per stabilire la pianificazione e la conduzione della sperimentazione clinica al fine di ottenere dei validi risultati (*Tab. 1*). Importanti processi includono la formulazione di un quesito specifico e conci-

---

Membri del Sottocomitato Sperimentazioni Cliniche: Kazuo Tsubota, MD (Chair); Penny Asbell, MD; Murat Dogru, MD; Desmond Fonn, OD; Gary Foulks, MD (captain); Debra Schaumberg, ScD, OD, MPH; Oliver Schein, MD, MPH; Hitoshi Watanabe, MD.

Si potrà avere accesso agli articoli originali presso il sito [www.tearfilm.org](http://www.tearfilm.org).

La corrispondenza legata a questo capitolo del rapporto DEWS può essere indirizzata a: Kazuo Tsubota MD, Ophthalmology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan. Tel: 81-3-3353-1211. Fax: 81-3-3352-8703. Email: [tsubota@sc.itc.keio.ac.jp](mailto:tsubota@sc.itc.keio.ac.jp).

**STRUTTURA DEL CAPITOLO**

- I. Introduzione
- II. Obiettivi del Sottocomitato Sperimentazioni Cliniche
- III. Linee guida per sperimentazioni cliniche in generale
  - A. Pianificazione
  - B. Criteri di inclusione ed esclusione
  - C. Outcomes (obiettivi)
  - D. Dimensione dei campioni, randomizzazione e analisi dei dati
  - E. Gestione di una sperimentazione clinica
- IV. Linee guida per le sperimentazioni cliniche nella malattia dell'occhio secco
- V. Osservazioni derivanti da precedenti sperimentazioni cliniche nell'occhio secco
  - A. Peculiarità delle sperimentazioni cliniche nell'occhio secco
  - B. Parametri della valutazione e dei risultati
  - C. Attributi suggeriti delle sperimentazioni cliniche nell'occhio secco
- VI. Caratteristiche per facilitare le sperimentazioni cliniche d'equipe, multicentriche ed internazionali.

**Tabella 1****Attributi di una sperimentazione clinica ben pianificata**

- Formulazione di un quesito di studio conciso e specifico.
- Specificazione di una misura di outcome primario.
- Stima statistica della dimensione del campione necessario.
- Specificazione della lunghezza del *follow-up* e schema specifico per le valutazioni di base e nel *follow-up*.
- Selezione della popolazione di studio.
- Definizione della misura dell'outcome primario.
- Distribuzione randomizzata dell'intervento (interventi)/trattamento (trattamenti).
- Strategie per il mantenimento della compliance con l'intervento (interventi)/trattamento (trattamenti) effettuato, e per il raggiungimento di tassi alti e bilanciati di *follow-up*.
- Creazione di una struttura organizzativa e decisionale
- Specificazione delle procedure per l'immissione di dati per il corretto monitoraggio del paziente.

so, la specificazione della misura dell'*outcome* primario, la valutazione statistica della grandezza del campione necessaria, la specificazione della lunghezza del *follow-up*, uno schema specifico per le valutazioni di base e nel *follow-up*, la selezione della popolazione in studio, la definizione della misura dell'*outcome* primario, la randomizzazione dell'intervento (interventi)/del trattamento (trattamenti), la creazione di strategie per mantenere la *compliance* all'intervento (interventi)/trattamento (trattamenti) effettuato e il raggiungimento di tassi alti e bilanciati di *follow-up*. Inoltre, è importante stabilire una struttura organizzativa e decisionale e stabilire delle procedure specifiche per l'immissione dei dati e per il corretto monitoraggio del paziente.

**A. Pianificazione**

Lo study design più auspicabile per una sperimentazione clinica consiste nell'ideazione di uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con gruppo placebo di controllo in parallelo, in *cross-over*. Altri studies design accettabili includono sperimentazioni di equivalenza o superiorità per paragonare una nuova terapia a quella che è già stata approvata o alla terapia in uso. Queste sperimentazioni devono anche essere impostate come studi prospettici randomizzati e in cieco<sup>(2-5)</sup>. Studi di gruppi paralleli dovrebbero idealmente fornire la comparabilità a livello demografico, di clima ambientale e di attività. Con un campione sufficientemente ampio, la randomizzazione tenderà ad assicurare una distribuzione equa delle caratteristiche demografiche sui gruppi di trattamento.

Se uno o più fattori demografici (p.es. sesso, età) fossero oggetto di qualche dubbio, un'equa distribuzione di questi fattori nei gruppi trattati può essere raggiunta rando-

mizzando a piccoli blocchi. Sfortunatamente, questa tecnica è generalmente poco pratica e aumenta in modo considerevole il numero di pazienti da controllare per trovare le giuste combinazioni.

In generale, le sperimentazioni con *cross-over* hanno il vantaggio di usare il paziente che effettua un controllo autonomo, ma creano problemi di confusione quando, come per l'occhio secco, esiste la possibilità che gli effetti persistenti di un trattamento si sovrappongano a quelli di un altro. Inoltre, se un trattamento interferisce con un altro, gli effetti conseguenti dei farmaci o dei trattamenti potrebbero essere fuorvianti. In uno studio con *cross-over* si parte da tre presupposizioni:

1. Il trattamento non cura la malattia.
2. Non c'è alcun rapporto tra i periodi.
3. Per contribuire all'analisi, tutti i pazienti devono completare tutte le fasi dello studio.

Il vantaggio di uno studio in *cross-over* su uno studio in parallelo si basa sul presupposto che la variabilità intrapazienti è minore rispetto alla variabilità inter-pazienti. Questo non è sempre vero. Periodi di *washout* con trattamenti placebo possono essere utilizzati per eliminare gli effetti duraturi della terapia precedente, ma la durata del periodo di *washout* deve essere sufficiente per rendere quest'ultimo efficace e la durata sufficiente può variare secondo gli agenti specifici testati. Considerando tutto questo, una strategia importante di compensazione nelle sperimentazioni con *cross-over* è quella di randomizzare la sequenza della somministrazione degli agenti testati e di controllo, in modo tale che alcuni individui riceveranno prima una terapia attiva, mentre altri riceveranno prima una terapia di controllo.

## B. Criteri di inclusione ed esclusione

Appropriati criteri di inclusione ed esclusione sono essenziali per assicurare l'integrità della sperimentazione. I criteri di inclusione dovrebbero identificare un numero di variabili appropriate specificatamente al fine di definire la popolazione che verrà analizzata (Tab. 2). Questi criteri generalmente includono:

1. La possibilità dei soggetti di fornirne il consenso informato.
2. La possibilità di osservare il protocollo.
3. La sussistenza di una malattia sufficientemente grave da dimostrare un effetto della terapia statisticamente rilevante e clinicamente significativo.

I criteri diagnostici specifici vengono generalmente definiti per assicurare l'omogeneità dello status della malattia, che può portare ad uno studio più preciso.

I criteri di esclusione possono essere utilizzati per escludere, per esempio:

1. Soggetti con una malattia concomitante che potrebbe modificare la risposta alla terapia.
2. Soggetti che probabilmente non riuscirebbero a osservare il protocollo o che potrebbero non presentarsi per il *follow-up*.
3. Soggetti con una riconosciuta ipersensibilità o intolleranza alla terapia proposta (Tab. 3).

Al momento di selezionare i criteri di inclusione ed esclusione, l'esaminatore dovrebbe essere a conoscenza dei *trade-off* inerenti tra la validità interna della sperimentazione ed il suo grado di generalizzazione ad una popolazione più ampia di persone con la malattia di interesse. Criteri di inclusione ed esclusione minimamente restrittivi rendono il reclutamento più facile e forniscono una più ampia base per la generalizzazione delle scoperte scaturite dagli studi, ma gli effetti del trattamento possono venire nascosti dall'eterogeneità dello status della malattia.

