

EUROPEAN JOURNAL OF ONCOLOGY

GIORNALE EUROPEO DI ONCOLOGIA

Official Organ of
the Italian Society
of Tumours
SIT

Prevention, Diagnosis, Therapy

Organo Ufficiale
della Società
Italiana Tumori
SIT

Prevenzione, Diagnosi, Terapia

Scientific Editors Direttori Scientifici /

LEONARDO CALDAROLA
Turin, Italy/*Torino, Italia*

CESARE MALTONI†
Bologna, Italy/*Italia*

Scientific Committee Comitato Scientifico /

JOHN CHRISTIAN BAILAR III
Chicago, IL, USA

TULLIO BATTELLI
Ancona, Italy/*Italia*

FIGIELLA BELPOGGI
Bologna, Italy/*Italia*

VANNI BELTRAMI
Roma, Italy/*Italia*

EMILIO BOMBARDIERI
Milano, Italy/*Italia*

SALVATORE CARIELLO
Salerno, Italy/*Italia*

GIUSEPPE COLUCCI
Bari, Italy/*Italia*

MASSIMO CRESPI
Rome, Italy/*Roma, Italia*

ANDERS ENGLUND
Solna, Sweden/*Svezia*

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

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

JAMES E. HUFF
Research Triangle Park, NC, USA

LINDA C. KOO
New York, NY, USA

OLE KRONBORG
Odense, Denmark/*Danimarca*

JOSEPH LADOU
San Francisco, CA, USA

PHILIP J. LANDRIGAN
New York, NY, USA

MASSIMO LOPEZ
Rome, Italy/*Roma, Italia*

FRANCESCO MORINO
Turin, Italy/*Torino, Italia*

ANTONIO MUSSA
Turin, Italy/*Torino, Italia*

MARIO NANO
Turin, Italy/*Torino, Italia*

COSTANZO NATALE
Foggia, Italy/*Italia*

HÉLÈNE SANCHO-GARNIER
Montpellier, France/*Francia*

MORANDO SOFFRITTI
Bologna, Italy/*Italia*

FIorenzo STIRPE
Bologna, Italy/*Italia*

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

EDOARDO TRIGGIANI
Palermo, Italy/*Italia*

GUIDO TUVERI
Trieste, Italy/*Italia*

Editorial Staff / Redazione

JILL V. BRAZIER (Head Editor/Redattore Capo)

LUCIANO BUA

ELISA CATTIN

DAVIDE DEGLI ESPOSTI

LAURA FALCIONI

MICHELINA LAURIOLA

SOFIA LUNDBORG

FRANCO MINARDI

MICHELA PADOVANI

EVA TIBALDI

Journal Director / Direttore Responsabile

FEDERICO CIONI



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 9 - N. 1 - 2004

COLLEGIUM RAMAZZINI STATEMENTS

Presentation / Presentazione

5

SEVENTH COLLEGIUM RAMAZZINI STATEMENT

The Precautionary Principle: implications for research and policy making / *Il Principio di Precauzione: implicazioni per la ricerca e la promulgazione di leggi*

7

COMMENTARY / COMMENTARIO

Implications of the Precautionary Principle for research and policy making / *Implicazioni del Principio di Precauzione sulla ricerca e sull'azione politica*

P. Grandjean, J.C. Bailar, D. Gee, H.L. Needleman, D.M. Ozonoff, E. Richter, M. Soffritti, C.L. Soskolne

9

EIGHTH COLLEGIUM RAMAZZINI STATEMENT

Call for a reduction of exposure to benzene to the lowest possible level / *Richiesta di una riduzione dell'esposizione a benzene al minimo livello possibile*

13

EDITORIAL / EDITORIALE

Benzene: a haematopoietic and multi-organ carcinogen at any level above zero / *Benzene: un cancerogeno per i tessuti emopoietici e multipotente ad ogni livello al di sopra dello zero*

M.A. Mehlman

15

CRITICAL REVIEWS / RIVISTE CRITICHE

ANATOMIC SITES / SEDI ANATOMICHE

Neuroendocrine tumours / *Tumori neuroendocrini (C75.9)*

Tumori neuroendocrini: linee guida per la diagnosi e il trattamento / *Neuroendocrine tumours: an update about diagnosis and treatment*

F. Cirillo

37

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

GENERAL TOPICS / ARGOMENTI GENERALI

Centri di lettura dello screening citologico in Emilia Romagna / Reading centres of cytologic screening in Emilia-Romagna, Italy

R. Rapezzi, S. Prandi, V. Cocchi, A.C. Finarelli, C. Naldoni, A. Bondi

49

Influence of ultrasonic dissolution on the stability of cyclophosphamide powder for injection / Influenza della dissoluzione mediante ultrasuoni sulla stabilità di ciclofosfamida in polvere iniettabile

F.S. Robustelli della Cuna, M. Mella, A. Lanza, R. Gatti, A.M. Goglio

55

CLINICAL CASE REPORTS / RESOCONTI DI CASI CLINICI

Skin / Cute (C44.9)

Resoconto di un caso di metastasi gastriche da melanoma cutaneo / Report of a case of gastric metastases from skin melanoma

F. Tatulli, A. Caputi, V. Ciani, G. Chetta, N. Sasso

61

Meninges / Meningi (C70.9)

Meningioma papillare. Profilo immunoistochimico e ultrastrutturale di un caso / Papillary meningioma. Immunohistochemical and ultrastructural study of a case

L. Cuccurullo, M. Accardo, F. Ferraraccio, L. Columbano, F.A. Cioffi

63

OBITUARY / NECROLOGIO

Professor Olav Axelson

P. Comba, F. Forastiere

69



Ramazzini Days, Carpi, 2002

Giornate Ramazziniane, Carpi, 2002

Collegium Ramazzini Statements

Presentation

The Collegium Ramazzini is an independent, international academy comprised of renowned physicians and scientists, from 35 countries, who are experts in environmental and occupational health.

Statements issued by the Collegium reflect the official orientation of this academic body on topics of major interest in the field of environmental and occupational health. These orientations are adopted in full independence and are exclusively based on scientific knowledge and on ethical principle.

The Collegium Ramazzini has previously issued Statements on: 1) Benzidine and its Salts (1984); 2) Benzene (1993); 3) Chrysotile Asbestos (1993); 4) Oxygenated and Reformulated Gasolines (1995); 5) 1,3-Butadiene (1995); and 6) Call for a Ban on Asbestos (1999).

Morando Soffritti, MD
Secretary General
Collegium Ramazzini

Presentazione

Il Collegium Ramazzini è un'accademia internazionale indipendente, costituita da medici e scienziati di riconosciuta autorevolezza, esperti in medicina del lavoro ed ambientale ed appartenenti a 35 paesi.

Le "Posizioni" pubblicate dal Collegium riflettono l'orientamento ufficiale di questo consesso accademico su argomenti di grande interesse nell'ambito della salute ambientale ed industriale. Questi orientamenti vengono adottati in completa autonomia e si basano esclusivamente sulle conoscenze scientifiche e su principi etici.

Il Collegium Ramazzini ha espresso "Posizioni" su: 1) Benzidina e suoi Sali (1984); 2) Benzene (1993); 3) Amianto Crisotilo (1993); 4) Benzine Ossigenate e Riformulate (1995); 5) 1,3-Butadiene (1995); 6) Richiesta di Messa al Bando dell'Amianto (1999).

Dottor Morando Soffritti
Segretario Generale
Collegium Ramazzini

THE PRECAUTIONARY PRINCIPLE

IMPLICATIONS FOR RESEARCH AND PREVENTION IN ENVIRONMENTAL AND OCCUPATIONAL HEALTH



EUROPEAN RAMAZZINI FOUNDATION

Editors

**Philippe Grandjean, Morando Soffritti,
Franco Minardi and Jill V. Brazier**

European Journal of Oncology

Eur. J. Oncol. - Library Vol. 2

European Foundation of Oncology and Environmental Sciences "B. Ramazzini"

International Conference on: "The Precautionary Principle: implications for research and prevention in environmental and occupational health"

On 23rd and 24th October 2002, an international conference was held in Bologna on "The Precautionary Principle: implications for research and prevention in environmental and occupational health", promoted by the Collegium Ramazzini, the Emilia-Romagna Region, the European Environmental Agency and the Ramazzini Foundation.

The conference was attended by many scientists from various geographical areas of the world. The proceedings have been published this year in volume 2 of the European Journal of Oncology Library series and have been posted on the Collegium Ramazzini website www.collegiumramazzini.org.

In this number of the Journal we are pleased to publish the Commentary of the conference and the Statement on "The Precautionary Principle: implications for research and policy-making", which was approved by the Fellows of the Collegium Ramazzini during the Council of Fellows meeting held in Carpi on October 25th, 2003, within the framework of the Ramazzini Days.

Congresso Internazionale su: "Il Principio di Precauzione: implicazioni per la ricerca e la prevenzione nella medicina ambientale e del lavoro"

Il 23 e 24 ottobre 2002 si è svolto a Bologna un congresso internazionale su: "Il Principio di Precauzione: implicazioni per la ricerca e la prevenzione sulla medicina ambientale e del lavoro", promosso dal Collegium Ramazzini, dalla Regione Emilia-Romagna, dall'European Environmental Agency e dalla Fondazione Ramazzini.

Al convegno sono intervenuti studiosi provenienti da varie aree geografiche del mondo. Gli atti sono stati pubblicati nel corrente anno nel volume numero 2 della collana di libri del Giornale Europeo di Oncologia e sul sito del Collegium Ramazzini www.collegiumramazzini.org.

In questo numero del Giornale pubblichiamo con piacere il Commentario del Convegno e la Posizione su "Principio di Precauzione: implicazioni sulla ricerca e sull'azione politica", approvato dai Fellows del Collegium Ramazzini nella seduta del Consiglio dei Fellows che si è tenuta il 25 ottobre 2003 a Carpi, nell'ambito delle Giornate Ramazziniane.

MORANDO SOFFRITTI

Secretary General/*Segretario Generale*
Collegium Ramazzini

**THE PRECAUTIONARY PRINCIPLE:
IMPLICATIONS FOR RESEARCH
AND POLICY MAKING**

**IL PRINCIPIO DI PRECAUZIONE:
IMPLICAZIONI PER LA RICERCA E
LA PROMULGAZIONE DI LEGGI**

The Collegium Ramazzini endorses the use of the Precautionary Principle for protecting human health and sustainability of the environment. The Precautionary Principle 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. 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 can be 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, 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 action is taken on an agent or an exposure. The frequent insistence that a link between exposure and disease be established with 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 approach, science preserves its authority and enhances the impact of the alarms that it raises. However, the absence of evidence about harmful impacts is not evidence of their absence. This scientific approach needs to be more explicit and reconciled with public policy on health and environment.

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 health and environment agencies at all levels to increase emphasis on precaution.
- Increased allocation of public resources to support research, training, education and policy analysis in precautionary approaches, with major investment in developing better instruments to assess the potential harms and benefits of products and technologies, both new and old, and to stimulate innovations in the development of alternatives.
- 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 programmes aimed at the early detection of any unwanted consequences from products and technologies.

