

### Scientific Editors / Direttori Scientifici

LEONARDO CALDAROLA  
Turin, Italy/*Torino, Italia*

CESARE MALTONI†  
Bologna, Italy/*Italia*

### Scientific Committee / Comitato Scientifico

ANDERS AHLBOM  
Stockholm, Sweden/*Stoccolma, Svezia*

DIEGO ETTORE CUZZOCREA  
Bologna, Italy/*Italia*

MARIO NANO  
Turin, Italy/*Torino, Italia*

GIORGIO ARCANGELI  
Rome, Italy/*Roma, Italia*

ANDERS ENGLUND  
Solna, Sweden/*Svezia*

COSTANZO NATALE  
Foggia, Italy/*Italia*

JOHN CHRISTIAN BAILAR III  
Chicago, IL, USA

GIOVAN GIACOMO GIORDANO  
Naples, Italy/*Napoli, Italia*

BENIAMINO PALMIERI  
Modena, Italy/*Italia*

TULLIO BATTELLI  
Ancona, Italy/*Italia*

MICHAEL J. HILL  
Slough, UK/*Gran Bretagna*

MAX PARKIN  
Oxford, UK/*Gran Bretagna*

FIGRELLA BELPOGGI  
Bologna, Italy/*Italia*

JAMES E. HUFF  
Research Triangle Park, NC, USA

STEFANO PILERI  
Bologna, Italy/*Italia*

VANNI BELTRAMI  
Rome, Italy/*Roma, Italia*

LINDA C. KOO  
New York, NY, USA

GIANCARLO PIZZA  
Bologna, Italy/*Italia*

GENEROSO BEVILACQUA  
Pisa, Italy/*Italia*

OLE KRONBORG  
Odense, Denmark/*Danimarca*

HÉLÈNE SANCHO-GARNIER  
Montpellier, France/*Francia*

GUIDO BIASCO  
Bologna, Italy/*Italia*

JOSEPH LADOU  
San Francisco, CA, USA

MORANDO SOFFRITTI  
Bologna, Italy/*Italia*

EMILIO BOMBARDIERI  
Milano, Italy/*Italia*

PHILIP J. LANDRIGAN  
New York, NY, USA

FIorenzo STIRPE  
Bologna, Italy/*Italia*

SALVATORE CARIELLO  
Salerno, Italy/*Italia*

GIORGIO LELLI  
Ferrara, Italy/*Italia*

ADRIAN TOOKMAN  
London, UK/*Londra, Gran Bretagna*

FRANCESCO COGNETTI  
Rome, Italy/*Roma, Italia*

MASSIMO LOPEZ  
Rome, Italy/*Roma, Italia*

EDOARDO TRIGGIANI  
Palermo, Italy/*Italia*

GIUSEPPE COLUCCI  
Bari, Italy/*Italia*

ALBERTO MONTORI  
Rome, Italy/*Roma, Italia*

GUIDO TUVERI  
Trieste, Italy/*Italia*

PIETRO COMBA  
Rome, Italy/*Roma, Italia*

FRANCESCO MORINO  
Turin, Italy/*Torino, Italia*

DAVID ZARIDZE  
Mosca/Moscow, *Russia*

MASSIMO CRESPI  
Rome, Italy/*Roma, Italia*

ANTONIO MUSSA  
Turin, Italy/*Torino, Italia*

### Editorial Staff / Redazione

JILL V. BRAZIER (Head Editor/Redattore Capo)

LUCIANO BUA

LUCA LAMBERTINI

FRANCO MINARDI

DAVIDE DEGLI ESPOSTI

MICHELINA LAURIOLA

MICHELA PADOVANI

LAURA FALCIONI

MARCO MANSERVIGI

EVA TIBALDI

### Journal Director / Direttore Responsabile

FEDERICO CIONI



Associato  
all'Unione Stampa  
Periodica Italiana



European Foundation of Oncology  
and Environmental Sciences "B. Ramazzini"  
*Fondazione Europea di Oncologia  
e Scienze Ambientali "B. Ramazzini"*



PUBLISHER  
MATTIOLI 1885 - SPA  
CASA EDITRICE

Autorizzazione del Tribunale di Parma n. 14/97 del 11/6/1997 - ISSN 1128-6598

*The European Journal of Oncology is indexed by Excerpta Medica (EMBASE) and the Elsevier BioBASE  
Il Giornale Europeo di Oncologia è recensito su Excerpta Medica (EMBASE) e su Elsevier BioBASE*

# CONTENTS/INDICE

VOLUME 10 - N. 3 - 2005

## EDITORIAL / EDITORIALE

**Amianto e globalizzazione / Asbestos and globalization**

C. Bianchi, T. Bianchi

169

## CRITICAL REVIEWS / RIVISTE CRITICHE

### GENERAL TOPICS / ARGOMENTI GENERALI

**Hyperthermia, hypoxia and chemotherapy: new interactions and perspectives /**

***Ipertermia, ipossia e chemioterapia: nuove interazioni e prospettive***

G. Fiorentini, U. De Giorgi, M. Cantore, A. Del Freato, V. Ferrari, L. Rota, G. Turrisi, S. Rossi

P. Denticò, P. Bernardeschi, S. Guadagni

173

## ARTICLES ON ORIGINAL STUDIES AND RESEARCH / ARTICOLI SU STUDI E RICERCHE ORIGINALI

### GENERAL TOPICS / ARGOMENTI GENERALI

**Il progetto OCCAM (Occupational Cancer Monitoring) / The Italian Occupational Cancer Monitoring System (the OCCAM project)**

P. Crosignani, A. Scaburri, R. Audisio, P. Amendola, S. Massari, A. Scarselli, S. Cavuto

181

### ANATOMIC SITES / SEDI ANATOMICHE

Biliary tract / *Vie biliari* (C24.9)

**Trattamento endoscopico delle neoplasie della via biliare / Endoscopic treatment of biliary tract cancer**

S. Ciletti, M.E. Riccioni, S. Cogliandolo, A. Andreoli, A. Tesi, R. Coppola

185

Pleura and peritoneum / *Pleura e peritoneo* (C38.4 - C48.2)

**I casi di mesotelioma maligno in Italia. Attività e risultati del Registro Nazionale (ReNaM) / Cases of malignant mesothelioma in Italy. Activity and results of the National Registry (ReNaM)**

M. Nesti, A. Marinaccio, G. Cauzillo, R. De Zotti, V. Gennaro, G. Gorini, M. Menegozzo,

C. Mensi, E. Merler, D. Mirabelli, F. Montanaro, M. Musti, F. Pannelli, A. Romanelli,

R. Tumino ed il gruppo di lavoro del Registro Nazionale dei Mesoteliomi (ReNaM)

191

Haemopoietic system / *Sistema emopoietico* (C42.4)

**Ectopic expression of p210 bcr-abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukaemia downregulates DR4 receptor expression / *L'espressione ectopica della tirosin-chinasi p210 bcr-abl nella leucemia mieloide cronica down-regola l'espressione del recettore DR4***

G. Brusa, M. Mancini, E. Zuffa, V. Ghetti, E. Benedettini, E. Barbieri, M.A. Santucci

199

Breast / *Mammella* (C50.9)

**Nuove strategie della chirurgia radioguidata nelle lesioni non palpabili della mammella: la ROLL / *New strategies of radioguided surgery in non-palpable breast lesions: the ROLL***

R. Palmeri, S. Lazzara, G. Melita, G. Iapichino, G. Currò, E. Cucinotta, P. Melita

207

## **OBITUARY / *NECROLOGIO***

**Doctor Marvin S. Legator**

M.A. Mehlman

213

## **ANNOUNCEMENT / *ANNUNCIO***

**International Congress on "Wood dust", Strasbourg, France, October 2006 /**

***Convegno Internazionale su "Polvere di legno", Strasburgo, Francia, ottobre 2006***

215

## Amianto e globalizzazione

### *Asbestos and globalization*

Claudio Bianchi, Tommaso Bianchi

Centro di Studio e Documentazione sui Tumori Ambientali, Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori, Monfalcone, Italia

#### Riassunto

Sebbene parecchi paesi abbiano vietato l'uso dell'amianto, la produzione mondiale del minerale rimane elevata. Nell'ultimo decennio i maggiori consumi si sono registrati nella Federazione Russa e in vari paesi asiatici. Nel mondo globalizzato molte industrie dell'amianto e altre attività implicanti un'elevata esposizione al minerale (come la demolizione navale) sono facilmente emigrate dai paesi occidentali a quelli in via di sviluppo. Le malattie da amianto, e in particolare il mesotelioma maligno, continuano a rappresentare un'emergenza nei paesi occidentali. Nelle zone ad alto consumo di amianto della Russia e dell'Asia, al contrario, la patologia asbesto-correlata sembra assente o di scarso rilievo. La relazione amianto-mesotelioma, molto evidente nei paesi occidentali, risulta maldefinita nei paesi consumatori del minerale. Per giungere al bando mondiale dell'amianto sono necessarie: 1) la percezione del rischio (percezione ancora debole in varie regioni del mondo); e 2) l'azione energica di gruppi e organismi internazionali. Eur. J. Oncol., 10 (3), 169-172, 2005

**Parole chiave:** produzione di amianto, malattie amianto-correlate, mesotelioma maligno, epidemiologia, bando

#### Introduzione

Il numero dei paesi che hanno vietato l'uso dell'amianto è in continuo aumento (Tabella 1). Dall'ottobre

#### Summary

In a growing number of countries asbestos is banned. However, the world production of the mineral remains high. In the last decade the highest consumptions have occurred in the Russian Federation and in various Asian countries. In a globalized world, many asbestos industries as well as other activities involving severe asbestos exposures (such as shipbreaking) have easily migrated from western to developing countries. In the western world, asbestos-related diseases in general, and malignant mesothelioma in particular, remain a major problem. On the contrary, asbestos disease seems to be absent or scarcely relevant in the regions with high asbestos consumption. Studies conducted in western countries show a clear relationship between asbestos and mesothelioma; in Russia and Asia, however, such a relationship remains ill-defined. In order to reach a global asbestos ban, two prerequisites seem to be necessary: 1) an adequate perception of the risk (such perception is not yet sufficient in various parts of the world); and 2) vigorous action by international groups and organizations. Eur. J. Oncol., 10 (3), 169-172, 2005

**Key words:** asbestos production, asbestos-related diseases, malignant mesothelioma, epidemiology, ban

2004 si è aggiunto all'elenco il Giappone. Anche se in questo paese il bando non è stato totale, il fatto assume particolare rilievo in quanto il Giappone è stato uno dei maggiori consumatori di amianto fino a metà degli anni

Received/Pervenuto 8.6.2005 - Accepted/Accettato 18.7.2005

Address/Indirizzo: Prof. Claudio Bianchi, Centro di Studio e Documentazione sui Tumori Ambientali, Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori, Ospedale di Monfalcone, 34074 Monfalcone (GO), Italia – Tel. 0039/0481/44007 – E-mail: legatumori1@interfree.it

**Tabella 1** - Paesi che hanno bandito l'amianto (dati al gennaio 2005)

Europa	Africa
Austria	Gabon
Belgio	
Cipro	America
Danimarca	Argentina
Estonia	Cile
Finlandia	Honduras
Francia	Uruguay
Germania	
Grecia	Asia
Irlanda	Arabia Saudita
Islanda	Giappone
Italia	Kuwait
Lettonia	Seychelles
Lituania	
Lussemburgo	Oceania
Malta	Australia
Norvegia	
Paesi Bassi	
Polonia	
Portogallo	
Regno Unito	
Repubblica ceca	
Slovacchia	
Slovenia	
Spagna	
Svezia	
Ungheria	

'90. Dal gennaio 2005 il divieto è diventato regola per i 25 paesi dell'Unione Europea, i cui membri peraltro avevano già quasi tutti vietato l'uso del minerale.

Le recenti estensioni del bando assumono grande significato. Tuttavia i paesi che hanno abolito l'uso dell'amianto rimangono una minoranza. La produzione mondiale di amianto resta elevata. Nell'anno 2000 sono stati superati i due milioni di tonnellate<sup>1</sup>. Circa il 70% della produzione è concentrata in tre paesi: la Federazione Russa, la Cina e il Canada.

### Bando dell'amianto e tsunami

Nel mondo globalizzato la coesistenza di paesi dove l'amianto è fuorilegge con altri nei quali l'amianto è perfettamente legale diventa difficile. Un esempio eloquente viene dal recente disastro dello tsunami del dicembre 2004. Il maremoto ha distrutto un gran numero di costruzioni nelle quali era presente amianto. Le imprese coinvolte nella ricostruzione hanno manifestato il proposito di usare ancora il minerale, basandosi sull'assunto che il criotilo può essere impiegato senza pericolo<sup>2</sup>. Quando tale

progetto è venuto a conoscenza di parlamentari di alcuni paesi come l'Australia e il Regno Unito, si è avuta in questi paesi una netta presa di posizione. Si è dichiarato che nel caso si fosse usato ancora amianto, non si era disposti a collaborare economicamente nella ricostruzione<sup>2</sup>.

### Emigrazione delle industrie dell'amianto

In vari paesi industrializzati si è registrata una caduta del consumo di amianto con largo anticipo rispetto al bando totale. In Svezia l'importazione del minerale è crollata già dopo il 1975<sup>3</sup>. Anche prima dell'abolizione si sono avute delle restrizioni sempre più forti.

In un mondo globalizzato le industrie dell'amianto non trovarono difficoltà a trasferire la loro attività in paesi dove le restrizioni non esistevano. Nella Corea del Sud le industrie tessili dell'asbesto decollarono nei primi anni '70 del secolo scorso<sup>4</sup>. La Rex-Asbest, una delle più grandi industrie tessili dell'asbesto della Germania, iniziò la propria attività in Corea proprio in questo periodo e così pure molte piccole imprese giapponesi dello stesso settore emigrarono in Corea<sup>4</sup>. Ancora prima che si ponesse il problema dell'amianto, la cantieristica navale, dove in passato veniva largamente usato il minerale, si era concentrata per ragioni di mercato in Giappone e successivamente anche nella Corea del Sud.

Un'attività scomparsa del tutto dai paesi sviluppati è quella delle demolizioni navali. In Europa e negli Stati Uniti la rottamazione navale e il conseguente recupero di materiali divennero man mano sempre meno remunerativi. Il problema poteva essere aggirato spostandosi in paesi dove il costo della manodopera era incomparabilmente inferiore, la legislazione poco severa e i controlli inesistenti. In una prima fase i cimiteri navali si trasferirono in paesi come la Corea del Sud e Taiwan<sup>5</sup>. Nella fase successiva questi paesi compresero che i cantieri potevano essere utilizzati molto più vantaggiosamente che per lavori di demolizione. Si registrò quindi un'ulteriore trasmissione. Attualmente si calcola che circa il 90% delle demolizioni navali venga effettuato in tre paesi soltanto: India, Bangladesh e Pakistan<sup>5</sup>.

### Consumo di amianto e mesotelioma

Nell'ultimo decennio i maggiori consumi di amianto si sono registrati nella Federazione Russa e in alcuni paesi dell'Asia centrale e orientale. Nel 1996 la Russia era al primo posto con 3,4 kg *pro capite*<sup>6</sup>. Seguivano la Thailandia (3 kg *pro capite*), la Corea del Sud (1,9 kg), il Kazakistan (1,8 kg), il Giappone (1,5 kg) e la Malesia

(1,4 kg). In tali paesi il mesotelioma sembra non costituire un problema rilevante. Per quanto riguarda la Russia, nell'area delle miniere di crisotilo di Bazkenovskoye, in un periodo di 23 anni (1981-2003), sono stati diagnosticati solo 8 casi di mesotelioma pleurico<sup>7</sup>. In Thailandia l'importazione di amianto, che si aggirava sulle 90.000 tonnellate nel 1987, è raddoppiata nel 2002, quando ha raggiunto 181.348 tonnellate<sup>8</sup>. Tuttavia nessun caso di malattie asbesto-correlate è stato notificato al Fondo per la Compensazione dei Lavoratori<sup>8</sup>. Nella Corea del Sud il numero annuo di mesoteliomi registrati dal Registro Nazionale Tumori è di 40-50 casi, per una popolazione di oltre 46 milioni<sup>9</sup>. In una ricerca condotta nel 2001 su 46 casi di mesotelioma, la relazione con l'asbesto fu accertata in 9 casi<sup>9</sup>. Un quadro poco allarmante sembra emergere anche dai dati del Giappone, dove il numero di mesoteliomi indennizzati in un periodo di quattro anni (aprile 1999-marzo 2003) era di 148 casi<sup>10</sup>. L'apparente situazione delle aree ad alto consumo di amianto è in marcato contrasto con quella rilevata in Europa. Sebbene in alcuni paesi europei l'epidemia di mesotelioma sembri mostrare qualche attenuazione<sup>11</sup>, in altri le previsioni rimangono pessimistiche<sup>12, 13</sup>.

A livello mondiale è evidente una chiara relazione tra consumi di amianto ed incidenza del mesotelioma<sup>1</sup>. A livello nazionale in alcuni paesi è rilevabile un disegno a "duplice onda". La curva del consumo di amianto si riproduce dopo un intervallo di alcuni decenni in un'analoga curva di incidenza del mesotelioma. Ciò è rilevabile ad esempio in Gran Bretagna<sup>14</sup> e in Svezia<sup>3</sup>. In vari paesi è inoltre osservabile una perfetta corrispondenza tra localizzazione delle industrie con alto uso di amianto e incidenza di mesotelioma. In Italia la mortalità per tumore della pleura nella popolazione maschile<sup>15</sup> rispecchia fedelmente l'ubicazione delle industrie in cui l'amianto è stato largamente usato. In Gran Bretagna i più alti tassi di incidenza sono stati rilevati nei distretti sedi di cantieri navali<sup>16</sup>. In Spagna la mortalità per tumore pleurico raggiunge il suo picco a Cerdanyola del Valles<sup>17</sup>, dove l'industria del cemento-amianto ha iniziato la sua attività all'inizio del secolo scorso.

Le ragioni per cui da grande parte dell'Asia emerge un panorama diverso rimangono da identificare.

### Considerazioni conclusive

- 1) In un mondo globalizzato i cittadini dei paesi dove è stato bandito l'amianto non sono del tutto al riparo dal rischio. In occasione di soggiorni per vari motivi nei paesi dove l'amianto è usato, essi possono venire a contatto con il minerale. Questo contatto

può verificarsi anche in patria e non solo per la persistenza di amianto in molte strutture. Varie aree portuali, ad esempio, sono considerate extraterritoriali e quindi la libera circolazione di amianto non vi può essere proibita<sup>18</sup>.

- 2) La mancata percezione del rischio che sembra tuttora sussistere nei paesi ad alto consumo di amianto rappresenta un grosso ostacolo sulla via del bando totale.
- 3) Rimane molto importante il ruolo di organizzazioni non governative, movimenti di opinione, gruppi di parlamentari, sindacati, ecc. nell'azione volta a raggiungere il divieto mondiale. Il Collegium Ramazzini ha portato un fondamentale contributo in questo campo<sup>19</sup>. Il Global Asbestos Congress, svoltosi a Tokyo nel novembre 2004, si è concluso con un appello per il bando mondiale.
- 4) Secondo alcuni pareri autorevoli<sup>20</sup>, l'epidemia di tumori indotti dall'amianto sarebbe stata evitata, se organismi internazionali come l'Organizzazione Mondiale della Sanità e l'Ufficio Internazionale del Lavoro fossero intervenuti con tempestività e senso di responsabilità.

### Bibliografia

1. Tossavainen A. Global use of asbestos and the incidence of mesothelioma. *Int J Occup Environ Health* 2004; 10: 22-5.
2. Kazan-Allen L. Asbestos fall-out from Indian Ocean tsunami (message 30 March 2005).
3. Hillerdal G. The Swedish experience with asbestos: history of use, diseases, legislation, and compensation. *Int J Occup Environ Health* 2004; 10: 154-8.
4. Paek D, Choi JK. Asbestos in Korea: country report. In Takahashi K, Lehtinen S, Karjalainen A. Proceedings of the Asbestos Symposium for the Asian Countries, September 26-27, 2002, Kitakyushu, Japan. *J UEEH* 2002; 24 suppl 2: 42-50.
5. Langewiesche W. *The Outlaw Sea*. New York: North Point Press, 2004.
6. Tossavainen A. National mesothelioma incidence and the past use of asbestos. *Monaldi Arch Chest Dis* 2003; 59: 146-9.
7. Kashansky SV, Novoselova TA. Main results of 70 years monitoring of the occupational exposure and asbestos-related diseases in Bazkenovskoye chrysotile asbestos deposit. Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Conference on Occupational Respiratory Diseases, April 19-22, 2005, Beijing. ILO, Ministry of Health of China, 39-40 (abstract).
8. Siriruttanapruk S. Current situation of asbestos in Thailand. Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Conference on Occupational Respiratory Diseases, April 19-22, 2005, Beijing. ILO, Ministry of Health of China, 46-7 (abstract).
9. Kang SK, Ahn YS, Kim E, *et al.* Asbestos related disease in South Korea. Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Conference on Occupational Respiratory Diseases, April 19-22, 2005, Beijing. ILO, Ministry of Health of China, 47-8 (abstract).

10. Morinaga K, Kohyama N, Kishimoto T, *et al.* Compensation for malignant mesothelioma due to asbestos exposure in Japan. Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Conference on Occupational Respiratory Diseases, April 19-22, 2005, Beijing. ILO, Ministry of Health of China, 42 (abstract).
11. Burdorf A, Järholm B, Englund A. Explaining differences in incidence rates of pleural mesothelioma between Sweden and The Netherlands. *Int J Cancer* 2005; 113: 298-301.
12. Hodgson JT, McElvenny DM, Darnton AJ, *et al.* The expected burden of mesothelioma mortality in Great Britain from 2002 to 2050. *Br J Cancer* 2005; 92: 1-7.
13. Marinaccio A, Montanaro F, Mastrantonio M, *et al.* Predictions of mortality from pleural mesothelioma in Italy: a model based on asbestos consumption figures supports results from age-period-cohort models. *Int J Cancer* 2005; 115: 142-7.
14. White C. Annual deaths from mesothelioma in Britain to reach 2000 by 2010. *BMJ* 2003; 326: 1417.
15. Mastrantonio M, Belli S, Binazzi A, *et al.* La mortalità per tumore maligno della pleura nei comuni italiani, 1988-1997. *Rapporti ISTISAN* 2002; 02/12.
16. Health and Safety Executive. Mesothelioma area statistics: county districts in Great Britain, 1976-1991 <<http://www.hse.gov.uk/statistics/asbestos/cd7691.pdf>>.
17. López-Abente G, Hernández-Barrera V, Pollán M, *et al.* Municipal pleural cancer mortality in Spain. *Occup Environ Med* 2005; 62: 195-9.
18. Bolis P. I giudici «Trieste porto franco, niente sequestri». *Il Piccolo* 20 febbraio 2005, p 26.
19. Soffritti M, Belpoggi F, Minardi F, *et al.* The asbestos ban in the world: the role of the Collegium Ramazzini. In Bianchi C, Soffritti M, Minardi F, Brazier JV. *Ban on asbestos in Europe*. *Eur J Oncol Library* 2004; 3: 83-96.
20. LaDou J. The asbestos cancer epidemic. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 285-90.

## Hyperthermia, hypoxia and chemotherapy: new interactions and perspectives

### *Ipertermia, ipossia e chemioterapia: nuove interazioni e prospettive*

Giammaria Fiorentini\*, Ugo De Giorgi\*, Maurizio Cantore\*\*, Alfonso Del Freo\*\*, Vittorio Ferrari\*\*\*, Luigina Rota\*\*\*\*, Gina Turrisi\*, Susanna Rossi\*, Patrizia Denticio\*, Paolo Bernardeschi\*, Stefano Guadagni\*\*\*\*\*

\* Department of Oncology, "San Giuseppe" General City Hospital, Empoli (FI), Italy

\*\* Department of Oncology, City Hospital, Carrara (MS), Italy

\*\*\* Department of Oncology, Spedali Civili, Brescia, Italy

\*\*\*\* Medical Oncology, Casa di Cura Poliambulanza, Brescia, Italy

\*\*\*\*\* Department of Surgical Sciences, University of L'Aquila, L'Aquila, Italy

#### Summary

Tumour hypoxia is a crucial factor in oncology, since it contributes to tumour progression by the activation of genes associated with those promoting angiogenesis and stopping apoptosis. Moreover it has profound effects on therapy: oxygen helps to stabilise radiation and chemotherapeutic damage in DNA, while hypoxic cells show considerable resistance to chemo-radiotherapy; this is considered the major cause for the failure of therapy in some tumours. Attempts to overcome this effect include the use of hyperthermia, oxygen-mimetic "radiosensitizers" and multifractional radiotherapy to allow re-oxygenation of tumour tissue. To achieve greater efficacy many researchers are attempting to amplify the differences between normal and malignant cells at the cellular milieu as well as their biomolecular properties. Preclinical thermo-chemotherapy studies have given valuable information on the schedule of the cytotoxic interaction between the different agents and on the molecular mechanisms responsible for the potentiating effect. Several studies have demonstrated that the cytotoxic activity of various chemotherapeutic agents is enhanced by mild or moderate hyperthermia (40.5-43°C). There are data regarding doxorubicin, the platinum compounds cisplatin, carboplatin and oxaliplatin, the bifunctional alkylating agent melphalan

#### Riassunto

L'ipossia tumorale è un problema centrale in oncologia, in quanto promuove la progressione di malattia attivando i geni correlati con l'angiogenesi e l'inibizione dell'apoptosi. Inoltre essa ha profonde correlazioni con la terapia: l'ossigeno aiuta a consolidare i danni del DNA provocati dai trattamenti chemo-radianti, mentre le cellule ipossiche mostrano una notevole resistenza a tali trattamenti; questa è considerata la principale causa di insuccesso della terapia in alcuni tumori. Tentativi di superare questo effetto comprendono l'uso dell'ipertermia, di "radiosensibilizzanti" ossigeno-mimetici e della radioterapia multifrazionata per consentire la riossigenazione del tessuto tumorale. Per ottenere una maggiore efficacia molti ricercatori cercano di amplificare le differenze fra le cellule normali e maligne nell'ambiente cellulare e nelle proprietà biomolecolari. Studi preclinici di termo-chemioterapia hanno fornito importanti informazioni sul tipo di interazione citotossica tra i diversi agenti e sui meccanismi molecolari responsabili dell'effetto potenziante. Diversi studi hanno dimostrato che l'attività citotossica di vari agenti chemioterapici è aumentata da una lieve o moderata ipertermia (40,5-43°C). Ci sono dati sulla doxorubicina, sui composti del platino cisplatino, carboplatino e oxaliplatino, sull'agente alchilante bifunzionale melphalan e sull'anti-

Received/Pervenuto 20.5.2005 - Accepted/Accettato 28.6.2005

Address/Indirizzo: Dr. Giammaria Fiorentini, U.O. di Oncologia, Ospedale Civile "San Giuseppe", Via Paladini 40, 50053 Empoli (FI), Italia  
Tel./fax 0039/0571/702614 - E-mail: oncologiaempoli@usl11.toscana.it



and the antimetabolite methotrexate, gemcitabine, docetaxel and taxol which indicate that in each case the maximal cytotoxicity occurs when the drug is administered simultaneously with hyperthermia. Adenovirus-mediated and heat-activated gene therapy provides a novel approach to radiosensitize human tumours. Tumour hypoxia is a unique target for hyperthermia and cancer bioreductive therapy that could be exploited for therapeutic use. *Eur. J. Oncol.*, 10 (3), 173-179, 2005

**Key words:** hyperthermia, hypoxia, chemotherapy, radiotherapy

## Introduction

Cancer physiology can be a new significant target for therapy. Nonsurgical approaches to cancer treatment, primarily radiation therapy and chemotherapy, are almost exclusively based on agents that kill cells. The main problem with these current treatments, however, is that they do not have specificity for cancer cells. In the case of antineoplastic drugs, it is primarily the rapid proliferation of many of the cancer cells that makes them more sensitive to cell killing than their normal cellular counterparts; for radiation therapy, a degree of specificity is achieved by localizing the radiation to the tumour and its immediate surrounding normal tissue. However, both treatments are limited by their toxic effects on normal cells. To achieve greater efficacy, many researchers are attempting to amplify the differences between normal and malignant cells at the cellular milieu, as well as their biomolecular properties. The physiology of solid tumours at the microenvironmental level is sufficiently different from that of the normal tissues from which they arise to provide a unique and selective target for cancer treatment.

## The problem of tumour hypoxia in anticancer therapy

Tumour hypoxia is a very important factor in oncology, since it contributes to tumour progression by the activation of genes associated with those promoting angiogenesis. Moreover it has profound effects on therapy: oxygen helps to stabilise radiation damage in DNA, while hypoxic cells show considerable (about five-fold) resistance to radiotherapy; this is considered the major cause for the failure of radiotherapy in some tumours. Attempts to overcome this effect include the use of hyperthermia, oxygen-mimetic "radiosensitizers" and multifractional

metabolita metotrexate, sulla gemcitabina, sul docetaxel e sul taxolo, che indicano che in tutti i casi la massima citotossicità si ha quando il farmaco è somministrato simultaneamente all'ipertermia. La terapia genica, mediata dagli adenovirus e attivata dal calore, fornisce un nuovo approccio per radiosensibilizzare i tumori umani. L'ipossia tumorale è un bersaglio unico per l'ipertermia e la terapia bioriduttiva dei tumori, che potrebbe essere sfruttato per fini terapeutici. *Eur. J. Oncol.*, 10 (3), 173-179, 2005

**Parole chiave:** ipertermia, ipossia, chemioterapia, radioterapia

radiotherapy to allow re-oxygenation of tumour tissue. Radiosensitizers are drugs designed to act in a similar way to oxygen in fixing radiation damage in DNA, but they are less rapidly metabolised, and are therefore more widely distributed in tumour tissues. There are also good reasons why, and considerable evidence to show how, hypoxic cells in tumours limit the efficacy of anticancer drugs.

The pioneering work of Gray *et al*<sup>1</sup> demonstrated that the sensitivity of cells and tissues to radiation damage depends on the presence of oxygen at the time of irradiation. The histological studies on human lung adenocarcinomas by Thomlinson and Gray<sup>2</sup> provided an explanation of the mechanism by which cells could become hypoxic in tumours. They postulated that, because of their unrestrained growth, tumour cells would be forced away from vessels, beyond the effective diffusion distance of oxygen in respiring tissue, thereby becoming hypoxic and eventually necrotic.

There are two important further consequences of reducing oxygen concentration: 1) the fraction of proliferating cells and/or the rate of cell proliferation decrease as a function of distance from the vascular supply, a phenomenon that is largely the result of decreasing oxygen levels<sup>3-5</sup>. An important consequence of this hypoxia-induced inhibition of proliferation is that, because most anticancer drugs are primarily effective against rapidly dividing cells, their effectiveness would be expected to fall off as a function of distance from blood vessels: this has been shown experimentally<sup>1-7</sup>; and 2) since hypoxic cells are the ones most distant from blood vessels, they will be exposed to lower concentrations of drug than those adjacent to blood vessels, primarily as a result of the metabolism of such agents through successive cellular layers.

Hypoxia in solid tumours, however, has an important consequence in addition to conferring a direct resistance to radiation and chemotherapy<sup>5-7</sup>. Graeber *et al*<sup>7</sup> showed

that low oxygen levels caused apoptosis in minimally transformed mouse embryo fibroblasts and that this apoptosis depended to a large extent on wild-type *p53* genotype. They further showed, using these same cells growing as solid tumours in immune-deprived mice, that apoptosis co-localized with hypoxic regions in tumours derived from *p53* wild-type mice. In tumours derived from *p53*  $-/-$  cells, there was much less apoptosis and no co-localization with tumour hypoxia. These findings provide evidence that hypoxia, by selecting for mutant *p53*, might predispose tumours to a more malignant phenotype.

Clinical data support this conclusion. Studies on both soft tissue sarcomas and on carcinomas of the cervix have shown that hypoxic tumours are more likely to be metastatic.