## C. Misure degli outcomes (obiettivi)

La misura degli *outcomes* viene utilizzata per paragonare i trattamenti e può consistere in un evento clinico o nella misura di un *outcome* surrogato.

La misura dell'*outcome* primario dovrebbe essere selezionata prima di iniziare la raccolta dei dati, visto che il suo tasso di incidenza influenzerà vari aspetti della pianificazione dello studio, tra cui la lunghezza dello studio e la dimensione dei campioni.

Sebbene alcune sperimentazioni cliniche abbiano impiegato un'analisi *post-hoc* di variabili di *outcomes*, gli enti regolatori sono spesso riluttanti ad accettare queste analisi nelle sperimentazioni importanti. Tuttavia, è giusto che la maggior parte delle sperimentazioni raccolga e analizzi informazioni su un numero di misure di *outcomes* secondari. Questi possono fornire ulteriori informazioni che possono contribuire alla valutazione generale dei trattamenti studiati.

Le misure di *outcome* surrogato sono caratteristiche misurabili della malattia che in maniera attendibile riflettono un parametro di *outcome* che è clinicamente rilevante ma difficile da determinare con esattezza. Per esempio, la misurazione della frequenza dell'instillazione di gocce può essere una misura soggettiva surrogata quantificabile della frequenza /durata del discomfort che si presenta nel corso della giornata.

Analogamente, una misura surrogata oggettiva dell'osmolarità del film lacrimale potrebbe essere la conducibilità elettrica di un campione lacrimale. La misura di un *outcome* surrogato deve essere riconosciuta come un affidabile e importante dispositivo di controllo dell'*outcome*, ma può avere un valore speciale in condizioni quali quella dell'occhio secco, dove la correlazione dei segni e sintomi è debole ed è necessaria un'evidenza oggettiva dei cambiamenti nella malattia.

**Tabella 2**

### Criteri di inclusione per la sperimentazione clinica

- I soggetti devono essere in grado di fornire il consenso informato.
- I soggetti devono essere in grado di osservare il protocollo.
- La gravità della malattia deve essere sufficiente da dimostrare un effetto della terapia statisticamente rilevante e clinicamente significativo.
- I criteri specifici diagnostici devono essere definiti per assicurare l'omogeneità dello status della malattia, che può portare ad uno studio più preciso.
- I soggetti devono essere in grado di rispondere ai meccanismi di azione dell'intervento in analisi.

**Tabella 3**

### Criteri di esclusione per la sperimentazione clinica

- I soggetti che hanno una malattia concomitante che potrebbe modificare la risposta alla terapia.
- I soggetti che probabilmente non potrebbero seguire il protocollo o che non potrebbero presentarsi al *follow-up*.
- I soggetti con una riconosciuta ipersensibilità o intolleranza alla terapia proposta.
- I soggetti sottoposti nello stesso tempo a una terapia che ha un impatto sulla funzione lacrimale o sull'integrità della superficie oculare.
- I soggetti che si sono sottoposti ad interventi chirurgici o altri interventi sull'occhio che potrebbero confondere i parametri dell'esito o interferire con il meccanismo d'azione dell'intervento preso in esame.

#### D. Dimensioni dei campioni, randomizzazione e analisi dei dati

La dimensione dei campioni di una sperimentazione clinica dovrebbe essere sufficiente da permettere un'analisi statisticamente efficace dell'ipotesi primaria di studio. Può anche fornire confronti statistici con sottogruppi, se lo si ritiene necessario, per chiarire una reazione terapeutica. È importante che la sperimentazione sia sufficientemente ampia da essere in grado di rilevare un effetto del trattamento clinicamente significativo e statisticamente rilevante. L'analisi statistica deve essere appropriata per la dimensione del campione, la pianificazione, la misura degli *outcomes*, la durata dello studio. Il potere di rilevazione delle differenze tra i trattamenti è direttamente proporzionale alla dimensione del campione e alla differenza di trattamento e indirettamente proporzionale al valore alpha e alla variabilità. Un fattore determinante è la selezione di un parametro che abbia una differenza rilevante dal punto di vista clinico. Dopo di che si determina il numero necessario di pazienti per rilevare una differenza che sia sufficientemente consistente, dando per scontato che esista.

La randomizzazione dei trattamenti del gruppo sperimentale e di controllo è generalmente la migliore strategia disponibile nelle sperimentazioni cliniche per evitare errori sistematici di selezione del trattamento. Ci sono molti metodi per stabilire la randomizzazione. Oggi la maggior parte dei ricercatori usano dei metodi di randomizzazione elaborati dal computer, che possono essere ulteriormente stratificati dal sito di studio e da caratteristiche precedenti allo studio (p.es. gravità della malattia). Bisognerebbe elaborare una descrizione dello schema di randomizzazione per l'erogazione del trattamento. Questa descrizione dovrebbe includere sufficienti dettagli da permettere ad una persona di riprodurre lo schema di erogazione; il processo di assegnazione dovrebbe stabilire una chiara sperimentazione di verifica.

Le assegnazioni del trattamento dovrebbero essere mascherate al paziente, allo sperimentatore e alla persona che rilascia le assegnazioni, fino a che il paziente non è stato ufficialmente reclutato e randomizzato nello studio. Di preferenza, lo studio dovrebbe essere mascherato per i pazienti e gli sperimentatori fino al suo completamento. Tutto ciò potrebbe essere più semplice da eseguire se le assegnazioni fossero rilasciate da una persona o da un gruppo esterno alla clinica. I ricercatori dovrebbero anche sapere, in particolar modo negli studi piccoli, che si potrebbe verificare un errore sistematico di randomizzazione che deve essere controllato o valutato. Le caratteristiche basilari dei gruppi di studio possono anche variare per caso e, se sono abbastanza ampie, queste differenze possono avere un impatto sui confronti dei trattamenti. La strategia per l'analisi dei dati della sperimentazione clinica deve essere stabilita in anticipo e deve comprendere le variabili dell'*outcome* specificato con appropriati metodi di analisi.

La caratteristica chiave nell'analisi delle sperimentazioni cliniche è l'aderenza al principio di «intenzione di trattamento». Cioè, l'analisi primaria dei dati in una sperimentazione deve essere condotta classificando i soggetti di studio sulla base di un trattamento originale al quale erano assegnati, senza considerare il trattamento che effettivamente hanno ricevuto o la loro aderenza al protocollo di studio (Tab. 4). Una buona pratica clinica esige che la valutazione dei pazienti qualificati e le visite debbano essere fatte dalla direzione clinica (cioè il gruppo organizzativo) prima di aprire la chiave dell'assegnazione del trattamento. Inoltre, si dovrebbe dichiarare a priori nel protocollo e nel piano di analisi statistica quale sarebbe la popolazione primaria.

È possibile utilizzare dei metodi statistici per i dati mancanti, p.es. ultima osservazione riportata (*Last Observation Carried Forward - LOCF*) o la sostituzione dell'end point. Idealmente, l'efficacia e la precisione dei risultati provenienti da tutte le popolazioni dovrebbe essere in accordo generale. Tuttavia, possono verificarsi delle diversità, per esempio, quando si presenta un *drop-out* dei soggetti dovuto alla mancanza di efficacia o per motivi di sicurezza. Il *cross-over* del trattamento, una scarsa conformità e il mancato *follow-up* sono i fattori principali che minacciano la validità della sperimentazione clinica; bisognerebbe fare ogni sforzo necessario per assicurare l'aderenza al protocollo di studio e un completo *follow-up*. Qualora si verificasse una perdita nel *follow-up*, si è soliti condurre una serie di analisi che considerano varie ipotesi sul tasso di eventi tra i pazienti persi nel *follow-up*. Analogamente, le analisi secondarie possono tenere conto dei trattamenti ricevuti e delle differenze nella compliance, ma queste non costituiscono un sostituto dell'analisi primaria di «intenzione di trattamento».