COUNCIL OF FELLOWS
October 25th, 2003

Implications of the Precautionary Principle for research and policy making

Implicazioni del Principio di Precauzione sulla ricerca e sull'azione politica

Philippe Grandjean^{1,2}, John C. Bailar³, David Gee⁴, Herbert L. Needleman⁵, David M. Ozonoff⁶, Elihu Richter⁷, Morando Soffritti⁸, Colin L. Soskolne⁹

¹Institute of Public Health, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

²Department of Environmental Health, Harvard School of Public Health, Boston, MA, USA

³Professor Emeritus, University of Chicago, IL, USA

⁴European Environment Agency, Copenhagen, Denmark

⁵Departments of Psychiatry and Pediatrics, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, USA

⁶Department of Environmental Health, Boston University School of Public Health, Boston, MA, USA

⁷Unit Occupational and Environmental Medicine, Hebrew University School of Public Health and Community Medicine, Jerusalem, Israel

⁸European Foundation of Oncology and Environmental Sciences "B. Ramazzini", Bentivoglio, Bologna, Italy

⁹Department of Public Health Sciences and the John Dossetor Health Ethics Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

Summary

The Precautionary Principle has recently been formally introduced into national and international law. The key element is the justification for acting in the face of uncertainty. The Precautionary Principle is thereby a tool for avoiding possible future harm associated with suspected, but not conclusive, environmental risks. Accordingly, the burden of proof is shifted from demonstrating the presence of risk to demonstrating the absence of risk. Past experience shows the costly consequences of disregarding early warnings about environmental hazards. Today, the need for applying the Precautionary Principle is even greater. New research is needed to expand current insight into disease causation, to elucidate the full scope of potential adverse implications resulting from environmental pollutants, and to identify opportunities for prevention. Research approaches should be developed and strengthened to counteract innate ideological biases and to support our confidence in applying the Precautionary Principle for decision-making in the public policy arena. *Eur. J. Oncol.*, 9 (1), 9-12, 2004

Key words: environmental health, hazardous substances, primary prevention, public health, risk assessment

Introduction

The Precautionary Principle has recently been formally introduced into national and international law, including the European Union¹. The key element is the justification for acting in the face

Riassunto

Il Principio di Precauzione è stato recentemente introdotto ufficialmente nelle legislazioni nazionali ed internazionali. L'elemento chiave è la giustificazione ad agire in situazioni di incertezza. Il Principio di Precauzione è quindi un mezzo per evitare possibili danni futuri dovuti a rischi ambientali possibili ma non ancora definiti. L'onere della prova passa quindi dal dimostrare la presenza di un rischio al dimostrare l'assenza di un rischio. Le esperienze del passato hanno dimostrato le spiacevoli conseguenze di trascurare i primi allarmi sui rischi ambientali. La necessità di applicare il Principio di Precauzione è oggi ancora maggiore. Sono necessarie nuove ricerche per ampliare le attuali conoscenze sulle cause delle malattie, per chiarire completamente le potenziali implicazioni negative per la salute, conseguenza dell'inquinamento ambientale, e per identificare le possibilità di prevenzione. Gli orientamenti della ricerca dovrebbero essere sviluppati e rafforzati per contrastare pregiudizi innati e sostenere la nostra fiducia nell'applicare il Principio di Precauzione nell'ambito della sanità pubblica. *Eur. J. Oncol.*, 9 (1), 9-12, 2004

Parole chiave: salute ambientale, sostanze pericolose, prevenzione primaria, sanità pubblica, determinazione dei rischi

of uncertain knowledge about risks from environmental exposures. Appropriate public health action should be taken in response to limited, but plausible and credible, evidence of likely and substantial harm. The Precautionary Principle is thereby aimed at avoiding possible future harm associated with suspected, but not conclusive, environmental risks. The burden of proof is shifted from demonstrating the presence of risk to demonstrating the absence of risk.

Received/Pervenuto 14.11.2003 - Accepted/Accettato 30.12.2003

Address/Indirizzo: Dr. Philippe Grandjean, Winslowparken 17, DK-5000 Odense C, Denmark. - Tel 0045/6550.3769 - Fax: 0045/6591.1458

Precautionary action is as old as medicine, and prudence has always been advised in regard to decisions affecting human health. The lack of precautionary or preventive action despite early warnings has resulted in severe harm to health and damage to ecosystems². Too often, unreasonable delays in preventive responses have resulted from demands for detailed proof of causation, including detailed knowledge of mechanistic actions. The adverse effects on human health and ecosystem sustainability have in some cases been catastrophic.

Asbestos is perhaps the best known example of a preventable health hazard for which there was credible evidence of harm long before the causal link was generally accepted. However, asbestos is still being used in many developing countries, with attendant increases in cancer and pulmonary disease. The same sequence of events occurred with other toxic materials, such as benzene. The toxic properties of these well-known hazards have now been clearly documented, and prevention efforts are justified without any need to employ the Precautionary Principle. Had appropriate action been taken when the first evidence of adverse effects emerged, then a truly precautionary intervention could have ensued, preventing much illness and many premature deaths.

Similarly, when tetraethyllead was synthesized in the 1920s, a strong precautionary argument was made by Professor Yandell Henderson of Yale University. A medical physiologist and chemical warfare expert, Henderson warned, based on best available evidence, that adding lead to gasoline would poison the entire planet. His warning was ignored, and the large-scale production of lead additives began. At its peak, 250,000 tons of lead were released into the atmosphere each year in the US alone. The cessation of this practice began in the 1970s and was completed in the US, most of Europe and Japan 20 years later. The US average blood-lead concentration dropped from 155 µg/L (0.77 µmol/L) in 1970 to 21 µg/L (0.10 µmol/L) in 1999. For the US birth cohort of children born in 1998 alone, the monetized benefit from this lowering of their blood-lead concentration was estimated by the US Centers for Disease Control and Prevention to range in the hundreds of billions of dollars. Still, while this primary prevention effort was highly successful, it was not precautionary, because it was initiated only after a preponderance of evidence had become available.

Many new and potentially hazardous chemicals are released to the environment, and the magnitude of exposures and their effects, singly and in combination, are only partially understood. The need for precautionary action has therefore increased. In recognizing this imperative, the European Commission Communication (2000) on the Precautionary Principle states that precautionary decisions are indicated when preliminary objective scientific evaluation suggests reasonable grounds for concern. Limited precautionary action has been taken so far in relation to more proximate exposures. In regard to global change, precaution needs to be exercised in relation to the more complex mix of determinants that act to degrade environmental carrying capacities and endanger sustainable development. Maintaining the integrity of the global environment, and its various life-supporting ecosystems, is essential to human survival. The greater the potential for disastrous, large-scale, or catastrophic impacts on health related to environmental degradation, the greater the need for precaution. Because the consequences for human health and well-being from changes of global scale are orders of magnitude greater than those from more proximate hazards, precautionary strategies and actions are even more critical for minimizing harm.

Lessons from applying precaution

In public health, removing one risk may produce others. Removing one risk may incur other unanticipated hazards. When the evidence on leaded gasoline was finally considered to be convincing, other additives were sought to raise octane levels. From a precautionary viewpoint, enough was known about benzene to impose limits on the content of this carcinogen in gasoline: instead, methyl-*tert*-butylether (MTBE), a less studied octane booster, was employed. This substance has now produced health risks from severe water contamination, which was not easily anticipated despite the highly persistent nature of MTBE. Another example relates to the microbiological safety of drinking water in developing countries, where precaution suggested that well water from underground aquifers would be less likely to be contaminated with infectious agents than surface water. However, the release of arsenic and fluoride from naturally occurring subterranean sources have now caused mass intoxication in Bangladesh and India.

In these examples, the preventive approach failed to anticipate the risk from the substitutes. Especially when the uncertainty about risks is high, the likelihood of a false positive will invariably increase, and the need to assess alternatives and evaluate the intervention becomes even more important.

Current risk assessment and standard-setting are generally based on limited information about single hazards. Uncertainty has been taken into account when hypothesized safety factors or uncertainty factors were invoked to calculate legal limits. However, the history of declining exposure limits for many substances testifies to the failures of this approach. Early warnings were often misinterpreted or ignored².

Science for precaution

The tools and principles of science, when applied to public policy, have often implicitly worked against precaution. In particular, the absence of universally accepted evidence demonstrating damage or harm has often been misinterpreted as evidence of safety.

Implementing a precautionary approach in decision-making must be linked to established scientific principles. The Precautionary Principle therefore has important implications for scientific strategies, methods, interfaces with policy-making, and risk communication. These considerations present science with opportunities and challenges and relate to the way scientific studies are conducted and how the results are communicated. The interrelationships, for instance between science and policy, should reflect the needs for new knowledge generated from using precaution in public-health decisions. Although most attention has been paid to specific applications of the Precautionary Principle, this prevention strategy should stimulate the development and strengthening of research approaches that aim to increase public confidence in applying the Precautionary Principle for decision-making.

Science has traditionally placed emphasis on replication of results or observations. Still, by insisting on confirmatory evidence, science may penalize false positives more than false negatives. A probability value of 5% is usually required to reject an hypothesis of no effect, but this tradition places an unreasonable preference on the absence of an effect. Under the Precautionary Princi-

ple, incomplete, but credible, scientific documentation may be deemed sufficient for decision-making.

A mere replication or simple extension of the scientific knowledge base beyond a minimal requirement may no longer constitute a priority. While current research has often focussed on simplified model systems and the effects of single hazards, one by one, an expanded and refocussed research agenda should rather emphasize the sources of variability and uncertainty, including individual susceptibility, impacts of mixed and variable exposures, susceptible life-stages, and vulnerable communities.

Statistical analysis of research data has aimed at testing whether an effect could be considered a possible result of natural variability. This strategy has been considered a necessary part of scientific rigour, although it is often coupled with demands for the demonstration of causality. It is also necessary to consider both the severity of potential adverse outcomes and their likelihood. Although a prerequisite for implementing the Precautionary Principle, such information has not usually been considered a standard product of the scientific endeavour.

In general, statistical analysis of research data tends to bias the conclusions toward the null hypothesis. For example, the standard application of a limit of 5% for 'statistical significance' will rule out many findings of causal associations, simply because the study was too small and thus lacked statistical power, or because some imprecision or limited sensitivity of the parameters precluded a more definitive observation. Table 1 shows examples that current research practices are biased by producing many more instances of false negatives than false positives.

Decisions should not be based on an assumed certainty of scientific information, but rather on an estimate of the uncertainty. Science should therefore provide the necessary information to facilitate consideration of the risk of both false negatives and false positives. Type II errors, i.e., overlooking a true hazard, become an essential issue in the decision-making process.

Uncertainty has always been recognized as a key component of our incomplete understanding of human disease and the environment. An important goal now is to achieve a better character-

ization of these uncertainties and their implications. Appropriate statistical methods should therefore be developed and applied to determine the likelihood of adverse or extreme outcomes and how they may be affected by precautionary actions.

Science should continue to update existing knowledge and to improve communication of risks as well as their associated uncertainties. In analyzing and communicating such information, science should help frame the debate and facilitate the dialogue among stakeholders on where and how to apply the Precautionary Principle.

Research should emphasize studies to determine the societal impacts and benefits of preventive interventions. Such research is required to determine if precautionary action was successful and to modify actions that may have resulted in new risks.

Conclusions

Scientific uncertainty has too often been the excuse for limiting and postponing preventive efforts. In addition, debates over details in risk assessments have resulted in delayed action to protect the public health and the environment. New research is needed to expand current insight into disease causation, to elucidate the full scope of potential implications for health and the biosphere resulting from pollutants and other hazards, and to identify opportunities for the prevention of risks at the source. Recognizing the nature of cumulative, complex and synergistic effects on whole ecosystems, essential to the support of life, is foundational to precautionary action, and necessary to avert the serious consequences of ecological disintegrity.

Current scientific research agendas, funding priorities, science education, risk communication, and science policy need to be re-examined in light of the Precautionary Principle. The need for better links between science and public policy in the spirit of the Precautionary Principle are clearly warranted as reflected in the Statement from the Collegium Ramazzini published in the present issue of the Journal.

Table 1 - Potential sources of bias in environmental research using standard methodological approaches in experimental and observational studies.

Type of scientific study	Methodological feature	Main direction of error
Experimental study	High doses	False positive
	Limited number of dose levels	False negative
	Low genetic variability	False negative
	Exposure to single substances only	False negative
	Chronic rather than foetal-lifetime exposure	False negative
	Standard effect measures	False negative
Observational studies	Inappropriate controls	False negative
	Exposure misclassification	False negative
	Concomitant exposures	False positive
	Residual confounding	False positive
	Inadequate follow-up	False negative
	Lost cases	False negative
Both types of studies	Low statistical power (e.g., small studies)	False negative
	Use of 5% probability level to minimize chances of false positives	False negative
	Use of 20% probability level to minimize chances of false negatives	False negative
	<i>Post hoc</i> hypothesis	False positive
	Scientific and social pressure against false alarm	False negative
	Publication bias toward positive findings	False positive

We recommend that researchers, in collaboration with research funding agencies, regulatory bodies and stakeholders, revise current scientific paradigms and traditions to ensure that scientific information is used in decision-making within a framework that facilitates the application of precaution to supplement prevention.

Acknowledgements

This paper was developed under the auspices of the Collegium Ramazzini and its Committee on the Precautionary Principle. Substantial input was received at the Collegium's International Scientific Conference on The Precautionary Principle: Implications for Research and Prevention in Environmental and Occupational Health, Bologna, 23-24 October, 2002 (Grandjean *et al*, 2003). The proceedings from this conference have been published as European Journal of Oncology Library Vol. 2 (2003) and are available at www.collegiumramazzini.org

References

1. European Commission. Communication from the Commission on the Precautionary Principle (COM(2000) 1). Brussels, 2000. URL: http://europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/pub/pub07_en.pdf (accessed, 30 November, 2003).
2. European Environment Agency. Late lessons from early warnings: the precautionary principle 1896-2000. Environmental Issue Report No. 22. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2001.
3. Grandjean P, Soffritti M, Minardi F, Brazier J, eds. The Precautionary Principle. Implications for research and prevention in environmental and occupational health. Eur J Oncol Library 2: 1-245. URL: <http://www.collegiumramazzini.org> (accessed, 30 November, 2003).