However, others have proposed that tumour hypoxia can occur in a second way, by temporary obstruction or cessation of tumour blood flow, the so-called acute hypoxia model. Definitive evidence for this type of acute hypoxia arising from fluctuating blood flow, has come from elegant studies with transplanted tumours in mice using diffusion-limited fluorescent dyes. Because fluctuating blood flow has also been demonstrated in human tumours, it is likely that this type of hypoxia is also present in human tumours. The consequences of acute hypoxia will be similar to those of the diffusion-limited hypoxia. Any cells surrounding a closed blood vessel will be resistant to radiation killing because of their lack of oxygen at the time of radiation and will be exposed to lower levels of anticancer drugs than those surrounding blood vessels with a normal flow. This would be expected to lead to differences in response to anticancer agents, as has been observed in experimental tumours.

The low oxygen levels in tumours can be probably turned from a disadvantage to an advantage in cancer treatment. Such a possibility was proposed more than 30 years ago by Lin *et al*<sup>8</sup>, who reasoned that compounds based on the quinone structure of mitomycin C might be more active in hypoxic tumours. It was known that mitomycin C required metabolic reduction of the benzoquinone ring to produce the cytotoxic bifunctional alkylating agent. Lin *et al* reasoned that a lower oxidation reduction (redox) potential for tumour tissue, relative to most normal tissues, could increase reductive activation of these quinone derivatives in tumours. Although this was not the correct mechanism for the increased cytotoxicity of mitomycin C and certain analogues toward hypoxic cells (much lower levels of hypoxia are needed to change cellular redox potential), these studies were important in suggesting the potential of hypoxia-activated drugs and led to the concept of selectively killing the hypoxic cells in solid tumours.

## Hypoxia and chemotherapy

There are presently three different classes of hypoxia-specific drugs that are in use clinically or are being developed for clinical use. They are the quinone antibiotics, the nitroimidazoles, and the benzotriazine di-N-oxides. In the quinone class, the three principal agents of current clinical interest are mitomycin C, porphyromycin and E09. All are structurally similar and require reductive metabolism for activity. Each of them is converted by reductive metabolism to a bifunctional alkylating agent and probably produces its major cytotoxic activity through the formation of DNA interstrand cross-links.

Mitomycin C, considered to be the prototype bioreductive drug, was introduced into clinical use in 1958 and has demonstrated efficacy towards a number of different tumours, in combination with other selective drugs whose toxicity towards hypoxic cells is modest, with values for hypoxic cytotoxicity ratios (the ratio of drug concentration to produce equal cell kill for aerobic and hypoxic cells) of 1 (no preferential toxicity) to approximately 5. However, based on this activity, mitomycin C has been combined with radiotherapy in two randomized trials of head and neck cancer, the pooled results of which gave a statistically significant disease-free survival benefit<sup>5-8</sup>. The third drug in this series, E09, is a much more efficient substrate for DT-diaphorase than either mitomycin C or porphyromycin and shows high toxicity to both aerobic and hypoxic cells with high DT-diaphorase levels. Cells with low DT-diaphorase levels are much less susceptible to killing by E09 under aerobic conditions, but this drug shows a high, up to 50-fold, preferential toxicity toward hypoxic cells. However, the pharmacokinetics of this agent work against its clinical utility, and phase I clinical studies have shown little activity of this drug.

A second class of bioreductive agents is that of the nitroimidazoles, the first two of which, metronidazole and misonidazole, have been extensively tested as hypoxic radiosensitizing agents. Further drug development by Adams and Stratford<sup>9</sup> produced a compound, RSU1069, which has been shown to be a highly efficient cytotoxic agent with activity both *in vitro* and *in vivo*. RSU1069 has an hypoxic cytotoxicity ratio of some 10-100 for different cell lines *in vitro*, and it, or its prodrug, RB6145, has shown excellent activity with mouse tumour models when combined with irradiation or agents that induce hypoxia. Unfortunately, however, clinical testing of RB6145 has been aborted due to irreversible cytotoxicity toward retinal cells.

Tirapazamine (TPZ) is the first, and thus far, only representative of the third class of hypoxia-selective cytotoxins<sup>6</sup>. The mechanism for the preferential toxicity of

TPZ towards hypoxic cells is the result of an enzymatic reduction that adds an electron to the TPZ molecule, forming a highly reactive radical. This radical is able to cause cell killing by producing DNA damage leading to chromosome aberrations. Moreover, DNA damage occurs only from TPZ metabolism within the nucleus. TPZ produces specific potentiation of cell kill by radiation and cisplatin. Specifically, the synergistic cytotoxic interaction observed when TPZ and cisplatin are given in sequence depends on the TPZ exposure being under hypoxic conditions. In fact, there is no interaction when TPZ is given under aerobic conditions. It has also been demonstrated that the cytotoxic activity of TPZ under hypoxia is independent of *p53* gene status of tumour cells. This drug has 100-fold differential toxicity toward hypoxic *vs* aerobic cells.

Based on experimental studies that evaluated the responsiveness of tumour cells under aerobic and hypoxic conditions, Teicher *et al*<sup>10</sup> classified chemotherapeutic agents into three groups: 1) preferentially toxic in aerobic conditions (bleomycin, procarbazine, streptonigril, actinomycin D, vincristine and melphalan); 2) preferentially toxic under hypoxic conditions (mitomycin C and adriamycin); 3) no major preferential toxicity to oxygenation (cisplatin, 5-fluorouracil and methotrexate).

### Hypoxia and gene therapy

The newest direction for exploiting tumour physiology is aimed toward the evolving field of gene therapy. In this novel approach to anticancer therapy, genetic material is transferred into cells with the ultimate goal of selectively killing cancer cells and sparing normal cells. Recent studies have regarded the possibility of using the hypoxia-signalling pathway to selectively activate gene expression<sup>11-12</sup>. Hypoxia induces the expression of a number of genes, principally via the stabilization of members of the bHLH/PAS family of transcription factors that bind to a consensus DNA sequence, the hypoxia response element (HRE). Physiologically regulated expression vector systems, containing HRE sequences, are now under development, to target therapeutic gene expression to tumour cells characterized by low oxygen tension<sup>11</sup>. From a clinical point of view the combination of hyperthermia and hypoxia seems to add activity to intra-arterial chemotherapy<sup>12</sup>. At the same time the exposure of body regions, such as pelvis or limbs, to a locally high dose of bioreductive agent such as mytomicin C, in hypoxic conditions shows activity in refractory cancers<sup>13-16</sup>.

Following the study of genes we understood that there are other ways in which hypoxia might contribute to drug

resistance. One is through the amplification of genes, such as dihydrofolate reductase, conferring various glucose-regulated proteins that appear to be responsible for resistance to doxorubicin, etoposide and camptothecin.

### Hyperthermia and chemotherapy

Preclinical thermo-chemotherapy studies have given valuable information on the schedule of the cytotoxic interaction between the different agents and on the molecular mechanisms responsible for the potentiating effect. Several studies have demonstrated that the cytotoxic activity of various chemotherapeutic agents is enhanced by mild or moderate hyperthermia (40.5-43°C)<sup>17</sup>. In these investigations the effect of scheduling on the cytotoxic interaction between hyperthermia and drugs has also been investigated in *in vitro* experimental systems. There are data regarding doxorubicin, the platinum compounds cisplatin and carboplatin, the bifunctional alkylating agent melphalan and the antimetabolite methotrexate, which indicate that in each case the maximal cytotoxicity occurs when the drug is administered simultaneously with hyperthermia<sup>17-24</sup>.

The mechanisms responsible for the effect of hyperthermia on cell killing by anticancer drugs are not entirely understood. For example, for melphalan, which is widely used in experimental and clinical thermo-chemotherapy studies, different putative mechanisms of potentiation have been suggested, including an increase in melphalan influx leading to a higher intracellular drug accumulation<sup>20</sup>.

Melphalan induces the alteration of the DNA quaternary structure, which favours alkylation; the interference with drug-DNA adduct metabolism and inhibition of repair<sup>21</sup> the stabilization of drug-induced G2 phase cell accumulation<sup>21</sup> through the inhibition of *p32<sup>cdc2</sup>* kinase activity<sup>22,23</sup>. As regards cisplatin, it has been demonstrated that the cytotoxic activity of this compound, as well as that of the platinum derivatives lobaplatin and oxaliplatin, is increased under hyperthermic conditions as the consequence of an enhanced formation of DNA-platinum adducts<sup>24</sup>.

Preclinical studies have also significantly contributed to the proposition of potential cellular determinants of response to individual and combined treatments. The relevance of cell kinetic and DNA ploidy characteristics as indicators of thermoresponsiveness has been determined in primary cultures of human melanoma<sup>25</sup>. Results from this study showed that the median 3H-thymidine labelling index of sensitive tumours was four-fold that of resistant tumours. Moreover, thermosensitivity was found more frequently in tumours with a diploid nuclear DNA content

than in those with DNA aneuploidy. Since heat and drug sensitivity may be related to the ability of tumour cells to mount a stress response, the relationship between constitutive (and inducible) levels of heat shock proteins (HSPs) and thermosensitivity has been evaluated in testes and bladder cancer cell lines<sup>26</sup>. No correlation between constitutive levels of HSP90 or HSP72/73 and cellular thermoresponsiveness was found. However, results suggest that low HSP27 expression might contribute to heat sensitivity.

#### *Hyperthermia and antineoplastic drugs selection*

The most effective agent(s) at elevated temperatures have yet to be determined. Some studies suggest that the drug of choice at elevated temperatures may be different from that at the physiological temperature, and that the alkylating agents may be most effective at elevated temperatures. To further investigate these possibilities, the effect of chemotherapeutic agents were compared by Takemoto *et al*<sup>27</sup>. They studied these agents: cyclophosphamide, ifosfamide, melphalan, cisplatin, 5-fluorouracil, mitomycin C and bleomycin. Three tumours (mammary carcinoma, osteosarcoma and squamous cell carcinoma) were used. They were transplanted into the feet of C3H/He mice. When tumours reached 65 mm, a test agent was injected intraperitoneally. Tumours were immediately heated at 41.5°C for 30 minutes, and the tumour growth (TG) time was studied for each tumour. Using the TG times, the TG-50 (the time required for one-half of the total number of the treated tumours to reach the volume of 800 mm from 65 mm) was calculated. Subsequently, the tumour growth delay time (GDT) and the thermal enhancement ratio (TER) were obtained. The GDT was the difference between the TG-50 of treated tumours and that of non-treated control tumours. The TER was the ratio of the GDT of a group treated with an agent at 41.5°C to that of a group treated with the agent at room temperature. Results showed that the top three effective agents tested at 41.5°C were solely alkylating agents cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan for each kind of tumour. The GDT of cisplatin was smaller than those of the alkylating agents. The smallest TER, 1.1, was observed for 5-fluorouracil, which was given for mammary carcinoma, and for mitomycin C, which was given for squamous cell carcinoma. It could be concluded that the alkylating agents at elevated temperatures might be the drugs of choice for many types of tumours.

#### *Alkylating agents and oxaliplatin*

Urano and Ling<sup>28</sup> studied the effects of various agents on animal tumours with different histopathology at

elevated temperatures. Their studies indicated that alkylating agents were most effective on all tumours at a moderately elevated temperature. Cisplatin was also effective on all tumours, but its effectiveness at 41.5°C was less than that of alkylating agents. To quantitatively study these findings, the magnitude of thermal enhancement of melphalan, an alkylating agent, and that of oxaliplatin, a new platinum compound, were studied by these authors at 37-44.5°C by the colony formation assay. The dose of each agent was kept constant, and cell survival was determined as a function of treatment time. The cell survival curve was exponentially related to treatment time at all test temperatures, and the T(0) (the time to reduce survival from 1 to 0.37) decreased with an increasing temperature. These results suggested that the cytotoxic effect of these agents occurred with a constant rate at 37°C, and the rate was facilitated by an increasing temperature. This suggests that heat can accelerate the cytotoxic chemical reaction, leading to substantial thermal enhancement. The TER, the ratio of T(0) at 37°C to T(0) at an elevated temperature, increased with an increase in the temperature. The activation energy for melphalan at moderately elevated temperatures was largest among the agents tested in the laboratory and that for oxaliplatin was approximately half of the melphalan activation energy. This suggests that the thermal enhancement for the cytotoxicity of melphalan or alkylating agents might be the greatest.

#### *Docetaxel*

Recent studies suggest that docetaxel may show improved response at elevated temperatures. Factors that may modify the thermal enhancement of docetaxel were studied by Mohamed *et al*<sup>29</sup> to optimize its clinical use with hyperthermia. The tumour studied was an early-generation isograft of a spontaneous C3Hf/Sed mouse fibrosarcoma, FSa-II. Docetaxel was given as a single intraperitoneal injection. Hyperthermia was achieved by immersing the tumour-bearing foot into a constant temperature water bath.

Four factors were studied: duration of hyperthermia, sequencing of hyperthermia with docetaxel, intensity of hyperthermia, and tumour size. To study duration of hyperthermia, tumours were treated at 41.5°C for 30 or 90 minutes immediately after intraperitoneal administration of docetaxel. For sequencing of hyperthermia and docetaxel, animals received hyperthermia treatment of tumours for 30 minutes at 41.5°C immediately after drug administration, hyperthermia both immediately and 3 hours after docetaxel administration and hyperthermia given only at 3 hours after administration of docetaxel. Intensity of hyperthermia was studied using heat treatment

of tumours for 30 minutes at 41.5 or 43.5°C immediately following docetaxel administration.

The effect of tumour size was studied by delaying experiments until three times the tumour volume (113 mm<sup>3</sup>) was observed. Treatment of tumours lasted for 30 minutes at 41.5°C immediately following drug administration. Tumour response was studied using the mean tumour growth time. Hyperthermia in the absence of docetaxel had a small but significant effect on tumour growth time at 43.5°C, but not at 41.5°C. Hyperthermia at 41.5°C for 90 minutes immediately after docetaxel administration significantly increased mean tumour growth time ( $p = 0.0435$ ) when compared to tumours treated with docetaxel at room temperature. Treatment for 30 minutes had no effect. Application of hyperthermia immediately, and immediately plus 3 hours after docetaxel administration, was effective in delaying tumour growth. Treatment at 3 hours only had no effect. No significant difference in mean tumour growth time was observed with docetaxel and one half hour of hyperthermia at 41.5 or 43.5°C. For larger tumours, hyperthermia alone caused a significant delay in tumour growth time. Docetaxel at 41.5°C for 30 minutes did not significantly increase mean tumour growth time compared to large tumours treated with docetaxel at room temperature. Docetaxel shows a moderate increase in anti-tumour activity with hyperthermia. At 41.5°C the thermal enhancement of docetaxel is time-dependent, if hyperthermia is applied immediately following drug administration. In the experiments with large tumours, docetaxel alone or docetaxel plus hyperthermia showed the greatest delays in tumour growth time.

### Hyperthermia and gene therapy

Li *et al*<sup>30</sup> reported the activity of adenovirus-mediated heat-activated antisense Ku70 expression radiosensitizers in tumour cells *in vitro* and *in vivo*<sup>30</sup>. Ku70 is one component of a protein complex, Ku70 and Ku80, that functions as a heterodimer to bind DNA double-strand breaks and activates DNA-dependent protein kinase. The previous study of this group with Ku70<sup>-/-</sup> and Ku80<sup>-/-</sup> mice, and cell lines has shown that Ku70- and Ku80-deficiency compromises the ability of cells to repair DNA double-strand breaks, increases the radiosensitivity of cells, and enhances radiation-induced apoptosis. In this study, Li *et al* examined the feasibility of using adenovirus-mediated, heat-activated expression of antisense Ku70 RNA as a gene therapy paradigm to sensitize cells and tumours to ionizing radiation. First, they performed experiments to test the heat inducibility of HSP70 promoter and the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer in rodent and human cells. Replication-defective adenovirus

vectors were used to introduce a recombinant DNA construct, containing the enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the control of an inducible HSP70 promoter, into exponentially growing cells. At 24 hours after infection, cells were exposed to heat treatment, and heat-induced EGFP expression at different times was determined by flow cytometry. The data by Li *et al* clearly show that heat shock at 42°C, 43°C, or 44°C appears to be equally effective in activating the HSP70 promoter-driven EGFP expression (>300-fold) in various tumour cells. Second, the authors have generated adenovirus vectors containing antisense Ku70 under the control of an inducible HSP70 promoter. Exponentially growing cells were infected with the adenovirus vector, heat shocked 24 hours later, and the radiosensitivity determined 12 hours after heat shock. Data show that heat shock induces antisense Ku70 RNA, reduces the endogenous Ku70 level, and significantly increases the radiosensitivity of the cells. Third, the authors have performed studies to test whether Ku70 protein level can be down-regulated in a solid mouse tumour (FSa-II), and whether this results in enhanced radiosensitivity *in vivo*, as assessed by *in vivo/in vitro* colony formation and by the tumour growth delay. Their data demonstrate that heat-shock-induced expression of antisense Ku70 RNA attenuates Ku70 protein expression in FSa-II tumours, and significantly sensitizes the FSa-II tumours to ionizing radiation. Taken together, these interesting results suggest that adenovirus-mediated, heat-activated antisense Ku70 expression may provide a novel approach to radiosensitize human tumours in combination with hyperthermia.

### Conclusions

The comprehension, about 50 years ago, that hypoxic cells are resistant to X-rays led to the concept that cancers might be resistant to radiotherapy and chemotherapy because of their poor oxygen supply and subsequent hypoxia. Now tumour hypoxia is seen as a mechanism of resistance to many antineoplastic drugs, as well as a predisposing factor toward increased malignancy and metastases<sup>31</sup>.

However tumour hypoxia is a unique target for hyperthermia and cancer bioreductive therapy that could be exploited for therapeutic use. An hypoxic cell is unable to have a stable pH; this increases the permeability of the cell membrane so that antineoplastic agents can easily move through the membrane improving the global concentration of the drug both inside and outside the cell. Hyperthermia seems the best opportunity to enhance these phenomena.

## References

1. Gray LH, Conger AD, Ebert M, *et al.* Concentration of oxygen dissolved in tissue at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953; 26: 638-48.
2. Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; 9: 539-49.
3. Moulder JE, Rockwell S. Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 1987; 5: 313-41.
4. Brown JM. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy. *Cancer Res* 1999; 59: 5863-70.
5. Rauth AM, Melo T, Misra V. Bioreductive therapies: an overview of drugs and their mechanism of action. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 42: 755-62.
6. Wouters BG, Wang LH, Brown JM. Tirapazamine: a new drug producing tumor specific enhancement of platinum-based chemotherapy in non small cell lung cancer. *Ann Oncol* 1999; 10 suppl 5: S29-S33.
7. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379: 88-91.
8. Lin A, Cosby L, Shansky C, *et al.* Potential bioreductive alkylating agents. 1. Benzoquinone derivatives. *J Med Chem* 1972; 15: 1247-52.
9. Adams GE, Stratford IJ. Bioreductive drugs for cancer therapy: the search for tumour specificity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 29: 231-8.
10. Teicher BA, Holden SA, Al-Achi A, *et al.* Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulation in vivo in the FSaIIc murine fibrosarcoma. *Cancer Res* 1990; 50: 3339-44.
11. Binley L, Iqbal S, Kingsman S, *et al.* An adenoviral vector regulated by hypoxia for the treatment of ischaemic disease and cancer. *Gene Ther* 1999; 6: 1721-7.
12. Zaffaroni N, Fiorentini G, De Giorgi U. Hyperthermia and hypoxia: new developments in anticancer chemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 340-2.
13. Guadagni S, Fiorentini G, Palumbo G, *et al.* Hypoxic pelvic perfusion with mitomycin C using a simplified balloon-occlusion technique in the treatment of patients with unresectable locally recurrent rectal cancer. *Arch Surg* 2001; 136 (1): 105-12.
14. Guadagni S, Russo F, Rossi CR, *et al.* Deliberate hypoxic pelvic and limb chemoperfusion in the treatment of recurrent melanoma. *Am J Surg* 2002; 183: 28-36.
15. Fiorentini G, Poddie D, Graziani G, *et al.* Hypoxic isolated limb perfusion with mitomycin C in locally recurrent melanoma and sarcoma: results of a phase II study. *Reg Cancer Treat* 1995; 8: 135-9.
16. Brown JM, Giacca AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 1998; 58: 1408-16.
17. Urano M, Kuroda M, Nishimura Y. For the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures. *Int J Hypertherm* 1999; 2: 79-107.
18. Zaffaroni N, Villa R, Daidone MG, *et al.* Antitumor activity of hyperthermia alone or in combination with cisplatin and melphalan in primary cultures of human malignant melanoma. *Int J Cell Cloning* 1989; 7: 385-94.
19. Kusumoto T, Holden SA, Ara G, *et al.* Hyperthermia and platinum complexes: time between treatments and synergy in vitro and in vivo. *Int J Hyperthermia* 1995; 11: 575-86.
20. Bates DA, Mackillop WJ. Effect of hyperthermia on the uptake and cytotoxicity of melphalan in Chinese hamster ovary cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 16: 187-91.
21. Zaffaroni N, Villa R, Orlandi L, *et al.* Effect of hyperthermia on the formation and removal of DNA interstrand cross-links induced by melphalan in primary cultures of human malignant melanoma. *Int J Hypertherm* 1992; 8: 341-9.
22. Orlandi L, Zaffaroni N, Bearzatto A, *et al.* Effect of melphalan and hyperthermia on cell cycle progression and cyclin B1 expression in human melanoma cells. *Cell Prolif* 1995; 28: 617-30.
23. Orlandi L, Zaffaroni N, Bearzatto A, *et al.* Effect of melphalan and hyperthermia on p34cdc2 kinase activity in human melanoma cells. *Br J Cancer* 1996; 74: 1924-8.
24. Rietbroek RC, van de Vaart PJ, Haveman J, *et al.* Hyperthermia enhances the cytotoxic activity and platinum-DNA adduct formation of lobaplatin and oxaliplatin in cultured SW 1573 cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123: 6-12.
25. Orlandi L, Costa A, Zaffaroni N, *et al.* Relevance of cell kinetic and ploidy characteristics for the thermal response of malignant melanoma primary cultures. *Int J Oncol* 1993; 2: 523-6.
26. Richards EH, Hickman JA, Masters JR. Heat shock protein expression in testis and bladder cancer cell lines exhibiting differential sensitivity to heat. *Br J Cancer* 1995; 72: 620-6.
27. Takemoto M, Kuroda M, Urano M, *et al.* Effect of various chemotherapeutic agents given with mild hyperthermia on different types of tumours. *Int J Hyperthermia* 2003; 19 (2): 193-203.
28. Urano M, Ling CC. Thermal enhancement of melphalan and oxaliplatin cytotoxicity in vitro. *Int J Hyperthermia* 2002; 18 (4): 307-15.
29. Mohamed F, Stuart OA, Glehen O, *et al.* Docetaxel and hyperthermia: factors that modify thermal enhancement. *J Surg Oncol* 2004; 88 (1): 14-20.
30. Li GC, He F, Shao X, *et al.* Adenovirus-mediated heat-activated antisense Ku70 expression radiosensitizes tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2003; 63 (12): 3268-74.
31. Fiorentini G, Zaffaroni N, Bernardeschi P, *et al.* Perspectives of hypoxia in anticancer treatments: activated prodrugs and bioreductive perfusions. *Eur J Oncol* 2003; 8 (1): 17-20.



## **Il progetto OCCAM (Occupational Cancer Monitoring)**

### ***The Italian Occupational Cancer Monitoring System (the OCCAM project)***

Paolo Crosignani\*, Alessandra Scaburri\*, Roberto Audisio\*\*, Plinio Amendola\*\*\*, Stefania Massari\*\*\*\*, Alberto Scarselli\*\*\*\*, Silvio Cavuto\*

\* Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano, Italia

\*\* UO Medicina del Lavoro, Ospedale di Vimercate, AO Sesto San Giovanni (MI), Italia

\*\*\* Dipartimento di Medicina Preventiva, Occupazionale e di Comunità, Università di Pavia e Fondazione Maugeri, Pavia, Italia

\*\*\*\* ISPESL, Dipartimento di Medicina del Lavoro, Laboratorio di Epidemiologia e Statistica Sanitaria Occupazionale, Roma, Italia

#### **Riassunto**

**Il progetto OCCAM (Occupational Cancer Monitoring) nasce per stimare l'importanza ed individuare i tumori di origine lavorativa. È articolato in numerosi sottoprogetti volti sia alla stima per area, sede e comparto produttivo dell'importanza dei tumori di origine occupazionale, sia alla individuazione dei casi di possibile origine professionale a fini risarcitori e di miglioramento degli ambienti di lavoro. È inoltre realizzato e aggiornato un sistema di classificazione dei risultati dei lavori scientifici al fine di interpretazione dei risultati ottenuti dagli studi di area. La stessa base di conoscenza viene proposta come strumento per i Medici di Medicina Generale per la identificazione dei casi di sospetta origine professionale. Eur. J. Oncol., 10 (3), 181-184, 2005**

**Parole chiave:** occupazione, cancro, sorveglianza, letteratura

#### **Introduzione**

Il monitoraggio dei rischi oncologici in campo occupazionale è una priorità sanitaria sia per i lavoratori che per la popolazione nel suo complesso<sup>1,2</sup>. Il progetto OCCAM (Occupational Cancer Monitoring) nasce dalla rilettura dell'art. 71 del D.lgs 626/94, che attribuisce all'Istituto

#### **Summary**

**The OCCAM (Occupational Cancer Monitoring) project has been established to estimate and detect occupational cancer. It includes several subprojects aimed at estimating the burden of occupational cancers by area, site and job, as well as at detecting cases of possible occupational origin for compensation purposes and improvement of the work environment. Furthermore a system for the classification of the results of scientific papers has been created and is kept updated, with a view to evaluating the results of the area studies. The same knowledge base is proposed as an instrument for General Practitioners for the detection of cases of possible occupational origin. Eur. J. Oncol., 10 (3), 181-184, 2005**

**Key words:** occupation, cancer, surveillance, literature

per la Prevenzione e Sicurezza sui Luoghi di Lavoro (ISPESL) il compito di istituire un sistema di "monitoraggio dei rischi oncogeni di origine professionale" implementando un archivio "nominativo" dei tumori di sospetta origine professionale, segnalati allo stesso Ente da "medici, strutture pubbliche e private, nonché dagli istituti previdenziali".

Received/Pervenuto 9.6.2005 - Accepted/Accettato 30.6.2005

Address/Indirizzo: Dr. Paolo Crosignani, Unità Operativa Registro Tumori ed Epidemiologia Ambientale, Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Via Venezian 1, 20133 Milano, Italia - Tel. 0039/02/23902460 - Fax 0039/02/23902762 - E-mail: occam@istitutotumori.mi.it



Poiché un sistema basato su segnalazioni volontarie si è rivelato di difficile realizzazione<sup>3-6</sup>, è sembrato opportuno definire un sistema alternativo per la rilevazione dei tumori di sospetta origine professionale, basato su fonti informative correnti. Per attuare questo sistema informativo è stata istituita una collaborazione tra l'ISPESEL e l'Istituto Nazionale Tumori di Milano, che in modo sistematico e continuo realizza il collegamento tra le più numerose basi di dati di patologia possibili con le storie professionali ottenute in primo luogo dall'Istituto Nazionale della Previdenza Sociale (INPS), eventualmente integrate dalle informazioni contenute nelle basi di dati dell'Istituto Nazionale Assistenza Infortuni sul Lavoro (INAIL) e dell'Istituto Statistico (ISTAT).

Dati sulla storia lavorativa sono disponibili in forma elettronica presso l'INPS, che per ogni iscritto, annualmente, ha registrato, a partire dal 1974, tutti i lavori svolti dai dipendenti di imprese del settore privato, la ragione sociale delle imprese stesse e il relativo settore economico/industriale.

Le tipologie industriali di appartenenza dei lavoratori sono state classificate a partire dai codici delle professioni secondo la classificazione ATECO 81 e tipologie simili sono state raggruppate in un settore unico (es. Gomma, Cuoi e calzature, Trasporti, ecc.).

Per stimare il rischio per tumori professionali in base al tipo di neoplasia e al comparto produttivo ci si è avvalsi di sistemi informativi di rilevazione e archiviazione delle malattie su base territoriale: i Registri Tumori di popolazione<sup>7</sup>, gli archivi di mortalità regionali, e il sistema delle Schede di Dimissione Ospedaliera (SDO) come fonte per individuare i pazienti affetti da patologie tumorali.

In pratica il progetto OCCAM ha implementato la realizzazione di studi caso-controllo che confrontano le storie professionali, ottenute da INPS, di chi è ammalato di tumore con quelle di chi è senza malattia, reperendo i casi di neoplasie dalle fonti di dati disponibili a livello istituzionale.

## OCCAM - Registri Tumori

In una prima fase di attività del gruppo, utilizzando i casi incidenti rilevati da alcuni Registri Tumori italiani ed un campione della popolazione sorgente campionato dall'anagrafe assistiti, sono stati ottenuti risultati estremamente incoraggianti. Le informazioni sui lavori precedentemente svolti a partire dal 1974, per i soggetti assunti in imprese private, sono state collegate con i casi di tumore rilevati da sei Registri Tumori di Popolazione (Friuli, Genova capoluogo, Genova provincia, Macerata, Umbria, Varese, Veneto)<sup>7</sup> ed è stato così implementato uno studio caso-controllo<sup>8,9</sup> per mappare in ogni area il rischio per sito e tipologia economica nel settore privato. L'analisi si basava su 36.379 casi e 29.572 controlli di popolazione e da essa sono emerse associazioni statisticamente significative per molti settori economici per i quali era già noto, partendo dalla classificazione della International Agency for Research on Cancer (IARC)<sup>10</sup>, un rischio professionale per neoplasie in diverse sedi (Tabella 1). I risultati complessivi dell'indagine sono stati recentemente pubblicati<sup>11</sup>.

## OCCAM - SDO

In una fase successiva si è passati all'analisi di altri sistemi routinari di rilevazione della patologia, in particolare le SDO che, rispetto ai Registri Tumori, servono aree più vaste ma, derivando da attività che non sono nate per la ricerca epidemiologica, possono fornire dati di qualità inferiore.

– OCCAM - SDO Toscana. In Toscana sono stati identificati, attraverso le SDO, 4.915 casi incidenti di tumore maligno del polmone, pleura e vescica per il biennio 2000-2001 e un gruppo di controlli di popolazioni estratti dall'anagrafe assistiti di 14.115 soggetti. Dall'analisi caso-controllo sono emerse nume-

**Tabella 1** - Associazioni rilevate nello studio caso-controllo basato su sei Registri Tumori Italiani. Alcuni risultati statisticamente significativi

Settore	Sede neoplasia/sesso	Casi/controlli esposti per settore	OR (limiti di confidenza al 90%)
Cuoi e calzature	Leucemia/M	10/2019	1,48 (0,80-2,73)
	Leucemia/F	6/1296	0,90 (0,42-1,93)
	Naso/M	5/2019	4,68 (1,65-13,27)
	Naso/F	1/1296	7,97 (0,76-83,89)
Siderurgia	Polmone/M	369/1163	1,28 (1,13-1,45)
	Polmone/F	1/73	21,08 (2,73-162,92)
Gomma	Vescica/M	10/83	1,31 (0,73-2,34)
	Vescica/F	5/34	1,49 (0,67-3,31)
	Leucemia/M	3/83	2,18 (0,78-6,08)
	Leucemia/F	3/34	8,65 (2,88-25,96)

**Tabella 2** - Rischi per settore di attività economica per i casi di tumore maligno del polmone, pleura e vescica identificati attraverso il sistema delle dimissioni ospedaliere per il biennio 2000-2001

Ramo di attività economica	Sede della neoplasia	Rischio relativo	Intervalli di confidenza al 90%	N. di casi esposti
Siderurgia	Polmone	3,67	2,62-5,15	46
	Vescica	2,27	1,52-3,39	26
Costruzioni meccaniche	Pleura	4,45	2,07-9,59	7
Cuoio e calzature	Polmone	1,84	1,40-2,42	59
Legno	Polmone	2,47	1,85-3,30	58
Edilizia	Polmone	1,67	1,40-1,99	224
	Pleura	2,22	0,96-5,15	9
Trasporti	Polmone	2,08	1,62-2,67	79
	Pleura	4,12	1,55-10,91	5
	Vescica	1,45	1,09-1,93	52
Vetro	Polmone	2,18	1,44-3,29	25

rose associazioni positive tra settori produttivi e rischio di neoplasie, elencate nella Tabella 2.