I metodi analitici di base per le sperimentazioni cliniche possono essere trovati in molti libri di testo di biostatistica ed in altre fonti.

Le analisi degli *outcomes* basate sul confronto della proporzione dei pazienti che hanno riscontrato un *outcome* interessante costituiscono un comune metodo per analizzare i dati della sperimentazione. Questi sono generalmente va-

**Tabella 4**  
**Analisi dei dati: popolazioni da analizzare**

- Intenzione di trattamento (*intent-to-treat - ITT*) : Tutti soggetti randomizzati.
- Intenzione di trattamento Modificato (Mod ITT): tutti soggetti randomizzati che hanno ricevuto almeno una dose di farmaco
- Per Protocollo (*per-protocol - PP*): tutti i soggetti randomizzati che hanno completato il trattamento secondo protocollo.

lidi se la durata del *follow-up* è comparabile nei due gruppi di trattamento, le perdite di *follow-up* sono poco rilevanti e i gruppi di trattamento hanno delle caratteristiche di base comparabili.

La valutazione statistica della differenza nelle proporzioni può essere effettuata utilizzando il test esatto di Fisher, o un test del *Chi-quadro*, se adatto. Comunque, la semplice analisi della proporzione di pazienti che hanno riscontrato il risultato non prende in considerazione la lunghezza del *follow-up*, questo potrebbe essere importante nella messa in opera di molte sperimentazioni cliniche in cui i pazienti sono reclutati in un periodo di tempo molto lungo e poi seguiti secondo uno specifico calendario, con una conseguente variazione della lunghezza del *follow-up* del paziente.

L'analisi dei dati di questi studi è in genere effettuata attraverso lo studio dell'aspettativa di vita, un mezzo statistico per studiare la durata variabile del *follow-up*. Si possono fare degli aggiustamenti per quel che riguarda le differenze nelle caratteristiche di base grazie alla stratificazione o all'analisi multivariabile. I ricercatori dovrebbero sapere che la questione sulle componenti di importanza statistica è complessa e che dovrebbero interpretare i valori P con cautela, soprattutto perché la maggior parte delle sperimentazioni forniranno dati su un certo numero di misure di risultati. Questi confronti statistici non possono essere considerati reciprocamente indipendenti. E' imperativo fare delle considerazioni circa un aggiustamento appropriato per confronti multipli.

#### **E. Gestione di una sperimentazione clinica**

L'organizzazione e la gestione di una sperimentazione clinica sono fondamentali per la buona riuscita del progetto. E' auspicabile una struttura organizzativa per sperimentazioni su larga scala e multicentriche. Uno schema di organizzazione tipo è riportato nella *Figura 1*.

E' necessario prepararsi in anticipo e stabilire delle procedure standard per ogni fase della sperimentazione per evitare l'alto rischio di errore o evitare di perdere dei dati. Le appendici citate alla fine di questo capitolo sono disponibili presso il sito: [www.tearfilm.org](http://www.tearfilm.org). Sarebbe necessario preparare un Manuale delle Procedure. Gli elementi per un adeguato manuale sono elencati nell'*Appendice 1*<sup>(6-11)</sup>.

Sarebbe necessario mettere in pratica gli Standard per una buona pratica clinica (*Good Clinical Practice - GCP*) per assicurarsi la qualità del lavoro.

Le linee guida per gli sponsor e i ricercatori sono espresse nei dettagli nell'*Appendice 2* e includono l'osservazione dei requisiti regolatori tra cui:

1. Il ruolo dello sponsor.
2. Il ruolo del ricercatore.
3. Il ruolo dello studio clinico e funzionale del laboratorio.
4. Il comitato etico o il comitato per la protezione degli individui.

5. L'*International Conference on Harmonization*.

6. Le direttive degli organi regolatori<sup>(12-30)</sup>.

Bisognerebbe preparare la Brochure dello Sperimentatore per il farmaco testato (*Appendice 3*)<sup>(31)</sup>, indicare l'uso del prodotto farmacologico in studio (*Appendice 4*)<sup>(32-36)</sup>, identificare gli eventi avversi e la loro gestione (*Appendice 5*)<sup>(37-43)</sup>. Il processo di approvazione etica dovrebbe essere condotto attraverso un Comitato di Revisione Istituzionale appropriato. I dati derivanti dalle sperimentazioni cliniche dovrebbero essere resi disponibili dopo il completamento dello studio e dell'analisi dei dati<sup>(43)</sup>.

#### **IV. LINEE GUIDA PER LE SPERIMENTAZIONI CLINICHE NELLA MALATTIA DELL'OCCHIO SECCO**

Le considerazioni generali riguardanti le sperimentazioni cliniche nella malattia dell'occhio secco coinvolgono i concetti chiave delineati per le sperimentazioni cliniche in generale. La pianificazione delle sperimentazioni cliniche nella malattia dell'occhio secco può includere pianificazioni prospettiche ambientali o di provocazione. E' auspicabile la creazione di un apposito protocollo per l'ipotizzato meccanismo di azione di un farmaco o di un intervento da testare.

Una sperimentazione ambientale dovrebbe seguire le linee guida generali già menzionate con caratteristiche di inclusione prospettica, randomizzazione, doppio cieco, e controllo placebo/veicolo. Lo studio dovrebbe avere una durata sufficiente a dimostrare la sua efficacia e correttezza.

I criteri di inclusione ed esclusione dovrebbero identificare una popolazione potenzialmente responsiva ed essere selezionati per evitare o minimizzare i rischi di errori sistematici di osservazione. Questo approccio dovrebbe escludere:

1. La presenza o l'assenza di una qualsiasi malattia della superficie oculare che possa essere causa di occhio secco se non quella per cui il farmaco viene testato.
  2. La presenza o l'assenza di una malattia sistemica associata all'occhio secco diversa dalla condizione primaria che causa l'occhio secco.
  3. L'uso sistemico di farmaci con possibile influenza sul film lacrimale, sulla secrezione lacrimale o sulla superficie oculare.
  4. L'uso di farmaci topici concomitanti o precedenti che altererebbero la valutazione dell'effetto del farmaco o dell'intervento.
  5. Una storia di precedente chirurgia oculare, tra cui la chirurgia rifrattiva, i tatuaggi sulle palpebre, la chirurgia palpebrale o la chirurgia corneale.
  6. La presenza o assenza di malattie associate alle ghiandole di Meibomio adatte per lo studio dei parametri.
  7. La presenza o l'assenza di portatori di lenti a contatto.
- Il fatto che i pazienti si trovino in un regime stabile di te-