EIGHTH COLLEGIUM RAMAZZINI STATEMENT

CALL FOR A REDUCTION OF EXPOSURE TO BENZENE TO THE LOWEST POSSIBLE LEVEL

RICHIESTA DI UNA RIDUZIONE DELL'ESPOSIZIONE A BENZENE AL MINIMO LIVELLO POSSIBILE

The Collegium Ramazzini reaffirms its previously stated position (1993) that benzene is a human carcinogen. The Collegium Ramazzini affirms further, based on recently published evidence, that there is no reason to believe there is a threshold level of exposure below which benzene is not a carcinogen.

The Collegium Ramazzini is an international society of physicians and health scientists dedicated to occupational and environmental medicine and to protection of the health of working men and women worldwide. Periodically the Collegium Ramazzini issues position statements and advisories and holds conferences on occupational, environmental, and public health issues of pressing importance to public health. In this document, the Collegium Ramazzini expresses its deep concern about the continuing exposure of workers in developing nations as well as in industrially developed nations to benzene, a proven, potent cause of human cancer.

Occupational exposure to benzene occurs in the manufacture of benzene and related chemicals in refineries and petrochemical and coke plants; in the manufacturing, distribution and sale of gasoline; in the painting trades where benzene-contaminated solvents are used in paint products; and in the tire industry where solvents are contaminated with benzene. Some of the most hazardous exposures to benzene today involve the use of benzene-contaminated gasoline as a solvent, particularly in developing countries, and the use of benzene as a solvent in small industries such as shoe manufacturing.

Benzene is a proven human carcinogen. Its carcinogenicity has been affirmed repeatedly by the US Environmental Protection Agency (EPA), the US National Toxicology Program (NTP), the US Occupational Safety and Health Administration (OSHA), and the International Agency for Research on Cancer (IARC) of the World Health Organization (WHO), and by similar agencies in many other nations of the world. Benzene has been associated with the induction of a range of haematopoietic and lymphoreticular malignancies including all of the major forms of acute and chronic leukaemia, non-Hodgkin's lymphoma, multiple myeloma, and the myelodysplastic syndromes (MDS).

In 1997, Hayes *et al.* reported a significant dose-response relationship between benzene exposure and all lymphohaematopoietic cancers (LHP) combined as well as for leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma examined separately. In this analysis, a cumulative benzene exposure of 4.3 ppm-year was associated with a statistically significant, 2-fold increased risk for all LHP cancers. This effect corresponds to a time-weighted average (TWA) exposure of 0.11 ppm per year over a 45-year working lifetime. In this study, a cumulative exposure of 6.7 ppm-years was associated with a 3-fold elevation in the risk of acute non-lymphocytic leukaemia including MDS; this finding was statistically significant.

A recent study of Australian petroleum workers (Health Watch Eleventh Report, 2002) exposed to benzene has demonstrated a statistically significant 50% increase in the incidence of leukaemia. For this cohort, the average intensity of benzene exposure was 0.2 ppm, well below the standard recommended by American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) of 0.5 ppm in 1997 and the current OSHA 1 ppm TLV-TWA standard, - with 98% of the cohort having exposures below 1.0 ppm. The average cumulative exposure to benzene in this population was only 4.9 ppm-years. The European carcinogenesis directive (90/394/EEC amended by directives 97/42/EC and 97/38/EC) obliges the European member states to bring into force a maximum occupational exposure limit of 1 ppm. Member states are free to set a lower limit.

In summary, the elevated risks of leukaemia and lymphoma observed in these recent, carefully conducted, peer-reviewed studies are the consequence of exposures to benzene that occur at levels well below current permissible exposure limits in the USA and in other countries.

The Collegium Ramazzini states that these current data overwhelmingly support the immediate need to reduce the occupational standard exposure limit for benzene. Continued maintenance of an occupational exposure standard for benzene at a level above 40 ppb presents a serious, needless, and preventable risk of cancer to working men and women throughout the world.

The Collegium Ramazzini calls upon occupational and environmental authorities in nations around the world to take immediate action to reduce the standard for occupational exposure to benzene well below the standard recommended by ACGIH (0.5 ppm in 1997) and the current OSHA 1 ppm (TLV-TWA) standard.

The Collegium Ramazzini calls upon occupational and environmental authorities in nations around the world to take immediate action to reduce the standard for occupational exposure to benzene and, at the same time, to reduce general exposure to the lowest possible level.

Fundamental references

- Collegium Ramazzini Position Paper on Benzene. 10 September 1993.
- European Commission. EUR 15091 – Occupational exposure limits: Recommendations of the Scientific Expert Group 199-1992. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 1994.
- Hayes RB, Yin SN, Dosemeci M, *et al.* Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. For the Chinese Academy of Preventive Medicine—National Cancer Institute Benzene Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1065-71.
- Hayes RB, Yin SN, Rothman N, *et al.* Benzene and lymphohematopoietic malignancies in China. *J Toxicol Environ Health* 2000; 61: 419-32.
- Health Watch Eleventh Report. The Australian Institute of Petroleum Health Surveillance Program. The University of Adelaide Department of Public Health, Adelaide University, South Australia, 2002, 1-75.
- Huff JE, Haseman JK, De Marini DM, *et al.* Multiple site carcinogenicity of benzene in Fisher 344 rats and B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect* 1989; 82: 125-63.
- Infante PF. Benzene and leukemia: cell types, latency and amount of exposure associated with leukemia. In Imbriani M, Ghittori S, Pezzagno G, *et al.* (eds). Update on benzene, advances in occupational medicine and rehabilitation. Fondazione Salvatore Maugeri Edizioni, Pavia, Italy, 1995, 107-20.

- Maltoni C, Ciliberti G, Cotti G, *et al.* Benzene an experimental multipotential carcinogen: results of the long-term bioassays performed at the Bologna Institute of Oncology. *Environ Health Perspect* 1989; 82: 109-24.
- Mehlman MA. Benzene health effects: unanswered questions still not addressed. *Am J Ind Med* 1991; 20: 707-11.
- Mehlman MA. Benzene – A hematopoietic and multi-organ carcinogen at any level above zero. *Eur J Oncol*, in this volume.
- Pearce NE, Howard JK. Occupation, social class and male cancer mortality in New Zealand, 1974-1978. *Int J Epidemiol* 1986; 15: 456-62.
- Raaschou-Nielsen O, Hertel O, Thomsen BL, *et al.* Air pollution from traffic at the residence of children with cancer. *Am J Epidemiol* 2001; 153: 433-43.
- Rinsky RA, Smith AB, Hornung R, *et al.* Benzene and leukemia: an epidemiologic risk assessment. *N Engl J Med* 1987; 316: 1044-50.
- Smith MT, Zhang L, Wang Y, *et al.* Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene. *Cancer Res* 1998; 58: 2176-81.
- Yin S-N, Hayes RB, Linet MS, *et al.* An expanded cohort study of cancer among benzene-exposed workers in China. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 1339-41.

Benzene: a haematopoietic and multi-organ carcinogen at any level above zero

Benzene: un cancerogeno per i tessuti emopoietici e multipotente ad ogni livello al di sopra dello zero

Myron A. Mehlman

Robert Wood Johnson School of Medicine and Dentistry, Piscataway, NJ, USA and The University of Texas Medical Branch at Galveston, TX, USA

Summary

Benzene has been shown to be both an animal and a human carcinogen. This manuscript reviews the history, mechanisms, animal and human data that show that benzene is a multipotential carcinogen that causes human cancers of the lymphohaematopoietic system (all types of leukaemias, lymphomas, multiple myeloma), the kidney, stomach, colon, and lung. Data on benzene-containing solvents and their potential synergistic and/or additive effects are also presented. Recommended workplace benzene exposure levels have been decreased over time, and we conclude that there is no safe level of benzene above zero that can protect workers and the public from the carcinogenic effects of benzene. Eur. J. Oncol., 9 (1), 15-36, 2004

Key words: benzene, haematopoietic tumours, lymphoreticular tumours, solid tumours, solvents

To the late Professor Cesare Maltoni and all of his staff, especially Professors Morando Soffritti, Fiorella Belpoggi, Franco Minardi and Jill V. Brazier of the European Ramazzini Foundation of Oncology and Environmental Sciences Bentivoglio (Bologna), Italy

Introduction

The early history of the manufacture of benzene in Europe during World War I and its subsequent manufacture in the United States is elegantly detailed by Alice Hamilton¹. After the introduction of benzene into gasoline, the carcinogenic effects of

Riassunto

Il benzene è stato dimostrato cancerogeno nell'animale e nell'uomo. Questo lavoro passa in rassegna la storia, i meccanismi di azione, i dati sull'animale e sull'uomo che dimostrano che il benzene è un cancerogeno multipotente che provoca nell'uomo tumori del sistema linfoemopoietico (tutti i tipi di leucemie, linfomi, mieloma multiplo), del rene, dello stomaco, del colon e del polmone. Vengono presentati anche dati sui solventi contenenti benzene e sui loro potenziali effetti sinergici e/o additivi. I livelli raccomandati di esposizione a benzene nei luoghi di lavoro sono diminuiti nel tempo, e concludiamo che non c'è nessun livello sicuro di benzene sopra lo zero che possa proteggere i lavoratori e la popolazione dai suoi effetti cancerogeni. Eur. J. Oncol., 9 (1), 15-36, 2004

Parole chiave: benzene, tumori del sistema emopoietico, tumori del sistema linforeticolare, tumori solidi, solventi

benzene on many organ systems in animals and humans became known, and occupational benzene standards have been steadily decreased from 100 parts per million in 1946 to one part per million in 1987. Even lower benzene exposure levels of workers and the general public are currently recommended. This manuscript describes the nature of petroleum hydrocarbons, particularly benzene, and the evidence supporting the carcinogenic nature of benzene.

Liquid gasoline is one of the better-known complex mixtures of petroleum chemicals to which humans are exposed. It consists of more than 150 hydrocarbons with a boiling range of approximately 140°C to 180°C. The gasoline hydrocarbons are comprised of about 50% to 70% of alkanes (paraffins), which consist of straight-chain hydrocarbons of C₄ to C₁₂ range; isoparaffins, which are branched-chain hydrocarbons of about the same size; alkenes (olefins), approximately 5% of which are unsaturated linear and branched-chain hydrocarbons; and naphthenics, which are saturated cyclics.

Received/Pervenuto 31.7.2003 - Accepted/Accettato 2.9.2003
Address/Indirizzo: Dr. Myron A. Mehlman, 7 Bouvant Drive, Princeton, NJ 08540, USA - Tel. 001/609/6834750 - Fax 001/609/6830838
E-mail: mehlman@patmedia.net

Aromatics, which are the most dangerous carcinogenic chemicals in gasoline, are present at 30% to 40% and consist mainly of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene. Other blending agents and additives are also present in gasoline. As a result of phasing out in recent years of both tetraethyl and tetramethyl lead (which are strong neurotoxicants from gasolines), alcohols and others such as ethanol, methanol, tert-butyl alcohol, and methyl-tert-butyl ether (MTBE) are being added at 5% to 20% to the gasoline. Gasoline contains more than 1,000 possible chemical substances.

Total benzene usage today in the United States is approximately 11 billion gallons per year², and an estimated 238,000 people are occupationally exposed to benzene in petrochemical plants, petroleum refineries, and other operations. More than 90% of the benzene produced in the United States is manufactured from petroleum sources. Benzene has been shown to be a carcinogen in both animals and humans and is currently classified by the US Environmental Protection Agency (EPA), the Occupational Safety and Health Association (OSHA), the National Toxicology Program (NTP) of the National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) and the International Agency for Research of Cancer (IARC) as a human carcinogen.

Carcinogenicity of benzene: animal and human data

In 1974, IARC³ concluded that "Benzene has been tested only in mice by subcutaneous injection and skin application. The data reported do not permit the conclusion that carcinogenic activity has been demonstrated". The IARC did revise the monograph on benzene in 1982⁴, and evaluated benzene as a human carcinogen, recognizing, however, only a causal association with leukaemias.

Maltoni and Scarnato⁵ published preliminary results on carcinogenicity of benzene in 1977. Two years later, Maltoni and Scarnato⁶ published a more definitive study showing that benzene caused Zymbal gland carcinomas (fig. 1) in Sprague-Dawley rats at two dose levels with a dose-response relationship.