- **OCCAM - SDO Lombardia.** È stato condotto uno studio caso-controllo basato sulla popolazione con 1.886 casi di tumore della vescica occorsi nell'anno 2000, estratti dagli archivi delle SDO, e 22.632 controlli campionati in maniera casuale tra la popolazione residente in Lombardia. Con questa analisi siamo stati in grado di identificare alcune associazioni tra rischio per tumori vescicali ed impiego nei seguenti settori industriali: Cuoio e calzature (OR=1,83; IC 90%: 1,01-3,33; 10 casi osservati), Trasporti (OR=1,28; IC 90%: 0,94-1,76; 37 casi osservati), Gomma (OR=1,22; IC 90%: 0,80-1,85; 19 casi osservati), Stampe (OR=1,5; IC 90%: 1,10-2,05; 38 casi osservati).

### OCCAM, matrice della letteratura

Nell'ambito del progetto OCCAM è stato dedicato ampio spazio al reperimento dei dati e di tutte le informazioni presenti in letteratura riguardanti il rischio di tumore in ambito professionale. Oltre 550 lavori scientifici pubblicati e indicizzati dal 1976 ad oggi, escluse pubblicazioni del tipo "case report", sono stati classificati per comparto produttivo e per sede di neoplasie (gli stessi criteri del progetto epidemiologico) e riportati graficamente in maniera da realizzare una intersezione, dove sono presenti le informazioni tra le due categorie. Sono riportati gli Autori, l'anno di pubblicazione ed il valore della misura dei rischi, unicamente per le pubblicazioni con associazioni positive tra lavoro e rischio oncogeno professionale. La costruzione di quella che abbiamo denominato "Matrice della letteratura" ha una duplice funzione: corroborare i risultati ottenuti con OCCAM e fornire uno strumento informativo, rapido ed essenziale a chiunque

voglia documentarsi sul rischio oncologico in ambito professionale. La matrice della letteratura è consultabile attualmente al sito: [www.occam.it](http://www.occam.it).

### OCCAM - MMG (Medici di Medicina Generale)

Nel corso dell'ultimo anno, partendo dal *database* della letteratura e basandosi inoltre sulle evidenze sul rischio oncogeno in ambito lavorativo raccolte con la metodologia di OCCAM, è stato realizzato un *software* informativo che aiutasse i medici di medicina generale a riconoscere e sospettare un'eventuale eziologia professionale per i casi di neoplasie tra i propri assistiti. Il lavoro, presentato recentemente al Corso Nazionale per Autori di Formazione Medici di Medicina Generale della Toscana, permette, conoscendo la sede ed i settori produttivi in cui ha prestato opera un assistito del medico, di accedere ai dati della letteratura che supportano l'ipotesi dell'eziologia professionale e contemporaneamente guida il medico nelle azioni da intraprendere sulla base del grado di sospetto.

### Conclusioni

Il sistema di rilevazione è apparso in grado di mettere in evidenza rischi noti per tumori occupazionali e altri rischi sconosciuti in numerose aree del paese. Esso potrebbe fornire uno strumento adatto per l'individuazione tempestiva dei casi di tumore di sospetta origine professionale permettendo, anche attraverso la consultazione della letteratura scientifica raccolta e organizzata nella matrice, di studiare dal punto di vista igienistico-industriale i reparti a rischio, per mettere in atto gli interventi di prevenzione necessari se i rischi dovessero rivelarsi ancora presenti.

## Ringraziamenti

Lo sviluppo di questo progetto non sarebbe stato possibile senza il supporto finanziario dell'Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro (Roma), del Ministero del Welfare e della Regione Lombardia. Di primaria importanza è stata la collaborazione dell'INPS, in particolare delle sedi di Roma e di Savona, che ha consentito di mettere a punto gli algoritmi di estrazione delle storie professionali.

## Bibliografia

1. Tomatis L. The identification of human carcinogens and primary prevention of cancer. *Mutat Res* 2000; 462: 407-21.
2. Bosch X. EC urges reporting of occupational diseases. *Lancet* 2003; 362: 1129.
3. Leigh JP, Robbins JA. Occupational disease and workers' compensation: coverage, costs, and consequences. *Milbank Q* 2004; 82 (4): 689-721.
4. Merler E, Vineis P, Alhaique D, *et al.* Occupational cancer in Italy. *Environ Health Perspect* 1999; 107 suppl 2: 259-71.
5. Azaroff LS, Levenstein C, Wegman DH. Occupational injury and illness surveillance: conceptual filters explain underreporting. *Am J Public Health* 2002; 92: 1421-9.
6. Kauppinen T, Toikkanen J, Pedersen D, *et al.* Occupational exposure to carcinogens in the European Union. *Occup Environ Med* 2000; 57: 10-8.
7. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, *et al.* Cancer incidence in five continents. Vol. VIII. Lyon: IARC Scientific Publication No. 155, 2003.
8. Miettinen OS. *Theoretical Epidemiology*. New York: John Wiley & Sons, 1985; 47.
9. Breslow NE, Day NE. *Statistical methods in cancer research*. Vol I. The analysis of case-control studies. Lyon: IARC Scientific Publications No. 32, 1980.
10. International Agency for Research on Cancer. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans*, Supplement 7. Lyon: IARC Lyon, 1987.
11. Crosignani P, Nesti M, Audisio R, *et al.* A monitoring system for occupational cancer. *Med Lav* 2005; 96 (1): 33-41.

## Trattamento endoscopico delle neoplasie della via biliare

### *Endoscopic treatment of biliary tract cancer*

Settimio Ciletti\*, Maria Elena Riccioni\*, Santa Cogliandolo\*\*, Arnaldo Andreoli\*\*\*, Antonio Tesi\*\*\*, Roberto Coppola\*\*\*\*

\* Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia

\*\* Hospice Oncologico Villa Speranza, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia

\*\*\* U.O. Gastroenterologia - Azienda Ospedaliera S. Camillo-Forlanini, Roma, Italia

\*\*\*\* Istituto di Chirurgia Generale, Università Campus Biomedico, Roma, Italia

#### Riassunto

Le neoplasie della via biliare si caratterizzano per una modesta percentuale di resecabilità chirurgica ed una prognosi spesso infausta a breve termine. La dilatazione cistica della via biliare, la colite ulcerativa, la colangite sclerosante, la calcolosi intraepatica, alcune parasitosi come l'infestazione da fasciola epatica e l'esposizione al thorocontrast si correlano ad una maggiore incidenza di neoplasie della via biliare. Scopo di questo lavoro retrospettivo è di valutare i risultati del trattamento palliativo endoscopico nei pazienti non suscettibili di trattamento chirurgico e l'eventuale utilità del drenaggio endoscopico preoperatorio. Nel periodo compreso tra novembre 1987 e ottobre 2004, 1313 pazienti itterici sono stati sottoposti a colangiopancreatografia retrograda endoscopica (CPRE). In 247 casi (21,8%) è stata posta diagnosi di neoplasia della via biliare. I pazienti consistevano in 139 maschi e 108 femmine, con un'età media complessiva di 66,1 anni. Il drenaggio biliare è riuscito in 224 pazienti (90,7%). Il drenaggio palliativo endoscopico è stato il trattamento definitivo in 166 pazienti (67,2%). Le complicanze precoci, che si sono verificate in 21 pazienti (8,5%), includono 17 casi di colangite, 2 emorragie, una pancreatite ed una perforazione retroduodenale. Quarantanove pazienti hanno presentato un episodio di colangite che è stato causato dall'ostruzione tardiva dell'endoprotesi. Non vi è stata mortalità correlata alla metodica. La

#### Summary

Bile duct cancer has a low surgical resectability rate and a poor survival rate even in the short term. Bile duct cysts, ulcerative colitis, sclerosing cholangitis, hepatolithiasis, some parasitoses such as liver fluke infections, and thorocontrast exposure are associated with an increased risk of bile duct cancer. The aim of this retrospective study is to evaluate the results of palliative endoscopic treatment in non-operable patients and the usefulness of preoperative endoscopic biliary drainage. From November 1987 to October 2004, 1313 patients with obstructive jaundice were submitted to endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP). In 247 patients (21.8%) this jaundice was due to a bile duct cancer. There were 139 males and 108 females with an average overall age of 66.1 years. Endoscopic internal biliary drainage was successful in 224 patients (90.7%). Palliative endoscopic biliary drainage was the definitive treatment in 166 patients (67.2%). There were 21 early complications (8.5%), including 17 cholangitis, 2 bleedings, one pancreatitis and one retroduodenal perforation. Late occlusion of stent caused cholangitis in 49 patients. There were no deaths related to endoscopic drainage. Average patency was 101 days for plastic stents and 152 days for metallic stents. Radical surgery is the only curative option for bile duct cancer, but the high percentage of patients (in particular in the case of tumours of the

Received/Pervenuto 29.4.2005 - Accepted/Accettato 31.5.2005

Address/Indirizzo: Dr. Settimio Ciletti, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Policlinico Gemelli, Largo Gemelli 8, 00168 Roma, Italia

E-mail: settimiocil@katamail.com

durata media della pervietà delle protesi è stata di 101 giorni per quelle di plastica e di 152 giorni per le metalliche. L'unica vera possibilità curativa per i tumori della via biliare è l'intervento chirurgico. Tuttavia l'elevata percentuale di pazienti (in particolare per i tumori della via biliare intraepatica) che già al momento della diagnosi hanno una malattia non resecabile, pone il problema di quale palliazione debba essere attuata. In questi pazienti il drenaggio endoscopico sembrerebbe garantire un'adeguata percentuale di successo. *Eur. J. Oncol.*, 10 (3), 185-190, 2005

**Parole chiave:** neoplasie della via biliare, colangiopancreatografia retrograda endoscopica, drenaggio biliare, protesi biliari, complicanze endoscopiche

## Introduzione

Il carcinoma della via biliare rappresenta il 2% di tutti i carcinomi. Caratteristica distintiva delle neoplasie della via biliare è la difficoltà di diagnosi precoce e di conseguenza una limitata possibilità di guarigione ed una prognosi spesso infausta a breve termine.

La maggiore incidenza di neoplasie biliari si osserva nella sesta e settima decade di vita. I maschi sono maggiormente colpiti dal carcinoma della via biliare con un rapporto rispetto alle donne di 1,3/1<sup>1,2</sup>.

Alcuni fattori eziologici vengono correlati all'insorgenza delle neoplasie delle via biliare. La *dilatazione cistica della via biliare* è una patologia che si caratterizza per la presenza di un'anomala confluenza della via biliare e del dotto di Wirsung, con formazione di un lungo comune tra i due dotti. Questa anomalia sarebbe responsabile dapprima della dilatazione della via biliare e successivamente, con l'instaurarsi di una flogosi cronica, dell'insorgenza di un carcinoma della via biliare. La diagnosi di carcinoma della via biliare insorto su dilatazione cistica avviene generalmente nella terza o quarta decade di vita, circa trent'anni prima che nei pazienti non a rischio. Esiste inoltre un'evidente relazione tra epoca d'esordio della sintomatologia e comparsa della neoplasia: se i sintomi sono evidenti già nella prima decade di vita e quindi si arriva più precocemente alla diagnosi di dilatazione cistica ed all'intervento chirurgico, il rischio d'insorgenza di un carcinoma della via biliare è solo dello 0,7%; tale rischio sale al 6,8% se la sintomatologia compare tra la prima e la seconda decade di vita, raggiungendo il 14,3% oltre la seconda decade<sup>2,3</sup>.

Altra importante associazione è con la *colite ulcerativa*. La prima evidenza venne pubblicata già nel 1954 da Parker e Kendall<sup>4</sup>. Ulteriori studi hanno inoltre rilevato

intrahepatic bile duct) who, at diagnosis, have a non-resectable disease, puts the problem of which palliative therapy should be chosen. In these patients, endoscopic drainage seems to be successful in an adequate percentage of cases. *Eur. J. Oncol.*, 10 (3), 185-190, 2005

**Key words:** bile duct cancer, endoscopic retrograde cholangiopancreatography, biliary drainage, biliary stent, endoscopic complications

che lo sviluppo di una neoplasia della via biliare in questi pazienti è in relazione alla presenza di una *colangite sclerosante*, malattia idiopatica a patogenesi verosimilmente autoimmune. Il rischio di neoplasie della via biliare per i pazienti affetti da colangite sclerosante varia tra il 10 ed il 15%, con un'incidenza più elevata nella quinta decade di vita<sup>5</sup>.

Anche i *calcoli*, in particolar modo la litiasi intraepatica, vengono considerati come un possibile fattore predisponente. Recenti studi hanno rilevato un rischio superiore al 5% di neoplasie della via biliare in pazienti con litiasi intraepatica; le possibili cause potrebbero essere la stasi biliare, le infezioni biliari e le dilatazioni cistiche dell'albero biliare intraepatico<sup>2</sup>.

Alcuni *parassiti* (*Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felineus*), tipici dell'oriente, vengono considerati fattori predisponenti all'insorgenza di neoplasie della via biliare. Anche il *Thorotrast*, un radiocontrasto usato fra gli anni '30 e '40, ha causato numerose neoplasie epatiche e biliari<sup>3</sup>.

Ulteriori fattori di rischio sono stati evidenziati in un recente lavoro di Shaib *et al*<sup>6</sup>: essi includono epatite C, HIV, cirrosi epatica, diabete.

## Classificazione topografica

La classificazione topografica attualmente adottata, proposta nel 1973 da Longmire *et al*<sup>7</sup> e ufficialmente acquisita dall'American Joint Committee of Cancer, prevede la suddivisione delle neoplasie della via biliare in tre gruppi, ciascuno dei quali interessa un differente segmento della via biliare<sup>8</sup>:

– *neoplasie del terzo superiore*, comprendenti l'epatico comune ed il confluente biliare principale;

- *neoplasie del terzo medio*, dallo sbocco del cistico sino al margine superiore del duodeno;
- *neoplasie del terzo inferiore*, comprendenti la via biliare intrapancreatica.

Un'ulteriore classificazione, proposta da Bismuth *et al*<sup>9</sup>, viene utilizzata per le neoplasie del terzo superiore in relazione al coinvolgimento dei dotti biliari intraepatici e delle convergenze biliari:

- *tipo 1*, coinvolgimento dell'epatico comune ma non del confluente biliare principale; è ancora presente una comunicazione tra epatico destro ed epatico sinistro;
- *tipo 2*, coinvolgimento del confluente biliare principale, con separazione degli emisistemi biliari di destra e di sinistra che non comunicano tra loro;
- *tipo 3*, il tumore si estende alla confluenza secondaria di destra (3a), o di sinistra (3b);
- *tipo 4*, sia la confluenza secondaria di destra che la sinistra sono coinvolte.

## Materiali e metodi

Nel periodo compreso tra novembre 1987 e ottobre 2004, 1313 pazienti itterici sono stati sottoposti a colangiopancreaticografia retrograda endoscopica (CPRE). In 247 casi (21,8%) è stata posta diagnosi di neoplasia della via biliare. Si trattava di 139 uomini e 108 donne con età compresa tra 16 e 96 anni (media 66,1 anni).

Dieci pazienti erano gastrossectati: 8 con ricostruzione sec. Billroth 2, e 2 con ricostruzione sec. Billroth 1; 13 erano stati sottoposti a colecistectomia per litiasi.

In 105 pazienti (42,5%), al momento della diagnosi, erano presenti importanti malattie associate: 39 casi di malattie dell'apparato cardiovascolare, 26 casi di diabete, 10 casi di neoplasie associate, 9 epatopatie croniche, 7 neuropatie, 7 patologie dell'apparato respiratorio, 5 ulcere peptiche, 2 insufficienze renali croniche.

Al ricovero la bilirubinemia totale media era di 13,2 mg/dl, con un *range* da 2,5 a 39,8 mg/dl; le transaminasi S-GOT erano elevate, in media 3,1 volte la norma; le transaminasi S-GPT 4,8 volte; la fosfatasi alcalina 4,2 volte; le gamma-GT 10,7 volte.

L'esame è stato eseguito d'urgenza nei pazienti che presentavano valori di bilirubinemia sierica superiori a 10 mg/dl.

## Risultati

L'opacizzazione completa biliare e pancreatica è stata ottenuta in 235 dei 247 pazienti (95,1%). Il drenaggio bi-

liare, tentato in tutti i 235 pazienti, è riuscito in 224 di essi (95,3%). Di questi ultimi pazienti, in 52 la stenosi era localizzata a livello del terzo inferiore, in 39 a livello del terzo medio ed in 133 a livello del terzo superiore (fig. 1). Dei 133 pazienti con stenosi del terzo superiore, 61 appartenevano al tipo 1 di Bismuth, 29 al tipo 2 ed i rimanenti 43 ai tipi 3 e 4.

È stata posizionata un'endoprotesi biliare in 149 casi, 2 endoprotesi in 58 casi, 3 endoprotesi in 3 casi e un sondino nasobiliare in 14 casi. In 15 pazienti con malattia non resecabile ma in buone condizioni generali è stata posizionata un'endoprotesi metallica espandibile.

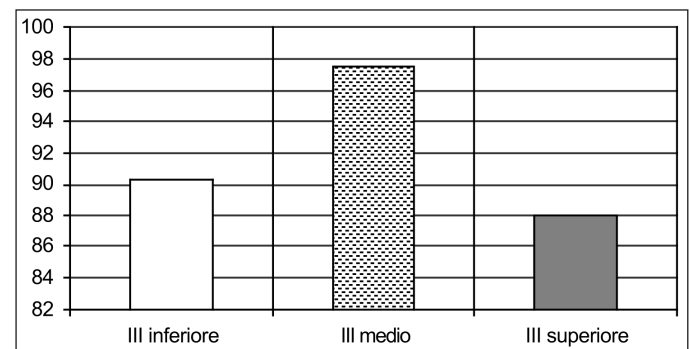
L'esecuzione del drenaggio ha richiesto un solo esame endoscopico in 163 pazienti, 2 esami in 57 pazienti e 3 esami in 4 pazienti.

La durata media della pervietà delle protesi è stata di 101 giorni (*range* 26-189) per quelle di plastica e di 152 giorni (*range* 121-193) per le metalliche.

Il drenaggio palliativo endoscopico è risultato il trattamento definitivo in 166 pazienti (67,2%). La percentuale di palliazione endoscopica in base alla topografia della stenosi è stata del 56% nelle neoplasie del III inferiore, del 49% per quelle del III medio ed infine dell'89% per quelle del III superiore (Tabella 1).

## Complicanze immediate

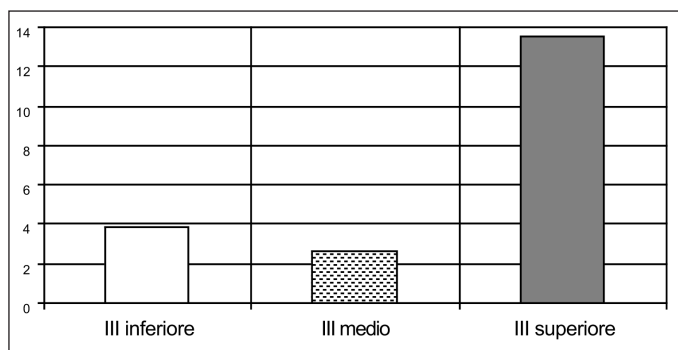
Le complicanze si sono verificate in 21 pazienti: 17 casi di colangite, 2 emorragie dopo sfinterotomia endosco-



**Fig. 1.** Distribuzione percentuale del successo endoscopico in base alla sede della stenosi

**Tabella 1** - Trattamento definitivo in 247 pazienti con tumore delle vie biliari

Trattamento	Pazienti	%
Drenaggio endoscopico	166	67,2
Resezione radicale	58	23,5
Drenaggio transepatico	12	4,8
Derivazione bilio-digestiva	11	4,5



**Fig. 2.** Distribuzione percentuale delle complicanze in base alla sede della stenosi

pica, una pancreatite ed una perforazione retroduodenale. Nessuna complicanza ha richiesto un trattamento chirurgico. La percentuale totale di complicanze è stata dell'8,5%. In base alla topografia della stenosi la percentuale delle complicanze è risultata del 3,8% per le neoplasie del III inferiore, del 2,6% per quelle del III medio ed infine del 13,5% per quelle del III superiore (fig. 2).

Non vi è stata mortalità correlata alla metodica.

### Complicanze tardive

Quarantanove pazienti, portatori di endoprotesi biliare definitiva, hanno presentato un episodio di colangite per l'ostruzione dell'endoprotesi. In 45 casi si trattava di endoprotesi di plastica ed in 4 pazienti di endoprotesi metallica.

Per i pazienti con endoprotesi di plastica, l'ostruzione è sopravvenuta ad una distanza media di circa 3 mesi dal posizionamento: in 40 di questi pazienti l'endoprotesi è stata sostituita con facilità; solo in un paziente, giovane ed ancora in buone condizioni generali, a causa di frequenti episodi di colangite, si è preferito eseguire un'anastomosi biliodigestiva. Sette pazienti sono stati sottoposti ad un ulteriore cambio di protesi sempre ad una distanza di circa 3 mesi dal precedente.

In 4 pazienti con endoprotesi metallica l'ostruzione è avvenuta a circa 5 mesi dal posizionamento per l'ulteriore infiltrazione del tumore a monte della protesi: in questi casi è stata posizionata una protesi di plastica attraverso la protesi metallica, lasciando in sede quest'ultima.

### Discussione

L'unica vera possibilità curativa per i tumori della via biliare è l'intervento chirurgico. Sfortunatamente la diagnosi, in gran parte dei casi, è tardiva ed in particolare

circa l'80% delle neoplasie della via biliare intraepatica risulta inoperabile al momento dell'osservazione per interessamento vascolare o per la presenza di metastasi a distanza<sup>1,5,10,11</sup>. Da questo dato emerge l'importanza del ruolo svolto dalle metodiche di drenaggio palliativo dell'ittero conseguente all'ostruzione biliare causata da queste neoplasie.

Attualmente il drenaggio biliare si avvale fondamentalmente delle colangiografie dirette operative: la colangiografia percutanea transepatica (PTC) o la CPRE.

Agli inizi degli anni '70, la PTC sembrava rispondere efficacemente alle esigenze di un drenaggio palliativo dell'ittero, nei pazienti a rischio chirurgico, perché eseguibile in anestesia locale, rapida e relativamente poco invasiva. Mediante tale metodica è possibile infatti posizionare dei semplici drenaggi esterni, dei drenaggi passanti la stenosi o inserire endoprotesi biliari definitive<sup>3,12</sup>.

Nel 1976 Nagai *et al*<sup>13</sup> e Cotton<sup>14</sup> posizionarono i primi sondini nasobiliari endoscopici ottenendo un efficace drenaggio biliare esterno con apparente minor impegno e minori rischi per il paziente. Da allora la metodica endoscopica ha avuto un rapido sviluppo, anche per l'ampia disponibilità tecnologica in questo settore, riguardante la continua ricerca di nuovi materiali ed un costante miglioramento dello strumentario. A vantaggio della metodica endoscopica rispetto a quella transepatica o all'intervento chirurgico è la vasta applicabilità con rare controindicazioni assolute<sup>2,3,15,16</sup>. Se sono presenti stenosi ilari particolarmente complesse può essere necessario, per ottenere un drenaggio completo, integrare le due metodiche, percutanea ed endoscopica.

Le complicanze *precoci* più frequenti, dopo drenaggio endoscopico, sono la colangite, l'emorragia, la pancreatite e le perforazioni (retroduodenali o intraperitoneali). L'emorragia è, di solito, dovuta alla sfinterotomia in pazienti con deficit coagulativi secondari alla colestasi. Per tale motivo, per prevenire questa complicanza, Lindstrom ed Anderberg<sup>17</sup> hanno proposto di eseguire il posizionamento di endoprotesi biliari senza sfinterotomia. La colangite, invece, si verifica generalmente solo se vi è un incompleto drenaggio biliare o se, per realizzare il drenaggio, sono state eseguite più sedute endoscopiche. La pancreatite e la perforazione duodenale o retroperitoneale sono probabilmente le complicanze meno prevedibili.

Tra le complicanze *tardive*, l'ostruzione dell'endoprotesi appare un evento così frequente che può considerarsi una naturale evoluzione del drenaggio biliare endoscopico. Huibregtse<sup>18</sup> riporta un'incidenza di occlusione dell'endoprotesi del 50% dei casi dopo un tempo medio di 5 mesi. Le cause che determinano l'ostruzione delle endoprotesi biliari, a tutt'oggi, non sono state identificate. Tut-

tavia il relativamente recente utilizzo delle endoprotesi metalliche espandibili, che si caratterizzano per un diametro più ampio rispetto a quelle di plastica, ha determinato un allungamento del tempo medio di pervietà, con conseguente beneficio per i pazienti, che vengono sottoposti con minor frequenza ad eventuali successivi reinterventi endoscopici<sup>10, 19, 20</sup>. Nella nostra esperienza la durata media di pervietà è stata 101 giorni (*range* 26-189) per le protesi di plastica e 152 giorni (*range* 121-193) per quelle metalliche.

## Conclusioni

Tuttora dibattuto, in particolare per le neoplasie del III inferiore e del III medio, dove le percentuali di reseccabilità chirurgica superano il 50%, è il ruolo del trattamento endoscopico come drenaggio temporaneo preoperatorio, allo scopo di sottoporre ad intervento chirurgico pazienti non itterici e di diminuire così il rischio legato alla bilirubinemia elevata. Anche se non tutti gli autori concordano<sup>21, 22</sup>, al momento la maggioranza degli studi sembra propendere per l'attuazione del drenaggio che migliorerebbe la morbilità e la mortalità post-operatoria<sup>23-28</sup>.

Anche per quanto riguarda le neoplasie della via biliare intraepatica la chirurgia rimane l'unica terapia in grado di migliorare la prognosi<sup>2, 5, 10, 29, 30</sup>. Tuttavia l'elevata percentuale di pazienti, circa l'80%, che già al momento della diagnosi hanno una malattia non reseccabile, pone il problema sul tipo di palliazione (chirurgica, endoscopica, percutanea) da eseguire<sup>3, 10, 31, 32</sup>. Anche se gli studi finora condotti non concordano sul trattamento da adottare, il drenaggio endoscopico, in particolare nei pazienti ad elevato rischio chirurgico, e sempre in considerazione delle specifiche competenze dei vari centri, sembrerebbe garantire un'adeguata percentuale di successo con una contenuta percentuale di complicanze<sup>2, 8, 10, 20</sup>.

## Bibliografia

- De Vita V Jr, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer: principle and practice of oncology, 4<sup>th</sup> Edition. New York: Lippincott, 2001.
- Picciochi A, Coppola R, Riccioni ME, *et al.* Le neoplasie delle vie biliari. In Ferrarese S. Manuale di chirurgia. Roma: CIC Edizioni Internazionali, 1997.
- Terblanche J. Hepatobiliary malignancy: its multidisciplinary malignancy. London: Edward Arnold, 1994.
- Parker RG, Kendall EJ. The liver in ulcerative colitis. *Br Med J* 1954; 4845: 1030-2.
- Metaire S, Lucidi V, Castaing D. Intra-hepatic cholangiocarcinoma. *J Chir* 2004; 141: 315-21.
- Shaib YH, El Serag HB, Davila JA, *et al.* Risk factor of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. A case-control study. *Gastroenterology* 2005; 128: 620-6.
- Longmire WP, McArthur MS, Bastounis EA, *et al.* Carcinoma of the extrahepatic biliary tract. *Ann Surg* 1973; 178 (3): 333-45.
- AJCC Cancer Staging Manual, 1<sup>st</sup> Edition. New-York: Springer-Verlag, 1977.
- Bismuth H, Houssin D, Castaing D. Major and minor segmentectomies "regles" in liver surgery. *World J Surg* 1982; 6: 10-24.
- Freeman ML, Sielaff TD. A modern approach to malignant hilar biliary obstruction. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; 3: 187-201.
- Guthrie CM, Haddock G, De Beaux AC. Changing trends in the management of extrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Surg* 1993; 80: 1434-9.
- Hatfield ARW, Terblanche J, Fataar S, *et al.* Preoperative external biliary drainage in obstructive jaundice. *Lancet* 1982; 2: 896-9.
- Nagai N, Toli F, Oi I, *et al.* Continuous endoscopic pancreaticocholedochal catheterization. *Gastrointest Endosc* 1976; 23 (2): 78-81.
- Cotton PB, Chapman M, Whiteside CG, *et al.* Duodenoscopic papillotomy and gallstone removal. *Br J Surg* 1976; 63 (9): 709-14.
- Cotton PB. Management of malignant bile duct obstruction. *J Gastroenterol Hepatol* 1990; 5 (suppl 1): 63-77.
- Shepherd HA, Royle G. Endoscopic biliary endoprosthesis in the palliation of malignant obstruction of the distal common bile duct: a randomized trial. *Br J Surg* 1988; 75: 1166-8.
- Lindstrom E, Anderberg B. Endoscopic biliary drainage in malignant bile duct obstruction. *Acta Chir Scand* 1988; 154: 277-81.
- Huibregtse K. Endoscopic palliation in malignant bile duct strictures: the Amsterdam experience. *Dig Endosc* 1990; 2: 203-6.
- Vitale GC, Carson GH, George M, *et al.* Management of malignant biliary stricture with self-expanding metallic stent. *Surg Endosc* 1996; 10: 970-3.
- De Palma GD, Rega M, Persico M, *et al.* Endoscopic palliation of inoperable hilar biliary carcinoma with self expanding metal stents. *Minerva Chir* 2004; 59: 249-53.
- Hochwald SN, Burke EC, Jarnagin WR, *et al.* Association of preoperative biliary stenting with increased postoperative infectious complications in proximal cholangiocarcinoma. *Arch Surg* 1999; 134: 261-6.
- Povoski SP, Karpeh MS, Conlon K, *et al.* Association of preoperative biliary drainage with postoperative outcome following pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg* 1999; 230 (2): 131-42.
- Coppola R, Riccioni ME, Ciletti S, *et al.* Periapillary tumors. Analysis of 319 consecutive cases submitted to preoperative endoscopic biliary drainage. *Surg Endosc* 2001; 15: 1135-9.
- Marcus SG, Dobryansky M, Shamamian P, *et al.* Endoscopic biliary drainage before pancreaticoduodenectomy for periampullary malignancies. *J Clin Gastroenterol* 1998; 26 (2): 125-9.
- McPherson GA, Benjamin IS, Hodgson HJF, *et al.* Pre-operative percutaneous transhepatic drainage: the results of a controlled trial. *Br J Surg* 1984; 71: 371-5.



26. Pisters PWT. Preoperative biliary decompression does not increase pancreaticoduodenectomy-associated morbidity: 250 consecutive cases. Annual meeting of the American College of Surgeons, San Francisco, 1999.
27. Trede M, Schwall G. The complications of pancreatotomy. *Ann Surg* 1988; 207 (1): 39-47.
28. Lillemoe K. Preoperative biliary drainage and surgical outcome. *Ann Surg* 1999; 230 (2): 143-4.
29. Yi B, Zhang BH, Zhang YJ, *et al*. Surgical procedure and prognosis of hilar cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3 (3): 453-7.
30. Zervos EE, Pearson H, Durkin AJ, *et al*. In-continuity hepatic resection for advanced hilar cholangiocarcinoma. *Am J Surg* 2004; 188 (5): 584-8.
31. Boender J, Lameris JS. Malignant common bile duct obstruction: factors influencing the success rate of endoscopic drainage. *Endoscopy* 1990; 22: 259-62.
32. Stain SC, Baer HU, Blumgart LH. Current management of hilar cholangiocarcinoma. *Surg Gynecol Obstet* 1992; 75: 579-88.