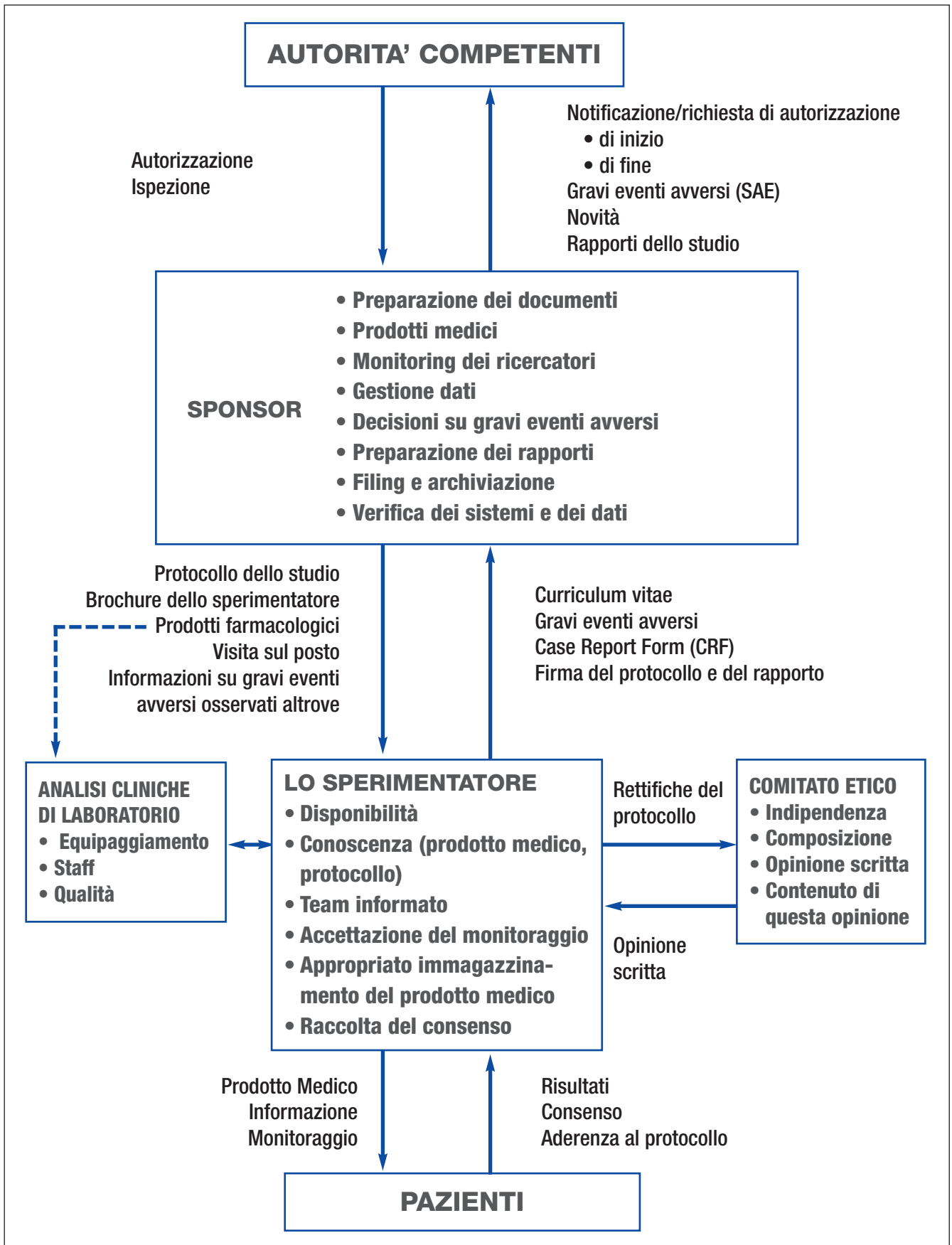


Figura 1. Organizzazione generale della sperimentazione clinica.

Ristampato con l'autorizzazione di: Spriet A, Dupin- Spriet T. Clinical trials and quality (chapter 1). In: *Good practice of clinical trials*. Svizzera, Karger, 2005, ed 3, p 7.

rapia lubrificante non sembra interferire specificatamente con il meccanismo dell'azione del farmaco o dell'intervento da testare, questi pazienti possono essere inclusi nello studio pur continuando ad usare lubrificanti. Tuttavia sarebbe necessario monitorare l'uso di questa terapia.

La dimensione dei campioni dovrebbe essere tale da permettere l'attuazione di una valida analisi statistica e di confronti statistici dei sottogruppi, qualora fosse necessario. La dimensione dei campioni dovrebbe avere un potere statistico in grado di supportare le conclusioni dello studio. Se le conclusioni dello studio giungono all'equivalenza dei due gruppi di trattamento, allora è importante considerare la capacità dello studio di rilevare una differenza clinicamente rilevante. Generalmente, è necessaria una capacità (beta) minima dell'80%. Bisognerebbe riconoscere e distribuire in maniera uniforme i vari gradi della gravità della malattia per evitare di indirizzare i risultati dello studio verso una possibile risposta terapeutica positiva o negativa. Bisognerebbe verificare la possibilità dei soggetti di seguire e completare lo studio.

Uno studio di provocazione con ambiente avverso controllato (*Controlled Adverse Environment - CAE*) può essere utilizzato per controllare l'ambiente, le attività dei soggetti o entrambi i fattori durante la sperimentazione clinica, considerando che un ambiente avverso può esasperare i sintomi e i segni dell'occhio secco<sup>(44)</sup>. Questo test è importante specialmente per stabilire l'effetto di un farmaco a breve termine. L'umidità, la temperatura e l'aria sono variabili ambientali che possono essere monitorate e manipolate. In attività richiedenti sforzo visivo, l'ammiccamento e la stabilità del film lacrimale possono essere monitorizzati. La pianificazione della sperimentazione dovrebbe riguardare uno studio controllato avente come caratteristiche l'analisi prospettica, la randomizzazione e il mascheramento (nella misura possibile).

Il riconoscimento di un possibile adattamento dei pazienti alle condizioni di ambiente avverso richiede aggiustamenti nell'analisi dei dati<sup>(45,46)</sup>. Quando si seleziona la popolazione di pazienti sulla base della risposta spontanea all'ambiente avverso, questa selezione potrebbe ridurre il grado di generalizzazione delle conclusioni dello studio all'intera popolazione dell'occhio secco.

## V. OSSERVAZIONI DERIVANTI DA PRECEDENTI SPERIMENTAZIONI CLINICHE NELL'OCCHIO SECCO

### A. Peculiarità delle sperimentazioni cliniche nell'occhio secco

I sintomi e i segni sembrano essere strettamente legati in alcune sperimentazioni e non in altre. La maggior parte delle sperimentazioni di farmaci ha mostrato una disparità nei segni e sintomi<sup>(47,76)</sup>. Esiste un apparente e preponderante effetto placebo nella maggior parte della sperimentazioni cliniche volte a valutare una terapia topica per la ma-

lattia dell'occhio secco<sup>(1)</sup>. Malgrado gli effetti placebo siano stati rilevati in numerose sperimentazioni che valutavano i sintomi, è stata notata anche un'importante risposta al placebo per parametri oggettivi osservati nelle sperimentazioni per l'occhio secco. La spiegazione di questa importante risposta placebo non è chiara, ma potrebbe essere parzialmente giustificata con una regressione verso la media.

L'effetto idratante e lubrificante sul gruppo di controllo può anche fornire un miglioramento nelle manifestazioni dell'occhio secco e anche solo la partecipazione ad una sperimentazione clinica sembra aumentare la compliance<sup>(3,5)</sup>. I miglioramenti osservati sia nel gruppo di controllo che nel gruppo di sperimentazione attiva dopo la randomizzazione alla terapia possono riflettere l'aspettativa e il desiderio del soggetto e dell'osservatore di un effetto positivo di qualsiasi terapia proposta. Questo fenomeno è stato definito «aspettativa di randomizzazione» e può influenzare la reazione a qualsiasi trattamento assegnato.