Fig. 1. Rat with a Zymbal gland carcinoma

Many additional studies⁷⁻²⁶ demonstrated that benzene caused tumours in rats and mice that included cancers of the Zymbal gland, oral cavity, lung, skin, nasal cavity, forestomach, Harderian gland, mammary gland, ovary, and uterus; lymphoma; haemolymphoreticular neoplasia; and all types of leukaemias. Table 1 compares the organs in which cancers appeared in rats and mice exposed to benzene in the early studies of Maltoni *et al*¹⁴ and Huff *et al*²⁵.

In 2002, Huff²⁷ detailed the concordance of findings in long-term experiments of carcinogenesis by various substances in studies by the National Toxicology Program in the United States and the Ramazzini Foundation in Europe and underscored the pertinence of long-term animal studies of potential carcinogens.

Carcinogenicity of gasoline vapours containing benzene

Studies on the carcinogenicity of gasoline vapours were carried out by the American Petroleum Institute (API) on whole, vapourized gasoline in B6C3F1 mice and Fisher 344 rats²⁸. The mice and rats were exposed for two years to gasoline vapours at concentrations of 67 ppm, 292 ppm, and 2,056 ppm. The results showed a significant increase in tumours in the female mice at a high dose of exposure (Table 2). A dose-related increase in kidney tumours (adenomas and carcinomas) was also reported (Table 3).

The increase in carcinomas of the liver in both male and female mice is dose related and thus significant for evaluation of human risk.

Studies by Swenberg *et al*²⁹ of the Chemical Industry Institute of Toxicology (CIIT) sponsored by the petroleum industry through the API suggest that the renal tumours in male rats may be due to alpha 2 μ -globulin nephropathy and that neoplastic kidney lesions in rats chronically exposed to vapourized gasoline were due to accumulation of hyaline droplets in the proximal tubule of the rat kidney causing cell injury or death, which in turn stimulated cell proliferation and neoplasia²⁹⁻³². Alpha 2 μ -globulin is excreted via the kidney glomerulus. Because male rat kidneys retain this product and female rats rapidly metabolize and excrete it³¹, Swenberg *et al*²⁹ suggested that the male rat kidney tumours were due to a mechanism that was not applicable to human carcinogenesis. Because of several inconsistencies and important data gaps in the hypothesis linking kidney cancer with alpha 2 μ -globulin nephropathy in rats, Melnick³³ described an alternative hypothesis with the same data to show how alpha 2 μ -globulin

Table 1 - Cancers caused by benzene exposure in rats and mice

Source: Maltoni <i>et al</i> ¹⁴	Source: Huff <i>et al</i> ²⁵
Zymbal gland	Zymbal gland
Oral cavity	Oral cavity
Skin	Skin
Forestomach	Forestomach
Mammary gland	Mammary gland
Haemolymphoreticular neoplasia	Lymphoma, leukaemia
Lung	Lung
Hepatomas, angiosarcoma of liver	---
Nasal cavities	---
---	Harderian gland
---	Preputial gland
---	Ovary, uterus

Table 2 - Incidence of liver tumours in male and female mice exposed to whole vapourized gasolines^a

Test group	Animals examined	Total tumours	Adenomas	Carcinomas
Males				
Controls	51	23	12	11
Low dose	42	18	4	14
Mid dose	44	21	5	16
High dose	54	25	5	20
Females				
Controls	57	8	1	7
Low dose	52	10	4	6
Mid dose	57	13	4	9
High dose	56	28	8*	20
Males and females				
Control	108	31	13	18
Low dose	94	28	8	20
Mid dose	101	34	9	25
High dose	110	53	13	40

^aFrom MacFarland *et al*²⁸

* p <0.05

Table 3 - Incidence of kidney tumours in male rats exposed to whole vapourized gasoline^a

Test group	Number of animals necropsied	Number of kidney tumours
Controls	49	0
Low dose (67 ppm)	59	
Carcinoma		1
Mid dose (292 ppm)	56	
Carcinoma		2
Adenoma		2
High dose (2,056 ppm)	52	
Carcinoma		6
Adenoma		1

^aFrom MacFarland *et al*²⁸

may simply serve as a transport protein increasing the delivery of a toxicant or protoxicant to proximal tubule cells. Although neither hypothesis has been validated experimentally, the plausibility of the latter hypothesis was demonstrated in the physiological model of Kohn and Melnick³⁴. Because the human studies (*vide infra*) contribute sufficient evidence to classify gasoline as a human carcinogen, the significance of the observations in male rats is not clear.

Thus, our current scientific knowledge establishes gasoline as a carcinogen: 1) all known human carcinogens have been demonstrated to cause cancer in animals, 2) findings by the API²⁹ that gasoline causes cancer in at least two species, rat kidney and mouse liver, and 3) human epidemiology studies showing significant increases in cancer of the liver, kidney, colon and other digestive organs, respiratory system, skin, pancreas, prostate, brain, and all haematopoietic and lymphatic systems.

Interpretation of epidemiological studies for establishment of causation

Causation is a judgement about results of a study. A scientist takes into account biological plausibility, animal studies, exposure, mechanistic studies, if available, and biases that may be introduced into the study.

Sir Bradford Hill in his classical lecture on “causal” relationships of epidemiological studies described nine points of view that have, in recent years, been severely mischaracterized by epidemiologists, toxicologists, and corporate legal counselors who have economic interests in the outcome of these studies.

Sir Bradford Hill’s points of view are not logical necessities at all. They are not meant to replace good common sense and unbiased judgement. Indeed, he states that “Clearly none of these nine viewpoints can bring indisputable evidence for or against a ‘cause and effect’ hypothesis and equally, none can be required as a *sine qua non*”. His points of view must be used and interpreted judiciously. Sir Bradford Hill states:

“However, before deducing ‘causation’ and taking action we shall not invariably have to sit around awaiting the results of the research. The whole chain may have to be unraveled or a few links may suffice. It will depend on circumstances”.

In reaching a conclusion, Sir Bradford Hill advocates action when circumstances warrant it. Following is a description of the nine guidelines.

1. Strength

“We must not be too ready to dismiss a cause and effect hypothesis merely on the grounds that the observed association appears to be slight. There are many occasions in medicine when this is in truth so. Relatively few persons harboring the meningococcus fall sick of the meningococcal meningitis. Relatively few persons occupationally exposed to rats urine contract Weil’s disease”.

2. Consistency

“We have, therefore, the somewhat paradoxical position that the different results of a different inquiry certainly cannot be held to refute the original evidence: yet the same results from precisely the same form of inquiry will not invariably greatly strengthen the original evidence. I would myself put a good deal of weight upon similar results reached in quite different ways, e.g. prospectively and retrospectively”.

3. Specificity

“Milk as a carrier of infection and, in that sense, the cause of disease can produce such a disparate galaxy as scarlet fever, diphtheria, tuberculosis, undulant fever, sore throat, dysentery, and typhoid fever. Before the discovery of the underlying factor, the bacterial origin of disease, harm would have been done by pushing too firmly the need for specificity as a necessary factor before convicting the dairy”.

“In short, if specificity exists we may be able to draw conclusions without hesitation; if it is not apparent, we are not thereby necessarily left sitting irresolutely on the fence”.

4. Temporality

*The exposure must come before the event:
“Which is the cart, and which is the horse?”*

5. Biological gradient

“Often the difficulty is to secure some satisfactory quantitative measures of the environment which will permit us to explore the dose-response. But we should invariably seek it”.

6. Plausibility

“It will be helpful if the causation we suspect is biologically plausible. But this is a feature I am convinced we cannot demand. What is biologically plausible depends upon the biological knowledge of the day”.

“In short, the association we observe may be one new to science or medicine and we must not dismiss it too lightly as just too odd. As Sherlock Holmes advised Dr. Watson ‘when you have eliminated the impossible, whatever remains, however improbable must be the truth’”.

7. Coherence

“Nevertheless while such laboratory evidence can enormously strengthen the hypothesis and, indeed, may determine the actual causative agents, the lack of such evidence cannot nullify the epidemiological associations in man”.

8. Experiment

Here Sir Bradford Hill states that occasionally it is possible to appeal to experimental, or semi-experimental evidence such as the administration of a preventive action. An example of such would be the removal of lead from gasoline and the drop in blood lead levels.

9. Analogy

“In some circumstances it would be fair to judge by analogy. With the effects of thalidomide and rubella before us we would surely be ready to accept slighter but similar evidence with another drug or viral disease in pregnancy”.

Finally, Sir Bradford Hill states:

“What I do not believe - and this has been suggested - that we can usefully lay down some hard-and-fast rules of evidence that must be obeyed before we can accept cause and effect. None of my nine viewpoints can bring indisputable evidence for or against the cause-and-effect hypothesis and none can be required as a sine qua non. What they can do, with greater or less strength, is to help us to make up our minds on the fundamental question - is there any other way of explaining the set of facts before us, is there any other way of explaining the set of effects before us, is there any other answer equally, or more likely than cause - and - effect?”

“All scientific work is incomplete - whether it be observational or experimental. All scientific work is liable to be upset or modified by advancing knowledge. That does not confer upon us a freedom to ignore the knowledge we already have, or to postpone the action that it appears to demand in a given time.”

Bradford Hill’s views on causation are consistent with those of Dr. John Snow, a London physician, who found that virtually all of the 83 people who died of cholera in the Golden Square area of London had drawn water from the popular Broad Street pump. He recommended that the pump handle be removed. Authorities

agreed, thereby preventing further infection from that source. Snow’s views on cholera causation were not shared by a majority of scientists including the Royal College of Physicians (1853-1854) and the General Board of Health (1854)³⁵. The link between polluted water and cholera came 30 years later with Koch’s discovery of *cholera vibrio* in 1884. Meanwhile, many lives were saved.

The source of information for 95% certainty determinations include epidemiological and animal studies and take into consideration target tissues, metabolism, mechanism, pathophysiology of disease as relates to chemical exposures, biological plausibility, more likely than not, which is standard methodology used by scientists in the field. The generally accepted standard of scientific probability of data showing a *p* value of 0.05 or less, a figure generally accepted as demonstrating a likelihood of 95% that the association shown is not due to chance.

Absence of evidence of effect is not equal to evidence of absence of effect

McMichael³⁶ reviewed studies that allegedly showed that exposure to benzene did not produce effects on the haematopoietic system in humans. McMichael’s analysis showed that:

- The large mortality study of Thorpe³⁷ of 38,000 petroleum workers potentially exposed to benzene has often been cited as showing no evidence of significant leukaemia excess because of exposure to benzene. This interpretation ignores the comparison of the exposed workers with the control workers (workers from the same facilities, but not exposed to benzene). The exposed group had a two-fold risk for leukaemia relative to the non-exposed group.
- The most frequently reported form of leukaemia associated with benzene exposure is the acute myelocytic form. However, research on rubber workers^{38,39} indicates that, in chronic low-level exposure situations, lymphocytic leukaemia may predominate. Chronic forms of leukaemia are also less likely to be reported on death certificates as the underlying cause of death.
- The choice of an appropriate comparison is an important issue. In a number of studies, analyses based on comparisons with the general population failed to detect an increased risk for lympho-haematopoietic cancer or leukaemia. The cohort study of eight oil refineries in Britain⁴⁰, the initial calculations of the leukaemia SMR, based on a comparison with the general population, revealed no significant excess. However, subsequent analyses that took account of variations in benzene exposure between categories of workers revealed the association between benzene exposure and leukaemia.

The industry-sponsored review paper of Paustenbach *et al*⁴¹ was critically analyzed by Utterback and Rinsky⁴² who emphasize the following points:

- *“Paustenbach DJ et al (1992)⁴¹ have apparently overlooked important information in literature related to the use and testing of control ventilation in the rubber hydrochloride plants even though they extensively cite other information from the very same page of that source.” [p. 665]*
- Utterback and Rinsky (1995)⁴² concluded that:
 - *“In summary, Paustenbach DJ et al⁴¹ used selected information, sometimes improperly cited, to adjust previously*

reported benzene exposure estimates for the RH worker cohort. The previous estimates by Rinsky *et al*⁴³ and Crump and Allen⁴⁴ were largely based on short-term and probably inaccurate sampling results collected as early as 1946. The Paustenbach method involved multiple adjustments of these early monitoring results by a number of factors that are apparently based on worse case assumptions. Their factors are determined through extrapolation of data collected under substantially different and frequently unknown conditions. As a result, Paustenbach *et al*⁴¹ estimate annual average exposures to benzene that are in some cases almost an order of magnitude greater than the actual measurements.”