## I casi di mesotelioma maligno in Italia. Attività e risultati del Registro Nazionale (ReNaM)

### *Cases of malignant mesothelioma in Italy. Activity and results of the National Registry (ReNaM)*

Massimo Nesti<sup>1</sup>, Alessandro Marinaccio<sup>1</sup>, Gabriella Cauzillo<sup>2</sup>, Renata De Zotti<sup>3</sup>, Valerio Gennaro<sup>4</sup>, Giuseppe Gorini<sup>5</sup>, Massimo Menegozzo<sup>6</sup>, Carolina Mensi<sup>7</sup>, Enzo Merler<sup>8</sup>, Dario Mirabelli<sup>9</sup>, Fabio Montanaro<sup>10</sup>, Marina Musti<sup>11</sup>, Franco Pannelli<sup>12</sup>, Antonio Romanelli<sup>13</sup>, Rosario Tumino<sup>14</sup> ed il gruppo di lavoro del Registro Nazionale dei Mesoteliomi (ReNaM) \*

<sup>1</sup>Registro Nazionale dei Mesoteliomi (ReNaM), Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro (ISPESL), Dipartimento di Medicina del Lavoro, Roma, Italia; <sup>2</sup>Centro Operativo Regionale della Basilicata, Servizio Osservatorio Epidemiologico Regionale, Potenza, Italia; <sup>3</sup>Centro Operativo Regionale del Friuli-Venezia Giulia, Unità Clinico-Operativa della Medicina del Lavoro, Trieste, Italia; <sup>4</sup>Registro Mesoteliomi della Liguria, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (IST), Genova, Italia; <sup>5</sup>Archivio Regionale Toscano dei Mesoteliomi Maligni, Unità di Epidemiologia Ambientale ed Occupazionale, Firenze, Italia; <sup>6</sup>Centro Operativo Regionale della Campania, Sezione di Medicina Sperimentale, Napoli, Italia; <sup>7</sup>Registro Mesoteliomi Lombardia, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia; <sup>8</sup>Registro Regionale Veneto dei Casi di Mesotelioma, AUSL 16, Padova, Italia; <sup>9</sup>Registro dei Mesoteliomi Maligni del Piemonte, A.O. S. Giovanni Battista, Torino, Italia; <sup>10</sup>Registro Tumori del Canton Ticino, Istituto di Patologia, Locarno, Svizzera; <sup>11</sup>Centro Operativo Regionale Pugliese del Registro Nazionale Mesoteliomi, Policlinico, Bari, Italia; <sup>12</sup>Registro dei Mesoteliomi delle Marche, Dipartimento di Scienze Igienistiche e Sanitarie Ambientali, Camerino, Italia; <sup>13</sup>Registro Mesoteliomi dell'Emilia Romagna, AUSL Reggio Emilia, Reggio Emilia, Italia; <sup>14</sup>Centro Operativo Regionale della Sicilia, Registro Tumori Ragusa, Ragusa, Italia\*\*

#### Riassunto

**Il Registro Nazionale dei Mesoteliomi (ReNaM) è stato istituito presso l'Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro (ISPESL) con l'obiettivo di stimare l'incidenza del mesotelioma in Italia, di verificare le modalità di esposizione ad amianto, di determinare l'impatto e la diffusione della patologia nella popolazione e di identificare eventuali fonti di contaminazione ancora sottovalutate o sconosciute. In 16 regioni italiane sono stati istituiti i Centri Operativi Regionali (COR) con lo scopo di identificare e studiare i casi di mesotelioma maligno incidenti in ciascuna regione con metodi e procedure definite dalle Linee Guida nazionali. Ciascun COR ricerca attivamente i casi presso le strutture che possono diagnosticare e**

#### Summary

**The Italian National Mesothelioma Registry (ReNaM) has been set up at the National Institute for Occupational Safety and Health (ISPESL), in order to estimate the incidence of malignant mesothelioma in Italy, to define the modalities of exposures to asbestos, to assess the impact and diffusion of the pathology in the population, and to identify underestimated (or unknown) sources of environmental contamination with asbestos. Regional Operating Centres (COR) have been set up in 16 Italian regions to identify and to investigate all cases of malignant mesothelioma diagnosed in each region, applying national guidelines. Each COR directly collects cases in those care institutions that diagnose and treat mesothelioma cases (anatomic-pathological units,**

Received/Pervenuto 3.5.2005 - Accepted/Acettato 16.6.2005

Address/Indirizzo: Dr. Massimo Nesti, Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro, Dipartimento di Medicina del Lavoro, Laboratorio di Epidemiologia e Statistica Sanitaria Occupazionale, Via Alessandria 220/E, 00198 Roma, Italia - E-mail: alessandro.marinaccio@ispesl.it

\* Gruppo di lavoro del Registro dei Mesoteliomi: a fine articolo

\*\* Elenco completo dei COR: a fine articolo

trattare casi di mesotelioma (anomie patologiche, pneumologie, chirurgie toraciche, ecc.). La ricostruzione della storia lavorativa, residenziale e le abitudini di vita di ciascun caso sono ottenute mediante un questionario standard, fornito da un intervistatore esperto. Le modalità di esposizione sono poi classificate da un igienista industriale, che valuta se il lavoro del soggetto, la vita privata o condizioni ambientali particolari possono avere comportato esposizione ad amianto. I dati presentati si riferiscono a casi registrati in dodici regioni nel periodo 1993-2001. Sono stati raccolti 4.961 casi di mesotelioma maligno: i mesoteliomi pleurici hanno colpito il 93% dei casi ed il rapporto fra casi pleurici e peritoneali è di 14,6:1. La quota di casi di sesso femminile è considerevole (il rapporto di genere M/F è pari a 2,6:1). C'è un'ampia varietà di esposizioni professionali, comprendente numerosi settori, alcuni già noti come settori ad alto rischio, altri inattesi. I settori più colpiti sono l'edilizia, l'industria metallurgica e siderurgica, la cantieristica navale e i rotabili ferroviari. Sono state individuate come categorie ad alto rischio: muratori, idraulici e carpentieri nell'edilizia, elettricisti, saldatori, installatori e manutentori nell'industria metallurgica e siderurgica, attrezzisti e verniciatori nella cantieristica navale, demolitori e manutentori dei rotabili ferroviari. Nonostante l'attività del ReNaM soffra attualmente di molti limiti, un'attività coordinata a livello nazionale, con procedure e strumenti concordati, di sorveglianza epidemiologica dei mesoteliomi e di ricostruzione delle modalità di esposizione ad amianto, rappresenta uno strumento essenziale per la prevenzione primaria delle patologie amianto-correlate. Eur. J. Oncol., 10 (3), 191-198, 2005

*Parole chiave:* registro mesoteliomi, pleura, peritoneo

pneumology units and chest surgery wards). Occupational history, lifestyle habits and areas of residence for each case are obtained by direct interview using a standard questionnaire, administered by a trained interviewer. The modalities of exposure are then classified by an industrial hygienist who evaluates whether the subject's work, private life or any particular environmental conditions could have involved exposure to asbestos. The data presented refer to a case series from 12 Italian regions in different periods during the years 1993-2001. 4,961 cases of malignant mesothelioma have been collected: pleural mesothelioma affected 93% of cases and the ratio pleural/peritoneal cases is 14.6:1. The percentage of female cases is remarkable: the gender ratio (M/F) is 2.6:1 over the entire case series. There is a wide variety of occupational exposures, in a large range of sectors, including some already known as high risk sectors and others unexpected. The most common occupational exposures occurred in the building and construction industries, metallurgy and steel, shipbuilding, and railway stock. Categories at high risk such as bricklayers, plumbers, carpenters in the building and construction industries, electricians, welders, installers and maintenance workers in the metallurgy and steel industry, and general labourers, tool makers and painters in shipbuilding repair and demolition and railway rolling stock maintenance have been encountered. Although the work of ReNaM currently suffers from many limitations, the research activity which it conducts regarding the epidemiology of the mesothelioma incident cases and the analysis of the modalities of exposure for each case, using national standardized criteria, is a fundamental tool for the primary prevention of asbestos-related diseases. Eur. J. Oncol., 10 (3), 191-198, 2005

*Key words:* mesothelioma registry, pleura, peritoneum

## Introduzione

L'amianto è stato usato in quantità assai rilevanti nei paesi industrializzati. La produzione mondiale cumulativa tra il 1900 ed il 2000 è stata di circa 173 milioni di tonnellate. Nei paesi dell'Europa occidentale, Scandinavia, Nord America ed Australia la produzione e l'uso di amianto si sono sviluppati in maniera crescente negli an-

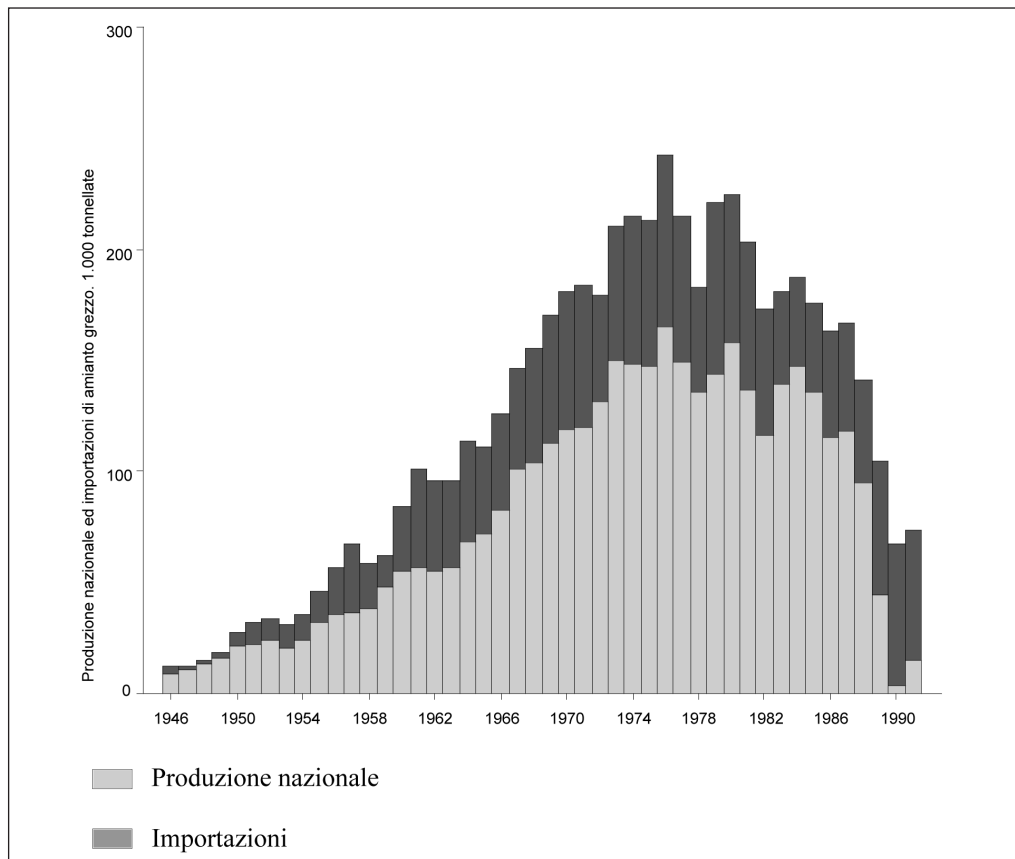
ni '50 e '60 ed hanno raggiunto il culmine negli anni '70. Nell'anno 2000 la produzione complessiva mondiale è stata di circa 2.130.000 tonnellate, ed i maggiori paesi produttori sono stati Russia (700.000 tonnellate), Cina (450.000), Canada (335.000), Kazakistan (180.000), Brasile (170.000) e Zimbabwe (130.000)<sup>1</sup>.

Il mesotelioma maligno è un tumore a prognosi infausta (la sopravvivenza è generalmente inferiore ad un an-

no)<sup>2,3</sup> che insorge generalmente nella pleura (la membrana che riveste il polmone) o nel peritoneo, pur essendo segnalati anche casi di mesotelioma del pericardio e della tunica vaginale del testicolo. L'associazione con una pregressa esposizione ad amianto è molto frequente e la patologia si manifesta generalmente dopo un lungo periodo di latenza (che può superare i 40 anni e non è di regola inferiore ai 15 anni). Non è possibile definire una soglia minima di esposizione a fibre di amianto sotto la quale il rischio di questa malattia sia assente, mentre è documentata la relazione fra intensità di esposizione e rischio che aumenta in ragione più che proporzionale alla durata ed alla intensità dell'esposizione.

Dopo l'Unione Sovietica, l'Italia è stata il secondo paese produttore di amianto in Europa fino alla fine degli anni '80. Dalla fine della seconda guerra mondiale al bando del 1992, l'Italia ha prodotto 3.748.550 tonnellate di amianto grezzo con un picco di circa 160.000 tonnellate annue nel periodo 1976-1979. Le importazioni di amianto in fibra (soprattutto dal Canada, dall'Australia e dal Sud Africa) sono state molto consistenti fino ai primi anni '90 e sono state superiori alla produzione nazionale nel periodo immediatamente precedente al bando (1989-1991) con più di 77.000 tonnellate per anno (fig. 1). Ri-

spetto alla curva dei consumi di amianto degli Stati Uniti, della Gran Bretagna, dei paesi scandinavi e dell'Australia, l'Italia mostra un andamento dei consumi temporalmente posticipato di circa dieci anni. Per l'Italia la situazione è quindi particolarmente preoccupante a causa degli assai elevati consumi di amianto e della inadeguatezza delle misure di protezione nei luoghi di lavoro fino in prossimità del bando del 1992. Sulla base dei dati disponibili e dei consumi di amianto in Italia è possibile identificare le coorti di nascita più a rischio in quelle nate nel periodo 1940-1954<sup>4,5</sup>. L'Italia è uno dei pochi paesi europei (con l'ex Unione Sovietica e la Grecia) produttori di amianto in fibra (estratto in gran parte dalla miniera di Balangero, in provincia di Torino), ma l'attività di estrazione dell'amianto ha interessato un numero relativamente ristretto di addetti. La produzione industriale di manufatti a base di amianto (soprattutto cemento-amianto) e le attività di coibentazione a spruzzo (principalmente nei rotabili ferroviari e nei cantieri navali) sono invece i settori che hanno determinato il numero più elevato di esposti<sup>4</sup>. In questo preoccupante quadro epidemiologico la raccolta sistematica dei casi di mesotelioma e l'analisi delle occasioni di esposizione a polveri di amianto è uno strumento essenziale di prevenzione primaria.



**Fig. 1.** Produzione nazionale ed importazioni di amianto grezzo, in migliaia di tonnellate, in Italia dal 1946 al bando dell'amianto (1992) (istogramma a barre sovrapposte).

Fonti dei dati: Istat e Istituto del Commercio con l'Estero (ICE). Statistiche della produzione e del commercio estero.

La sorveglianza epidemiologica dei mesoteliomi e l'analisi delle esposizioni ad amianto è in corso in molti paesi. In Danimarca, Finlandia, Islanda, Norvegia, Svezia la sorveglianza non deriva dall'attivazione di un registro specializzato, ma si avvale della registrazione dell'incidenza di tutti i tumori a livello di popolazione sull'intero territorio nazionale. Le informazioni sull'incidenza dei mesoteliomi e l'analisi dei rischi per settore economico avviene attraverso procedure di *linkage* fra registri tumori di popolazione, dati censuari ed archivi dei dati professionali. In Gran Bretagna il sistema si basa sui certificati di decesso, nei quali viene richiesto di riferire dell'attività lavorativa prevalente svolta in vita dal soggetto. Analogamente negli Stati Uniti il "Work-related Lung Diseases Program", promosso dalla Division of Respiratory Disease del National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) analizza la diffusione del mesotelioma a partire dai certificati di decesso, mentre in Germania il registro è orientato prevalentemente a definire i criteri per l'indennizzo.

In Francia e Italia (analogamente ad Australia e Nuova Zelanda) la sorveglianza epidemiologica del mesotelioma si basa su una ricerca attiva dei casi attraverso una rete delle strutture sanitarie dove la malattia è diagnosticata e trattata (istituti di anatomia patologica, di chirurgia toracica, reparti di oncologia, ecc.). La storia lavorativa, residenziale ed ambientale, in relazione alla possibile esposizione ad amianto, è affidata a intervistatori addestrati con un questionario adottato a livello nazionale con criteri prestabiliti per la diagnosi di mesotelioma e l'attribuzione delle modalità di esposizione.

In questo contributo sarà descritta l'attività del Registro Nazionale dei Mesoteliomi (ReNaM) italiano e saranno fornite informazioni sull'incidenza e sulle modalità di esposizione ad amianto per i casi di mesotelioma segnalati al Registro.

## Materiali e metodi

In recepimento dell'art. 17 della Direttiva Comunitaria n. 83/477 che prescriveva "per gli Stati Membri l'obbligo di predisporre un Registro dei casi accertati di asbestosi e di mesotelioma", il 15 agosto 1991 è stato emanato in Italia il Decreto Legislativo 277 che all'art. 36 - "Registro tumori" - prevede che "presso l'Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro (ISPESL) è istituito un registro dei casi accertati di asbestosi e di mesotelioma asbesto-correlati".

Il "Regolamento per il modello e le modalità di tenuta del registro" è stato definito dal Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri n. 308 del 10 dicembre 2002,

pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale n. 31 del 7 febbraio 2003.

L'ISPESL ha concordato con le regioni sia l'adozione di standard operativi comuni sia l'istituzione di Centri Operativi Regionali (COR) che, su specifico mandato dei rispettivi Assessorati alla Sanità, hanno compiti di attivazione, controllo, trasmissione e ricezione dei flussi informativi inerenti la sorveglianza epidemiologica dei casi di mesotelioma. Gli obiettivi principali del ReNaM sono la stima dell'incidenza dei casi di mesotelioma maligno in Italia, la raccolta d'informazioni sulla pregressa esposizione ad amianto, l'identificazione di inattese fonti di pregresse esposizioni occupazionali e di contaminazione ambientale con amianto. Attualmente il ReNaM è diffuso su gran parte del territorio nazionale e COR sono stati istituiti in Piemonte, Liguria, Lombardia, Veneto, provincia autonoma di Trento, Friuli-Venezia Giulia, Emilia-Romagna, Toscana, Marche, Umbria, Abruzzo, Campania, Basilicata, Puglia, Calabria e Sicilia (fig. 2).

La rilevazione dei casi di mesotelioma viene effettuata dai COR presso quelle strutture sanitarie, presenti sul territorio di loro competenza, che diagnosticano e trattano casi di mesotelioma (servizi di Anatomia ed Istologia Patologica, reparti di Pneumologia e quelli di Chirurgia Toracica). Controlli di esaustività e completezza della casistica raccolta vengono effettuati con l'utilizzo delle Schede di Dimissione Ospedaliera (SDO) e delle Schede di Morte ISTAT. Protocolli diagnostici di riferimento per la standardizzazione dei criteri di diagnosi di mesotelioma consentono di definire il diverso livello di certezza diagnostica raggiunto.

La rilevazione dell'anamnesi professionale, delle abitudini di vita e della storia residenziale di ciascun caso viene effettuata tramite l'intervista al soggetto (intervista diretta) oppure, verificata la indisponibilità, ad una persona a lui vicina (intervista indiretta) in grado di fornire informazioni sulla storia lavorativa e di vita con un questionario standard per l'uso del quale l'intervistatore è stato addestrato. I COR si avvalgono, per l'acquisizione dei dati relativi alla esposizione professionale e residenziale dei casi identificati, della collaborazione dei Dipartimenti di Prevenzione delle Aziende Sanitarie (AASSLL). La classificazione della probabilità di esposizione ad amianto viene effettuata in ogni COR sulla base dell'attività lavorativa, della storia personale di vita del soggetto e di eventuali condizioni ambientali. La classificazione dell'esposizione viene effettuata secondo un sistema di codifica concordato. Per l'identificazione, nonché per la raccolta e la definizione delle storie di esposizione dei casi accertati, le procedure seguite sono definite dalle Linee Guida nazionali recentemente aggiornate<sup>6</sup>.



**Fig. 2.** Distribuzione territoriale dei Centri Operativi Regionali (COR) del Registro Nazionale dei Mesoteliomi (ReNaM)

## Risultati

Attualmente negli archivi del ReNaM sono presenti informazioni su 4.961 casi di mesotelioma pervenuti da dodici registri regionali: Piemonte, Liguria, Lombardia, Veneto, Friuli-Venezia Giulia, Emilia-Romagna, Toscana, Marche, Campania, Puglia, Basilicata e Sicilia (Tabella 1).

Il 93% dei casi è a localizzazione pleurica ed il rapporto fra mesotelioma pleurici e peritoneali è 14,6:1. Sono stati identificati anche 11 casi di mesotelioma del pericardio e 13 della tunica vaginale del testicolo. Il rapporto fra casi di sesso maschile e femminile è di 2,6:1.

I dati relativi al periodo 1993-1996 sono stati pubblicati nel I rapporto ReNaM<sup>7</sup> mentre le stime di incidenza e sopravvivenza dei casi di mesotelioma del Registro Nazionale sono state pubblicate con riferimento all'anno 1997<sup>3, 8, 9</sup> e sono in corso di elaborazione i dati del quadriennio 1998-2001. Per i 429 casi di mesotelioma incidenti nelle regioni del Piemonte, Liguria, Emilia-Romagna, Toscana e Puglia nel 1997, il tasso standardizzato di incidenza è pari a 2,21 per 100.000 residenti (3,24 negli uomini e 1,22 nelle donne) per tutte le sedi e 2,03 per i

**Tabella 1** - Casi di mesotelioma segnalati al Registro Nazionale (ReNaM) per regione e periodo di incidenza

Regione	Periodo di incidenza	Numero di casi
Piemonte	1993-2001	1181
Liguria <sup>a</sup>	1994-2001	885
Lombardia	2000-2001	457
Veneto	1993-2001	587
Friuli-Venezia Giulia	1995-1999	98
Emilia-Romagna <sup>b</sup>	1993-2001	591
Toscana	1993-2001	430
Marche	1996-2001	141
Campania	2000-2001	12
Puglia	1993-2001	280
Basilicata	2000-2001	15
Sicilia	1998-2001	284
<b>Totale<sup>c</sup></b>		<b>4.961</b>

<sup>a</sup> Per il COR della Liguria la rilevazione parte nel 1994 per il solo comune di Genova, per il 1995 riguarda la provincia di Genova ed è estesa all'intera regione Liguria dal 1996. Per il periodo 1994-1996 la Liguria ha rilevato i soli casi di mesotelioma della pleura.

<sup>b</sup> I dati del COR dell'Emilia-Romagna per il periodo 1993-1995 si riferiscono quasi esclusivamente alla provincia di Reggio Emilia, mentre dal 1996 l'incidenza è da ritenersi completa e riferita all'intera Regione.

<sup>c</sup> Negli archivi ReNaM sono inoltre presenti 21 casi incidenti nella provincia di Sassari nel periodo 2000-2003.

mesoteliomi della pleura (3,00 nei maschi e 1,07 nelle donne).

La mediana di sopravvivenza per i casi di mesotelioma della pleura risulta pari a 275 giorni e la quota di sopravvissuti ad uno e tre anni dalla diagnosi di mesotelioma pleurico è pari al 35,3% e 7,1% rispettivamente. Risultano avere influenza sulla prognosi l'età e il tipo istologico, nel senso che ad età avanzata e tipo istologico fibroso sono associate sopravvivenze significativamente più brevi.

Sono disponibili informazioni sulle modalità di esposizione ad amianto per 3.453 casi (Tabella 2). Il 67,4% degli ammalati è stato esposto ad amianto per motivi lavorativi, ma non irrilevante è anche il ruolo delle esposizioni ambientali (4%). I settori di attività economica maggiormente rilevanti come fonti di esposizione ad amianto sono l'edilizia e le costruzioni, la cantieristica navale, il settore delle ferrovie e l'industria metallurgica e siderurgica. L'analisi dettagliata delle occasioni di esposizione (lavorative ed extralavorative) è attualmente in corso e sarà resa disponibile nel II Rapporto ReNaM, la cui pubblicazione è prevista per la fine del corrente anno. I diversi registri regionali hanno sviluppato approfondimenti sui rischi lavorativi nelle loro realtà territoriali<sup>10-17</sup>.

La ricostruzione della storia di esposizione e la definizione globale di ogni caso avviene mediamente dopo circa 2 anni dalla identificazione. Il quadro complessivo del-

**Tabella 2** - Modalità di esposizione ad amianto per i casi attualmente registrati negli archivi del Registro Nazionale dei Mesoteliomi (ReNaM)<sup>a</sup>

Modalità di esposizione ad amianto	Numero di casi	% rispetto ai casi con esposizione definita
Esposizione professionale certa	1.479	41,2
Esposizione professionale probabile	477	13,3
Esposizione professionale possibile	372	10,4
Esposizione familiare	153	4,3
Esposizione ambientale	149	4,1
Esposizione extraprofessionale	50	1,4
Esposizione improbabile	219	6,1
Esposizione ignota	554	15,4
Totale casi per i quali è stata definita l'esposizione	3.453	
Esposizione in corso di definizione	1.367	-
Esposizione non classificata	141	3,9
Totale	4.961	

<sup>a</sup> Per il sistema di definizione e codifica delle esposizioni si veda Nesti *et al*<sup>6</sup>.

le esposizioni professionali che hanno prodotto casi di mesotelioma risulta altamente differenziato e comprende numerosi settori produttivi. In molti casi si tratta di esposizioni non solo collegate all'uso di amianto come materia prima, ma alla presenza del materiale nei cicli produttivi o negli ambienti di lavoro. Insieme ai settori di attività tipicamente propri della lavorazione dell'amianto, quali la produzione di manufatti in cemento-amianto, emergono i settori nei quali si è verificato uso di amianto per l'isolamento termico e la protezione dal fuoco, come la cantieristica navale e la produzione e manutenzione di rotabili ferroviari. Tuttavia, è importante osservare che un rilevante gettito di casi si associa invece ad altri settori di produzione, caratterizzabili come "utilizzatori a valle", nel senso che non impiegavano l'amianto direttamente, ma piuttosto manufatti in amianto, talora nemmeno come materia prima, ma come materiale ausiliario: l'edilizia, la metallurgia e siderurgia, la raffinazione del petrolio, le vetrerie, il tessile. L'edilizia è un settore in cui è nota la concreta esistenza di un rischio così come la rilevanza degli isolamenti termici e della protezione dal fuoco in settori come la metallurgia, la siderurgia, la produzione del vetro, la raffinazione del petrolio (e in generale l'industria chimica), anche se le modalità di esposizione professionale che emergono dalle storie lavorative dei casi non sempre sono costituite dalla manipolazione diretta (ad esempio lavori di coibentazione, decoibentazione, manutenzione) di materiali contenenti amianto. Una chiara indicazione di quanto possano essere state importanti, in

certe circostanze, modalità di esposizione passiva ed indiretta emerge dai casi esposti durante il servizio prestato in Marina Militare. La distribuzione dei casi di mesotelioma per settore di attività economica delle esposizioni professionali dei casi presenta alcune peculiarità, conseguenti alla differenziazione territoriale delle attività produttive. Nel determinare queste differenze sono importanti i settori che hanno avuto sia un elevato numero di addetti, sia una specifica concentrazione locale; si tratta in particolare della cantieristica navale e della produzione del cemento-amianto. Questa osservazione è coerente con quanto evidenziato fin dalle prime esperienze italiane di analisi geografica della mortalità per tumore maligno della pleura, che mostravano spiccate differenze di mortalità tra province, con i massimi livelli in quelle che erano state sede di importanti porti e cantieri navali o di importanti realtà produttive del cemento-amianto<sup>18</sup>.

## Conclusioni

L'importanza di una attività coordinata ed uniforme sul territorio nazionale di ricerca attiva dei casi di mesotelioma e di ricostruzione delle modalità di esposizione ad amianto è di particolare rilievo per la identificazione di fonti di contaminazione tuttora misconosciute ed inattese, per disporre di un patrimonio informativo prezioso in termini di rischio sul territorio, per la identificazione e stima dei lavoratori esposti nel passato e per avviare programmi di risanamento e bonifica sul territorio. Disporre di una banca dati epidemiologica di proporzioni rilevanti e distribuita su gran parte del territorio nazionale consente di condurre analisi di approfondimento su specifiche situazioni di rischio con buona rappresentatività.

I risultati dell'attività condotta fino ad oggi mostrano come siano possibili ancora oggi numerose occasioni di esposizione, a causa della presenza dell'amianto negli ambienti di lavoro e di vita, e che le attività di risanamento ambientale non siano ancora complete. Il quadro epidemiologico conoscitivo del rischio amianto in Italia non può inoltre prescindere dall'emanazione dei decreti attuativi per la registrazione degli esposti e dall'impegno di tutte le regioni nella redazione dei piani di bonifica e di risanamento.

## Bibliografia

1. Tossavainen A. National mesothelioma incidence and past use of asbestos. *Monaldi Arch Chest Dis* 2003; 59 (2): 146-9.
2. Magnani C, Viscomi S, Dalmaso P, *et al.* Survival after pleural malignant mesothelioma: a population-based study in Italy. *Tumori* 2002; 88: 266-9.

3. Marinaccio A, Nesti M, and Regional Operational Centres. Survival analysis for mesothelioma cases in the Italian Register (ReNaM). *Eur J Cancer* 2003; 39 (9): 1290-5.
4. Merler E, Lagazio C, Biggeri A. Andamento temporale della mortalità per tumore primitivo pleurico e incidenza del mesotelioma pleurico in Italia: una situazione particolarmente grave. *Epidemiol Prev* 1999; 23 (4): 316-26.
5. Marinaccio A, Montanaro F, Mastrantonio M, *et al.* Predictions of mortality from pleural mesothelioma in Italy: a model based on asbestos consumption figures supports results from age-period-cohort models. *Inter J Cancer* 2005; 115 (1): 142-7.
6. Nesti M, Adamoli S, Ammirabile F, *et al.* Linee Guida per la rilevazione e la definizione dei casi di mesotelioma maligno e la trasmissione delle informazioni all'ISPEL da parte dei centri operativi regionali. Roma: ISPEL, 2003. Disponibile su <http://www.ispesl.it/ispesl/sitorenam/index.asp>
7. Nesti M, Marinaccio A, Silvestri S. Il Registro Nazionale dei Mesoteliomi: I Rapporto. Roma: ISPEL, 2001. Disponibile su <http://www.ispesl.it/ispesl/sitorenam/index.asp>
8. Nesti M, Marinaccio A, Chellini E, and Regional Operational Centers. Malignant mesothelioma in Italy, 1997. *Am J Ind Med* 2004; 45 (1): 55-62.
9. Nesti M, Marinaccio A, Chellini E, e Centri Operativi Regionali. La sorveglianza epidemiologia del mesotelioma maligno in Italia. I dati del Registro Nazionale (ReNaM), 1997. *Epidemiol Prev* 2003; 27 (3): 147-53.
10. Chiappino G, Mensi C, Riboldi L, *et al.* Il rischio amianto nel settore tessile: indicazioni dal Registro Mesoteliomi Lombardia e definitiva conferma. *Med Lav* 2003; 94 (6): 521-30.
11. Gennaro V, Montanaro F, Lazzarotto A, *et al.* Registro Mesoteliomi della Liguria. Incidenza ed eziologia professionale in un'area ad alto rischio. *Epidemiol Prev* 2000; 24: 213-8.
12. Gorini G, Chellini E, Merler E, *et al.* Mortalità ed incidenza per mesotelioma maligno in Toscana nel periodo 1988-1999. *Epidemiol Prev* 2003; 27 (1): 13-7.
13. Ivaldi C, Dal Masso P, Nesti M, *et al.* Registro dei Mesoteliomi maligni del Piemonte. Incidenza nel periodo 1990-1995. *Epidemiol Prev* 1999; 23: 308-15.
14. Mangone L, Romanelli A, Campari C, *et al.* Il mesotelioma maligno in Emilia-Romagna. Incidenza ed esposizione ad amianto. *Epidemiol Prev* 2002; 26: 124-9.
15. Merler E, Gioffrè F, Sarto F, *et al.* Il ruolo dell'esposizione lavorativa ed ambientale ad amianto nella genesi dei casi di mesotelioma insorti in residenti del Veneto. Primo report. Regione Veneto, Padova, 2001.
16. Musti M, Palamà L, Cavone D, *et al.* Il Centro Operativo Pugliese del Registro Nazionale Mesoteliomi. *Eur J Oncol* 1999; 4: 387-90.
17. Seniori Costantini A, Chellini E. L'esperienza del Registro dei Mesoteliomi in Toscana nella valutazione del rischio per la salute associato all'esposizione ad amianto. *Med Lav* 1997; 88: 310-5.
18. Di Paola M, Mastrantonio M, Carboni M, *et al.* Esposizione ad amianto e mortalità per tumore maligno della pleura in Italia (1988-1994). *Rapporti Istisan* 00/9.