### B. Parametri della valutazione e dei risultati

Una revisione della letteratura rivela che il test di Schirmer, il tempo di rottura del film lacrimale (TFBUT), il grado di colorazione e i sintomi di discomfort sono i termini di confronto più comuni utilizzati nelle sperimentazioni cliniche dell'occhio secco. Esiste anche un'ampia gamma di *marker* usati in varie sperimentazioni, che dipendono dalla natura del farmaco, p.es. sostituti lacrimali, farmaci anti infiammatori e segretogoghi. Un'osservazione scaturita da questa revisione riguardava la durata delle sperimentazioni; le sperimentazioni che includevano sostituiti lacrimali erano relativamente brevi, tra le 6 e le 8 settimane, mentre le sperimentazioni che includevano agenti antinfiammatori o segretogoghi erano più lunghe (8-12 settimane con un *follow-up* che variava tra i 3 e i 12 mesi).

Oltre ai termini di confronto sopraelencati, le sperimentazioni che includevano agenti antinfiammatori utilizzavano esami, *markers* biologici ed *end points* che includevano la citologia ad impressione (numero di cellule calciformi, morfologia dell'epitelio, espressione dell'HLA DR, CD 3,4,8,40, Apo 2.7 e il profilo di citochine).

Le sperimentazioni sugli agenti segretogoghi consideravano l'osmolarità, le MUC 1,2,4 e l'espressione di MUC 5AC mRNA. A parte gli *end points* comuni già citati, le sperimentazioni sugli strumenti per rallentare il deflusso lacrimale, come i *goggles* e i *punctum plugs*, prendevano in considerazione il tasso di eliminazione delle lacrime, l'osmolarità lacrimale e l'indice funzionale lacrimale (TFI) oltre alla standardizzazione dell'umidità e della temperatura ambientale. Questi parametri sono stati usati per la valutazione di terapie con: lacrime artificiali<sup>(47-52)</sup>; agenti antinfiammatori, inclusi i corticosteroidi<sup>(53,54)</sup> e ciclosporina<sup>(55-61)</sup>; siero autologo<sup>(62-66)</sup>; segretogoghi, inclusi quelli per la stimolazione della componente acquosa<sup>(67-72)</sup> e mucosa<sup>(73-78)</sup>; apparecchiature<sup>(79-86)</sup> e varie terapie<sup>(87,88)</sup>.

### C. Attributi suggeriti delle sperimentazioni cliniche nell'occhio secco

I criteri di inclusione per le sperimentazioni cliniche nell'occhio secco dovrebbero identificare, basandosi sul meccanismo di azione del trattamento o dell'intervento proposto, una popolazione potenzialmente reattiva nella quale è possibile che i trattamenti o gli interventi si dimostrino efficaci.

I criteri di inclusione ed esclusione dovrebbero selezionare una specifica popolazione che eviti o minimizzi la regressione verso la media e le variabili che potrebbero confondere i risultati dello studio. I criteri di esclusione sono espressi nel dettaglio nella *Sezione IV*.

E' auspicabile la costituzione di un protocollo appropriato per il meccanismo di azione del farmaco o dell'intervento da testare. Le variabili degli *outcomes* dovrebbero essere selezionate in accordo con il meccanismo di azione del farmaco o dell'intervento in esame.

Il Sottocomitato consiglia caldamente l'inclusione dei *marker* biologici e/o di *marker* surrogati dello stato della malattia per le sperimentazioni future, in accordo con il continuo sviluppo della tecnologia, ma riconosce che occorre confermare la validità di tali *marker* surrogati. Per esempio l'aumento dell'osmolarità delle lacrime è un *marker* stabilito di occhio secco ed esistono dei metodi per misurarla. I *marker* surrogati possono essere diretti o correlati. I *marker* surrogati diretti sono quelli che derivano dalle stesse proprietà chimiche o fisiche dei *marker* primari, p.es. conduttività lacrimale vista come una misura di osmolarità lacrimale. I *marker* surrogati correlati sono quelli che sono correlati con il *marker* primario ma che possono essere prodotti anche da altri meccanismi, p.es. un singolo livello di citochina infiammatoria come *marker* di infiammazione.

Nella malattia dell'occhio secco, in cui la variabilità di un segno o un sintomo può essere largamente influenzata in qualsiasi momento da atteggiamenti riguardanti l'attività fisica o da fattori ambientali, la misurazione di *marker* affidabili e duraturi dell'attività della malattia dovrebbe essere considerata come una valida misura di efficacia di qualsiasi terapia o intervento. Le misure degli esiti dovrebbero essere valutate con dovuta accuratezza e riproducibilità. La misura del parametro di *outcome* primario dovrebbe essere fatta attraverso un test già ben sperimentato. Questo è vero per i segni clinici della malattia, per surrogati di misure, per i sintomi di discomfort e per i disturbi visivi<sup>(89-96)</sup>. La variabile di *outcome* primaria può essere un sintomo o un segno per un'analisi valida dell' *outcome*, ma l'approvazione dell'organo regolatorio potrebbe, in alcuni paesi, richiedere entrambi. I sintomi dovrebbero essere classificati in un sistema ben definito, come la scala analogica visiva (*Visual Analog Scale - VAS*) o la scala di Likert<sup>(2,97)</sup>.

Riconoscendo l'importanza dell'effetto placebo nelle sperimentazioni cliniche nell'occhio secco, il Sottocomitato ha

fatto numerose osservazioni. Dato che un vero placebo sembra comunque avere un effetto lubrificante, si potrebbe prendere in considerazione un braccio di non trattamento. Malgrado questo piano abbia delle limitazioni inerenti a possibili revisioni istituzionali e malgrado i pazienti possano fare uso saltuario di lubrificanti da banco che potrebbero confondere il risultato, tale piano è comunque degno di considerazione. In assenza di un protocollo, il Sottocomitato si raccomanda di considerare: una sperimentazione randomizzata e mascherata, in cui l'inizio del trattamento è nascosto sia al ricercatore che al soggetto, o uno studio withdrawal (con cessazione di somministrazione) in cui tutti i pazienti ricevono una cura attiva, seguita dalla randomizzazione del veicolo. Un vantaggio di questo studio è che tutti i soggetti ricevono una cura attiva ad un certo punto della sperimentazione e questo può servire ad invogliare i soggetti a far parte della sperimentazione.

Il Sottocomitato raccomanda l'inclusione dei seguenti parametri di esito:

1. Una misura oggettiva della funzione visiva (p.es. acuità visiva funzionale).
2. La determinazione della produzione e del volume lacrimale (p.es. test di Schirmer o test di diluizione della fluoresceina).
3. La determinazione della stabilità lacrimale (p.es. rottura del film lacrimale con fluoresceina TFBUT o uso di strumento non invasivo per determinare il TFBUT come la videocheratografia<sup>(96)</sup>).
4. Misura della composizione lacrimale (p.es. osmolarità, determinazione di contenuto proteico specifico, misura dei mediatori infiammatori nelle lacrime).
5. Misura dell'integrità della superficie oculare.

Si ritiene che l'integrità della superficie oculare sia al momento determinata nel miglior modo attraverso la colorazione della superficie oculare con fluoresceina, verde lissamina o rosa bengala (*vedi parametri del Rapporto del Sottocomitato Metodologia Diagnostica per le giuste dosi e l'uso di filtri di barriera*)<sup>(98)</sup>, anche se le limitazioni di questa valutazione sono state documentate in precedenti sperimentazioni cliniche<sup>(58,69,76)</sup>. Un sistema di classificazione standard dovrebbe catalogare separatamente la colorazione corneale e congiuntivale e registrare i punteggi delle aree individuali ed i punteggi delle aree combinate, per effettuare uno studio approfondito (*vedi Rapporto Sottocomitato Metodologia Diagnostica per l'apposito sistema di classificazione*)<sup>(98)</sup>. Il sistema di valutazione dovrebbe tener conto di uno o due punti di colorazione nel quadrante infero-nasale della cornea, perché questo tipo di colorazione si può verificare nei soggetti normali<sup>(99-107)</sup>.