- “The Paustenbach *et al*⁴¹ reconstruction has many cohort members exposed to prolonged levels of benzene in excess of 100, 150, and even 200 ppm. Some of the highest benzene exposures supposedly lasted as long as a decade. One would assume that such extreme exposure would produce an epidemic of serious benzene poisonings among the cohort, with resulting death from hematopoietic disorders such as aplastic anemia. However, no such epidemic occurred.”
- “The RH process that existed in 1975 when the process was terminated was fundamentally the same as it was shortly after it began in the early 1940s. Benzene exposures were monitored during the 1970s by a number of industrial hygienists using currently accepted methods^{45,46}. There have been no reports of substantial engineering improvements after 1943 to limit benzene exposures to a large number of cohort members over the decades of operation at St. Mary’s and Akron. Rather, as initially reported by Rinsky *et al*⁴³, there had been some traditional engineering controls, such as a few hoods installed, and perhaps some work practices had been improved. The Paustenbach *et al*⁴¹ approach fails short of their claim of providing derived by Rinsky *et al*⁴³. The NIOSH benzene exposure estimates for the RH cohort⁴³ remain the most consistent with all available information about the conditions that prevailed in RH manufacturing – even with information that has been discovered (US Department of Labor, 1942) after the estimates were first derived” [p. 674].

Peter Infante⁴⁷ discussed biases in the following articles published by consultants and health professionals working on behalf of industry.

- Wong O.⁴⁸ *Risk of acute myeloid leukaemia and multiple myeloma in workers exposed to benzene. Occup Environ Med* 1995; 52: 380-4.

About this report, Infante⁴⁷ wrote that Wong⁴⁸ “. . . concluded that benzene can only cause acute myelogenous leukaemia, in contrast to other types of leukaemia, and that the threshold is between 370 and 530 ppm-years of exposure. In this publication, he failed to include data from his own benzene study whereby he reported a statistically significant dose-response for benzene exposure and leukaemia among workers whose cumulative benzene exposures ranged from less than 15 ppm-years to more than 60 ppm-years (Wong^{49,50}). Furthermore, in the latter study, none of the leukaemia deaths was from acute myelogenous leukaemia. Thus, the findings and conclusions he drew from his own study contradict his opinion that benzene causes only acute myelogenous leukaemia and that the cumulative exposure threshold is between 370 and 530 ppm-years”.

- Wong O.⁵¹ *Risk of myeloid leukaemia and multiple myeloma in workers exposed to benzene-response. Occup Environ Med* 1996; 53: 357-8.
- Wong O.⁵² *Re: Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. (Letter to the Editor). J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 169-70.
- Wong O.⁵³ *A critique of the exposure assessment in the epidemiologic study of benzene-exposed workers in China conducted by the Chinese Academy of Preventive Medicine and the US National Cancer Institute. Regul Toxicol Pharmacol* 1999; 30: 259-67.
- Budinsky RA, DeMott RP, Wernke MJ, Schell JD.⁵⁴ *An evaluation of modeled benzene exposure and dose estimates published in the Chinese-National Cancer Institute collaborative epidemiology studies. Regul Toxicol Pharmacol* 1999; 30: 244-58.
- Bergsagel DE^a, Wong O, Bergsagel PL, Alexanian R, Anderson K, Kyle RA, Raabe GK.⁵⁵ *Benzene and multiple myeloma: appraisal of the scientific evidence. Blood* 1999; 94: 1174-82.

Teitelbaum *et al*⁵⁶, in a Letter to the Editor of *Blood*, questioned the validity of scientific evidence in the paper written by Bergsagel *et al*⁵⁵ on the relationship between benzene and multiple myeloma, saying that “Clearly, the current paper was litigation driven”.

Bernard Goldstein, whose work was seriously misquoted in a Letter to the Editor of *Blood* (Goldstein and Shalot⁵⁷), states that the evidence cited by Bergsagel *et al*⁵⁵ “does not at all support their conclusion that ‘There is no causal relationship between exposure to benzene or benzene-containing solvents and multiple myeloma’”. Goldstein further states that “The data they [Bergsagel *et al*⁵⁵] present in Tables 3 and 4 is akin to a fishing expedition in waters known to be sterile”. In addition, Goldstein⁵⁷ stated that Wong’s interpretation of lack of effect of benzene in multiple myeloma causation is intellectually dishonest.

- Wong O, Raabe G.⁵⁸ *Ce/I type specific leukemia analyses in a combined cohort of more than 208,000 petroleum workers in the U.S. and United Kingdom, 1937 - 1989. Regul Toxicol Pharmacol* 1995; 307: 32-41.

Infante⁵⁹ reviewed the above report and concluded that “Wong and Raabe from the Mobil Oil Corporation have recently said that benzene exposure causes acute myelocytic leukaemia only. . . It is difficult to reconcile Wong’s opinion in light of his own study results reported in the *British Journal of Industrial Medicine* in 1987”. Infante added that “Wong and Raabe⁵⁸ have recently concluded that a range of 400-500 ppm-years of benzene exposure is the threshold for leukaemia. The data in the Dow study (Ott *et al*, 1978⁶⁰; Bond *et al*, 1986⁶¹) and Wong’s own study (1987⁴⁹) clearly contradict this statement”.

John Bailar, III, (personal communication) summarizes as follows:

- “Science is often conducted by manufacturers, and this puts a premium on doing bad science that is guaranteed to produce negative results due to a) small sample size, b) poor protocols, c) fuzzy statistics”.
- “Thus, absence of evidence of effect is not equal to evidence of absence of effect”.

^aConsultant to AMOCO

Table 4 - Types of leukaemias and lymphomas from benzene exposure in humans^a

Acute myelogenous leukaemia	Chronic lymphocytic leukaemia
Acute lymphocytic leukaemia	Hairy cell leukaemia
Acute erythroleukaemic leukaemia	Hodgkin's lymphoma
Acute myelomonocytic leukaemia	Non-Hodgkin's lymphoma
Acute promyelocytic leukaemia	Lymphosarcoma
Acute undifferentiated leukaemia	Multiple myeloma
Chronic myelogenous leukaemia	Reticulum cell sarcoma

^aFrom Aksoy⁷⁷; Bond *et al*⁶¹; Decouflé *et al*⁷⁸; Delore *et al*⁷⁹; Goguel *et al*⁸⁰; Goldstein⁸¹; Infante⁵⁹; Infante and White⁸²; McMichael *et al*^{38,39,83}; Rinsky *et al*⁴³; Savitz *et al*⁸⁵; Schwartz⁸⁶; Travis *et al*⁸⁷; Vianna and Polan⁸⁸; Vigliani *et al*^{89,90}; Wong⁵⁰; Yin *et al*⁹¹⁻⁹⁴

Cytogenetic effects

The mechanism by which benzene causes cancers has been shown to be cytogenetic:

1. Picciano⁶² wrote as follows:

“Cytogenetic evaluation of peripheral lymphocytes from 52 workers exposed to low levels of benzene (less than 10 ppm) revealed an increase in aberration rates as compared to that of a 44-person group seen for pre-employment examination. Statistically significant differences were found in the distribution of specific types of chromosomal aberrations. These induced aberrations levels were not related to the age of the workers. For these reasons, continued study of benzene-exposed workers (as well as industrial populations exposed to any clastogenic agent) with medical cytogenetic surveillance, environmental monitoring, and lifetime epidemiologic investigation is recommended”.

2. Gad-El-Karim *et al*⁶³ wrote:

“Based on our findings in mice, we have drawn the following conclusions and postulations:

- The myeloclastogenic effect of benzene appears to be the earliest benzene-induced cellular damage in which chromosomal DNA is a primary critical target, and which is readily identifiable (scorable), and antedates changes in peripheral blood counts (leukocytes, platelets counts, etc).*
- Benzene's myeloclastogenicity is a function of its metabolism. Modification of benzene metabolism by an appropriate MFO inducer as 3MC or BNF or the co-administration of toluene is reflected in the extent of chromosomal damage, being increased or decreased, respectively.*
- Benzene myeloclastogenicity is greater with the p.o. than with the i.p. route of administration”.*

“The following points may be significant in interpreting the mechanism of benzene myeloclastogenicity: a) Enhancement of chromosomal damage by P-448 rather than P-450 enzyme inducers. b) Hydroquinone (HQ), catecholamines (CA), or phenols (PH) do not possess any of the potent myeloclastogenicity of the parent compound, benzene. HQ, in fact, shows a mild clastogenic response at a toxic dose (200 mg/kg b.w.). c) The unique presence of trans,trans-muconic acid in the urine of benzene-treated mice and not of those animals treated with HQ, CA, or PH”.

“Based on the above findings, we postulate that the likely events involved in the biotransformation of benzene entail the reported ability of benzene to induce its own metabolism, described as being similar to that of the polycyclic aromatic hydrocarbons.

*This is confirmed by the P-448 inducers 3MC and BNF, which induce a critical pathway of benzene metabolism in mice that leads to enhanced myeloclastogenicity. Induction of bone marrow MFO, especially the nuclear aryl hydrocarbon hydroxylase, could play a significant role in covalent binding of metabolites to nuclear DNA, especially in a rapidly proliferative organ such as bone marrow. The induction of epoxide hydrase may well be an additional important factor. Benzene oxide (Jerina *et al*, 1968⁶⁴; Tunek *et al*, 1978⁶⁵), which proved to be a potent inducer of DNA damage; and/or a putative aldehyde precursor of muconic acid capable of alkylating DNA, muconaldehyde, could be the likely candidates playing the major role in the chemical pathogenesis of benzene-induced chromosomal damage, aplastic anemia, preleukemia, and leukemia. The role of HQ, however, can only be ancillary and possibly more significant in chronic exposure, inasmuch as only a small amount is produced from benzene”. [For references cited by Gad-El-Karim *et al*⁶³, the reader is referred to the published manuscript.]*

Huff⁶⁶, Tsutsui *et al*⁶⁷, and Kari *et al*⁶⁸ also found a variety of chromosomal aberrations, gene mutations and carcinogenicity of benzene metabolites in animals including hamsters, F344/N rats and B6C3F1 mice.

3. White *et al*⁶⁹ wrote:

“In the 1977 OSHA benzene hearing record, Kilian and Daniel of Dow Chemical Company's Bio-Medical Research Laboratory released the results of a cytogenetic study of Dow employees exposed to benzene (Holder, 1978⁷⁰). This study, discussed in the section on effects from low-level exposure to benzene, clearly demonstrated a significant increase in structural chromosomal aberrations resulting from average benzene exposures below atmosphere concentrations of 10 ppm”.

A large body of scientific data suggests that an increased rate of chromosomal aberrations is of serious concern since chromosomal abnormalities have been associated with at least one-half of all spontaneously aborted fetuses⁷¹ and with several congenital syndromes that also show an increased risk of malignancy⁷². In addition, chromosomal breakage, whether of genetic or environmental origin, has been associated with leukemia⁷². The US EPA⁷³ Health Effects Research Laboratory described chromosomal aberrations as “a major cause of heritable human disease, and their occurrence is often associated with cancer.”

4. Santos-Mello and Cavalcante⁷⁴ found that “chromosome analysis showed a significantly higher frequency of chromosome deletions among the gas station attendants than a control group. Taking into account the relationship between clastogenicity and increased cancer risk, we may consider these workers to form a risk group.”

5. Lan *et al*⁷⁵ reported the following analysis of lymphocyte subsets among workers exposed to benzene in China:

“Benzene is toxic to various components of the haematopoietic system. To evaluate its effects on lymphocyte subset populations, we carried out a cross-sectional study of 31 unexposed controls, 20 workers exposed to mean concentration 1.8 ppm (median 1.7 ppm, range 0.5-6.6 ppm) benzene, and 37 workers exposed to 21.9 ppm (12.8 ppm, 2.2-84.6) in Tianjin, China. As expected, the absolute lymphocyte, granulocyte, platelet, and red blood count decreased with increasing benzene exposure and the red

blood cell mean corpuscular volume increased. The absolute lymphocyte counts were 2,200 (500) [mean (SD)], 2,300 (500), and 1,700 (400) cells per ml for controls, lower and higher exposed workers, respectively (p trend = 0.0005 by linear regression, using mean benzene air level within each group, adjusted for age, sex, and toluene air exposure). Similarly, the CD4 count decreased with increasing benzene exposure (p trend <0.0001). As a consequence, the CD4:CD8 ratio decreased as benzene exposure increased (p trend = 0.001). The B-cell but not the NK cell count decreased across benzene exposure groups (p trend = 0.02). These results suggest that benzene could have greater toxicity for specific lymphocyte subpopulations, and may provide insight into the mechanism of benzene's hematotoxic and carcinogenic effects".