#### \* Gruppo di Lavoro del Registro Nazionale dei Mesoteliomi

C. Magnani, A. Stura, B. Terracini (COR Piemonte), A. Lazzarotto, P. Viarengo (COR Liguria), G. Chiappino, A.C. Pesatori (COR Lombardia), G. Schallenberg (COR P.A. Trento), F. Gioffrè, N. Ballarin, S. Roberti (COR Veneto), S. Candela, L. Mangone, A.M. Pezzarossi, C. Storch (COR Emilia-Romagna), A. Seniori-Costantini, A.M. Badiali, V. Cacciarini, E. Chellini, S. Silvestri (COR Toscana), P. Mosciatti, C. Pascucci (COR Marche), F. La Rosa, F. Stracci, E. Falsetti (COR Umbria), L. Traficante, S. Gatta (COR Abruzzo), S. Menegozzo, F. Izzo (COR Campania), D. Cavone (COR Puglia), L. Convertini (COR Basilicata), S. Scondotto, G. Cianciolo, C. Nicita, G. Dardanoni, M. Di Giorgio, A. Mira (COR Sicilia), P. Crosignani (Istituto per la Cura dei Tumori di Milano), P.G. Barbieri (Registro Mesoteliomi della provincia di Brescia), T. Marras (Asl Sassari), S. Tosi, C. Branchi, S. Massari, S. Iavicoli, A. Scarselli (Dipartimento di Medicina del Lavoro dell'ISPEL).

#### \*\* Elenco completo dei COR

##### COR Piemonte

Registro dei Mesoteliomi Maligni del Piemonte c/o Centro di Prevenzione Oncologica (CPO) del Piemonte, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista, Via Santena 7, 10126 Torino

##### COR Liguria

Registro Mesoteliomi della Liguria

c/o SSD Epidemiologia descrittiva e Registro Tumori, Dipartimento Epidemiologia e Prevenzione, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (IST), Largo R. Benzi 10, 16132 Genova

##### COR Lombardia

Registro Mesoteliomi Lombardia c/o Dipartimento di Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Milano, Via San Barnaba, 8, 20122 Milano



**COR Provincia Autonoma di Trento**

Registro Provinciale dei Mesoteliomi (ReProM) c/o Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari, Igiene e Medicina del Lavoro, Piazza A. Leoni 11, 38068 Rovereto (TN)

**COR Veneto**

Registro Regionale Veneto dei Casi di Mesotelioma c/o SPISAL, AUSL 16, Padova, Via dell'Ospedale 22. 35128 Padova

**COR Friuli-Venezia Giulia**

Centro Operativo Regionale del Friuli-Venezia Giulia c/o Università degli Studi di Trieste, Unità Clinico-Operativa della Medicina del Lavoro, Via Pietà 13, 34142 Trieste

**COR Emilia-Romagna**

Registro Mesoteliomi dell'Emilia Romagna c/o Dipartimento di Sanità Pubblica - AUSL Reggio Emilia, Via Amendola 2, 41100 Reggio Emilia

**COR Toscana**

Archivio Regionale Toscano dei Mesoteliomi Maligni c/o Centro per lo Studio e la Prevenzione Oncologica (CSPO), Unità di Epidemiologia ambientale ed occupazionale, Via di S. Salvi 12, 50135 Firenze

**COR Marche**

Registro dei Mesoteliomi delle Marche c/o Università di Camerino, Dipartimento di Scienze Igienistiche e Sanitarie Ambientali, Via E. Betti 3, 62032 Camerino (MC)

**COR Umbria**

Registro Mesoteliomi dell'Umbria c/o Università di Perugia, Dipartimento Igiene e Sanità Pubblica, Via del Giochetto, 06100 Perugia

**COR Abruzzo**

Registro Mesoteliomi dell'Abruzzo c/o AUSL Pescara, Unità Operativa di Medicina del Lavoro, Polo sanitario di Tocco da Casauria. Via XX Settembre, 65028 Tocco da Casauria (PE)

**COR Campania**

Centro Operativo Regionale della Campania c/o Sezione di Medicina Sperimentale, Piazza Miraglia 2, 80138 Napoli

**COR Puglia**

Centro Operativo Regionale Pugliese del Registro Nazionale Mesoteliomi c/o DIMI Università degli Studi di Bari, Policlinico, Sezione di Medicina del Lavoro, Piazza Giulio Cesare, 70124 Bari

**COR Basilicata**

Centro Operativo Regionale della Basilicata, Servizio Osservatorio Epidemiologico Regionale, Dipartimento Sicurezza e Solidarietà Sociale, Regione Basilicata, Via Anzio, 85100 Potenza

**COR Sicilia**

Centro Operativo Regionale della Sicilia c/o Registro Tumori Ragusa, Via Dante 109, 97100 Ragusa

## Ectopic expression of p210 bcr-abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukaemia downregulates DR4 receptor expression

### *L'espressione ectopica della tirosin-chinasi p210 bcr-abl nella leucemia mieloide cronica down-regola l'espressione del recettore DR4*

Gianluca Brusa\*, Manuela Mancini\*, Elisa Zuffa\*\*, Valeria Ghetti\*, Elisa Benedettini\*\*\*, Enza Barbieri\*\*, Maria Alessandra Santucci\*

\* Institute of Haematology and Medical Oncology "Lorenzo e Ariosto Seràgnoli", University of Bologna, Bologna, Italy

\*\* Institute of Radiotherapy "Luigi Galvani", University of Bologna, Bologna, Italy

\*\*\* Institute of Oncology "F. Addarii", University of Bologna, Bologna, Italy

#### Summary

**Aim.** The constitutive tyrosine kinase (TK) activity of p210, the fusion protein of the bcr-abl rearranged gene, has a key rôle in the survival advantage of clonal haematopoietic progenitors of Chronic Myeloid Leukaemia (CML) upon their normal counterpart. In the study herein presented we discuss the effects of bcr-abl on pathways controlling extrinsic apoptosis. We demonstrated that the function of DR4, a member of the tumour necrosis factor (TNF) receptor superfamily involved in cell death in response to external signals, is inhibited by p210 TK. **Materials and methods.** We performed experiments in 32D murine myeloid progenitor cell clones transducing a temperature-sensitive (ts) bcr-abl construct whose protein shows constitutive TK activity at the permissive temperature of 33°C, but lacks it at the non-permissive temperature of 39°C. **Results.** The inhibition of p210 TK activity induced by exposure to the TK inhibitor imatinib mesylate (IM) was associated with an early and significant upmodulation of DR4 expression, arising, at least in part, from transcriptional mechanisms. **Conclusions.** The combined suppression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), Apo2L, through the inhibition of the forkhead FoxO3a transcription factor, and TRAIL receptors represents a

#### Riassunto

**Finalità.** La costitutiva attività tirosin-chinasica di p210, la proteina chimerica trascritta dal gene riarrangiato bcr-abl, svolge un ruolo chiave nel conferire un vantaggio proliferativo ai progenitori ematopoietici clonali sulla controparte normale nella Leucemia Mieloide Cronica (LMC). Lo studio qui presentato propone l'analisi degli effetti di bcr-abl sui circuiti di controllo dell'apoptosi estrinseca. Abbiamo verificato che l'induzione di DR4, un membro della superfamiglia dei recettori del fattore di necrosi tumorale (tumour necrosis factor = TNF), coinvolto nella morte cellulare in risposta a segnali esterni, è inibita dalla tirosin-chinasi p210. **Materiali e metodi.** Abbiamo svolto gli esperimenti in cloni cellulari murini derivanti dalla linea cellulare di progenitori mieloidi 32D che esprimono un costrutto temperatura-sensibile (ts) di bcr-abl, la cui proteina presenta attività tirosin-chinasica alla temperatura permissiva di 33°C, ma manca di attività tirosin-chinasica alla temperatura non permissiva di 39°C. **Risultati.** L'inibizione dell'attività tirosin-chinasica di p210 indotta dall'esposizione all'inibitore della tirosin-chinasi imatinib mesylate (IM) è stata associata ad una precoce e significativa up-modulazione dell'espressione di DR4 che deriva, almeno in parte, da meccanismi trascrizionali. **Conclusioni.** L'inibizio-

Received/Pervenuto 1.6.2005 - Accepted/Accettato 5.7.2005

Address/Indirizzo: Dr. Gianluca Brusa, Istituto di Ematologia e Oncologia Medica "L.A. Seragnoli", Università di Bologna-Policlinico S. Orsola, Via Massarenti 9, 40138 Bologna, Italia - Tel. 0039/051/6364036 - Fax 0039/051/398973 - E-mail: gbrusa@alma.unibo.it

crucial mechanism that enables bcr-abl-expressing cells to escape the effects of external inhibitory signals. The pharmacological targeting of death receptor-mediated pathways, leading to the induction of TRAIL ligands and receptors, may be seen to ameliorate the clinical outcomes of IM therapy and prevent the emergence of drug resistance in CML patients. *Eur. J. Oncol.*, 10 (3), 199-206, 2005

**Key words:** DR4, chronic myeloid leukaemia, p210<sup>bcr-abl</sup>, imatinib, apoptosis

## Introduction

Apoptosis is a cell suicide mechanism which plays a central rôle in tissue development and homeostasis. It may either proceed from intrinsic signals, activated in response to stress conditions (DNA damage or growth factor withdrawal) or from external stimuli<sup>1,2</sup>. Death ligands (tumour necrosis factor [TNF]-alpha, lymphotoxin-alpha, Fas ligand [Apo-1L] and TNF-related apoptosis-inducing ligand [TRAIL or Apo-2L]) are, with the only exception of lymphotoxin-alpha, type II transmembrane proteins also existing as soluble molecules, resulting from cleavage by metalloproteases present in the microenvironment. They exert their functions by forming homotrimers which cross-link with specific receptors on the surface of target cells<sup>3</sup>. Death receptors belong to the TNF/nerve growth factor receptor superfamily and comprise more than 20 proteins with a broad range of biological functions including differentiation and immune response in addition to the regulation of cell death and survival. They share similar cysteine-rich repeats within their extracellular domain and are defined by a cytoplasmic domain of about 80 aminoacids called "death domain" (DD), of critical importance in transmitting death signals from the cell surface to intracellular signalling pathways. The best characterized death receptors comprise the CD95 (Apo-1/Fas), TNF receptor 1 (TNFR1) and TRAIL receptors. Upon ligand binding, death receptor clustered DDs orchestrate the assembly of adaptor proteins such as the Fas-associated death domain (FADD/Mort1) that, through its N-terminal death effector domain (DED), recruits the most apical initiator procaspases-8 and -10. The complex of interacting proteins, referred to as the death-inducing signalling complex (DISC), is necessary for transcatalsis to generate active caspases 8 and 10 that initiate apoptosis

ne combinata del *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), Apo2L, mediante inibizione del fattore di trascrizione FoxO3a, e dei recettori di TRAIL rappresenta un meccanismo cruciale che consente alle cellule che esprimono bcr-abl di sfuggire agli effetti di segnali inibitori esterni. I circuiti indotti dai ligandi di morte che mediano l'attivazione dei rispettivi recettori potrebbero quindi essere presi in considerazione come bersaglio farmacologico per implementare gli esiti clinici della terapia con IM e per prevenire l'insorgenza di resistenza farmacologica in pazienti con LMC. *Eur. J. Oncol.*, 10 (3), 199-206, 2005

**Parole chiave:** DR4, leucemia mieloide cronica, p210<sup>bcr-abl</sup>, imatinib, apoptosi

by direct cleavage and activation of downstream effector caspases, as well as of other substrates conveying extrinsic death signals to mitochondria<sup>4,6</sup>.

The TRAIL receptor family consists of at least five membrane-bound members: TRAIL-R1 (DR4) and -R2 (DR5, Killer and TRICK2) are agonistic receptors containing a DD motif within their intracellular domain, while TRAIL-R3 and -R4, due to absent or incomplete DDs, function as antagonistic receptors incapable of transmitting the apoptotic signal. Although their functions have not been completely understood, they seemingly act as "decoy" receptors eventually competing with signalling death receptors for TRAIL/Apo2 ligand<sup>7</sup>. A fifth TRAIL receptor, osteoprotegerin (OPG) exists in a dimeric, soluble form, acting as a decoy receptor in osteoclastogenesis<sup>8</sup>. Death ligand-induced caspase activation at the DISC is further controlled by the cellular FLICE inhibitory protein c-FLIP (also known as I-FLICE, FLAME, CASPER or CASH) acting, at least in its long splice isoform (c-FLIP<sub>L</sub>), as a dominant-negative inhibitor by binding FADD and/or caspase 8<sup>9</sup>.

Resistance to apoptosis resulting from the unbalance of pro- to anti-apoptotic signals is a hallmark of cancer. It allows the illegitimate expansion of transformed cells, therefore contributing to cancer pathogenesis, and promotes the genetic instability that favours disease progression towards a more aggressive, drug-resistant phenotype. Indeed, cell response to antineoplastic drugs is conditional upon critical levels of death receptors and down-regulation of death receptor expression, as well as over-expression of inhibitory proteins in some instances, and has been correlated with drug insensitivity of transformed cells<sup>10,11</sup>. Accordingly, death ligand and death receptor targeting is now regarded as a promising strategy to complement and enhance the efficacy of conventional

chemotherapy and radiotherapy<sup>12</sup>. However, a better knowledge of the biomolecular mechanisms underlying apoptosis defects in different tumour cell types is required, to provide new options for pathway-based rational therapies.

Chronic myeloid leukaemia (CML) is a clonal myeloproliferative expansion characterized by a marker chromosome, the Philadelphia (Ph<sup>1</sup>) chromosome, arising from t(9:22) (q34, q11) balanced translocation. The Ph<sup>1</sup> results in the juxtaposition of bcr and abl genes whose 210 kDa chimeric protein, termed p210, shows constitutive tyrosine kinase (TK) activity<sup>13</sup>. The p210 TK provides CML haematopoietic progenitors with a survival advantage over their normal counterpart by preventing multiple pro-apoptotic pathways (TRAIL, Bad, Bax and Bim induction, cytochrome-*c* release and caspase 3 and 9 activation) and by enhancing pro-survival signals (Bcl2, BclxL, Bfl-1/AP1, Mcl-1 and survivin)<sup>14, 15</sup>. Interferon (IFN)-alpha was the first-line therapy for CML patients from the early 1980s up to the late 1990s, when the TK inhibitor imatinib mesylate (IM) was approved for clinical use<sup>16, 17</sup>. Its selective effects on CML haematopoiesis are mediated by Fas/Apo1 and TRAIL/Apo2 ligands, whose induction addresses leukaemic progenitors towards apoptotic death and elicits their immuno-mediated control by cytotoxic T lymphocytes. Interestingly, the sensitivity of Ph<sup>1</sup>-positive leukaemia cells to TRAIL is mostly correlated with the cell-surface expression of both DR4 and DR5 receptors, suggesting that apoptosis resistance may proceed from death receptor impaired expression and/or induction<sup>18, 19</sup>.

The aim of our study was to ascertain the rôle of p210 TK activity on DR4 expression. To this purpose we used 32D murine myeloid progenitor cell clones transducing a temperature-sensitive (ts) bcr-abl construct whose protein shows constitutive TK activity at the permissive temperature of 33°C, but lacks it at the non-permissive temperature of 39°C. Our results confirm the ability of p210 TK to downmodulate DR4 transcription through mechanisms probably involving p53 loss of function.

## Materials and methods

### *Cell lines and treatments*

Construction of the bcr-abl construct was based on known ts mutants of v-src and v-abl tyrosine kinases<sup>20</sup>. Briefly, His replacement at Arg<sup>457</sup> and Tyr<sup>469</sup> (corresponding to aminoacids 480 and 492 of v-src and to aminoacids 578 and 590 of v-abl) led to the loss of p210 TK activity at the non-permissive temperature of 39°C, but not at the

permissive temperature of 33°C. Accordingly, IL-3 became dispensable for cell growth only at 33°C. The mutated bcr-abl fragment, subcloned into a full length bcr-abl and placed into a recombinant pGD retrovirus vector containing the neomycin phosphotransferase gene (allowing selection in G418-added culture medium) was expressed in murine myeloid progenitor cell line 32D by electroporation at 0.25V/960mF (Equibrio Easyjet, Optima). As expected, p210 enzymatic activity and autophosphorylation at 39°C were remarkably reduced in 32D cell clones isolated from single colonies grown in methylcellulose at 33°C in the absence of IL-3 and in the presence of 500 µg/ml G418 (Sigma-Aldrich) and exhibiting similar bcr-abl expression levels<sup>21</sup>. Parental 32D cell line and ts bcr-abl-transduced cell clones were maintained at the proper temperatures in RPMI (Gibco) additioned with 10% FCS (Gibco), antibiotics and 10% WEHI-3 conditioned medium as source of IL-3 when required. One µM IM, kindly provided by E. Buchdunger (Novartis Pharmaceutical Inc.), was used to inhibit p210 TK under permissive culture conditions.

### *Detection of DR4 by flow cytometry*

Cytofluorimetric analysis of DR4 expression on the cell surface was performed on 1x10<sup>6</sup> cells labelled with anti-DR4 antibody (Upstate Biotechnology). The cells were washed twice with PBS and suspended in 0.1 ml PBS, then incubated with anti-DR4 antibody at 2 µl on ice for one hour. Then the samples were washed twice and cells were resuspended in 0.1 ml PBS and incubated with 1 µl of anti-rabbit IgG FITC for 30 minutes on ice. PBS (400 µl) was added and analysis was performed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).

### *RNA analysis*

Total RNA extraction was performed using a commercial kit (RNeasy from Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription (RT) was performed on 2 µg of total RNA in 50 µl of reaction mixture containing 1xRT buffer (50 nM Tris HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>), 4 µM DDT, 0.8 nM dNTPs, 200 U M-MLV reverse transcriptase, 40 U RNase inhibitor and 1.5 µM random hexamers. The RT reaction was carried out at 37°C for 1 hour, followed by 5 minutes at 95°C to inactivate the enzyme. PCR reactions were carried out on 2 µl of RT products in 30 µl of PCR reaction mixture (50 nM Tris pH 8.4, 250 µg/ml BSA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTPs, 4U Taq polymerase and 0.5 µM specific primers (see below). DR4 expression was assayed by means of a semiquantitative technique exploiting the ratios between

the coamplification signals of DR4 and the G3PDH housekeeping gene, quantified by densitometric analysis. DR4 primer sequences are:

5'AACTGCACTGACGGGGAAGA (upper) and  
3'TTTCTGAGTCTTGCCAGGTT (lower).

Beta-actin primers are:

5'CATGTGCAAGGCCGCTTC (upper) and  
3'GAAGGTGTGGTGCCAGATTT (lower).

Thirty-nine cycles (denaturation at 98°C for 5 seconds, annealing for 1 minute at 60°C, elongation at 72°C for 1 minute) were carried for DR4 and beta-actin coamplification. Amplification products were then resolved in 2% agar and signal intensities measured by densitometric analysis.

### Protein analysis

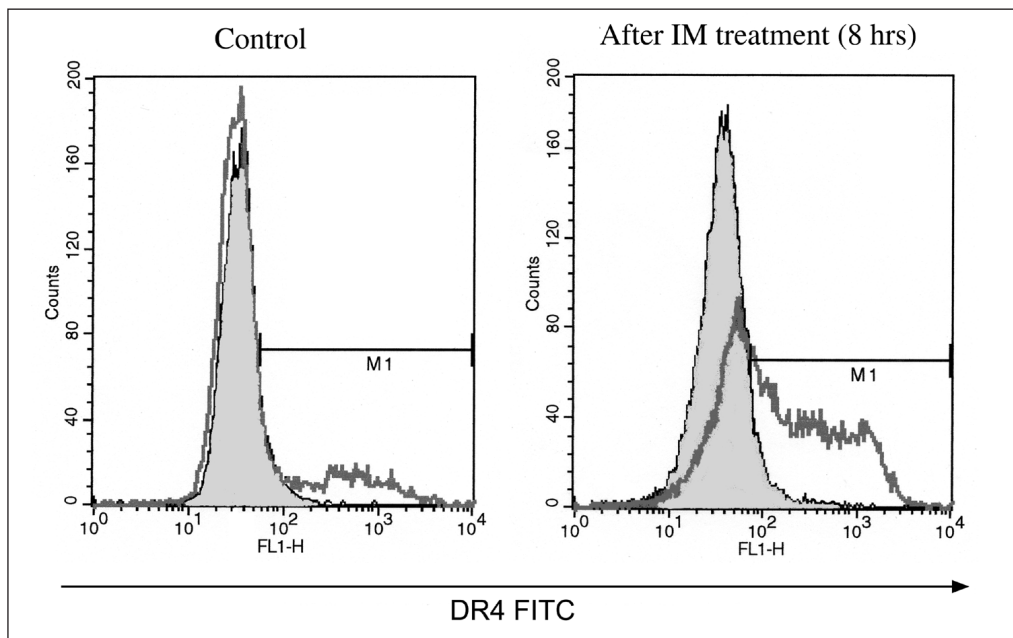
Whole-cell lysates were obtained from  $1-2 \times 10^7$  cells in 10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 nM iodacetamide, 1% Chaps, 0.02% sodium azide added with protease inhibitors. Immunoprecipitation (IP)/immunoblotting analyses were performed according to standard techniques. Briefly, 500  $\mu$ g proteins from whole cell lysate membranes were incubated overnight in IP buffer (250 mM NaCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM Hepes, 60 mM glycerophosphate added with protease inhibitors) with primary antibodies (anti-abl -SH2 and anti-phosphorylated at Tyr<sup>245</sup> from Cell Signaling, anti-DR4 from Upstate Biotechnology, anti-caspase 10, -8 and -7 from Cell Signaling and anti-FADD phosphorylated at Ser<sup>191</sup> from Upstate Biotechnology) in presence of CNRr-activated sepharose 4B (Pharmacia), resolved by SDS-PAGE, transferred into nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell) and labelled with the

same primary antibodies. Anti-beta actin antibody (Santa Cruz) was used as internal control for levels of cytoplasmic protein resolved in SDS-PAGE.

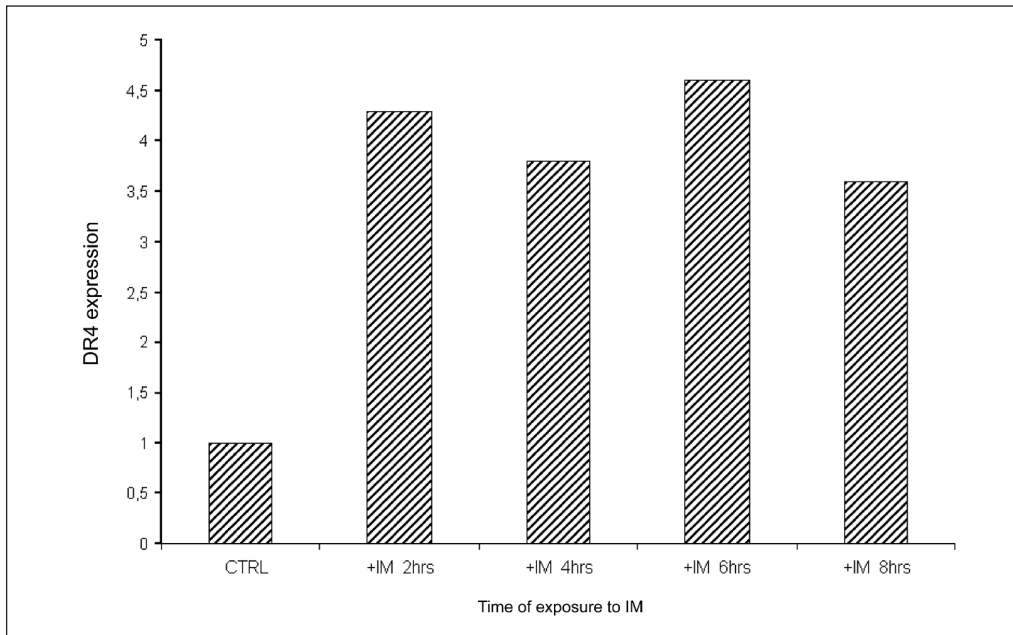
### Results

In preliminary experiments not reported in this paper we confirmed that the resistance to apoptotic death associated with bcr-abl expression is conditional upon p210 TK activity. Accordingly, ts bcr-abl-transduced cell clone 8B (representative of several other clones simultaneously assayed) kept at 33°C underwent apoptotic death by IM-induced abrogation of p210 bcr-abl phosphorylation at Tyr<sup>245</sup> of abl SH2-linker domain, proceeding from the constitutive phosphorylation of abl protein Tyr<sup>412</sup> in the activation loop and preventing the SH3 autoinhibitory function<sup>22</sup>. The loss of p210 TK enzymatic activity resulted in the induction of pro-apoptotic signals, followed by their aggregation at the mitochondrial and endoplasmic reticulum membranes and in the concomitant reduction of anti-apoptotic proteins in the cytoplasm<sup>23, 24</sup>.

DR4 expression on plasmatic membranes relative to p210 TK activity was first assayed by cytofluorimetric analysis. In fig. 1, the curve enclosing the grey-shaded area indicates rabbit IgG as control, while the curve enclosing the unshaded area indicates DR4 expression on plasmatic membrane. The panels show data on control cells and cells incubated with IM (fig. 1). The death receptor induction in response to apoptogenic stimuli is assumed to be an early event. Accordingly, the percentage of DR4 positive cells increased from 2<sup>nd</sup> to 8<sup>th</sup> hour of IM exposure. As shown in fig. 2, DR4 expression in clone 8B

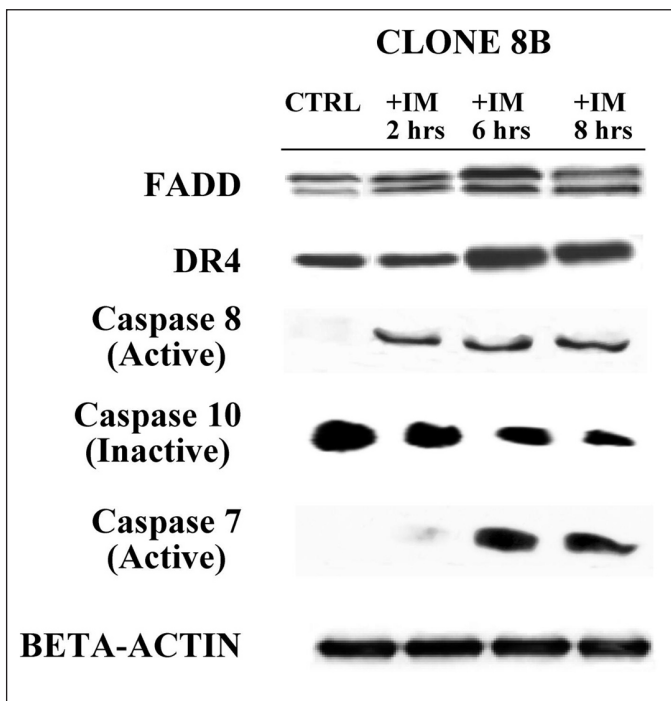


**Fig. 1.** Effect of IM on expression of DR4: data show the typical result of one experiment. The curve enclosing the grey-shaded area indicates rabbit IgG as control, the curve enclosing the unshaded area shows the baseline expression of DR4 in a BCR-ABL-transducing clone



**Fig. 2.** Effect of IM on 8B cell clones: time-dependent effects of Imatinib on DR4 expression. Cells were incubated for 2, 4, 6 and 8 hours with Imatinib 1  $\mu$ M. Each point shows the mean  $\pm$  SD of triplicates. DR4 expression was evaluated by flow cytometry

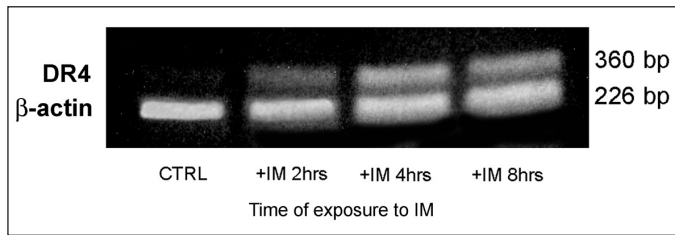
kept at 33°C, underwent a 4.3-fold increase at the 2<sup>nd</sup> hour of IM treatment, remained steady up to the 6<sup>th</sup> hour and started declining from the 8<sup>th</sup> hour; in all cases the differences were significant ( $p < 0.001$ ). IP/immunoblotting analysis further confirmed that DR4 was upmodulated as a consequence of p210 TK inhibition by IM (fig. 3). DR4



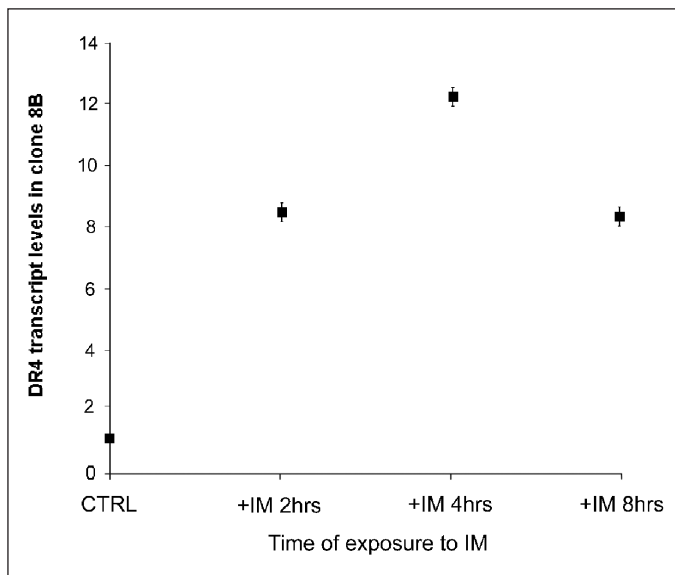
**Fig. 3.** Expression levels of FADD, DR4, caspase 8, -10, -7 in clone 8B originated from 32 DG cell line. Proteins expression levels were measured by Western Blot technique. The levels of beta-actin housekeeping gene protein were used as internal control

induction was associated with FADD phosphorylation at Ser<sup>191</sup>, part of a highly conserved C-terminal cluster of seven Ser residues including the Ser<sup>194</sup> human homolog, crucial in apoptosis amplification<sup>25</sup>. The increased levels of unphosphorylated FADD most probably resulted from the greater stability of the protein following its recruitment at individual ligand-receptor complexes (fig. 3)<sup>26</sup>. Once recruited at the death receptor DD activated, FADD is expected to bind procaspase 8, whose cleavage leads to the formation of active caspase 8 which, once dissociated from the DISC and with the likely cooperation of caspase 10, activates the effector caspase cascade. Accordingly, the levels of active caspase 8 were very significantly increased in clone 8B from the 2<sup>nd</sup> hour of exposure to IM and remained steady up to the 8<sup>th</sup> hour, as the most likely consequence of a caspase 6- and 3-dependent amplification loop (fig. 3). The reduction of inactive caspase 10 after exposure to IM is consistent with its participation in DR4-induced apoptosis signalling, further proceeding through effector caspase 7 activation (fig. 3).

We investigated whether DR4 induction resulted from gene-induced transcription following p210 TK inhibition. DR4 transcript levels relative to p210 TK activity were assayed by means of a semiquantitative PCR strategy, exploiting the ratios between the sample template and housekeeping beta-actin co-amplification signals, quantified by densitometric analysis in untreated controls and following IM exposure. As shown in figs. 4 and 5, the very low death receptor expression in untreated clone 8B was raised by 8.4-fold and 12.2-fold at the 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> hour of drug exposure and declined thereafter.



**Fig. 4.** Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of DR4 gene. To determine whether the selected conditions are suitable for semiquantitative RT-PCR, we performed a competition control, by amplifying the same sample at the same time in the presence of the specific primers for DR4 and the internal control  $\beta$ -actin together. The samples were then dispensed on to the same agarose gel for quantitation. The PCR products molecular weights were 360 bp for DR4 and 226 bp for beta-actin amplification product



**Fig. 5.** Bands intensity of the RT-PCR products resolved in ethidium bromide-stained agarose gel was quantified by Eagle-Eye II (Eppendorf) and expressed as relative absorbance units. DR4 transcript levels in clone 8B were calculated as ratio between the absorbance units at specific hours and the absorbance of the control sample. Mean and standard deviation of all experiments performed were calculated after normalization to beta-actin

## Discussion

Death receptor downregulation represents one mechanism through which the bcr-abl fusion gene elicits apoptosis resistance. Results of our study proved that an early induction of DR4, resulting, in turn, in the activation of extrinsic apoptosis machinery, is associated with the inhibition of p210 TK by IM, therefore confirming that DR4 expression is negatively regulated by bcr-abl fusion protein enzymatic activity. Indeed, combined down-

modulation of agonistic TRAIL receptors and transcriptional suppression of their death ligand TRAIL/Apo2L, proceeding from the phosphorylation and inhibition of the FoxO3 transcription factor, may be synergic in suppressing the extrinsic apoptotic pathway, therefore allowing CML progenitors to escape from the surface-mediated growth-inhibitory controls<sup>27</sup>. Since mutations in TRAIL receptor DDs are eventually responsible for the failure of leukaemic progenitor commitment to apoptosis, in response to TRAIL/Apo2L, the combination of IM and TRAIL/Apo2L may elicit better results than IM alone in the treatment of bcr-abl-positive leukaemias<sup>28,29</sup>. Alternatively, interferon (IFN)-alpha at low doses might increase the effects of IM and further concur to eradicate the leukaemic haematopoiesis, as both drugs induce the expression of membrane-bound TRAIL receptors; and IFN-alpha, in addition, increases the release of soluble form TRAIL/Apo2L from neutrophils and monocytes, therefore enhancing its immunomodulatory actions<sup>30</sup>.