La colorazione della caruncola congiuntivale e della piega semilunare non dovrebbe essere tenuta in considerazione, visto che si verifica nella maggior parte dei soggetti normali<sup>(101)</sup>.

Altri test che possono essere inclusi come misure di esito

negli specifici protocolli possono includere la citologia a impressione e la citometria a flusso (*per sperimentazioni selezionate, vedi parametri dal Rapporto del Sottocomitato Metodologia Diagnostica per il metodo appropriato e la procedura di colorazione*)<sup>(98)</sup>.

I progressi tecnologici nella misurazione della stabilità del film lacrimale, la misurazione del volume del menisco lacrimale, la misurazione della protezione della superficie lacrimale e la permeabilità dell'epitelio potranno in futuro permettere una precisa determinazione della funzione lacrimale e dell'integrità della superficie oculare. Tuttavia, al momento, non sono stati convalidati da sperimentazioni cliniche.

L'analisi degli *outcomes* in una malattia multifattoriale, con molti parametri clinici di alterazioni del film lacrimale, di danno alla superficie oculare e di scarsa funzionalità, può condurre alla composizione di indici di gravità della malattia. Questo approccio è stato utilizzato per la valutazione delle malattie reumatiche, con lo sviluppo degli indici (ACR 50 e ACR 70) dell'*American Congress of Rheumatology* (ACR) che valutano i molteplici fattori descrittivi della gravità della malattia.

Al momento, è stata fatta una valutazione inadeguata di questi indici compositi e non sono disponibili indici già convalidati. Il comitato ritiene che in futuro sarà necessario sviluppare e rendere validi tali indici per la valutazione della malattia dell'occhio secco.

Un'analisi statistica appropriata e accuratamente pianificata è fondamentale nella valutazione dei dati della sperimentazione clinica. La strategia dell'analisi dipenderà dalla variabile di *outcome* primario selezionata per la sperimentazione e deve essere scelta prima dell'inizio della raccolta dei dati. Sarà necessario aderire al principio generale

dell'analisi di intenzione di trattamento per l'analisi primaria dei dati.

## **VI. CARATTERISTICHE PER FACILITARE LE SPERIMENTAZIONI CLINICHE D'EQUIPE INTERNAZIONALI E MULTICENTRICHE**

Il Sottocomitato suggerisce lo sviluppo dei criteri da usare in ambito internazionale. L'uso di una terminologia uniforme è un importante aspetto da considerare per le sperimentazioni internazionali. Ciò potrebbe richiedere una doppia traduzione per chiarezza e precisione.

È necessario chiarire le connotazioni etniche o culturali o le implicazioni nella terminologia. Ci dovrebbe essere un'interpretazione uniforme delle variabili di esito con protocolli standard per la misura e la registrazione dei dati. Le procedure di verifica dovrebbero essere uniformi, con l'uso di reagenti standard, protocolli standard e una registrazione conforme dei risultati. Per mantenere lo stesso grado di abilità del personale addetto alla raccolta dati e degli osservatori, è necessario includere la certificazione dei ricercatori, dei coordinatori di ricerca e dei tecnici. Bisognerebbe tentare di ridurre gli errori sistematici legati alle differenze della popolazione (razza, etnia, clima).

Le Appendici di seguito elencate sono disponibili presso il sito [www.tearfilm.org](http://www.tearfilm.org):

- *Appendice 1* - Schema di un manuale di procedure.
- *Appendice 2* - Linee guida per una buona pratica clinica.
- *Appendice 3* - Composizione della Brochure dello sperimentatore per il farmaco testato.
- *Appendice 4* - Uso di prodotti farmacologici per la conduzione di un'indagine.
- *Appendice 5* - Eventi avversi e gestione problematiche.

## Bibliografia

(Parenthetical codes following some references indicate level of evidence according to the American Academy of Ophthalmology Preferred Practices guidelines).