Human leukaemias and cancers caused from exposure to benzene

While there is a prevalence of acute myelogenous leukaemia, it is certain that all forms of leukaemia are caused by benzene exposure. In 1971, Ishimaru *et al*⁷⁶ reported leukaemia in adult survivors of Hiroshima and Nagasaki. This report noted that the risk of leukaemia was 2.5 times greater among individuals who, in addition to radiation, had also been exposed occupationally to benzene.

Table 4 lists the types of haemolymphoreticular cancers in humans caused from exposure to benzene. In 1989, Yin *et al*⁹¹ reported significant increases in human cancers from exposure to benzene. Other investigators (Table 5) also reported significant increases in cancers of the kidney, colon, brain, lungs, stomach in addition to the increase in cancers of the lung, liver, lymphosarcomas, stomach, oesophagus, nasopharynx and intestine initially reported by Yin *et al*⁹¹. Benzene is also known to cause urothelial cancers in workers in the petroleum refining, rubber, printing and shoe production industries¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Low-level benzene exposure and leukaemia

Exposure to low levels of benzene, which causes leukaemia, is often expressed as a cumulative dose (measured in ppm-years), which is the average exposure over an eight-hour workday multiplied by the time of exposure. For example, an average exposure to 1 ppm benzene for 10 years in a facility would result in 10 ppm-years of cumulative benzene dose. A summary of acute myelogenous leukaemia deaths of Dow Chemical workers from exposure to benzene is shown in Table 6. Leukaemia cases 2, 3, and 5 had very low cumulative benzene exposures of 1.5, 25.4, and 23.6 ppm-years, respectively. An additional study by Bond *et al*⁶¹ of Dow Chemical workers showed a significantly elevated

Table 5 - Excess human cancers in benzene workers^a

Cancer	Stomach	Kidney
Lung	Oesophagus	Urothelium
Liver	Nasopharynx	
Lymphosarcoma	Intestine (colon)	

^aFrom Adelstein⁹⁵; Berger and Manz⁹⁶; Bond *et al*⁹⁷; Brown *et al*⁹⁸; Brownson *et al*⁹⁹; Creppi *et al*¹⁰⁰; Delahunt *et al*¹⁰¹; Goldberg *et al*¹⁰²; Greene *et al*¹⁰³; Hannis *et al*¹⁰⁴⁻¹⁰⁷; Lagorio *et al*¹⁰⁸; Lundberg and Milatou-Smith¹⁰⁹; Miller *et al*¹¹⁰; Partanen *et al*¹¹¹; Schnatter *et al*¹¹²; Thomas *et al*¹¹³; Yin *et al*^{91, 92}

risk of myelogenous leukaemia in workers exposed to an average concentration of benzene of 5.5 ppm.

Wong⁵⁰ showed that case No. 11 (chronic myelogenous leukaemia) and case No. 8 (multiple myeloma) were exposed to average benzene concentrations of 0.5 ppm for 1.2 years and 2.3 years, respectively (Table 6).

Reports by Rinsky *et al*⁸⁴ (Table 7) and Yin *et al*⁹¹ (Tables 8 and 9) show leukaemias and multiple myeloma in workers exposed to benzene for reasonably short periods of time.

In his comprehensive review of leukaemia cell types and benzene exposure, Peter Infante⁵⁹ concluded:

"As a result of this review, it is apparent that all of the major types of leukaemia and some of the more rare types of leukaemia are associated with occupational benzene exposures, namely: acute myelogenous (AML), myelomonocytic (AMMoL), monocytic (AMoL), promyelocytic, erythroleukaemia (AEL), acute undifferentiated, acute lymphatic (ALL), chronic myelogenous (CML), chronic lymphatic (CLL),

Table 6 - Deaths from lymphatic and haematopoietic cancers^a

Case	Cancer	ppm-years ^b
4	Chronic lymphocytic leukaemia	43.6
6	Chronic myelogenous leukaemia	10.0
11	Chronic myelogenous leukaemia	0.6
8	Myeloma	1.2
16	Chronic lymphocytic leukaemia	-

^aFrom Wong⁴⁸

^bLow level: <1 ppm TWA; medium level: 1-10 ppm TWA; high level: 11-50 ppm TWA. RR = 3.93 (p <0.02) for leukaemia and aleukaemia; RR = 4.12 (p <0.06) for non-Hodgkin's lymphopoietic cancers

Table 7 - Deaths from leukaemia and multiple myeloma in workers exposed to benzene^a

Case	Cancer	ppm-years ^b
1	Monocytic leukaemia	49.99
2	Chronic myelogenous leukaemia	0.1
8	Myelogenous leukaemia	10.16
10	Multiple myeloma	19.50
11	Multiple myeloma	0.11
13	Multiple myeloma	7.75

^aFrom Rinsky *et al*⁸⁴

^bSMR = 5.6 for leukaemia (p <0.001)

Table 8 - Leukaemias in benzene-exposed workers^a

Case	Diseases	ppm-years ^b
3	Acute monocytic leukaemia (AMoL)	89.1
7	Acute myelocytic leukaemia (AML)	96.0
8	Acute myelocytic leukaemia (AML)	27.9
9	Chronic myelocytic leukaemia (CML)	11.7
11	Acute myelocytic leukaemia (AML)	34.2
15	Chronic myelocytic leukaemia (CML)	16.2
16	Acute myelocytic leukaemia (AML)	28.8
18	Acute myelocytic leukaemia (AML)	12.4
26	Acute monocytic leukaemia (AMoL)	29.8
27	Acute myelocytic leukaemia (AML)	10.2

^aFrom Yin *et al*⁹¹

^bSMRs for AML = 4.96 (p <0.001); AMoL = 4.54 (p <0.05); CML = 4.24 (p <0.1)

Table 9 - Distribution of leukaemias in Chinese benzene workers^a

Type of leukaemia	Cell-specific SMR	p value
Acute lymphocytic leukaemia	1.94	
Acute myelogenous leukaemia	4.96	<0.001
Acute monocytic leukaemia	4.54	<0.05
Acute myelomonocytic leukaemia	5.56	<0.05
Chronic myelogenous leukaemia	4.24	<0.01

^a From Yin *et al*⁹¹

and hairy cell (HCL) as well as myelodysplastic syndrome and myelofibrosis have been reported in association with benzene exposure. In some case series, acute leukaemia, predominantly AML, was the most frequent form of leukaemia reported, while in other case series, chronic forms of leukaemia were common.”

A case-control interview study of 125 adult patients with acute leukaemia and 125 controls matched with respect to age (± 4 years), sex, and residence was carried out in central Sweden during the period from September 1980 to May 1983 by Lindquist *et al*¹¹⁷. Risk of developing acute leukaemia was significantly higher in patients who had an increased solvent exposure rate than in controls with an estimated odds ratio (OR) of 4.9 (95% CI 2.2-12.1). The most frequently exposed profession, painters, exhibits a relative risk of 13 (95% CI 2.0-554). These results suggested an aetiological relationship between organic solvent exposure and the development of acute leukaemia in man. Schwartz⁸⁶ found increased leukaemias: PMR = 3.28 ($p < 0.05$).

The current OSHA standard for occupational exposure for benzene is based on the data available in 1977. In the United States, a time-weighted average (TWA) eight-hour exposure is 1 part per million (ppm). This level is not protective for human health.

In 1997, Hayes *et al*¹¹⁸ reported a significant dose-response relationship between benzene exposure and all lymphohaematopoietic cancers (LHP) combined as well as for leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma examined separately. In this analysis, a cumulative benzene exposure of 4.5 ppm-years was associated with a statistically significant 2-fold increased risk for all LHP cancers. This corresponds to a time-weighted average exposure of 0.11 ppm per year over a 40-year working lifetime. It was also noted in the study by Hayes *et al*¹¹⁸ that a cumulative exposure of 6.7 ppm-years was associated with a statistically significant 3-fold elevation in the risk of acute non-lymphocytic leukaemia.

A recent study¹¹⁹ of Australian petroleum workers occupationally exposed to benzene demonstrated a statistically significant 50% increase in the incidence of leukaemia. For this cohort, estimates of average benzene exposure intensity (cumulative benzene exposure estimate divided by total duration of employment) ranged from 0.001 to 2.07 ppm, with a mean of 0.2 ppm. Average exposure intensity was estimated to be less than or equal to 1.0 ppm for 98% of subjects and less than or equal to 0.5 ppm for 90% of subjects. The average cumulative benzene exposure for the group was only 4.9 ppm-years.

In the Australian study¹¹⁹, average exposure was 200 parts per billion (ppb). Workers were followed for 12.8 years, in contrast to OSHA's setting of permissible exposure level (pel) based on 45 years of exposure. A 50% increase in risk equates to 3.5 extra leukaemia cases per 1,000 population over a lifetime, i.e., life background risk is seven deaths from leukaemia per 100,000 population. Since 200 ppb relates to 3.5 cancers per 1,000, a risk of

1.0 per thousand (OSHA's significant risk level) would be related to 57 ppb ($200/3.5 = 57$ ppb). Thus, Australian workers were followed for an average of 12.8 years versus 45 years exposure considered by OSHA's risk calculations – a difference of 3.5 times less. Dividing 57 ppb by 3.5 less time of exposure gives 16 ppb.

To provide adequate safety for the general population for a carcinogen like benzene, the “no observable effect” level is divided by 100- to 200-fold to allow for individual variability. Because the number of 16 ppb has an effect, i.e., is not the “no observable effect” level, the only safe level for benzene exposure has to be zero.

Multiple myeloma

Multiple myeloma is a cancer or tumour of the plasma cells, cells that are derived from lymphocytes originating in bone marrow. A tumour is the result of mutational changes produced in the lymphocytes while they are in the bone marrow¹²⁰. The mutational changes cause plasma cell dyscrasias. To date, the exact dyscrasias in myeloma have not been identified. In the absence of clear evidence of exposure to high levels of radiation, it is scientifically reasonable to attribute benzene exposure, as an environmental factor whose specific site of toxicological action is the bone marrow, as the most scientifically and medically probable causative factor.

A number of epidemiological studies showed that exposure to products that contain benzene, including, e.g., diesel fuel, solvents and paints, jet fuels, automobile exhaust and engine exhaust, results in an increased risk for multiple myeloma¹²¹⁻¹³¹. Other studies have shown an increased risk for development of multiple myeloma in transportation workers, railroad and road workers, and women exposed to exhaust fumes^{126,127,132,133} reported two cases of multiple myeloma associated with chronic benzene exposure.

In 1980 and 1984, Aksoy *et al*^{134,135} reported four cases of multiple myeloma associated with chronic benzene exposure. One of the patients had a short period of pancytopenia with hypoplastic bone marrow. In the Aksoy studies, the mean exposure time to benzene was longer for multiple myeloma than for leukaemia and malignant lymphomas, i.e., 28 years for leukaemia and 10.5 years for malignant lymphoma⁷⁷.

Rinsky *et al*⁸⁴ reported deaths from leukaemia and multiple myeloma in workers exposed to benzene. Exposure times varied from 0.10-49.99 ppm-years, a 500-fold variation. It is important to note that two workers developed leukaemias after very short exposure periods (4 days and 30 days, respectively) to low concentrations of benzene (Table 10).