DR4 upregulation, associated with IM-induced inhibition of p210 TK activity, results from transcriptional and post-transcriptional mechanisms. The latter probably involve the increased protein stability following DISC formation, while the former are controlled by multiple, entangled pathways. The downregulation of NF- $\kappa$ B, whose release, nuclear translocation and activation is prevented by the inhibition of I $\kappa$ B alpha phosphorylation by bcr-abl, may play a rôle in this<sup>31,32</sup>. Indeed, the transcription rate of gene encoding for TRAIL agonistic and antagonistic receptors and, in particular, for DR4 and DR5, is regulated by either p53-independent pathways, possibly involving the c-Jun NH2-terminal kinase, or p53-dependent mechanisms through intronic sequence-specific DNA-binding sites<sup>33-36</sup>. Although p53 mutations precluding its function are virtually absent in the early, chronic phase of CML, the loss of p53 oncosuppressive function may be one of the major causes of the genetic instability associated with bcr-abl expression, and may result in the emergence of additional, non random chromosome aberrations as the disease approaches its final outcome, the blast crisis<sup>37-39</sup>. In CML clonal progenitors, p53 functional inactivation, precluding its protein transcriptional interactions with downstream target genes that activate cell cycle checkpoints and trigger apoptosis, is the most likely result of MDM2 phosphorylation at Ser<sup>166</sup> and Ser<sup>186</sup> by the protein kinase B/Akt constitutively activated by p210 TK downstream of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)<sup>40</sup>. MDM2 phosphorylation promotes, in fact, its stabilization and functionally inactivates p53 by increasing its degradation<sup>41</sup>. Accordingly, a significant reduction of Akt phosphorylation and enzymatic activity was observed in bcr-abl-transduced 32D cell clones, followed p210 TK

inhibition by IM<sup>42</sup>. p53 binding to molecular chaperones, interacting with the protein active conformation and, in particular, with the heat shock protein (hsp)70, whose levels are significantly increased in CML haematopoietic progenitors, may further concur to p53 functional inactivation in CML progenitors<sup>28, 43</sup>. Accordingly, the histone deacetylase (HDAC) inhibitor ability of downmodulating hsp70 sensitizes bcr-abl-expressing cells to other drugs, including TRAIL/Apo2L<sup>29, 44</sup>.

## Conclusions

The results of our study are consistent with a rôle for DR4 downmodulation that further contributes to apoptosis resistance associated with bcr-abl expression. Clinical outcomes of CML may be potentially improved by combined treatments that restore extrinsic apoptosis by enhancing the TRAIL/Apo2L pathway.

## Acknowledgement

The study was supported by University of Bologna (fondi ex 60% e Progetto Pluriennali), Fondazione Carisbo, BolognaAil and Forlì-CesenaAil. Dr. Gianluca Brusa is the recipient of a grant dedicated to Mrs. Lalla Seragnoli. Dr. Manuela Mancini is the recipient of a grant provided by the Consorzio Interuniversitario Biotecnologie (CIB). Gianluca Brusa and Manuela Mancini equally contributed to the work.

## References

- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 647-56.
- LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, *et al.* Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med* 2002; 8: 274-81.
- Yagita H, Takeda K, Hayakawa Y, *et al.* TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 2004; 95: 777-83.
- Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 153-9.
- Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 2004; 16: 139-44.
- Milhas D, Cu villier O, Therville N, *et al.* Caspase-10 triggers bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2005; in press.
- LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 2003; 10: 66-75.
- Emery JG, McDonnell P, Burke MB, *et al.* Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998; 273: 14363-7.
- Jin TG, Kurakin A, Benhaga N, *et al.* Fas-associated protein with death domain (FADD)-independent recruitment of c-FLIP to death receptor 5. *J Biol Chem* 2004; 279: 55594-601.
- French LE, Tschopp J. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ* 2003; 10: 117-23.
- Kaufmann SH, Vaux DL. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7414-30.
- Hu W, Kavanagh JJ. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol* 2003; 4: 721-9.
- Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 340: 1330-40.
- Salomoni P, Condorelli F, Sweeney SM, *et al.* Versatility of BCR/ABL-expressing leukemic cells in circumventing proapoptotic BAD effects. *Blood* 2000; 96: 676-84.
- Aichberger KJ, Mayerhofer M, Krauth MT, *et al.* Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of STI571 and mcl-1 antisense oligonucleotides. *Blood* 2005; in press.
- The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1994; 330: 820-5.
- Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, *et al.* Activity of a specific inhibitor of BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001; 344: 1038-42.
- Selleri C, Sato T, Del Vecchio L, *et al.* Involvement of Fas-mediated apoptosis in the inhibitory effects of interferon-alpha in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1997; 89: 957-64.
- Uno K, Inukai T, Kayagaki N, *et al.* TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) frequently induces apoptosis in Philadelphia chromosome-positive leukemia cells. *Blood* 2003; 101: 3658-67.
- Carlesso N, Griffin JD, Druker BJ. Use of a temperature-sensitive mutant to define the biological effects of the p210 BCR-ABL tyrosine kinase on proliferation of a factor-dependent murine myeloid cell line. *Oncogene* 1994; 9: 149-56.
- Campanini F, Santucci MA, Pattacini L, *et al.* Competitive polymerase chain reaction as a method to detect the amplification of bcr-abl gene of chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2001; 86: 167-73.
- Smith KM, Yacobi R, Van Etten RA. Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain. *Mol Cell* 2003; 12: 27-37.
- Pattacini L, Mancini M, Mazzacurati L, *et al.* Endoplasmic reticulum stress initiates apoptotic death induced by STI571 inhibition of p210 bcr-abl tyrosine kinase. *Leuk Res* 2004; 28: 191-202.
- Mancini M, Brusa G, Benvenuti M, *et al.* The p210 BCR-ABL tyrosine kinase of chronic myeloid leukemia causes resistance to radio-induced apoptotic death by inhibiting the proapoptotic BAX gene. *Leukemia* 2004; 18: 370-2.
- Shimada K, Matsuyoshi S, Nakamura M, *et al.* Phosphorylation of FADD is critical for sensitivity to anticancer drug-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1089-97.
- Krippner-Heidenreich A, Tubing F, Bryde S, *et al.* Control of receptor-induced signaling complex formation by the kinetics of ligand/receptor interaction. *J Biol Chem* 2002; 277: 44155-63.



27. Ghaffari S, Jagani Z, Kitidis C, *et al.* Cytokines and BCR-ABL mediate suppression of TRAIL-induced apoptosis through inhibition of forkhead FOXO3a transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6523-8.
28. Nimmanapalli R, Porosnicu M, Nguyen D, *et al.* Cotreatment with STI571 enhances tumour necrosis factor alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL or apo-2L)-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukemia cells. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 350-7.
29. Rosato RR, Almenara JA, Day Y, *et al.* Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 1273-84.
30. Tecchio C, Huber V, Scapini P, *et al.* IFNalpha-stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood* 2004; 103: 3837-44.
31. DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. Phosphorylation of I kappa B alpha precedes but is not sufficient for its dissociation from NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1302-11.
32. Kimberley FC, Screaton GR. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* 2004; 14: 359-72.
33. Takimoto R, El-Deiry WS. Wild-type p53 transactivates the killer/D5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene* 2000; 19: 1735-43.
34. Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, *et al.* Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 409-16.
35. Liu X, Yue P, Khuri FR, *et al.* p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res* 2004; 64: 5078-83.
36. Zou W, Liu X, Yue P, *et al.* c-Jun NH2-terminal kinase-mediated up-regulation of death receptor 5 contributes to induction of apoptosis by the novel synthetic triterpenoid methyl-2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oate in human lung cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 7570-8.
37. Feinstein E, Cimino G, Gale RP, *et al.* p53 in chronic myeloid leukemia in acute phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6293-7.
38. Honda H, Ushijima T, Wakazono K, *et al.* Acquired loss of p53 induces blastic transformation in p210(bcr/abl)-expressing hematopoietic cells: a transgenic study for blast crisis of human CML. *Blood* 2000; 95: 1144-50.
39. Brusa G, Benvenuti M, Mazzacurati L, *et al.* p53 loss of function enhances genomic instability and accelerates clonal evolution of murine myeloid progenitors expressing the p(210)BCR-ABL tyrosine kinase. *Haematologica* 2003; 88: 622-30.
40. Kharas MG, Fruman DA. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res* 2005; 65: 2047-2053.
41. Feng J, Tamaskovic R, Yang Z, *et al.* Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 2004; 279: 35510-7.
42. Mancini M, Calonghi N, Pagnotta E, *et al.* P210 BCR-ABL tyrosine kinase prevents apoptotic cell death through multiple pathways converging at mitochondrial membranes. Submitted to *Haematologica/The Hematology Journal*, 2005.
43. Zyllicz M, King FW, Wawrzynow A. Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO J* 2001; 20: 4634-8.
44. Guo F, Sigua C, Bali P, *et al.* Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood* 2005; 105: 1246-55.

## Nuove strategie della chirurgia radioguidata nelle lesioni non palpabili della mammella: la ROLL

### *New strategies of radioguided surgery in non-palpable breast lesions: the ROLL*

Renato Palmeri, Salvatore Lazzara, Giuseppinella Melita, Giuliano Iapichino, Giuseppe Currò, Eugenio Cucinotta, Paolo Melita

Cattedra di Chirurgia Generale, Università degli Studi di Messina, Messina, Italia

#### Riassunto

Gli Autori, considerato che la localizzazione e l'identificazione delle lesioni non palpabili della mammella (non-palpable breast lesions = NPBL) costituiscono il momento chiave di una corretta condotta terapeutica, hanno verificato la validità di una nuova metodica di localizzazione definita ROLL (Radioguided Occult Lesion Localization), che prevede l'uso di traccianti radioattivi e di sonde per chirurgia radioguidata. Essi riportano la loro esperienza illustrando la tecnica impiegata ed i risultati ottenuti su un gruppo selezionato di 15 pazienti con NPBL. Dallo studio emerge che la ROLL consente di localizzare, durante tutte le fasi dell'intervento chirurgico, con la massima precisione, le NPBL, di ottenere che la lesione si trovi esattamente al centro dell'area resecata, e di verificare che non si sia lasciata parte della lesione in sede. Gli Autori concludono sottolineando che la ROLL è una metodica promettente, che consente di ottenere in un unico tempo, in modo rapido, accurato e definitivo, l'identificazione e il trattamento delle NPBL. Eur. J. Oncol., 10 (3), 207-211, 2005

**Parole chiave:** lesioni non palpabili della mammella, chirurgia radioguidata

#### Introduzione

Le lesioni non palpabili della mammella (non palpable breast lesions = NPBL) costituiscono una nuova realtà cli-

#### Summary

In consideration of the key rôle which the moment of the localization and identification of non-palpable breast lesions (NPBL) have within the framework of a correct therapeutic conduct, the authors have verified the validity of a new method of localization known as ROLL (Radioguided Occult Lesion Localization), which involves the use of radiotracers and probes for radioguided surgery. The authors report on their experience, illustrating the technique used and the results obtained on a selected group of 15 patients with NPBL. The results of the study demonstrate that ROLL permits the localization of the NPBL, with extreme precision, during all the phases of the surgical procedure, thus ensuring that the lesion is located exactly in the middle of the resected area, and further assuring that no residual part of the lesion be left in site. In conclusion, ROLL is shown to be a promising method that enables the identification and treatment of NPBL at one and the same time, in a fast, accurate and definitive way. Eur. J. Oncol., 10 (3), 207-211, 2005

**Key words:** non-palpable breast lesions, radioguided surgery

nica creata dalla sempre maggiore diffusione della mammografia e dell'ecografia, sia come metodiche di *screening* di massa in donne asintomatiche, sia come indagini routinarie in donne sintomatiche e/o asintomatiche a rischio<sup>1</sup>.

Received/Pervenuto 7.7.2005 - Accepted/Accettato 29.7.2005

Address/Indirizzo: Prof. Renato Palmeri, Chirurgia Generale e Mininvasiva, Pad. F 3° Piano, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico "G. Martino", Via C. Valeria, 98100 Messina, Italia - Tel. 0039/090/2212662 - E-mail: rpalmeri@unime.it

Si tratta di lesioni di piccole dimensioni, al di sotto della soglia di dimostrazione clinica che è stimata intorno ad 1 cm<sup>2</sup>.

Il 10% circa delle NPBL ha, tuttavia, dimensioni superiori a 10 mm e il 2-4% anche superiori a 15-20 mm, e la loro non palpabilità è da ricollegarsi al fatto che queste lesioni, anche se relativamente di grandi dimensioni, possono sfuggire alla ricerca clinica quando la consistenza, la sede profonda o l'essere localizzate in una mammella difficilmente esplorabile per dimensioni o struttura, non ne consentano l'identificazione<sup>2</sup>.

Il loro reperimento è di estrema importanza in quanto, frequentemente, queste lesioni possono essere l'espressione di una lesione neoplastica maligna<sup>3</sup>.

È quindi evidente che la localizzazione di un piccolo gruppo di microcalcificazioni, di una opacità e/o di una distorsione parenchimale associata o meno a microcalcificazioni, rappresenta il momento chiave per la successiva condotta terapeutica<sup>4</sup>.

In questi termini tali lesioni richiedono un adeguato approccio diagnostico-terapeutico, per una loro corretta tipizzazione e trattamento, che prevede una stretta collaborazione tra il chirurgo, il radiologo e il patologo.

Si sono così sviluppate e diffuse, in questi ultimi anni, numerose metodiche di localizzazione preoperatoria che, nonostante il grande sviluppo delle tecniche di *imaging*, degli strumenti stereotassici associati alla mammografia e delle metodiche ecografiche, soffrono di qualche limitazione.

L'approccio terapeutico ottimale, solitamente, prevede alcuni obiettivi prioritari:

- 1) la lesione deve essere localizzata con la massima precisione;
- 2) l'asportazione chirurgica deve essere completa, con sufficiente margine di resezione al fine di evitare reinterventi;
- 3) la lesione deve trovarsi al centro della porzione di tessuto rimossa;
- 4) l'esame istologico intraoperatorio deve essere accuratamente eseguito;
- 5) la decisione per un trattamento definitivo potrà essere presa nella stessa seduta chirurgica o rinviata dopo l'esame istologico definitivo<sup>5</sup>.

L'obiettivo di ottenere la precisa localizzazione della lesione, e contemporaneamente un'exeresi chirurgica che consenta di avere la lesione al centro della porzione di tessuto ghiandolare asportato, è stato lo stimolo a verificare la validità di una nuova tecnica di localizzazione che coniugasse l'uso di traccianti radioattivi e di sonde per chirurgia radioguidata<sup>6</sup>.

Questo metodo di localizzazione definito ROLL (Radioguided Occult Lesion Localization) prevede: l'impie-

go di macroaggregati di albumina umana con diametro variabile da 10 a 150 nm, che vengono coniugati con circa 3,7 Mbq (0,1 mC) di Tecnezio (Tc) 99, utilizzato ad un'attività specifica di 74 MBq/mg; l'utilizzo di una sonda per chirurgia radioguidata costituita da un piccolo cilindro metallico al cui interno è alloggiato un cristallo di ioduro di sodio; una apparecchiatura che analizza il segnale captato, che viene tradotto in numero di impulsi evidenziati da un *display* digitale e da un segnale acustico. L'intensità e la frequenza del segnale acustico sono direttamente proporzionali al livello di radioattività rilevata<sup>7,8</sup>.

La ROLL consente di individuare la proiezione cutanea della lesione, di eseguire l'incisione più appropriata, di identificare intraoperatoriamente la lesione sospetta, e di dimostrare la completa rimozione della lesione<sup>9</sup>.

## Materiali e metodi

Dal novembre 2004 al giugno 2005, presso l'UOC di Chirurgia Generale e Mininvasiva dell'AOU Policlinico "G. Martino" di Messina, abbiamo selezionato 15 pazienti con NPBL del diametro tra 4 e 12 mm, documentate mammograficamente e/o ecograficamente, nelle quali era stato eseguito un agoaspirato sotto guida ecografica.

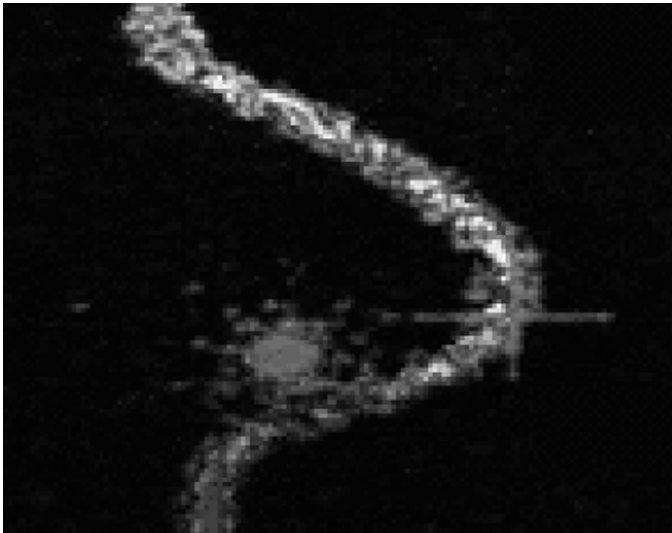
Le NPBL sono state classificate radiologicamente, in accordo con la classificazione di Recanatini<sup>10</sup>, in opacità nodulari, microcalcificazioni, opacità nodulari con microcalcificazioni, distorsioni parenchimali, e distorsioni parenchimali associate a microcalcificazioni.

Posta l'indicazione all'intervento chirurgico di asportazione della lesione mammaria, il pomeriggio antecedente al giorno dell'intervento chirurgico, sotto guida ecografica, abbiamo iniettato, all'interno della lesione mammaria (piccolo gruppo di microcalcificazioni, piccole opacità), 0,5 mg di macroaggregato coniugato con Tc 99.

La corretta sede di inoculo è stata confermata sia ecograficamente, con il rilevamento della classica "nubecola" creata dal liquido iniettato in un tessuto, che con l'utilizzo della *gamma camera*; mediante l'acquisizione di immagini planari anteriori e laterali (mammoscintigrafia), abbiamo verificato se il tracciante introdotto corrispondeva perfettamente alla lesione sospetta (fig. 1).

Il mattino seguente le pazienti sono state sottoposte ad intervento chirurgico.

Ricercata, con la sonda per chirurgia radioguidata, e ricoperta da una guaina sterile la proiezione cutanea della lesione "zona di maggiore attività" (fig. 2), abbiamo eseguito solitamente un'incisione chirurgica la cui direzione e ampiezza hanno tenuto conto di un eventuale successivo intervento di radicalizzazione.



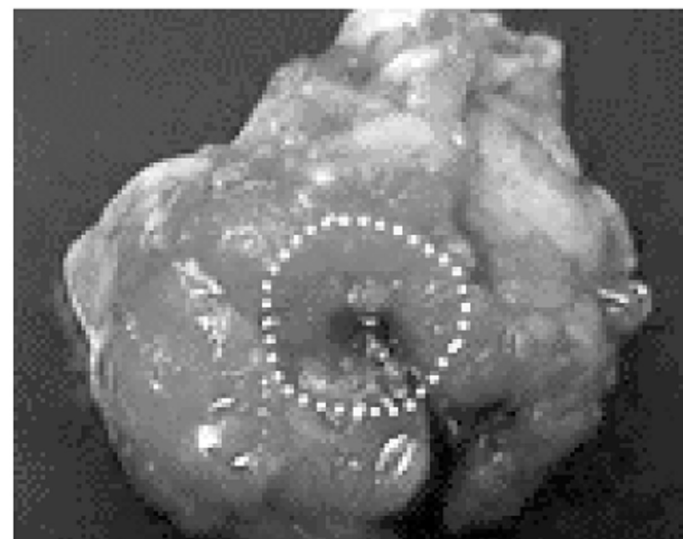
**Fig. 1.** Mammoscintigrafia: identificazione, con tracciante radioattivo, della lesione sospetta



**Fig. 3.** Identificazione intraoperatoria del punto di massima captazione corrispondente al centro della NPBL



**Fig. 2.** Ricerca, con sonda (*probe*), della proiezione cutanea della lesione non palpabile



**Fig. 4.** Pezzo chirurgico: lesione posizionata al centro

Incisa la cute, è stata isolata, dal grasso sottocutaneo, la ghiandola mammaria e, con la sonda, è stato identificato il punto di massima captazione, che corrisponde al centro della lesione (fig. 3).

Spostando progressivamente, di pochi millimetri, la sonda dal centro della lesione verso la periferia dell'area definita, abbiamo registrato la graduale riduzione del segnale di captazione fino alla sua completa scomparsa.

Definiti così i limiti della resezione chirurgica, abbiamo ottenuto un pezzo chirurgico a forma sferoidale con la lesione posizionata al centro (fig. 4).

Dopo l'asportazione del pezzo, la sonda è stata reinserita nel letto chirurgico, per verificare la totale assenza di

captazione residua e documentare la completa rimozione della lesione.

Il pezzo operatorio asportato è stato sempre sottoposto ad esame radiografico, per confermare l'avvenuta asportazione della NPBL e, successivamente, ad esame istologico.

Le lesioni non palpabili che radiologicamente si presentavano come microcalcificazioni o come distorsioni parenchimali di dimensioni uguali o inferiori a 1 cm, sono state sottoposte ad esame istologico definitivo su preparato incluso; per tutte le altre lesioni è stato eseguito un esame istologico estemporaneo.

Sulla base dell'esito dell'esame istologico abbiamo programmato la strategia terapeutica: nelle lesioni beni-

gne la biopsia chirurgica è stata il trattamento definitivo; nelle lesioni neoplastiche maligne è stato eseguito un intervento chirurgico, demolitivo o conservativo, scelto in base alla sede della lesione, alla multicentricità e all'età della paziente.

## Risultati

In tutte le 15 pazienti la ROLL ha consentito di identificare e di asportare radicalmente la NPBL.

Delle 15 pazienti, 3 presentavano una lesione istologicamente benigna, mentre 12 presentavano un carcinoma.

Questa metodica ci ha permesso di ottenere, in unico tempo chirurgico, sia l'identificazione e la natura della lesione non palpabile della mammella che il trattamento definitivo.

Nelle tre pazienti la cui NPBL risultò benigna, la biopsia escissionale radioguidata ha rappresentato l'unico atto terapeutico.

Nelle 12 pazienti che presentavano un carcinoma, in 11 casi è stato effettuato un trattamento chirurgico conservativo consistente nella quadrantectomia, mentre in un solo caso è stato necessario procedere ad una mastectomia per la multicentricità della lesione emersa al momento dell'intervento.

Le dimensioni macroscopiche del tumore sono risultate in tutti i casi inferiori ad 1 cm.

Considerando il gruppo delle 11 pazienti trattate con chirurgia conservativa, in nessun caso si è reso necessario procedere alla dissezione linfonodale ascellare, in quanto la biopsia del linfonodo sentinella ci ha consentito di escludere la presenza di metastasi linfonodali.

In nessun caso si è resa necessaria la radicalizzazione dei margini della resezione chirurgica.

## Discussione e conclusioni

In presenza di NPBL, prima del prelievo, è necessario localizzare la lesione da asportare mediante metodiche di repertaggio particolari.

Tali metodiche devono consentire di eseguire resezioni mirate, molto limitate, con scarsa compromissione dell'integrità mammaria; nel caso di lesioni benigne, la biopsia escissionale deve rappresentare anche l'unico atto terapeutico; in presenza di lesioni maligne, comunque, questo tipo di prelievo non deve compromettere l'ulteriore trattamento chirurgico<sup>5</sup>.

La ROLL, proposta da Luini *et al*<sup>11</sup>, è diventata una metodica di elezione per localizzare ed asportare chirurgicamente una lesione non palpabile. Tale tecnica, basata

sull'utilizzo di traccianti radioattivi, utilizza lo stesso principio della tecnica di ricerca e prelievo del linfonodo sentinella (iniezione di tracciante e rilevamento mediante *probe*), ma ne differisce per il tipo di sostanza utilizzata per veicolare il radiofarmaco<sup>12, 13</sup>.

Nella ROLL, infatti, il Tc 99 viene coniugato con molecole di macroaggregati di albumina colloidale, di diametro variabile tra 10 e 150 nm, molto maggiori di quelle utilizzate nello studio del linfonodo sentinella; questo al fine di non far migrare, rapidamente, il radiofarmaco dal sito di inoculo dove, infatti, rimane reperibile, dalla sonda, anche per 24 ore<sup>14, 15</sup>.

La ROLL trova indicazione nei *cluster* di microcalcificazioni, nelle distorsioni e nelle singole opacità, mentre non è indicata nei casi di lesioni diffuse o multicentriche<sup>16</sup>.

Essa consente di localizzare con la massima precisione le NPBL individuabili con la sonda durante tutte le fasi dell'intervento chirurgico, e di ottenere che la lesione escissa si trovi esattamente al centro dell'area resecata, indipendentemente dalla struttura anatomica della mammella<sup>17</sup>.

La localizzazione mediante ROLL, rispetto alle classiche metodiche (filo guida), anche se richiede una accurata programmazione per coordinare medici nucleari, radiologi e chirurghi, dà sicuramente dei vantaggi: non si verifica il dislocamento del repere, trattandosi di macroaggregati di albumina; consente un accesso facilitato andando con la sonda subito nella proiezione cutanea di massima captazione; permette in qualsiasi fase dell'intervento di conoscere la posizione della lesione; effettuata l'exeresi, permette di verificare che non vi sia attività residua e, pertanto, che non si sia lasciata parte della lesione in sede<sup>18</sup>.

Gli studi sull'attività radioattiva della sostanza introdotta nella mammella sul personale medico di radiologia e del reparto chirurgico, sul personale infermieristico della sala operatoria e sullo stesso strumentario utilizzato nella fase di inoculo e in sala operatoria durante l'intervento chirurgico (aghi, siringhe, guanti, bisturi, forbici, garze, involucro sterile a protezione della sonda, etc) hanno dimostrato che la procedura è sicura in termini di radioprotezione, sia per i bassi livelli di radioattività della sostanza introdotta nella mammella, che viene rimossa completamente all'atto dell'intervento chirurgico, sia per la bassa emivita del Tc 99<sup>19</sup>.

Per quanto riguarda la dose assorbita dagli organi, essa risulta essere notevolmente inferiore rispetto ad altre indagini radiografiche e in media è risultata di 0,45 mGy<sup>20</sup>.

La dose assorbita dalle mani del chirurgo dopo 100 interventi chirurgici rappresenta circa l'1% della dose limite annuale accettata per la popolazione generale. Non sono quindi richieste misure particolari di radioprotezione<sup>21</sup>.

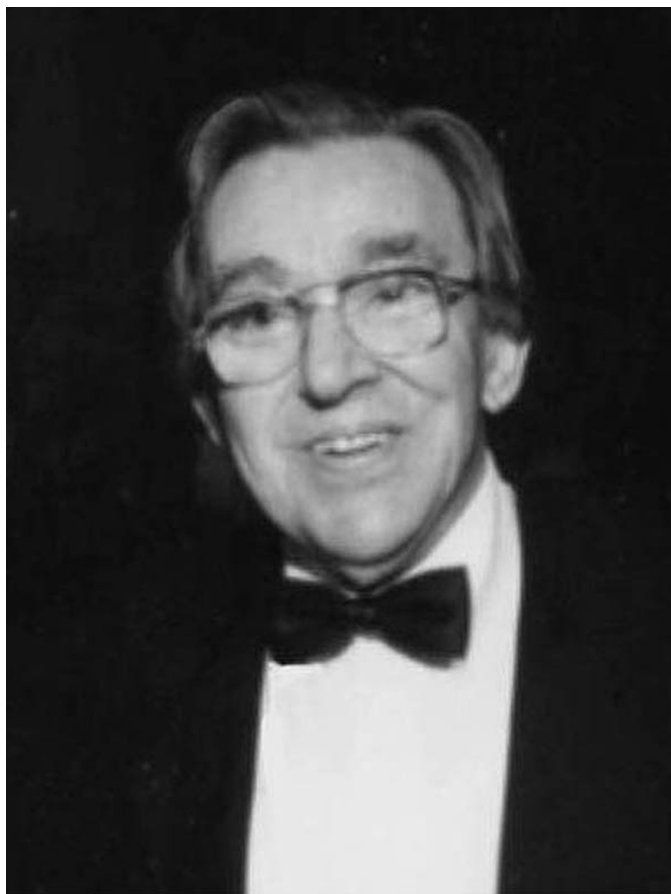
In conclusione, riteniamo che la ROLL sia una metodica estremamente promettente, che sembra in grado, in prospettiva, di ottenere in un unico tempo l'identificazione ed il trattamento, in modo rapido, accurato e definitivo, delle NPBL; tuttavia, la recente introduzione della metodica e la conseguente esiguità delle casistiche non consentono ancora di collocarla in una posizione peculiare nell'ambito dei moderni protocolli diagnostico-terapeutici.

## Bibliografia

- Catarzi S, Giuseppetti GM, Rizzato G, *et al.* Studio multicentrico per la valutazione dell'efficacia diagnostica e della mammografia e dell'ecografia nelle neoplasie non palpabili. *Radiol Med* 1992; 84: 193-5.
- Miras T, Seffert P, Mehdi A. Infraclinical breast lesions: a propos of a retrospective study of 261 cases. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2000; 29 (5): 467-77.
- Seidman JD, Ashtom M, Lefkowitz M. Atypical apocrine adenosis of the breast. A clinicopathologic study of 37 patients with 8.7-year follow-up. *Cancer* 1996; 77: 2529-37.
- Luini A, Zuridda S, Paganelli G, *et al.* Comparison of radioguided excision with wire localization of occult breast lesions. *Br J Surg* 1999; 86: 522-5.
- Leinung S, Scheider JP, Wurl P, *et al.* The radiological and surgical management of nonpalpable breast lesions. *Radiology* 2000; 40 (6): 568-73.
- Paganelli G, Luini A, Veronesi U. Radioguided occult lesion localization (ROLL) in breast cancer: maximizing efficacy, minimizing mutilation. *Ann Oncol* 2002; 13 (12): 1839-40.
- Gennari R, Galimberti V, De Cicco C, *et al.* Use of technetium-99m labelled colloid albumin for preoperative and intraoperative localization of nonpalpable breast lesions. *J Am Coll Surg* 2000; 190 (6): 692-8.
- Schneebaum S, Even-Sapir E, Cohen M, *et al.* Clinical applications of gamma-detection probes-radioguided surgery. *Eur J Nucl Med* 1999; 26 (4): 826-35.
- Zgajner J, Hocevar M, Frkovic-Grazio S, *et al.* Radioguided occult lesion localization (ROLL) of the nonpalpable breast lesion Neoplasma 2004; 51 (5): 385-9.
- Recanatini L, Renoldi L, Sfondrini MS, *et al.* Non-palpable lesions of the breast. Retrospective analysis of mammographic and ultrasonographic indications for surgery. *Radiol Med* 1998; 95: 32-7.
- Luini A, Zurrida S, Galimberti V, *et al.* Radioguided surgery of occult breast lesion. *Eur J Cancer* 1998; 34 (1): 204-5.
- Patel A, Pain SJ, Britton P, *et al.* Radioguided occult lesion localization (ROLL) and sentinel node biopsy for impalpable invasive breast cancer. *Eur J Surg Onc* 2004; 34 (9): 918-23.
- Gray RJ, Giuliano R, Dauway EL, *et al.* Radioguidance for nonpalpable primary lesions and sentinel lymph node(s). *Am J Surg* 2001; 182: 405-6.
- De Cicco C, Pizzamiglio M, Trifirò G, *et al.* Radioguided occult lesion localization (ROLL) and surgical biopsy in breast cancer. Technical aspects. *Q J Nucl Med* 2002; 46: 145-51.
- Spanu A, Dettori G, Chessa F, *et al.* 99mTc-tetrofosmin pinhole-SPECT (P-SPECT) and radioguided sentinel node (SN) biopsy in breast cancer axillary lymph node staging. *Cancer Biother Radiopharm* 2001; 16 (6): 501-13.
- Barbera L, Illanes L, Terrier F, *et al.* Occult breast cancer. Detection and radioguided surgery with 99mTc-MIBI. *Rev Esp Med Nucl* 2003; 22 (1): 6-12.
- Doridot V, Meunier M, El Khoury C, *et al.* Stereotactic radioguided surgery by site select for subclinical mammographic lesions. *Ann Surg Oncol* 2005; 12 (2): 181-8.
- Buonomo O, Cabassi A, Guadagni F, *et al.* Radioguided-surgery of early breast lesions. *Anticancer Res* 2001; 21 (3c): 2091-7.
- Cremonesi M, Ferrari M, Sacco E, *et al.* Radiation protection in radioguided surgery of breast cancer. *Nucl Med Commun* 1999; 20 (10): 919-24.
- Motta C, Turra A, Farina B, *et al.* Radioguided surgery of breast cancer: radiation protection survey. *Tumori* 2000; 86 (4): 372-4.
- Ferrari M, Cremonesi M, Sacco E, *et al.* Radiation protection in the use of tracers in radioguided breast surgery. *Radiol Med* 1998; 96: 607-11.