- Foulks GN. Challenges and pitfalls in clinical trials of treatments for dry eye. *Ocul Surf* 2003;1:21-36.
- Chow SC, Liu J-P. Design and analysis of clinical trials: concept and methodologies. John C Wiley and Co, New York, 1998;5:6,180.
- Hrobjartsson A, Gotzsche PC. Is the placebo powerless? An analysis of clinical trials comparing placebo with no treatment. *N Engl J Med* 2001;345:1277-8.
- Wehrauch TR, Gauler TC. Placebo-efficacy and adverse effects in controlled clinical trials. *Arzneimittel-Forschung* 1999;49:385-93.
- Shapiro AK, Shapiro E. The powerful placebo. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1997;149.
- Belorgey C, Demarez JP, Jaillon P, Giens XVII. Good clinical practice in clinical trials: training physicians, incentives to apply good clinical practice and assessment of compliance. *Therapie* 2002;57:339-46.
- Bohaychuk W, Ball G. Conducting GDP-compliant clinical research. Chichester, John Wiley and Sons, 1999.
- Bohaychuk W, Ball G. Standard operating procedures for clinical research personnel. *Quality Assurance J* Part 1, 1998;3:137-50. Part 2, 2000;4:31-46. Part 3, 2000;4:95-106. Part 4, 2000;4:151-68. Part 5, 2000;4:211-23. Part 6, 2001;5:37-47. Part 7, 2001;5:91-112. Part 8, 2001;5:163-73. Part 9, 2001;5:221-40. Part 10, 2002;6:23-32. Part 11, 2002;6:33-43. Part 12, 2002;6:103-11. Part 13, 2002;6:187-95. Part 14, 2002;6:235-44. Part 15, 2003;7:41-9. Part 16, 2003;7:100-12.
- Gerlis L. Sample standard operating procedures for good clinical practice. Richmond, PJB Publications, 1988.
- Spriet A, Dupin-Spriet T. Evaluation des therapeutiques. In: Herve P, Riffe G, Vuitton DA, et al., Eds. Transplantation d'organes et greffes de tissus. Paris, INSERM, John Libbey, 1994;77-97.
- Spriet A, Dupin-Spriet T, Simon P. Methodology of clinical drug trials. Basel, Karger, 1994.
- DeAngelis C, Fontanarosa PB, Flanagan A. Reporting financial conflicts of interest and relationships between investigators and research sponsors. *JAMA* 2001;286:89-91.
- Decoster G, Wahl M. Insuring subjects in clinical trials: sponsors need to work through a regulatory maze. *Appl Clin Trials* 1998;7:30-6.
- Dupin-Spriet T, Spriet A. Des essais cliniques pour un dossier international. Quelles difficultes? *STP Pharma Pratiques* 1993;3:1-5.
- European Parliament and Council of the European Union. Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council of April 2001 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use. Official Journal of the European Communities L 121/34-44/34-44.
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Explanatory note and comments to the ICH harmonized tripartite guideline E6: Note for Guidance on Good Clinical Practice (CP MP/ICH/135/95, CP MP/768/97. 8 September 1997.
- European Commission Enterprise Directorate-General. The rules governing medicinal products in the European Union. Volume 4, Good Manufacturing Practices, Annex 13, Manufacture of investigational medicinal products. July 2003.
- Horton R. Conflicts of interest in clinical research: opprobrium or obsession? *Lancet* 1997;349:1112-3.
- Hvidberg EF. Achieving investigator compliance. *Drug Information J* 1993;27:1107-10.
- Imada S. An update on good clinical practice legislation in Japan. *Quality Assurance J* 1998;3:37-42.
- Inoue K, Hasebe S. The quality assurance and quality control issue for sponsors on GCP compliance in Japan. *Quality Assurance J* 1999;3:65-9.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH topic E3. Structure and content of clinical study report. November 1995.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH topic E6. Note for guidance on good clinical practice. July 1996.
- International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH topic E9. Statistical principles for clinical trials. February 1998.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH topic S4A. Note for guidance on duration of chronic toxicity in animals (rodent and non rodent toxicity testing). November 1998.
- European Agency for Evaluation of Medicinal Products. ICH topic M3(M). Note for guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals. November 2000.
- Lacombe D. Insuring international clinical trials. An academic viewpoint. *Appl Clin Trials* 1998;7:24-9.
- Moses H, Martin JB. Academic relationships with industry. A model for biomedical research. *JAMA* 2001;285:933-5.
- US Code of Federal Regulations. Title 21: Food and Drugs. Part 50: Protection of human subjects. Part 56: Institutional review boards. Part 312: Investigational new drug application. April 2003.
- US Food and Drug Administration. Guidance for industry. Financial disclosure by clinical investigators. March 20, 2001.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH topic E6. Good clinical practice consolidated guideline. Section 7: Investigator's brochure. July 1996.
- Dupin-Spriet T, Spriet A. Les bonnes pratiques de fabrication des médicaments pour essai clinique, in Medicament, Ethique et Realite Industrielle. La reglementation pharmaceutique-Principes et philosophie. Paris, Editions de Sante 1996.
- International Air Transport Association. IA TA dangerous goods regulations 44th edition, 2003.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH topic Q1A (R2). Stability testing of new drug substances and products. August 2003.
- Lantz RJ Jr. Stability aspects of clinical supplies and scale-up studies. *Drug Development Industrial Pharmacy* 1984;10:1425-32.
- US Food and Drug Administration. Center for Drugs and Biologics. Office of Drug. Department of Health and Human Services. Guideline for submitting documentation for the stability of human drugs and biologics. Rockville, Food and Drug Administration, 1987.
- Begaud B, Evreux JC, Jouglard J, Lagier G. Imputation of the unexpected or toxic effects of drugs. Actualization of the method used in France. *Therapie* 1985;40:111-8.
- European Commission Enterprise Directorate-General. Detailed guidance on the European database of suspected unexpected serious adverse reactions (Eudravigilance-clinical trial module). April 2003.
- European Commission Enterprise Directorate-General. Detailed guidance for the request for authorization of a clinical trial on a medicinal product for human use to the competent authorities, notification of substantial amendments and declaration of the end of the trial. April 2003.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH topic E2A. Clinical safety data management: definitions and standards for expedited reporting: availability, notice. November 1994.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH topic E2B (M). Maintenance of the ICH guideline on clinical safety data management: data elements for transmission of individual case safety reports. February 2001.
- Karch FE, Lasagna L. Toward the operational identification of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther* 1977;21:247-54.
- US Code of federal regulations title 21, vol. 5. Part 312 Investigational New Drug application. Subpart B Section 312.32 IND safety reports.
- Ousler G, Gomes PJ, Welch D, Abelson MB. Methodologies for the study of ocular surface disease. *Ocul Surf* 2005;3:143-54.
- Ousler GW 3rd, Abelson MB, Nally LA, et al. Evaluation of time to 'natural compensation' in normal and dry eye subject populations during exposure to a controlled adverse environment. *Adv Exp Med Biol* 2002;506(Pt B):1057-63.
- Abelson MB, Ousler GW3rd, Nally LA, et al: Alternative reference values for tear film break up time in normal and dry eye populations. *Adv Exp Med Biol* 2002;506(Pt B):1121-5.
- Lopez Bernal D, Ubels JL. Quantitative evaluation of the corneal epithelial barrier: effect of artificial tears and preservatives. *Curr Eye Res* 1991;10:645-56 (LA1).
- Lopez Bernal D, Ubels JL. Artificial tear composition and promotion of recovery of the damaged corneal epithelium. *Cornea* 1993;12:115-20 (LA1).
- Gilbard JP, Farris RL. Tear osmolality and ocular surface disease in keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol* 1979;97:1642-6 (LA1).
- Christensen MT, Cohen S, Rinehart J, et al. Clinical evaluation of an HP - guar gellable lubricant eye drop for the relief of dryness of the eye. *Curr Eye Res* 2004;28:55-62 (LA1).
- Sand BB, Marner K, Norn MS. Sodium hyaluronate in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. A double masked clinical trial. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1989;67:181-3 (LA1).
- Nelson JD, Farris RL. Sodium hyaluronate and polyvinyl alcohol artificial tear preparations. A comparison in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arch*