Table 10 - Deaths from leukaemia and multiple myeloma in workers exposed to benzene^a

Case	Cancers	ppm-years	Duration of exposure
1	Monocytic leukaemia	49.99	1.5 years
2	Chronic myelogenous leukaemia	0.10	30 days
8	Myelogenous leukaemia	10.16	1.5 years
10	Multiple myeloma	19.50	1.5 years
11	Multiple myeloma	0.11	4 days
13	Multiple myeloma	7.75	9 months

^a From Rinsky *et al*⁸⁴

Table 11 - Benzene exposure and multiple myeloma (MM): odds ratios (OR)

Author	OR	CI (95%)	% increase	Group description
^a Nilsson <i>et al</i> ¹³⁹				
All lymphohaematopoietic MM	2.6 4.0	1.2-5.9 0.1-161	160 300	
Demers <i>et al</i> ¹⁴⁰ (MM)				
All cases	2.1	1.2-2.6	110	Painters exposed to solvents containing benzene
Self reported	2.5	1.3-4.7	150	
Employees of 10 yrs +	4.1	1.8-10.4	310	
Heineman <i>et al</i> ¹²⁷ (MM) ^a				
Transportation, road/railroad	2.3		130	All categories of exposure to gasoline and engine exhausts
Chauffeur	1.2		20	
Other transportation	7.4		640	
Linnet <i>et al</i> ¹⁴¹ (MM) ^b	3.7	1.3-10.3	270	Occupational exposure to petroleum products
Lundberg <i>et al</i> ¹⁰⁹ (MM)	5.49	1.13-16.06	449	Swedish painting industry

^aTable 1, p. 555^bTable 2, p. 2979**Table 12** - Benzene exposure and Multiple Myeloma (MM): Standardized Mortality Ratios (SMR)

Author	Observed	SMR	CI (95%)	% increase
^a Yin <i>et al</i> ⁹⁴				
Leukaemia	25	5.7		470
MM	1			
Ireland <i>et al</i> ¹⁴²				
MM-all		2.3	0.7-9.4	130
MM, 1940-1949	1	1.7	0.0-9.2	70
MM, 1950-1959	2	7.4	0.9-26.8	640
MM, 20-29 yrs after exposure	2	8.7	1.1-31.4	770
MM, > 30 yrs after exposure	1	1.7	0.0-9.4	70
Wong ¹³⁷				
MM, intermediate exposure group	4	357.1	43.1-1289.3 ^b	257
Rinsky <i>et al</i> ⁸⁴				
MM		409	1.1-10.47	409

^aPage 232, Table 4^bNot significant**Table 13** - Benzene exposure and Multiple Myeloma (MM): Proportional Mortality Ratios (PMR)

Author	Observed/expected	PMR	CI (95%)	% increase
^a Thomas <i>et al</i> ¹⁴³ (MM)	7/2.4	2.95*		195
Greene <i>et al</i> ¹⁰³				
MM - all races		2.19	1.2-4.0	119
MM in whites		2.46*		146

^aPage 138, Table 5 shows multiple myeloma (ICD 203)

*Statistically significant p ≤0.05

Infante¹³⁶ considered the ratio of leukaemia to multiple myeloma in four major cohort studies of benzene-exposed workers where such data were provided^{61,78,84,137} and concluded that there was an additional 39% excess of cancer deaths from multiple myeloma in these studies based on the ratios.

Schottenfeld *et al*¹³⁸ evaluated a prospective morbidity and mortality study (API) from 29 US oil companies and found a SIR of 552 for multiple myeloma. In a separate study, Lundberg *et al*¹⁰⁹ found SIR values of 3.8 (95% CI 0.8-11) and 4.4 (95% CI 0.9-13) in two separate groups of workers exposed to benzene.

Bernard Goldstein⁵⁷, a world renowned haematologist on the subject of benzene and blood diseases, wrote:

“Multiple myeloma is one of these diseases where we also do not know the etiology despite a readily identifiable tumor. I’m going to present some arguments that benzene could be a contributing cause of multiple myeloma. If I were asked from the point of view of a reasonable medical probability rather than a scientific acceptance, I would say that it is reasonably, medically probable that benzene can cause multiple myeloma”. He added, in his critical review of the literature, that *“It is now more likely than not that benzene exposure is an etiological factor in multiple myeloma”*.

Many studies have shown significant increases in multiple myeloma in workers exposed to petroleum products containing benzene (Tables 11-13).

Non-Hodgkin’s lymphoma

Many reports emphasize the importance of benzene as the causal agent for all haematopoietic and haemolymphopoietic cancers including non-Hodgkin’s lymphoma (Table 14). The mechanisms of benzene carcinogenicity are likely to be the same as for other haematopoietic cancers.

Chronic lymphocytic leukaemia

About 95% of persons with chronic lymphocytic leukaemia (CLL) have the B-cell type, the type most commonly seen in NHL. In contrast to the acute leukaemias, chronic leukaemias, including CLL, comprise a much smaller percentage of leukaemias associated with chronic exposure to benzene^{88,170,171}. However, there are several reports of the frequent occurrence of chronic leukaemia after exposure to benzene^{80,172,173}, and in some

Table 14 - Risk factors for non-Hodgkin's lymphoma from exposure to benzene or products containing benzene

Author	Exposure and/or disease	Findings	95% CI	p
Dryver <i>et al</i> ¹⁴⁴	Solvents > 5 years	OR 1.59	1.11-2.88	
	Aromatic hydrocarbons	OR 1.72	1.10-2.71	
	Painters	OR 1.77	1.13-2.76	
Rego <i>et al</i> ¹⁴⁵	All NHL & solvents	OR 1.67	0.97-2.87	
	All NHL, solvents >5 yrs	OR 1.87	1.05-3.34	
	Diffuse NHL, solvents >5 yrs	OR 1.98	1.03-3.68	
	Dose response (all NHL)	OR 1.28		
	< 5 yrs	OR 2.58		
	6-10 yrs	OR 2.66		
	11-15 yrs	OR 2.60		
Fabbro-Peray <i>et al</i> ¹⁴⁶	NHL	OR 2.0	1.1-3.9	
	Dose response:			
	0 days	OR 1.0		
	≤810 days	OR 1.7	0.4-6.8	
>810 days	OR 5.7*	1.4-23.2	0.02	
Persson and Fredrikson ¹⁴⁷	Solvents - NHL	OR 1.6	1.0-2.5	
	Solvents - NHL	OR 1.8	1.1-2.9	
	White spirits - NHL	OR 2.6	1.3-4.7	
	Thinner - NHL	OR 1.9	1.0-3.3	
	Gasoline - NHL	OR 1.9	0.9-3.8	
	Aviation gasoline - NHL	OR 3.5	0.6-17	
	Solvents - NHL	OR 1.4	0.8-2.4	
	Plastic & rubber chemicals	OR 2.2	1.0-4.8	
Nilsson <i>et al</i> ¹⁴⁸	NHL	OR 3.3	1.1-10.6	
		OR 4.0		
Fabbro-Peray <i>et al</i> ¹⁴⁹	Exposure to benzene	OR 3.45	1.1-10.2	<0.08
	Exclude other factors	OR 3.16	0.86-11.6	<0.09
Hayes <i>et al</i> ¹¹⁸	NHL	OR 3.0	0.9-10.5	
	Dose response:			
	Low dose	OR 2.7	0.7-10.6*	0.04
	Med dose	OR 1.7	0.3-10.2*	0.04
	High dose	OR 4.7	1.2-18.1*	0.04
	5 yrs	OR 0.7	0.1-7.2*	0.01
	5-9 yrs	OR 3.3	0.7-14.7*	0.01
	>10 yrs	OR 4.2	1.1-15.9*	0.01
NHL in chemical workers	OR 7.8	1.9-32.5		
Tatham <i>et al</i> ¹⁵⁰	All NHL & solvents	OR 1.10	0.9-1.3	
	Diffuse small cell NHL & solvents	OR 1.6	1.10-2.20	
Weisenberger ¹⁵¹	Solvents & other chemicals	OR 6.0	1.9-19.0	
Hardell <i>et al</i> ¹⁵²	Solvents	OR 2.4	1.4-3.9	
	Thinner	OR 3.4	1.4-10	
	White spirit	OR 3.2	1.3-8.3	
	Turpentine	OR 3.3	0.9-1.7	
	Degreaser	OR 11.0	2.9-72	
Blair <i>et al</i> ¹⁵³	Follicular NHL	OR 1.9	0.7-5.3	
	Diffuse NHL	OR 1.8	0.6-5.4	
	NHL 4-fold increase	OR 3.3	0.7-3.4	
Olson and Brandt ¹⁵⁴	Solvents, indep. risk factor	OR 3.3	1.9-5.8	
	Dose response:			
	120 months	OR 1.8	1.2-2.7*	0.001
	249 months	OR 3.3	1.5-7.1*	0.001
360 months	OR 6.0	1.9-19.0*	0.001	

* Statistically significant

(continued)

Table 14 (continued)

Author	Exposure and/or disease	Findings	95% CI	p
Brandt ¹⁵⁵	NHL	OR 3.3	1.9-5.8	
Wilcosky <i>et al</i> ¹⁵⁶	Hexane Solvent A	OR 4.0 OR 2.6		<0.05
Norseth <i>et al</i> ¹⁵⁷	Lymphoma	OR 2.2		
Keil ¹⁵⁸	NHL	OR 3.0	1.31-6.8	
Vianna and Polan ⁸⁸	NHL		1.6-2.0*	0.01
	Dose response:			
	< age 45 yrs		0.9-1.3	NS
	≥ age 45 yrs		1.7-2.1*	0.01
Hayes <i>et al</i> ¹¹⁸	NHL	RR 2.2	1.1-4.2	
	NHL - 10 yrs exposure	RR 4.2	1.1-15.9	
Yin <i>et al</i> ⁹¹	NHL - 21 cases of lymphoma	RR 4.0	1.1-2.57	
Delzell <i>et al</i> ¹⁵⁹	NHL	RR 2.4	1.2-4.9	
	Myeloma	RR 2.9	1.0-8.6	
Wong ⁵⁰	NHL	RR 3.77*		<0.05
Wong ⁵⁰	NHL & leukaemia	RR 8.6*		<0.04
	NHL predominating white men continuously exposed	RR 9.6*		<0.011
Wong ⁵⁰	NHL - lymphopoietic cancer			
	<108 ppm-months	RR 2.71		
	180-719 ppm-months	RR 2.96		
	>720 ppm-months	RR 4.12*		<0.06
Wong ¹⁶⁰	Lymphopoietic cancers	RR 3.20*		<0.05
Wong ¹⁶⁰	NHL	RR 3.77*		<0.05
Bond ⁵¹	NHL (LSRS)	RR 1.8	0.2-6.6	
Zoloth <i>et al</i> ¹⁶¹	NHL	RR 2.09	1.17-3.75	
Checkoway ¹⁶²	NHL	RR 3.0		NA
Hardell <i>et al</i> ¹⁶³	Lymphoma			
	Solvents, all doses	RR 2.4	1.5-3.8	
	Low dose	RR 1.2	0.5-2.6	
	High dose	RR 2.8	1.6-4.8	
Olin and Ahlbom ¹⁶⁴	Lymphohaemopoietic tumours	RR 2.18*		<0.05
Vianna and Polan ⁸⁸	NHL	RR 2.0	1.8-2.1	
Berlin <i>et al</i> ¹⁶⁵	Solvents, all HLCA	SIR 1.9	1.2-3.2	
	NHL	SIR 1.9	0.8-4.0	
Hansen and Olsen ¹⁶⁶	NHL	SIR 3.7	1.2 - 8.9	
Christie <i>et al</i> ¹⁶⁷	NHL	SIR 1.7	0.8 - 3.1	
Thomas <i>et al</i> ¹⁴³	NHL			
	Active	PMR 1.69		
	Retired	PMR 2.33*		<0.05
	Total	PMR 2.00*		<0.05
Capurro and Eldridge ¹⁶⁸	Reticular cell sarcoma & lymphosarcoma			
	3 vs. 0.04	SMR 73		
Tyroler <i>et al</i> ¹⁶⁹	Lymphoma age > 40 yrs, 10 yrs of service	PMR 2.51		
McMichael <i>et al</i> ³⁸	NHL	SMR 2.05		

* Statistically significant

studies^{38, 174} the predominant form of leukaemia associated with chronic benzene exposure was CLL. Flodin *et al*¹²² reported significant increases in CLL in individuals exposed to solvents (OD 1.7; 95% CI 0.8-3.6). McMichael *et al*³⁸ found a RR of 5.5 for CLL in heavy solvent-exposed workers and a lower risk of 2.5 for medium-exposed rubber workers. Arp *et al*¹⁷⁵ and Monson and Fine¹⁷⁶ found increases in CLL in workers exposed to benzene, xylene and coal-based solvents. Aksoy¹⁷⁷ reported CLL in two of three cases of chronic leukaemia in benzene-exposed workers, and Linos *et al*¹⁷⁸ found three out of four benzene-exposed workers with chronic leukaemia had CLL. McMichael *et al*^{38,39} and Checkoway *et al*¹⁶² each reported increases in CLL in rubber workers.

In more recent studies, Lewis *et al*¹⁷⁹ reported statistically significant increases in leukaemia among male workers in refinery and petrochemical plants (SMR 181, 95% CI 122-259); the excess was largely due to increases of CLL (SMR 351, 95% CI 168-645). Zheng *et al*¹⁸⁰ reported increases in NHL and CLL in persons employed in the motor vehicle and motor vehicle equipment industries in Kansas and Nebraska (OR 4.2, 95% CI 1.3-13.9).

Kidney cancers

Alderstein¹⁸¹ reported statistically significant increases in kidney cancer in shoe and electrical workers. In 1980, Paul Deisler, Vice President of Health, Safety and Environment for Shell Oil Company, reported to the EPA statistically significant increases in kidney cancers in distribution drivers who carried gasoline, diesel fuels, solvents and oils.