**Doctor Marvin S. Legator**  
(1926-2005)



Doctor Marvin S. Legator passed away on June 11, 2005 at his home in Galveston, Texas at age 79. He was born in Chicago, Illinois on June 27, 1926. He received his doctoral degree in Microbial Genetics and Biochemistry at the University of Illinois in Urbana in 1951.

He founded the Division of Environmental Toxicology in the Department of Preventive Medicine and Community Health at the University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas, in 1976, served as its Director until 1999, and remained active in the Department as a Professor until the time of his death. Previously, he was Professor of Genetics at Brown University, Chief of the Genetic Toxicity Branch of the Food and Drug Administration

in Washington, DC, and Professor of Genetics at George Washington University. He was Head of the Animal Health Program at Shell Development Company in Modesto, California from 1952 to 1962.

Marvin Legator was a pioneer in the development of research on the effects of toxic agents on the genetic apparatus, in developing methods for monitoring human populations for exposures to genetically toxic agents, and in developing methods for assessing health effects in communities with exposures to toxic agents.

Dr. Legator was the recipient of numerous awards and recognitions including:

- the Alexander Hollaender Award for outstanding contributions in the application of the principles and techniques of environmental mutagenesis to the protection of human health from the Environmental Mutagen Society;
- the Environmental Health Network National Award in recognition of his outstanding efforts in the fields of toxicology and public education;
- Certificate of Award from the US Environmental Protection Agency;
- Award of Merit from the Food and Drug Administration (FDA).

He authored or co-authored over 200 scientific papers and books. He served as the Editor of Teratogenesis, Mutagenesis and Carcinogenesis. He also served on the Editorial Boards of several journals including Toxicology and Industrial Health and Environmental Mutagenesis. He served on many International and National advisory committees and worked with community committees to better the environment.

Legator, Barbara Harper, and M.J. Scott in 1985 wrote "The Health Detectives Handbook. A Guide to the Investigation of Environmental Health Hazard by Nonprofessionals" (Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD), which is still in use as a standard textbook in epidemiology and toxicology. During the 1990s, he wrote a weekly newspaper column entitled "Living in a Chemical World" as a forum for answering questions from the



public on environmental and toxicological issues.

He was a member of the American College of Toxicology, Co-Founder and member of the Environmental Mutagen Society, member of the Society of Occupational and Environmental Health, and member of the New York Academy of Sciences. In 1983, he was among the first scientists elected to Fellowship in the Collegium Ramazzini, an international society of world-wide experts in environmental and occupational toxicology.

He leaves behind his devoted wife of 44 years, Donna; daughters Alice, Lori and Kim; and grandchildren Lark, Mikel, Andoni, Kimberly and Michelle.

Marvin Legator was a good friend for more than 40 years. We worked together at the FDA. Our families travelled together and played together be it fishing or miniature golf with the grandchildren. He loved to laugh and to tell stories, especially those in which he was the unwilling player in a series of calamities that always, somehow, turned out all right. He was enthusiastically dedicated to

his work and never at a loss for new ideas and projects. He became equally entranced with computer programmes that helped him deal with data and later to computer applications of photography. He developed albums of his family and of events that will serve as a living memory of his skills. Above all, he was dedicated to his family. Even though separated geographically from his children and grandchildren, he was always there for them.

We will all miss this brilliant, outgoing, enthusiastic, and involved individual who, we know, is looking over us and, at the same time, looking for new projects, causes, learning, and excitement. Keep having fun, Marvin, and godspeed.

**Myron A. Mehlman**

Adjunct Professor

The Mount Sinai School of Medicine

The City University of New York

New York, NY, USA



**International Congress on  
WOOD DUST  
Challenges for occupational risk assessment and management  
Strasbourg, France, 25-27 October 2006**

**Place / Lieu**

Palais des congrès de Strasbourg  
Place Bordeaux Wacken  
Strasbourg, France

**Languages / Langues**

English, Français

**Main deadlines / Dates limites importantes**

January, 2006: 2nd Announcement and call for abstracts  
April 30, 2006: Abstract submission  
May 31, 2006: Early registration

**Further information**

INRS - Wood Dust  
Dpt MP, Avenue de Bourgogne - BP 27  
54 501 Vandoeuvre Lès Nancy Cedex, France  
Phone: +33 383 50 21 37  
Fax: +33 383 50 20 60  
E-mail : wooddustconference2006@inrs.fr  
Website: www.ami.dk/wooddustconference2006

**Organized by:**

INRS – Institut National de Recherche et de Sécurité  
Vandoeuvre lès Nancy, France



**In cooperation with / En coopération avec:**



## Scope of the Congress

Today in our society, wood, a traditional material, and composite woods (plywood, medium, etc.) are widely used in many industrial activities such as construction, manufacture of furniture, wooden containers, ships and boats, etc.

In these industrial sectors, wood working processes are often linked with occupational exposure to wood dust. Health effects of wood dust exposure include irritation and inflammation of the respiratory tract, asthma and sino-nasal cancer.

The Congress is designed to provide participants with the newest developments in wood dust-related toxicology, epidemiology, exposure assessment, and prevention of risks.

The presentations delivered at the meeting will include those describing the latest results from the studies conducted in the frame of the WOOD-RISK European Project.

An *exhibition* displaying means and practical tools for controlling wood dust exposure and risks will be included.

The Congress will be of interest to researchers from the academia and research institutions, physicians and other experts active in the field of occupational health and safety, as well as representatives of industry, social partners, and national authorities.

## Provisional programme

### **Wednesday, October 25**

*Morning*

Registration – Opening

*Afternoon*

*SESSION 1 – Particle characteristics and sampling methods*

*SESSION 2 – Exposure assessment*

*SESSION 3 – Posters and exhibition*

Welcome Cocktail

### **Thursday, October 26**

*Morning*

*SESSION 4 – Human health effects*

*SESSION 5 – Biological mechanisms*

*Afternoon*

*SESSION 6 – Risk assessment*

*SESSION 7 – Risk management*

*Evening*

Reception

### **Friday, October 27**

*Morning*

*SESSION 8 – Risk control*

*SESSION 9 – Panel discussion, future directions and conclusions*

## INDICE

Issue 1 - Bernardino Ramazzini - Biografia e Bibliografia  
*P. Di Pietro*

Issue 2 - The Precautionary Principle - Implications for Research  
and Prevention in Environmental and Occupational Health  
*P. Grandjean, M. Soffritti, F. Minardi, J.V. Brazier (Editors)*

Issue 3 - Ban on asbestos in Europe - Messa al bando dell'amianto  
in Europa  
*C. Bianchi, M. Soffritti, F. Minardi, J.V. Brazier (Editors)*

Issue 4 - Genetic testing at work ethical and legal implications  
*K. Van Damme, M. Sorsa, M. Soffritti, F. Minardi,  
J.V. Brazier (Editors)*



- ISSUE 1**    **BERNARDINO RAMAZZINI - BIOGRAFIA E BIBLIOGRAFIA**  
PERICLE DI PIETRO - 20 €
- 
- ISSUE 2**    **THE PRECAUTIONARY PRINCIPLE IMPLICATIONS FOR RESEARCH AND PREVENTION IN ENVIRONMENTAL AND OCCUPATION HEALTH**  
P. GRANDJEAN, M. SOFFRITTI, F. MINARDI, J.V. BRAZIER (EDITORS) - 25 €
- 
- ISSUE 3**    **BAN ON ASBESTOS IN EUROPE**  
**MESSA AL BANDO DELL'AMIANTO IN EUROPA**  
C. BIANCHI, M. SOFFRITTI, F. MINARDI, J.V. BRAZIER (EDITORS) - 18 €
- 
- ISSUE 4**    **GENETIC TESTING AT WORK - ETHICAL AND LEGAL IMPLICATIONS**  
K. VAN DAMME, M. SORSA, M. SOFFRITTI, F. MINARDI, J.V. BRAZIER (EDITORS) - 18 €

# European Journal of Oncology

Official Organ of the Italian Society of Tumours (SIT)  
Prevention, Diagnosis, Therapy

<b>title (titolo)</b>	
European Journal of Oncology Giornale Europeo di Oncologia	
<b>notes (note)</b>	
<i>Issn</i>	1128-6598
<i>Issues/year</i>	4
<i>Language</i>	Italian-English
<i>Periodicità</i>	Trimestrale
<i>Lingua</i>	Italiano-Inglese

	Subscription rates (prezzi abbonamenti)				
	Individual (Privati)			Institution (Istituzioni)	
	Italy	Europe	out of Europe <i>Air Mail</i>	Italy and Europe	out of Europe <i>Air Mail</i>
Annual subscription (Abb. annuo)	52,00 euro	65,00 euro	76,00 euro	78,00 euro	88,00 euro
Back Numbers (Arretrati)					
Single Issue (Numero singolo)	19,00 euro	24,00 euro	28,00 euro	28,00 euro	32,00 euro
Complete Year (Annata compl.)	62,00 euro	78,00 euro	91,00 euro	84,00 euro	106,00 euro
Special Issues (Num. speciali)	Issue: 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/>			number of copies	

- I WOULD LIKE TO
- SUBSCRIBE TO THE "EUROPEAN JOURNAL OF ONCOLOGY" YEAR .....
  - RECEIVE THE FOLLOWING ISSUES OF "RAMAZZINI LIBRARY"
- ISSUE: 1  2  3  4

PLEASE SEND THE ISSUES TO:

MR/DR/PROF. ....

ADDRESS .....

N

TOWN .....

POSTAL CODE .....

COUNTRY .....

E-MAIL .....

PHONE/FAX .....

(IF ITALIAN) CODICE FISCALE E PARTITA IVA (MANDATORY): .....

PAYMENT MAY BE MADE:

BY CHECK N° .....

BY BANK TRANSFER intested to  
Mattioli 1885 spa Via Coduro 1/B, 43036 Fidenza (PR),  
Bank: Cassa di Risparmio di Parma e Piacenza, Ag. 3 di Fidenza;  
cod. IBAN: IT 39 S 06230 65732 000094186751  
cod. BIC: CRPPIT2P487

BY CREDIT CARD:  VISA  MASTERCARD

CARD NUMBER

EXPIRY DATE

CARDHOLDER'S NAME (IN CAPITAL LETTERS): .....

SIGNATURE .....

**Mattioli 1885** CASA EDITRICE  
VIA CODURO 1/B  
43036 FIDENZA (PR)



## Bernardino Ramazzini Biografia e Bibliografia

*Pericle Di Pietro*

*Primo volume della collana "Ramazzini Library". Dedicata a Bernardino Ramazzini (biografia e bibliografia), riconosciuto fondatore della Medicina del Lavoro, è opera del Professor Pericle Di Pietro, illustre conoscitore della vita, delle opere e dell'eredità culturale del grande Maestro carpigiano. Il testo esce in lingua italiana e in traduzione inglese ed è illustrato da alcune figure che riproducono in maniera essenziale la documentazione originale.*

<b>Details</b>	ISBN
<b>Anno</b>	2000
<b>Pagine</b>	144
<b>Formato</b>	volume in broccura stampato nel formato di cm 21,5 x 28
<b>Prezzo</b>	Euro 20,00
<b>Collana</b>	Ramazzini Library
<b>Issue</b>	1

---

### Presentazione

Il Giornale Europeo di Oncologia pubblica questa monografia dedicata a Bernardino Ramazzini (biografia e bibliografia) (GEO/EJO Library, Vol. 1), ad opera del Professor Pericle Di Pietro, illustre conoscitore della vita, delle opere e della eredità culturale del grande Maestro carpigiano. Questa monografia era stata richiesta all'illustre studioso dal Collegium Ramazzini (1).

Il testo esce in lingua italiana e in traduzione inglese (2), ed è illustrato da alcune figure che riproducono in maniera essenziale una documentazione originale.

I Direttori Scientifici della Rivista sono profondamente grati al Professor Di Pietro per l'impegno profuso a scrivere un testo, che certamente rimarrà un punto di riferimento nella storiografia di Bernardino Ramazzini.

Il contributo di Ramazzini rappresenta una grande pietra miliare nella storia della medicina. Ramazzini non solo è il riconosciuto fondatore della Medicina del Lavoro; è anche Colui che con precisione ha indicato che molte malattie sono di origine esogena e perciò prevenibili, e che ha introdotto con assoluta originalità e con forza il concetto che "Longe praestantius est praeservare quam curare, sicut satius est tempestatem praevidere ac illam effugere quam ab ipsa evadere", cioè che "è di gran lunga più conveniente prevenire che curare, poiché è più agevole prevedere la malattia ed evitarla, che liberarsi da essa".

La lezione di Ramazzini rimane oggi di grande attualità come capita per l'opera dei grandi pionieri che hanno anticipato la storia.

Le ragioni per cui una rivista di oncologia, come è la nostra, ha ritenuto opportuno, ed anzi un suo compito preciso, pubblicare la monografia "Bernardino Ramazzini" sono molteplici.

Innanzitutto i tumori sono oggi una malattia in larga misura di origine esogena: infatti la dimensione epidemiologica che essi hanno assunto nei nostri tempi è dovuta, oltre che all'invecchiamento delle popolazioni, anche all'inquinamento ambientale e agli stili di vita, caratteristici dell'era industriale.

Inoltre nell'attuale scenario molte delle popolazioni a maggiore rischio di cancro sono proprio categorie di lavoratori dell'industria.

Ancora, siccome molti tumori sono causati da agenti esogeni e quindi rimovibili, essi rappresentano un esempio emblematico di malattia per il controllo della quale la prevenzione rappresenta il maggiore e più incisivo intervento.

Non va dimenticato, infine, il contributo specifico di Ramazzini all'Oncologia, con quella che può essere considerata storicamente la prima ricerca "epidemiologica eziologica" oncologica, e cioè l'osservazione di un aumento del rischio di cancro mammario nelle monache, anticipando così di circa due secoli e mezzo l'evidenza scientifica che il rischio mammario è strettamente connesso alla storia riproduttiva e ormonale della donna e, in maniera più specifica, che le nullipare rappresentano una fascia di popolazione a maggiore rischio.

Cesare Maltoni  
Direttore Scientifico della Fondazione  
Europea Ramazzini e  
Segretario Generale del Collegium Ramazzini

---

(1) Il Collegium Ramazzini, fondato nel 1983 da un gruppo di ricercatori di vari paesi, fra cui il Prof. Irving J. Selikoff, che ne fu il primo Presidente, è un consesso accademico costituito da un numero chiuso di 180 membri (Ramazzini Fellows), eletti all'unanimità dal Consiglio Direttivo, fra i maggiori esperti sui rapporti fra modelli di sviluppo, ambiente, risorse e salute dei lavoratori e più in generale del genere umano.

(2) La Direzione Scientifica del Giornale Europeo di Oncologia esprime un sentito ringraziamento a Ralph Nisbet che ha curato la traduzione inglese, riproducendo il testo originale con grande fedeltà, nel contenuto e nella forma.

---

## Indice

---

*Presentazione di Cesare Maltoni*

7

### **Parte prima: Biografia**

1. Dalla nascita alla cattedra	9
2. Professore a Modena	13
3. Professore a Padova	17
4. Malattie e morte	19
5. Iconografia	21
6. Lo scienziato e l'uomo	26

### **Parte seconda: Opere**

1. Orazioni accademiche	33
2. Ricerche di carattere geofisico	37
3. Il Trattato sulle malattie dei lavoratori	42
4. Scritti degli ultimi anni	48
5. Scritti polemici	51
6. Scritti letterari	52
7. Opera omnia	53

### **Parte terza: Documenti e Bibliografia**

1. Documenti	55
2. Bibliografia	61
A. Opere di Bernardino Ramazzini	61
B. Scritti su Bernardino Ramazzini	62



## The Precautionary Principle Implications for Research and Prevention in Environmental and Occupational Health

*P. Grandjean, M. Soffritti, F. Minardi,  
J.V. Brazier (Editors)*

*Secondo volume della collana "Ramazzini Library". Raccoglie gli atti del Congresso Internazionale "Il Principio di Precauzione: implicazioni per la ricerca e la prevenzione nella medicina ambientale del lavoro", svoltosi a Bologna il 23 e 24 ottobre 2002, promosso dal Collegium Ramazzini, dalla Regione Emilia-Romagna, dall'European Environmental Agency e dalla Fondazione Ramazzini.*

<b>Details</b>	ISBN: 88-86235-80-1
<b>Anno</b>	2003
<b>Pagine</b>	248
<b>Formato</b>	volume in broccura stampato nel formato di cm 17 x 24
<b>Prezzo</b>	Euro 25,00 (Lire 48.407)
<b>Collana</b>	Ramazzini Library
<b>Issue</b>	2

---

### Collegium Ramazzini - Final Draft Statement

#### **The Precautionary Principle: implications for research and policy making**

---

The Collegium Ramazzini endorses the use of the Precautionary Principle for protecting human health and sustainability of the environment. The Precautionary Principle embodies and operationalises the axiom that it is better to be safe than sorry. It brings foresight and transparency to situations with high stakes, uncertain scientific evidence, and disputed values, but where decisions on policy are needed before additional knowledge can be generated. The Precautionary Principle re-invigorates the public health tradition requiring that we do no harm.

Past successes of precaution include the introduction of safe drinking water to major cities in Western Europe and North America decades before elucidation of the germ theory of disease. These actions saved millions of lives. The more recent banning of lead additives in petrol before full appreciation of the health impacts resulted in reductions of up to 90% in paediatric blood concentrations of this toxic metal.

Failures to take precautionary action, despite early warnings, have resulted in severe harm to human health and the environment. Examples include asbestos, ionizing radiation, lead, mercury, some pesticides, polychlorinated biphenyls, tobacco, and the chlorofluorocarbons that damage the ozone layer. Public and occupational health practitioners have often applied preventive measures, but these are not necessarily precautionary. For example, stopping asbestos use and exposure in 2003 is preventive, but hardly precautionary, given that we have known for many decades about the impacts of asbestos on health. In contrast, restricting asbestos exposure in the early decades of the previous century would have been both preventive and precautionary. While precautionary actions are generally reversible, failure to take precautionary action may cause irreversible harm.

Current regulatory practice permits the marketing of many products and technologies on the assumption that they cause no unacceptable harm, thus placing the burden of proving harm on public authorities. Under the Precautionary Principle, by contrast, products and technologies must be assessed to show that they are acceptably safe before they are introduced for use, as is currently the case for most pharmaceuticals and pesticides. If already in use, safety may need to be reassessed, taking into account worst-case scenarios, emerging scientific knowledge and all potential direct and indirect impacts. This approach places the burden of demonstrating safety on those responsible for introducing products and technologies.



The Precautionary Principle uses the best available science as an input to public policy-making. However, sound policy depends not only on good science and technology, but also on other values such as the moral imperative to preserve health, life and the environment. The Precautionary Principle provides a framework for achieving transparent, democratic processes that take these dimensions into consideration in developing policies.

An impediment to precaution is that the scientific community typically requires strong evidence of an adverse finding before “crying wolf” about an agent or an exposure. The frequent insistence that a link between exposure and disease be established with strict statistical confidence presumes the innocence of hazards until there is very strong evidence of harm, and it creates a culture of scientific caution that is more highly focused on avoiding “false positives” than “false negatives”. With this anti-precautionary attitude, science preserves its authority and enhances the impact of the alarms that it raises. However, because absence of proof is not a proof of absence, these positions need explicitly to be recognised and reconciled in light of the overall health and environmental issues at stake.

At a recent conference, the Collegium Ramazzini, in collaboration with the World Health Organization (WHO), the United States’ National Institute for Environmental Health Sciences (NIEHS), and the European Environment Agency (EEA) explored the different methods and goals of science and policy-making and the implications of the Precautionary Principle for better research, training and prevention. An urgent need was demonstrated for striking a better balance between good science and the protection of public health.

Therefore, the Collegium Ramazzini calls for:

- Revision and expansion of the agendas of public health agencies at all levels to increase emphasis on precaution and primary prevention as tools for preventing disease.
- Increased allocation of resources to support research, training, education and policy analysis in primary prevention, with major investment in developing better instruments to assess the potential harms and benefits of products and technologies, both new and old.
- Dissemination of information about potential impacts of products and technologies, and development of better methods of two-way communication between scientists and decision-makers, including the public, who have the right to know about the potential hazards to which they may be exposed, about the uncertainties in science, and about how these uncertainties are managed.
- Increased incentives for the timely contribution, and penalties for the non-production, of adequate information about hazards and their prevention by those responsible for the products and technologies.
- Application of more sensitive health and environmental surveillance programs aimed at the early detection of any unwanted consequences from products and technologies.

---

## Preface

---

By his effort over the millenia, man has surely been the motor driving what is called “development”, by which we mean productive growth, technological progress, innovation, welfare and availability of goods.

Human effort on this planet of ours has been the chief factor determining the quality of the environment in which man has lived. In its turn, the quality of the environment has conditioned the gamut of pathologies that have progressively set in and, as a result, the state of human health.

But whereas man in the past ages had to defend himself from nature’s aggressions in order to survive on the planet, nowadays, if he is to go on living, and above all give future generations a chance of doing so, he must take steps to protect nature from himself.

Such positive action will only be possible if one bears in mind certain inescapable starting assumptions: 1) our planet is in all likelihood unique as a biological scenario; 2) it is finite and so are its raw material and environmental resources; 3) there is a legitimate escalation in human demands.

But if such assumptions cannot be gainsaid, we must ask ourselves: is the current development model compatible with finite resources and legitimate growing human demands? And if the current development model is not compatible, what other form might it take and, above all, how might this be achieved?

To answer these questions we must rise above the ambiguities and irresponsibilities upon which our present development model is based, namely:

- first, that of taking it for granted that the answers to the main problems are essentially technological, economic and political in nature;
- second, that of assuming this development model to be unique, or at least a lesser evil, and that only its internal mechanisms may be adjusted, while the overall design of it cannot be changed, not to mention replaced by alternative models;

– lastly, the failure to recognize that what we hail as progress and creative expression by modern man has brought with it an artificial expansion of production and consumerism, aptly summed up in the fad for “disposable” wares.

Under the social, economic and political impact of the problem of reconciling development, environment and health, dare we claim nowadays to possess the right cognitive tools to guide our decisions towards so-called compatible development? The answer may be yes. We do today possess a lot of scientific tools which can be used to predict (rather than observing later) the effects of development strategies which are mainly (though not entirely) geared to maximizing profits and petty group interests.

One classic case is the long-term carcinogenicity trials on experimental animals to identify carcinogens. When properly planned and conducted, above all when closely reproducing human exposure scenarios, such trials can give precise indications as to agent carcinogenicity and environmental risks conditions, the time-scale being relatively short (2-3 years). The results of such studies can be extrapolated to man, in both qualitative and quantitative terms, and thus form the most effective instrument for predicting the carcinogenic hazard of such agents.

Safeguarding the environment, public health and the quality of life is a planet-wide issue, an integral part of any strategy to achieve a more physiological development model, harbouring resources whilst more fairly satisfying the legitimate claims of the whole world population.

It is quite true that many mistakes have been made, many disasters caused: our society today is justly disoriented. But all is lost? Certainly not. If man takes the situation in hand, without leaving the initiative to egoism or letting things slide, there is clearly hope.

Science can make an important contribution, bringing about a change of course.

But science must be free to identify the problems, set priorities, decide its own programmes, assess the results as they come in; above all it must establish relations with society, and society must make use of its contribution. These relations, however, must not undermine its independence: in other words, the relationship is one of interaction and interdependence, not dependency.

Is all feasible? Maybe it is, probably the time is ripe. At all events, we must strive to think the answer is yes.

In this context, the Precautionary Principle approach to governing the regaining of a just equilibrium between development, environment and health represents an adequate approach augured by many.

The Collegium Ramazzini is grateful to Professor Philippe Grandjean for promoting and organizing the Workshop on the “Precautionary Principle: implications for research and prevention in environmental and occupational health”. This has reviewed what scientific basis we possess today for properly applying the Precautionary Principle to safeguarding the environment and public health.

The Collegium Ramazzini is also grateful to the Emilia-Romagna Region, the European Environmental Agency, the Ramazzini Foundation, the World Health Organization, the National Institute of Environmental Health Sciences, the National Institute of Occupational Safety and Prevention, the Regional Agency for Health Prevention and Environmental Protection in the Emilia-Romagna Region, the Province of Bologna and the Municipality of Bentivoglio, as well as to industry. Our thanks to all of them for their generous support.

Morando Soffritti  
European Ramazzini Foundation of Oncology and  
Environmental Sciences, Bologna, Italy

---

## Indice

---

<b>The Precautionary Principle: implications for research and policy making</b>	7
Collegium Ramazzini, Final Draft Statement	
<b>Preface</b>	9
M. Soffritti	
<b>Opening remarks</b>	11
P.J. Landrigan	
<b>Opening remarks</b>	13
G. Tampieri	
<b>Implications of the Precautionary Principle for public health practice and research</b>	17
P. Grandjean	

<b>The Precautionary Principle, epidemiology and the ethics of delay</b>	21
E.D. Richter and R. Laster	
<b>Some legal implications of the Precautionary Principle: improving information-generation and legal protections</b>	31
C.F. Cranor	
<b>On being careful what we wish for: some difficulties with operationalizing the Precautionary Principle</b>	53
D. Ozonoff	
<b>The Precautionary Principle, science and human health protection</b>	61
M. Martuzzi and R. Bertollini	
<b>The Precautionary Principle: implications for risk management strategies</b>	67
A. Saltelli and S. Funtowicz	
<b>Incorporating science, technology, fairness, and accountability in environmental, health and safety decisions</b>	81
N.A. Ashford	
<b>On the even greater need for precaution under global change</b>	93
C.L. Soskolne	
<b>Methodologic implications of the Precautionary Principle: causal criteria</b>	103
D.L. Weed	
<b>Research implications of science-informed, value-based decision making</b>	109
J. Dowie	
<b>Commentary: the rôle of toxicology in prevention and precaution</b>	119
E.K. Silbergeld	
<b>Multidisciplinary research: strategies for assessing chemical mixtures to reduce risk of exposure and disease</b>	133
W.A. Suk and K. Olden	
<b>Values, errors, and precautions</b>	143
H.L. Needleman	
<b>Negative and non-positive epidemiological studies</b>	149
O. Axelson	
<b>Redefining the confidence interval</b>	157
J.C. Bailar III	
<b>Underestimation of risk due to exposure misclassification</b>	165
P. Grandjean, E. Budtz-Jørgensen, N. Keiding and P. Weihe	
<b>The importance of type II error and falsifiability</b>	173
H. Matsuda	
<b>The Precautionary Principle and statistical approaches to uncertainty</b>	185
N. Keiding and E. Budtz-Jørgensen	
<b>Implications of the Precautionary Principle: is it a threat to science?</b>	193
B.D. Goldstein and R.S. Carruth	
<b>Commentary: barriers and opportunities to changing the research agenda to support precaution and primary prevention</b>	203
J.A. Tickner	
<b>Children as a vulnerable population</b>	217
P.J. Landrigan	
<b>Asbestos in developing countries: magnitude of risk and its practical implications</b>	221
T.K. Joshi and R.K. Gupta	
<b>Major concerns in developing countries: applications of the Precautionary Principle in Ecuador</b>	231
R. Harari A., R.F. Morales and H. Harari F.	
<b>Comparison of Bayesian-utilitarian and maximin principle approaches</b>	237
P. Comba, M. Martuzzi and C. Botti	
<b>Risk communication and the Precautionary Principle</b>	241
M. Biocca	



## Ban on asbestos in Europe

*C. Bianchi, M. Soffritti, F. Minardi,  
J.V. Brazier (Editors)*

*Terzo volume della collana “Ramazzini Library”. Raccoglie gli atti del Congresso Internazionale “Ban on asbestos in Europe - Messa al bando dell’amianto in Europa”, svoltosi a Monfalcone nel febbraio del 2003, promosso dal Collegium Ramazzini, dalla Lega Italiana per la lotta contro i tumori (sezione di Gorizia), dal comune di Monfalcone e con il patrocinio della Regione Friuli Venezia Giulia.*

<b>Details</b>	ISBN: 88-86235-89-5
<b>Anno</b>	2004
<b>Pagine</b>	104
<b>Formato</b>	volume in broccatura stampato nel formato di cm 17 x 24
<b>Prezzo</b>	Euro 18,00
<b>Collana</b>	Ramazzini Library
<b>Issue</b>	3

---

### Proceedings of the Conference “Ban on asbestos in Europe”: presentation

#### *Atti del Convegno “Ban on asbestos in Europe”: presentazione*

---

The Proceedings of the Conference on asbestos in Europe, held in Monfalcone in 2003, are published at a time of great relevance in European history. Starting in May 2004, the European Union will enlarge eastwards so that it will include a large part of our micro-continent. Huge problems, cultural as well as economic and political, will have to be faced and resolved. The asbestos problem may be considered as a paradigm. Europe is affected by an epidemic of tumours induced by asbestos. Of such an epidemic it is not easy to predict the end. Asbestos consumption reached a peak in Europe in the 1970s. Since the mean latency periods of asbestos-related mesothelioma are about 50 years, a further worsening of the situation has to be expected over the next decades. Furthermore the diagnosis of mesothelioma is seldom timely and the results of treatment are still usually disappointing.

Asbestos legislation in Europe has been extremely heterogeneous. Once again the serious delays have demonstrated that scientific knowledge and political decisions run on parallel tracks. However, the most worrying factor is that the asbestos tragedy does not seem to have taught any lessons. The uncontrolled use of substances, the carcinogenic effect of which is well known continues, as does the use of substances whose long-term effects are completely unknown. Increasing risks are encountered in the sector of physical agents (e.g. electromagnetic fields), and the destruction of the environment continues.

Even in the case of asbestos, the European Union presents itself as a virtuous brother, whose example should be followed. However, there are some macroscopic exceptions. Still in the year 2000, Greece was the first among the “minor” asbestos producers, and the mineral was still used in the Iberian peninsula. Moreover, recent estimates show that, even in the virtuous European Union, great attention does not seem to be devoted to occupational cancer.

The contributions published in this book are not only a presentation and a discussion of scientific, historic, and legislative data. They are also a further call to change the course of events.

The asbestos tragedy has been the result of a series of mistakes. It is not by chance that the call comes from an area such as Monfalcone: an area, where a majority of families have a member struck by asbestos-related diseases. A large number of people exposed to asbestos over the last decades, now healthy, remain at high risk for asbestos disease. A campaign for the surveillance of this population has already been started. But the aim of the research is to identify ways of neutralizing the asbestos present in the tissues of a large number of people.

Gli Atti del Convegno sull'amianto in Europa, svoltosi a Monfalcone nel 2003, vengono pubblicati in un momento di grande portata storica. Dal maggio 2004 l'Unione Europea si ingrandirà verso est in modo da comprendere larga parte del nostro microcontinente. Immensi problemi culturali, economici e politici, dovranno essere affrontati e risolti. Il problema amianto può essere considerato un paradigma significativo. L'Europa è coinvolta da un'epidemia di tumori indotti dall'amianto, epidemia di cui non è facile prevedere la fine. I consumi di amianto hanno toccato il vertice in Europa negli anni '70 dello scorso secolo. Poiché i tempi medi di incubazione del mesotelioma da amianto si aggirano sui 50 anni, è da attendersi un peggioramento della situazione nei prossimi decenni. Inoltre per questo tumore la diagnosi non riesce ad essere tempestiva e la terapia rimane per lo più deludente.