- Ophthalmol* 1988;106:484-7 (LA1).
53. Pflugfelder SC, Maskin SL, Anderson B, et al. A randomized, doublemasked, placebo-controlled, multicenter comparison of loteprednol etabonate ophthalmic suspension, 0.5%, and placebo for treatment of keratoconjunctivitis sicca in patients with delayed tear clearance. *Am J Ophthalmol* 2004;138:444-57 (LA1).
  54. Avunduk AM, Avunduk MC, Varnell ED, Kaufman HE. The comparison of efficacies of topical corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory drops on dry eye patients: a clinical and immunocytochemical study. *Am J Ophthalmol* 2003;136:593-602 (LA1).
  55. Gunduz K, Ozdemir O. Topical cyclosporin treatment of keratoconjunctivitis sicca in secondary Sjogren's syndrome. *Acta Ophthalmol* (Copenh) 1994;72:438-42 (LA1).
  56. Laibovitz RA, Solch S, Andriano K, et al. Pilot trial of cyclosporine 1% ophthalmic ointment in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. *Cornea* 1993;12:315-23 (LA1).
  57. Stevenson D, Tauber J, Reis BL. Efficacy and safety of cyclosporin A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. The Cyclosporin A Phase 2 Study Group. *Ophthalmology* 2000;107:967-74 (LA1).
  58. Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, Reis BL. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. CsA Phase 3 Study Group. *Ophthalmology* 2000;107:631-9 (LA1).
  59. Kunert KS, Tisdale AS, Gipson IK. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. *Arch Ophthalmol* 2002;120:330-7 (LA1).
  60. Brignolle F, Pisella PJ, De Saint Jean M, et al. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in KCS: 6-month treatment with topical cyclosporin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:90-5 (LA1).
  61. Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, et al. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1489-96 (LA1).
  62. Poon AC, Geerling G, Dart JK, et al. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1188-97 (LB2).
  63. Tananuvat N, Daniell M, Sullivan LJ, et al. Controlled study of the use of autologous serum in dry eye patients. *Cornea* 2001;20:802-6 (LA2).
  64. Kojima T, Ishida R, Dogru M, et al. The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: a prospective randomized case-control study. *Am J Ophthalmol* 2005;139:242-6 (LA1).
  65. Noble BA, Loh RS, MacLennan S, et al. Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomised controlled crossover trial for ocular surface disease. *Br J Ophthalmol* 2004;88:647-52 (LA1).
  66. Tsubota K, Goto E, Fujita H, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999;83:390-5 (LB2).
  67. Gilbard JP, Rossi SR, Heyda KG, Dartt DA. Stimulation of tear secretion by topical agents that increase cyclic nucleotide levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1381-8 (LA1).
  68. Gilbard JP, Rossi SR, Heyda KG, Dartt DA. Stimulation of tear secretion and treatment of dry-eye disease with 3-isobutyl-1-methylxanthine. *Arch Ophthalmol* 1991;109:67;2-6 (LA1).
  69. Tauber J, Davitt WF, Bokosky JE, et al. Double-masked, placebo-controlled safety and efficacy trial of diquafosol tetrasodium (INS365) ophthalmic solution for the treatment of dry eye. *Cornea* 2004;23:784-92 (LA1).
  70. Mundasad MV, Novack GD, Allgood VE, et al. Ocular safety of INS365 ophthalmic solution: a P2Y(2) agonist in healthy subjects. *J Ocul Pharmacol Ther* 2001;17:173-9.
  71. Yerxa BR, Mundasad M, Sylvester RN, et al. Ocular safety of INS365 ophthalmic solution, a P2Y2 agonist, in patients with mild to moderate dry eye disease. *Adv Exp Med Biol* 2002;506(Pt B):1251-7 (LB2).
  72. Fujihara T, Murakami T, Fujita H, et al. Improvement of corneal barrier function by the P2Y(2) agonist INS365 in a rat dry eye model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:96-100.
  73. Fujihara T, Murakami T, Nagano T, et al. INS365 suppresses loss of corneal epithelial integrity by secretion of mucin-like glycoprotein in a rabbit short-term dry eye model. *J Ocul Pharmacol Ther* 2002;18:363-70.
  74. Yerxa BR, Douglass JG, Elena PP, et al. Potency and duration of action of synthetic P2Y2 receptor agonists on Schirmer scores in rabbits. *Adv Exp Med Biol* 2002;506(Pt A):261-5.
  75. Nakamura M, Endo K, Nakata K, Hamano T. Gefarnate stimulates secretion of mucin-like glycoproteins by corneal epithelium in vitro and protects corneal epithelium from desiccation in vivo. *Exp Eye Res* 1997;65:569-74 (LA1).
  76. Hamano T. Dry eye treatment with eye drops that stimulate mucin production. *Adv Exp Med Biol* 1998;438:965-8 (LA2).
  77. Jumblatt JE, Cunningham LT, Li Y, Jumblatt MM. Characterization of human ocular mucin secretion mediated by 15(S)-HE TE. *Cornea* 2002;21:818-24 (LA1).
  78. Jackson RS 2nd, Van Dyken SJ, McCartney MD, Ubels JL. The eicosanoid, 15-(S)-HE TE, stimulates secretion of mucin-like glycoprotein by the corneal epithelium. *Cornea* 2001;20:516-21 (LA1).
  79. Tuberville AW, Frederick WR, Wood TO. Punctal occlusion in tear deficiency syndromes. *Ophthalmology* 1982;89:1170-2 (LA1).
  80. Willis RM, Folberg R, Krachmer JH, Holland EJ. The treatment of aqueous-deficient dry eye with removable punctal plugs. A clinical and impression-cytologic study. *Ophthalmology* 1987;94:514-8 (LA1).
  81. Yen MT, Pflugfelder SC, Feuer WJ. The effect of punctal occlusion on tear production, tear clearance, and ocular surface sensation in normal subjects. *Am J Ophthalmol* 2001;131:314-23 (LA1).
  82. Balaram M, Schaumberg DA, Dana MR. Efficacy and tolerability outcomes after punctal occlusion with silicone plugs in dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol* 2001;131:30-6 (LA1).
  83. Tsubota K, Yamada M, Urayama K. Spectacle side panels and moist inserts for the treatment of dry-eye patients. *Cornea* 1994;13:197-201 (LA2).
  84. Tsubota K. The effect of wearing spectacles on the humidity of the eye. *Am J Ophthalmol* 1989;108:92-3 (LA2).
  85. Gresset J, Simonet P, Gordon D. Combination of a side shield with an ocular moisture chamber. *Am J Optom Physiol Opt* 1984;61:610-2 (LA2).
  86. Korb DR, Greiner JV, Glonek T, et al. Effect of periorcular humidity on the tear film lipid layer. *Cornea* 1996;15:129-34 (LA2).
  87. Sommer A. Treatment of corneal xerophthalmia with topical retinoic acid. *Am J Ophthalmol* 1983;95:349-52 (LA1).
  88. Nelson JD, Gordon JF. Topical fibronectin in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. Chiron Keratoconjunctivitis Sicca Study Group. *Am J Ophthalmol* 1992;114:441-7 (LA1).
  89. Begley CG, Chalmers RL, Abetz L, et al. The relationship between habitual patient-reported symptoms and clinical signs among patients with dry eye of varying severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4753-61 (LA1).
  90. Begley CG, Caffery B, Chalmers RL, Mitchell GL. Dry Eye Investigation (DREI) Study Group. Use of the dry eye questionnaire to measure symptoms of ocular irritation in patients with aqueous tear deficient dry eye. *Cornea* 2002;21:664-70 (LA1).
  91. Nichols KK, Begley CG, Caffery B, Jones LA. Symptoms of ocular irritation in patients diagnosed with dry eye. *Optom Vis Sci* 1999;76:838-44 (LA1).
  92. Schein OD, Tielsch JM, Munoz B, et al. Relation between signs and symptoms of dry eye in the elderly. A population-based perspective. *Ophthalmology* 1997;104:1395-401 (LA1).
  93. Bjerrum KB. Test and symptoms in keratoconjunctivitis sicca and their correlation. *Acta Ophthalmol Scand* 1996;74:436-41 (LA1).
  94. Bowman SJ, Booth DA, Platts RG, et al. UK Sjogren's Interest Group. Validation of the Sicca Symptoms Inventory for clinical studies of Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 2003;30:1259-66 (LA1).
  95. Nichols KK. Patient-reported symptoms in dry eye disease. *Ocul Surf* 2006;4:137-145.
  96. de Paiva CS, Lindsey JL, Pflugfelder SC. Assessing the severity of keratitis sicca with videokeratographic indices. *Ophthalmology* 2003;110:1102-9 (LA1).
  97. [www.socialresearchmethods.net/kb/scallik.htm](http://www.socialresearchmethods.net/kb/scallik.htm) (Accessed July 24, 2006).
  98. (No authors listed). Methodologies to diagnose and monitor dry eye: report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:108-152.
  99. Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea* 2003;22:640-50.
  100. Norn MS. Vital staining of cornea and conjunctiva. *Acta Ophthalmol* 1972;Supp 113:3-66.
  101. Norn MS. Lissamine green vital staining of cornea and conjunctiva. *Acta Ophthalmol* 1973;51:483-91.
  102. Norn MS. Vital staining of cornea and conjunctiva. *Acta Ophthalmol (Kbh)* 1962;40:389-401.
  103. Norn MS. External eye: methods of evaluation. Copenhagen, Scriptor, 1974:51-5.
  104. Korb DR, Korb JM. Corneal staining prior to contact lens wearing. *J Am Optom Assn* 1970;41:228-32.
  105. Schwallie JD, McKenney CD, Long WD, McNeil A. Corneal staining patterns in normal non-contact lens wearers. *Optom Vis Sci* 1997;74:92-8.
  106. Josephson JE, Caffery BE. Corneal staining characteristics after sequential instillations of fluorescein. *Optom Vis Sci* 1992;69:570-3.
  107. Caffery BE, Josephson JE. Corneal staining after sequential instillation of fluorescein over 30 days. *Optom Vis Sci* 1991;68:881-9.