La legislazione sull'amianto nel continente è stata estremamente disomogenea. Si sono verificati gravi ritardi, dimostrando ancora una volta che le conoscenze scientifiche e le decisioni politiche viaggiano su binari paralleli. Ma l'elemento più preoccupante è che la tragedia amianto sembra non aver insegnato niente. L'uso incontrollato di sostanze di cui si conosce l'effetto cancerogeno continua, come pure continua l'uso di sostanze di cui si ignorano del tutto gli effetti a lungo termine. Rischi sempre maggiori si incontrano nel campo degli agenti fisici (p.es. campi elettromagnetici) e continua lo scempio dell'ambiente.

Anche nel caso dell'amianto l'Unione Europea si presenta come un fratello virtuoso, del quale bisogna seguire l'esempio. Ma con qualche vistosa eccezione. Nel 2000 la Grecia era ancora il capofila tra i "piccoli" produttori di amianto e il minerale era ancora in uso nella penisola iberica. Inoltre anche nella virtuosa Unione Europea sembra non si presti molta attenzione ai tumori professionali, come recenti stime dimostrano.

I contributi riuniti in questo volume non sono solo un'esposizione e una discussione di dati scientifici, storici, legislativi. Sono anche un ulteriore richiamo ad invertire la rotta.

La tragedia amianto è stata il risultato di una sequenza di errori. Non è casuale che il richiamo venga da un'area come quella di Monfalcone: una zona dove la maggioranza delle famiglie ha avuto un proprio membro colpito da malattie asbesto-correlate. Un gran numero di persone esposte negli ultimi decenni e attualmente sane rimane ad alto rischio per malattie da amianto. Una campagna per la sorveglianza di tale popolazione è già stata avviata. Ma l'obiettivo della ricerca è individuare vie attraverso le quali neutralizzare l'amianto presente nei tessuti di un gran numero di persone.

Claudio Bianchi  
Centre for the Study of Environmental Cancer, Italian League against Cancer,  
Monfalcone (GO), Italy

---

## Indice

---

### **Presentation / Presentazione**

C. Bianchi	5
<b>Asbestos disease and legislation in the United Kingdom / Malattie da amianto e legislazione nel Regno Unito</b>	
L. Kazan-Allen	7
<b>Asbestos exposure and asbestos-related diseases in Croatia / Esposizione ad amianto e malattie ad esso correlate in Croazia</b>	
M. Šarić	17
<b>Asbestos use and its consequences in Slovenia / Utilizzo dell'amianto in Slovenia e sue conseguenze</b>	
M. Dodič Fikfak	25

<b>General problems related to asbestos exposure in Poland / <i>Problemi generali relativi all'esposizione ad amianto in Polonia</i></b>	
N. Szeszenia-Dabrowska, U. Wilczynska	33
<b>Malignant mesothelioma in the Cancer Registry of the Friuli Venezia Giulia Region, Italy, 1995-1998 / <i>Il mesotelioma maligno nel Registro Tumori della Regione Friuli Venezia Giulia, 1995-1998</i></b>	
G. Vicario, S. French, E. Bidoli	43
<b>Malignant mesothelioma of the pleura in Monfalcone, Italy: a 23-year monitoring in an area at high incidence / <i>Il mesotelioma maligno della pleura a Monfalcone: 23 anni di monitoraggio in un'area ad alta incidenza</i></b>	
C. Bianchi, A. Brollo, L. Ramani, T. Bianchi	49
<b>Imaging-based screening in workers with asbestos exposure: new possibilities / <i>Screening basato sulla diagnostica per immagini nei lavoratori esposti ad amianto: nuove possibilità</i></b>	
C. Procacci†, S. Minniti, L. Romeo, M. Gobbi	59
<b>Low-dose spiral CT screening in asbestos-exposed workers: an Alpe Adria Thoracic Oncology Multidisciplinary group study (ATOM 002) / <i>Screening con TC spirale a bassa dose di radiazioni in lavoratori esposti ad amianto: studio dell'Alpe Adria Thoracic Oncology Multidisciplinary group (ATOM 002)</i></b>	
G. Fasola, F. Barbone, T. Zanin, S. Meduri, P. Casseti, G. Pignata, M. Melato, C. Rieppi, A. Troilo, G. Pilati, D. Spazzapan, V. De Pangher, M. Aita, C. Rossetto, A. Follador, A. Scogna, O. Delicati, T. Ceschia, A. Morelli, F. Grossi, O. Belvedere	65
<b>Prospective results of trimodality treatment for malignant pleural mesothelioma / <i>Risultati prospettici del trattamento trimodale del mesotelioma maligno pleurico</i></b>	
V. Pagan, A. Busetto, P. Fontana, O. Nascimben, G. Pizzi	71
<b>The global campaign to ban asbestos / <i>Campagna globale per la messa al bando dell'amianto</i></b>	
L. Kazan-Allen	77
<b>The asbestos ban in the world: the rôle of the Collegium Ramazzini / <i>La messa al bando dell'amianto nel mondo: il ruolo del Collegium Ramazzini</i></b>	
M. Soffritti, F. Belpoggi, F. Minardi, M. Padovani, J.V. Brazier	83
<b>The origin and rôle of an international organisation: the International Agency for Research on Cancer (IARC) / <i>Origine e ruolo di un'organizzazione internazionale: l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC)</i></b>	
L. Tomatis	97



## Genetic testing at work - Ethical and legal implications

*K. Van Damme, M. Sorsa, M. Soffritti,  
F. Minardi, J.V. Brazier (Editors)*

*Quarto volume della collana "Ramazzini Library". Raccoglie gli atti del Convegno "Test Genetici nell'Ambito Lavorativo: Implicazioni Etiche e Legali", svoltosi a Carpi il 24 ottobre 2003 in occasione delle Giornate Ramazziniane promosse dal Collegium Ramazzini*

<b>Details</b>	ISBN: 88-89397-15-2
<b>Anno</b>	2005
<b>Pagine</b>	105
<b>Formato</b>	volume in broccatura stampato nel formato di cm 17 x 24
<b>Prezzo</b>	Euro 18,00
<b>Collana</b>	Ramazzini Library
<b>Issue</b>	4

---

### Introductory remarks to the Proceedings of the Conference "Genetic Testing at Work: Ethical and Legal Implications"

---

The Committee on Ethics of the Collegium Ramazzini decided some time ago to organize a special workshop on ethical issues related to occupational genetic testing as part of the Collegium's Annual Ramazzini Days 2003. With the generous support of the Collegium Secretariat in Bentivoglio, the endeavour was realized as a one-day symposium on 24th October at the former Convent of San Rocco in the historical town of Carpi, birthplace of Bernardino Ramazzini.

The timeliness of the topic relates to the rapid developments of molecular genetic techniques which allow potential applications in various biomedical fields with societal impact and interest. This concerns also the workplaces, with the possibilities that employers, either current or prospective, might be interested in applying the new genetic methods to select the best, fittest and healthiest job applicants or employees on the basis of their molecular genetic profile. This presumption is based on the idea that genetic tests might predict our future health and potential need for sick leave, thus leading to lower work efficacy and less economic profits. Such presumptive thinking needs to be openly discussed and analysed within the Collegium Ramazzini to bridge the science with the social and political impact, within the objective of the Collegium to conserve life and prevent disease.

The symposium comprised excellent lectures by guest speakers and Collegium Fellows followed by lively debates among all international participants. This proceedings volume collects the keynote lectures, but unfortunately leaves the comments and discussions for the imagination of the readers. A long and complex chain of potentially "ethically risky" behaviour is identified in the papers included. The true predictivity of present tests is questionable, both scientifically and statistically; the principle of free and informed consent is often dubious; and the ethical principles of beneficence, non-maleficence and respect for autonomy are vulnerable in global commercialisation and mass marketing of genetic tests. Legal rules and ethical codes have been established and this development should be encouraged to protect the well-being of workers.

This proceedings volume calls for further ethical discussions among its readers, persons involved with occupational safety and health issues and researchers on genetic susceptibility at work.

The organisers and the General Secretariat of the Collegium Ramazzini sincerely thank all authors and participants of the Carpi symposium for their valuable contributions.

Karel Van Damme, Marja Sorsa  
Collegium Ramazzini Committee on Ethics

---

## Indice

---

<b>Introductory remarks to the Proceedings of the Conference “Genetic Testing at Work: Ethical and Legal Implications” / Presentazione degli Atti del Convegno “Test Genetici nell’Ambito Lavorativo: Implicazioni Etiche e Legali”</b> K. Van Damme, M. Sorsa	7
<b>Genetic susceptibility and prevention of occupational diseases: scientific and socio-ethical considerations / Suscettibilità genetica e prevenzione delle malattie professionali: considerazioni scientifiche e socio-etiche</b> K. Van Damme, L. Casteleyn, M. Sorsa	9
<b>Assessing the relevance of screening for genetic risk factors in occupational health / Verifica della pertinenza degli screening per i fattori di rischio genetico in medicina del lavoro</b> L. Casteleyn, K. Van Damme	23
<b>Scientific, ethical and legal challenges in work-related genetic testing in the United States / Esigenze scientifiche, etiche e legali nella conduzione di test genetici in ambito lavorativo negli Stati Uniti d’America</b> N.A. Ashford	33
<b>Genetic testing and employment. Opinion of the European Group for Ethics / Test genetici ed impiego. Opinione del Gruppo Europeo per l’Etica</b> P.A. Whittaker	61
<b>Toxicogenomics in support of environmental regulation / La tossicogenomica a sostegno della legislazione sull’ambiente</b> A. Dearry, B. Weis, J. Guthrie	67
<b>Distinguishing between research and practice with biomarkers: science and ethics / Distinzione fra ricerca e pratica nel contesto dei biomarcatori: scienza ed etica</b> C.L. Soskolne	77
<b>Genetic testing at work. Considerations of the International Labour Organization and legal developments in Europe / I test genetici in ambito lavorativo/ Considerazioni dell’Organizzazione Internazionale del Lavoro e sviluppi legali in Europa</b> B. Froneberg	87



The European Journal of Oncology (Eur. J. Oncol.), Official Organ of the Italian Society of Tumours (SIT)/Prevention, Diagnosis and Therapy, is promoted by the **European Foundation of Oncology and Environmental Sciences "B. Ramazzini"** via Guerrazzi, 18 - 40125 Bologna, Italy  
 telephone: for Italy 051/237286; for abroad 0039/051/237286  
 fax: for Italy 051/2911679; for abroad 0039/051/2911679  
 and published by:

**Mattioli 1885 - Casa Editrice**

via Coduro, 1/B - 43036 Fidenza (PR) - Italy  
 telephone: for Italy 0524/84547; for abroad 0039/0524/84547  
 fax: for Italy 0524/84751 - for abroad 0039/0524/84751

All editorial mail must be addressed to the:

**Editorial Office of the European Journal of Oncology**

Cancer Research Centre,  
 Castle of Bentivoglio, Via Saliceto 3, 40010 Bentivoglio (Bologna), Italy  
 telephone: for Italy 051/6640650-6640143; for abroad 0039/051/6640650-6640143  
 fax: for Italy 051/6640223; for abroad 0039/051/6640223

All administrative mail must be sent to the publisher (Mattioli 1885 - Casa Editrice)  
 The European Journal of Oncology is sent free of charge to all paid-up members of the SIT.

The journal is a quarterly publication

## INFORMATION AND INSTRUCTIONS TO AUTHORS

### INFORMATION

The European Journal of Oncology publishes contributions in the various areas of oncology: biology, epidemiology, pathology and clinical medicine.

Contributions may be in the form of:

- editorials;
- general reviews;
- original studies and research;
- clinical case reports;
- brief communications;
- letters to the Editors.

The official languages of the journal are Italian and English.

Acceptance of contributions for publication is subject to review by referees chosen from experts in the various fields. The Editors may require modifications to manuscripts, as suggested by the referees, and all adjustments necessary to maintain homogeneity of style in the journal. Editorials and critical reviews may be solicited by the Editors, or submitted without request. In all cases they must adhere to the instructions to Authors, and will be submitted to referees like other contributions.

Publications, once accepted, belong to the journal. No papers, or substantial parts thereof, may be published in other journals or books, without written permission from the Publisher.

The European Journal of Oncology assumes no responsibility for statements and opinions advanced by contributors to the journal.

### INSTRUCTION FOR MANUSCRIPTS

#### Mailing

**Manuscripts must be sent to the Editorial Office (at the Cancer Research Centre, Bentivoglio) in THREE HARD COPIES AND ON DISKETTE.** Texts must be written in Word 6 (or earlier versions) for Windows or Mac and sent on floppy discs or CDs. Floppy discs or CDs must be labelled as follows: author's first name, surname and address and software used.

In the covering letter to the Editorial Staff, all relations that might raise a conflict of interests for the Authors with reference to the topic of the report must be clearly stated.

#### Texts

Texts must be typewritten or printed, double or triple-spaced, on good quality, 8.5 x 11 inch, white paper, with a margin of at least 1 inch.

Pages must be numbered sequentially.

### EDITORIALS, GENERAL REVIEWS AND ORIGINAL STUDIES AND RESEARCH

**Title page.** The first page of the manuscript should contain the following information: 1) title of the report, in English and Italian; 2) complete Authors' names; 3) name of institution in which the work was done; 4) acknowledgments of collaboration and research support; 5) name and address of the Authors to whom communications regarding the manuscript should be directed and by whom reprints may be requested; and 6) running title of 45 characters or less.

**Abstract.** The page(s) following the title page is/are to contain an abstract of 250 words or less, with the following headings: 1) aim; 2) materials and methods, or patients and methods; 3) results; 4) conclusions. For all articles the abstract must be prepared in English and Italian, the first version being the one in the language in which the text is written.

**Key words.** These must be indicated after the abstract, in both languages, and must not exceed 5 in number.

**Text.** In the text the various sections must be clearly defined in the following order: introduction, materials and methods, results, discussion, conclusions. This is not the case for editorials and general reviews.

**References.** These should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text. The list of references should be typed on separate sheets and numbered following the citation order, in accordance with the examples hereunder reported.

#### Bibliography style

Journal report, up to 3 Authors:

Sheibani K, Battifora H, Burke J. Antigenic phenotype of malignant mesotheliomas and pulmonary adenocarcinomas. *Am J Pathol* 1986; 123: 212-9.

Journal report, more than 3 Authors:

Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, *et al.* Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 527-37

Complete book:

Selikoff IJ, Lee DHK. Asbestos and disease. New York: Academic Press, 1978.

Chapter of book:

Freedman AS, Nadler LM. Non-Hodgkin's lymphomas. In Holland JF, Breast RC J, Morton DL, *et al*: Cancer Medicine, IV Ed, 2. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997, 2757-95.

Chapter of book that forms the proceedings of a meeting:

Lipkin M. Current knowledge of the cancer latent period. Chemoprevention strategies during colonic cancer development. In Maltoni C, Soffritti M, Davis W. International Forum, The Scientific Bases of Cancer Chemoprevention, Amsterdam: Excerpta Medica, 1996, 61-71.

Abstract:

Abeloff MD, Gray R, Tarmey DC, *et al*. Randomized comparison of CMFPT versus CMFPT/VATHT and maintenance versus no maintenance tamoxifen in premenopausal, node positive breast cancer. An ECOG study. Proc Am Soc Clin Oncol 1991; 10, 43: abstr 47.

Supplement:

Elison LO, Ekberg L. Ifosfamide, doxorubicin, vincristine, and etoposide in small cell lung cancer. Semin Oncol 1995; 22 suppl 2: 15-7.

Editorial:

Morrow M. The natural history of ductal carcinoma in situ: implications for clinical decision making. Cancer 1995; 76: 1113-5 (editorial).

Letter to the Editor:

Peat IM, Madden FJF. Neurological assessment of high grade astrocytomas following high dose radiotherapy as sole treatment. Clin Oncol 1995; 7: 273 (letter).

Scientific or technical report:

Akutsu T. Total heart replacement device - Bethesda (MD): National Institute of Health, National Heart and Lung Institute; 1974 Apr. Report No.: NIH-NHLI-69-2185-4

Newspaper article:

Rensberger B, Specter B. CFCs may be destroyed by natural process. The Washington Post 1989 Aug 7; Sect. A:2 (col. 5).

**Tables.** Tables must be typewritten or printed separately on one or more sheets, and must be numbered progressively, at the top left, in arabic numerals, and as such quoted in the text. Each table must have a title heading, which must appear at the top, near the identification number. Legends should include specifications or abbreviations, and should be listed at the bottom of the table, identified with small letters. Tables should be inserted in the manuscript after the text and references.

**Figures.** Graphs, diagrams, drawings and photographs, macro and micro, are to be indicated as figures and identified with progressive arabic numerals as a separate category. The size should not be larger than that of journal pages, and further reduction may be necessary. Pictures must be of a high technical quality, must be sent unmounted and should not be retouched. On the back of each figure, the name of Authors, the progressive number and an indication of top and bottom should be lightly pencilled. Legends to figures should be collected, double-space typewritten or printed, on one or more pages, under the page title FIGURES. All legends to figures and the figures themselves must be inserted in the manuscript after the tables.

Files must be saved on PC or MAC formatted floppy discs, CDs or ZIP discs. Images must be saved as single files in 10x15 cm format. *DRAWINGS-GRAPHS-DIAGRAMS* (black & white) must have an 800 dpi resolution and must be saved in BMP (bit map) or TIFF format. *RADIOGRAPHIES* (shades of grey) and digital images (full colour) must have a 300 dpi resolution and they must be in JPEG format with medium compression.

## CASE REPORTS

The text should follow the indications given for articles on original research and studies. The manuscript should have its various sections identified, i.e.: introduction, general data on cases, illustration of cases, discussion and conclusions.

## BRIEF COMMUNICATIONS

Communications should deal with issues of particular originality and topicality. They must be double-space typewritten or printed, and not exceed 3 pages of text, without including references, tables or figures. The sequence of sections of the report (which however should not be labelled), references, tables and figures should follow the instructions given for the articles on original studies and research. If accepted, brief communications will be given special priority in publication.

## LETTERS TO THE EDITOR

Letters to the Editor are welcome, and if their content is appropriate will be published. Letters must be double-space typewritten or printed, and should not exceed 2 pages. The letter should have a title and be signed by the Author, who must also state his/her affiliation. Letters should also include references (few and specific).

## PROOF READING

The Authors will be sent galley proofs and are asked to correct typesetting errors. Minor changes are allowed: any Author making undue alterations to proofs will be charged with the cost. The galley proofs must be returned within 5 days from receiving them.

## REPRINTS

Reprints should be requested by order form, which will be sent with the galley proofs. The same order form indicates the cost of reprints, which varies according to the number of pages and the number of copies requested. Readers who wish to obtain a reprint of an article appearing in the European Journal of Oncology, should contact the Author, at the address given on the first page of the article.

## ANNOUNCEMENTS

Announcements of meetings, conferences and similar, which may be of interest to readers of the European Journal of Oncology, should be sent to the Editorial Staff at least 4 months before the event. A fee is charged for each announcement, and the cost will be based on the length of the announcement. Further details may be obtained by contacting the Publisher directly.

## PUBLICITY

The European Journal of Oncology publishes advertisements dealing with fields of interest for the Readers. For ethical reasons, advertisements are submitted to the approval of the Editors. Enquiries concerning economic and administrative aspects should be directed to the publisher Mattioli 1885 - Casa Editrice.

## TRANSFER OF AUTHOR COPYRIGHT

Please include a signed release of copyright to European Journal of Oncology with your manuscript. Include the title of the article being submitted, as well as the date. Include the signature of coauthors.

Il Giornale Europeo di Oncologia, Organo Ufficiale della Società Italiana Tumori (SIT)/Prevenzione, Diagnosi e Terapia, è promosso dalla: **Fondazione Europea di Oncologia e Scienze Ambientali "B. Ramazzini"** via Guerrazzi, 18 - 40125 Bologna, Italia  
telefono: per l'Italia 051/237286 - per l'estero 0039/051/237286  
fax: per l'Italia 051/2911679 - per l'estero 0039/051/2911679  
e pubblicato presso la:

**Mattioli 1885 - Casa Editrice**

via Coduro, 1/B - 43036 Fidenza (PR) - Italia  
telefono: per l'Italia 0524/84547 - per l'estero 0039/0524/84547  
fax: per l'Italia 0524/84751 - per l'estero 0039/0524/84751

Tutta la corrispondenza editoriale deve essere indirizzata a:

**Redazione Giornale Europeo di Oncologia**

Centro di Ricerca sul Cancro,  
Castello di Bentivoglio, Via Saliceto 3, 40010 Bentivoglio (Bologna), Italia  
telefono: per l'Italia 051/6640650-6640143 - per l'estero 0039/051/6640650-6640143  
fax: per l'Italia 051/6640223 - per l'estero 0039/051/6640223

Tutta la corrispondenza amministrativa va invece inviata alla Mattioli 1885 - Casa Editrice. Il Giornale Europeo di Oncologia viene inviato gratuitamente ai Soci della SIT in regola con le quote associative.

La rivista esce con periodicità trimestrale

## INFORMAZIONI E ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

### INFORMAZIONI

Il Giornale Europeo di Oncologia pubblica contributi nei vari settori dell'oncologia: biologia, epidemiologia, patologia e clinica.

I lavori possono essere sotto forma di:

- editoriali;
- riviste generali;
- studi e ricerche originali;
- resoconti di casi clinici;
- comunicazioni brevi;
- lettere ai Direttori.

Le lingue ufficiali della rivista sono l'italiano e l'inglese.

L'accettazione per la pubblicazione dei lavori è subordinata al giudizio di revisori, scelti fra studiosi dell'argomento di volta in volta trattato. La Direzione si riserva di richiedere eventuali modifiche indicate dai revisori, e di apportare quelle che sono necessarie per mantenere una omogeneità di stile nella rivista. Editoriali e riviste critiche possono essere richiesti dalla Direzione della rivista, o essere inviati senza richiesta. In ogni caso devono essere preparati secondo le istruzioni per gli Autori, e verranno sottoposti ai revisori come tutti gli altri contributi.

Le pubblicazioni accettate diventano di proprietà della rivista. I lavori, o parti sostanziali di essi, non potranno essere pubblicati in altre riviste o libri, senza permesso scritto dell'Editore.

Il Giornale Europeo di Oncologia non assume alcuna responsabilità per affermazioni ed opinioni enunciate nel giornale dagli Autori.

### ISTRUZIONI PER I MANOSCRITTI

#### Invio

**I testi completi devono essere inviati alla Redazione (presso il Centro di Ricerca sul Cancro, Bentivoglio), in TRE COPIE CARTACEE E SU DISCHETTO.** I testi inviati su supporto informatico devono essere in Word 6 (o versione inferiore) per Windows o Mac su dischetti o CD. Il dischetto o CD va etichettato con: nome e cognome, indirizzo dell'autore e indicazione del programma utilizzato.

Nella lettera di accompagnamento devono essere specificate le relazioni che possono porre conflitti di interesse per gli Autori in riferimento al contenuto dell'articolo.

#### Stesura

I testi devono essere dattilografati o stampati, a doppio o triplo spazio, su carta bianca di buona qualità, di cm 29,5 x 21, con un margine di almeno cm 2,5.

Le pagine devono essere numerate sequenzialmente.

### EDITORIALI, RIVISTE GENERALI E STUDI E RICERCHE ORIGINALI

**Pagina con titolo.** La prima pagina del manoscritto deve contenere le seguenti informazioni: 1) titolo del lavoro, in italiano e in inglese; 2) nome per esteso degli autori; 3) nome dell'istituzione in cui la ricerca è stata fatta; 4) riconoscimenti per le collaborazioni e per i supporti economici della ricerca; 5) nome e indirizzo dell'autore a cui vanno indirizzate le comunicazioni relative al lavoro, e a cui vanno richiesti gli estratti; e 6) titolo abbreviato di testa che non deve superare i 45 caratteri.

**Riassunto.** Alla pagina con titolo segue un riassunto di massimo 250 parole, con i seguenti titoli: 1) finalità; 2) materiali e metodi o casistica e metodi, ecc; 3) risultati; 4) conclusioni. Per tutti gli articoli, il riassunto va preparato sia in lingua italiana che in lingua inglese, in pagine successive, mettendo per prima versione quella nella lingua in cui è scritto il testo.

**Parole chiave.** Vanno indicate dopo i riassunti nelle due versioni in misura non superiore a 5, in italiano ed in inglese.

**Testo.** Il lavoro deve avere chiaramente identificate le varie sezioni, e cioè nell'ordine: introduzione, materiali e metodi o equivalenti, risultati, discussione, conclusioni. Questa suddivisione non è necessaria per gli editoriali e le riviste generali.

**Bibliografia.** Le voci bibliografiche dovranno essere numerate in ordine di citazione ed il numero riportato nel testo tra parentesi. Tutta la bibliografia citata dovrà essere dattiloscritta su fogli separati e numerata secondo l'ordine di citazione, secondo gli esempi riportati di seguito.

#### Stile della bibliografia

Articolo in rivista, fino a 3 autori:

Sheibani K, Battifora H, Burke J. Antigenic phenotype of malignant mesotheliomas and pulmonary adenocarcinomas. *Am J Pathol* 1986; 123: 212-9.

Articolo in rivista, più di 3 Autori:

Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, *et al.* Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 527-37

#### Libro completo:

Selikoff IJ, Lee DHK. Asbestos and disease. New York: Academic Press, 1978.

#### Capitolo di libro:

Freedman AS, Nadler LM. Non-Hodgkin's lymphomas. In Holland JF, Breast RC J, Morton DL, *et al.* Cancer Medicine, IV Ed, 2. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997, 2757-95.

#### Capitolo di libro che costituisce gli atti di un convegno:

Lipkin M. Current knowledge of the cancer latent period. Chemoprevention strategies during colonic cancer development. In Maltoni C, Soffritti M, Davis W. International Forum, The Scientific Bases of Cancer Chemoprevention, Amsterdam: Excerpta Medica, 1996, 61-71.

#### Abstract:

Abeloff MD, Gray R, Tarmey DC, *et al.* Randomized comparison of CMFPT versus CMFPT/VATHT and maintenance versus no maintenance tamoxifen in premenopausal, node positive breast cancer. An ECOG study. Proc Am Soc Clin Oncol 1991; 10, 43: abstr 47.

#### Supplemento:

Elison LO, Ekberg L. Ifosfamide, doxorubicin, vincristine, and etoposide in small cell lung cancer. Semin Oncol 1995; 22 suppl 2: 15-7.

#### Editoriale:

Morrow M. The natural history of ductal carcinoma in situ: implications for clinical decision making. Cancer 1995; 76: 1113-5 (editorial).

#### Lettera all'Editore:

Peat IM, Madden FJF. Neurological assessment of high grade astrocytomas following high dose radiotherapy as sole treatment. Clin Oncol 1995; 7: 273 (letter).

#### Resoconto scientifico o tecnico:

Akutsu T. Total heart replacement device - Bethesda (MD): National Institute of Health, National Heart and Lung Institute; 1974 Apr. Report No.: NIH-NHLI-69-2185-4

#### Articolo di giornale:

Rensberger B, Specter B. CFCs may be destroyed by natural process. The Washington Post 1989 Aug 7; Sect. A:2 (col. 5).

**Tabelle.** Le tabelle devono essere dattiloscritte o stampate, ciascuna in un foglio o più fogli separati, e vanno numerate progressivamente, in alto a sinistra, con numeri arabi (e come tali citate nel testo). Ogni tabella va illustrata con un titolo che deve comparire in testa a fianco del numero di identificazione. Eventuali legende, che devono comprendere anche la specificazione delle abbreviazioni, vanno posizionate ai piedi della tabella, e identificate con lettere minuscole. Le tabelle vanno inserite nel lavoro dopo il testo e la bibliografia.

**Figure.** I grafici, gli schemi, i disegni, le foto (microfoto o macrofoto) vanno denominati come figure, e vanno identificate con numeri arabi, progressivamente, come un'unica categoria. Le loro dimensioni devono tenere conto di quelle della rivista, pur considerando l'eventualità di riduzioni. Le fotografie devono essere di alta qualità tecnica, e vanno inviate non montate né ritoccate. In ciascuna fotografia sul retro, leggermente a matita, vanno scritti il nome dell'Autore ed il numero progressivo, e indicata la base. Le legende delle figure vanno riportate, in un foglio o più fogli a parte, dattilografate o stampate a doppio spazio, sotto il titolo di pagina FIGURE. Tutte le legende delle figure e le figure stesse vanno inserite dopo le tabelle.

Per quanto concerne il supporto informatico, i files devono essere salvati su dischetto, CD o ZIP formattati PC o MAC. Le immagini vanno salvate come singolo file in formato di 10x15 cm. I *DISEGNI-GRAFICI-DIAGRAMMI* (tratti bianco/nero) devono avere una risoluzione di 800 dpi ed essere salvati in formato BMP (bit map) o TIFF. Le *RADIOGRAFIE* (scala di grigio) e le immagini digitali (colore) devono avere una risoluzione di 300 dpi ed essere in formato JPEG con compressione media.

## RESOCONTI SU CASI CLINICI

I testi devono essere preparati secondo le indicazioni fornite per gli articoli su studi e ricerche originali. Il resoconto deve avere chiaramente identificate le varie sezioni, e cioè: introduzione, materiali e metodi, dati generali sulla casistica, illustrazione della casistica, discussione e conclusioni.

## COMUNICAZIONI BREVI

Le comunicazioni devono riguardare contributi di particolare novità ed attualità. Devono essere dattiloscritte o stampate in doppio spazio, e non devono essere più lunghe di 3 pagine, escludendo bibliografia, tabelle e figure. La sequenza delle sezioni (che tuttavia non vanno evidenziate), la bibliografia, le tabelle e le figure devono uniformarsi alle stesse istruzioni fornite per gli articoli su studi e ricerche originali. Se accettate, le comunicazioni brevi avranno una speciale priorità nella pubblicazione.

## LETTERE ALL'EDITORE

Le lettere all'Editore sono ben accette e, se il loro contenuto è interessante, vengono pubblicate. Le lettere devono essere dattiloscritte o stampate in doppio spazio, non devono essere più lunghe di due pagine. L'Autore deve proporre un titolo, e deve sottoscrivere, indicando anche l'istituzione di appartenenza. La lettera può fare riferimento a voci bibliografiche, che devono essere contenute nel numero ed essere assolutamente specifiche.

## CORREZIONE DELLE BOZZE

Gli Autori riceveranno le bozze per la lettura e la correzione degli errori di stampa. In sede di bozze sono ammesse soltanto minime modifiche del dattiloscritto: gli Autori che apporteranno eccessive modificazioni devono sostenerne il costo. Le bozze corrette devono essere inviate alla Redazione entro 5 giorni dal loro ricevimento.

## ESTRATTI

Gli estratti dei lavori devono essere richiesti con l'apposito modulo, che viene inviato insieme alle bozze. Nello stesso modulo è indicato il costo degli estratti a seconda del numero delle pagine e del numero di copie. Coloro che desiderano avere estratti di un articolo comparso sul Giornale Europeo di Oncologia devono richiederlo all'Autore di riferimento, all'indirizzo indicato nella prima pagina del testo.

## ANNUNCI

Gli annunci di convegni, congressi e simili, che possono interessare i Lettori del Giornale Europeo di Oncologia, possono essere inviati alla Redazione, almeno quattro mesi prima dell'evento. Gli annunci sono pubblicati a pagamento, ed il costo varierà a seconda della lunghezza dell'annuncio. Per ulteriori dettagli rivolgersi alla Casa Editrice Mattioli.

## PUBBLICITÀ

Il Giornale Europeo di Oncologia pubblica inserzioni pubblicitarie inerenti a settori di interesse per i Lettori. La pubblicazione degli annunci pubblicitari è sottoposta ad approvazione dei Direttori della rivista. Per gli aspetti economici ed amministrativi rivolgersi alla Mattioli 1885 - Casa Editrice.

## TRASFERIMENTO DEL COPYRIGHT

Si prega di accludere al manoscritto una dichiarazione di cessione del copyright al Giornale Europeo di Oncologia. Citare il titolo dell'articolo, la data di invio e il nome di tutti i co-autori con le firme autografe.