Subsequently, numerous reports have shown significant increases in kidney cancer in workers exposed to gasoline, solvents, and petroleum products containing benzene (Table 15).

Partanen *et al*¹¹¹ showed that by measuring ppm equivalents of benzene ranging from 0.1 to 2.0 ppm as indicators of exposure to gasoline, humans exposed to gasoline demonstrated a large increase in the incidence of renal cell carcinoma with an OR of 7.39 (95% CI 1.58-34.6). The excess risk of human renal cancers was highest at a latency period of approximately 30 years. In the printing and publishing industries, where petroleum solvents similar to those present in gasoline are commonly used, the OR increases were 5.95 (95% CI 1.21-29.2) and 8.01 (95% CI 0.92-69.8). An association between renal cell carcinoma and ex-

Table 15 - Increases in kidney cancer associated with benzene exposure

Author	Group	Results	95% CI
Sinks <i>et al</i> ¹⁸³	Paperwork printing workers	SIR 3.7*	1.4-8.1
Schottenfield ¹⁸⁴	Petroleum distribution workers	SIR 127.8	
Lynge <i>et al</i> ¹⁸²	Workers exposed to gasoline vapours	SMR 1.3	1.0-1.7
Wong ⁵⁰	Marine workers exposed to gasoline	SMR 568*	
Matanoski <i>et al</i> ¹⁸⁵	Painters	PMR 140*	1.2-19.1
Miller <i>et al</i> ¹¹⁰	Painters	PMR 2.8	1.2-6.5
Thomas <i>et al</i> ¹¹³	Oil refinery workers	PMR 2.14	
Schnatter <i>et al</i> ¹¹²	Petroleum marketing and distribution workers	RR 4.06 RR 3.86 RR 3.80	
Hu <i>et al</i> ¹⁸⁶	Benzene-exposed workers	OR 2.5	1.6-3.4
	Mineral oil exposed workers	OR 2.0	1.2-3.3
Delahunt <i>et al</i> ¹⁰¹	Firefighters	OR 4.9*	2.47-8.93
	Painters	OR 1.70*	1.31-3.44
Partanen <i>et al</i> ¹¹¹	Gasoline workers: Exposed to 1-2 ppm Cumulative exposures	OR 7.39* OR 4.34*	1.58-34.6 1.15-16.4
Bethwaite <i>et al</i> ¹²⁵	Painters: kidney & urothelial cancer	OR 1.45	0.85-2.5
Kadamani <i>et al</i> ¹⁸⁷	Exposures to hydrocarbons Moderate exposure Exposure duration alone, 16-30 yrs Duration of exposure > 30 yrs	OR 2.7* OR 2.4* OR 2.3*	1.2-6.5 1.0-6.2 1.0-5.2
Siemiatycki <i>et al</i> ¹⁸⁸	Workers exposed to jet fuel Aviation gasoline	OR 2.5 OR 2.6	1.1-5.4 1.2-5.8
Asal ¹⁸⁹	Petroleum refining Chemical manufacturing Gas station attendants	OR 4.3* OR 4.0 OR 6.2	1.7-10.9 0.7-54.9 1.0-40.4
Bond <i>et al</i> ⁹⁷	Workers exposed to: Light hydrocarbons Kerosene Toluene	OR 1.86 OR 4.89 OR 1.31	0.55-6.25 0.72-33.1 0.53-3.24

* Statistically significant

posure to gasoline was also found by Schnatter *et al*¹¹². Lynge *et al*¹⁸² showed statistically significant elevated risk for kidney cancers with SMR of 1.3 (95% CI 1.0-1.7) for both men and women in Norway, Denmark and Finland. The standardized incidence ratio for renal pelvis cancer was 2.0 (95% CI 1.0-3.7).

Kadamani *et al*¹⁸⁷ reported statistically significantly elevated risk for renal cell carcinoma (Table 16) in male workers with moderate exposure (OR = 2.7). Increased kidney cancer risk was also significantly increased for men with duration of exposure between 16 and 30 years (OR = 2.4) and exposure greater than 30 years (OR = 2.3).

Stomach cancer

Yin *et al*⁹¹ reported a significant increase in cancer of the stomach in workers exposed to benzene. There are many other studies reporting statistically significant increases in cancer of the stomach in workers exposed to petroleum hydrocarbons containing benzene (Table 16).

Colon cancer

In 1940, Gafaer and Sitgreaves studied cancers among the male employees of an oil refining company between 1933 and 1938. The employees ranged in age from 15 to 69 and totaled almost 60,000 years of cumulative employment during the study period. A total of 70 cases of cancer were reported, which includ-

ed 46 deaths. Data indicated that the 46 refinery death cases included a higher percentage of digestive system sites (69.6%) than that expected from the US data (57.8%). This report did not include any information on the number of years worked prior to onset of diseases or job descriptions.

Studies by Theriault and Goulet¹⁹⁴ included all the men (1,205) who were employed for more than five years in an oil refinery located in East Montreal during the years 1928–1976. Information was accumulated for 1,015 men (190 men were lost in the follow-up). The SMRs for specific causes were above 100. The digestive system showed increased cancer (SMR = 117).

Hanis *et al*¹⁰⁴ reported on a cancer mortality study of 15,032 male employees of Imperial Oil Limited of Canada. Employees in this study were categorized as: employees highly exposed, moderately exposed and not exposed to petroleum and its products; and refinery workers and non-refinery workers. In the exposed category, workers had more than three times the risk of developing oesophageal and stomach cancer and approximately twice the risk of developing lung cancer compared to the non-exposed workers. This study also found that for the exposed group, increased duration of employment increased the risks to these two types of cancers. The results comparing refinery workers to non-refinery workers, showed that the refinery workers had twice the risk of cancer of the intestine and other digestive organs.

In 1980, Thomas *et al*¹¹³ showed increased cancer rates among workers employed in petroleum refining and petrochemical plants in Texas. The study group consisted of 3,015 males whose deaths were reported by union (OCAW) locals between 1947 and 1977. The data showed statistically significant PMRs for cancer among

Table 16 - Increases in gastrointestinal cancer associated with benzene exposure

Author	Group	Results	95% CI
Morgan and Wong ¹⁹⁰	Mobil refinery workers	SMR 756.1*	
Thomas <i>et al</i> ¹¹³		PMR 1.41*	
		PMR 1.66*	
	Non-whites	PMR 1.92*	
		PMR 2.54*	
Thomas <i>et al</i> ¹⁴³		PMR 2.69*	
		PMR 2.42*	
		PMR 2.8*	
		PMR 2.9*	
Berger and Manz ⁹⁶		SMR 1.77*	
Hanis <i>et al</i> ¹⁰⁴	Refinery workers	RR 1.82*	
Blot <i>et al</i> ¹⁹¹		RR 1.09	
Maizlich <i>et al</i> ¹⁹²		PMR 2.04	
Matanoski <i>et al</i> ¹⁸⁵		SMR 144*	101-180
Park <i>et al</i> ¹⁹³		SMR 4.4	1.62-9.6
		SMR 5.8	2.5-15
Siemiatycki <i>et al</i> ¹⁸⁸		SMR 1.5*	
Theriault and Goulet ¹⁹⁴	4 stomach cancers		
Chen and Seaton ¹⁹⁵		SMR 127.3	101.4-159.4
Brown <i>et al</i> ⁹⁸	Painting trades	SIR 2.3	0.7-5.3
Delzell and Monson ¹⁹⁷		SMR 145	94-214
		SMR 2	

* Statistically significant

white males. Site-specific PMRs for white males were significantly increased for cancers of the digestive and respiratory systems, skin and brain. The results also showed that risks of stomach and brain cancers, leukaemia and multiple myeloma increased with longer union membership. Colon cancers associated with benzene exposure are summarized in Table 17.

Lung cancer

In 1989, Aksoy⁷⁷ stated that “In 1976, we considered five individuals with lung cancer associated with chronic benzene exposure and suggested that there is a causal relationship between this chemical and lung cancer”. In 1985, Aksoy²⁰⁰ stated: “Today there seems to be sufficient data to incriminate benzene as a potent carcinogenic agent causing leukaemia, malignant lymphoma, multiple myeloma, and lung cancer, as well as numerous disorders of the bone marrow depression”. In these cases¹³⁵, duration of exposure ranged from 8-35 years (mean = 17 years).

Hayes *et al*²⁰¹ in their publication entitled “Mortality among benzene workers in China on 74,828 exposed workers and 35,805 non-exposed workers”, stated that the deaths due to lymphatic and haematopoietic malignancies ($p < 0.01$) and lung cancer

($p < 0.01$) increased significantly with increasing cumulative exposure to benzene.

Yin *et al*⁹³ reported statistically significant excesses in workers exposed to benzene of leukaemia (RR = 2.3), malignant lymphoma (RR = 4.5), and lung cancer (RR = 1.4), and in 1987, Yin *et al*⁹¹ reported 39 deaths from lung cancer (SMR = 2.31), which then ranked as the number one cause of death.

There is no safe level for benzene

In 1939, Francis T. Hunter²⁰² found that poisoning by benzene is a product of the following factors:

- degree of individual susceptibility;
- duration of exposure; and
- concentration is of relative but not absolute importance and the only really safe concentration [of benzene] is zero.

In September 1948, the API²⁰³ issued a document entitled “API Toxicology Review: Benzene” prepared by P. Drinker; it was widely circulated to oil companies. This report states: “Inasmuch as the body develops no tolerance to benzene and there is a wide variation in individual susceptibility, it is generally considered that the only absolutely safe concentration for benzene is zero”.

Table 17 - Increases in colon cancer associated with benzene exposure

Author	Group	Results	95% CI
Chen and Seaton ¹⁹⁵		SMR 117.8	100.2-138.6
Montanaro <i>et al</i> ¹⁹⁶	Tannery workers	SMR 180*	105-288
Lagorio <i>et al</i> ¹⁰⁸	Gas station attendants	SMR 136	54-286
Berger and Manz ⁹⁶	Coke gas plant workers	SMR 1.84*	
Blair <i>et al</i> ¹⁵³	Marine inspectors	SMR 1.44	0.82-2.34
Morgan and Wong ¹⁹⁰	Mobil refinery workers	SMR 438.5*	
Schottenfield <i>et al</i> ¹⁸⁴	Petroleum industry workers	SMR 140.11	
Hakama and Kilpikari ¹⁹⁸	Rubber workers	SMR 137	
Greene <i>et al</i> ¹⁰³	Printing plant workers	PMR 1.36*	1.1-1.8
Miller <i>et al</i> ¹¹⁰	Painters	PMR 1.9*	1.3-2.8
Brown <i>et al</i> ⁹⁸	Painting trades	SIR 1.3	1.0-1.7
Lundberg <i>et al</i> ¹⁰⁹	Painters	SIR 2.2	0.9-4.6
Goldberg <i>et al</i> ¹⁰²	Workers exposed to:		
	Diesel engine exhaust	OR 2.1*	1.3-7.7
	Benzene	OR 2.3	1.1-4.8
	Waxes & polishes	OR 2.9	0.8-10.3
	Polystyrene	OR 1.9	1.3-3.5
	Mineral oil	OR 3.3	1.2-8.9
	Benzene	OR 1.9	1.3-3.3
	Xylene	OR 1.9	0.8-4.3
	Toluene	OR 1.6	1.0-2.7
Brownson <i>et al</i> ⁹⁹	Printing machine operators	OR 1.9	1.0-3.3
	Petroleum product exposure	OR 2.7	1.0-7.2
Schnatter <i>et al</i> ¹¹²	Petroleum distribution workers		
	Less than daily exposure	RR 1.66	0.65-4.2
	Daily exposure	RR 1.4	0.54-4.16
Hanis <i>et al</i> ¹⁰⁴	Refinery workers	RR 1.97*	
Li <i>et al</i> ¹⁹⁹	Chemists	*	

* Statistically significant

The API document further stated: “A limit of 50 ppm or less is strongly recommended, particularly where exposures are recurrent. Skin contact should be avoided”. This API document-recommended level was 500-fold greater than that recently recommended by American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). Thus, in spite of scientific evidence and general knowledge of the carcinogenicity of benzene, it is disconcerting that warning labels are not used to identify the carcinogenicity of benzene in products containing this chemical, especially gasoline.

In 1958, ESSO, in their Toxigram, published by the ESSO Research and Engineering Company Medical Research Division in Linden, New Jersey, stated that:

“Most authorities agree that in the light of present knowledge, the only level which can be considered absolutely safe for prolonged exposure [to benzene] is zero”.

In the world’s largest animal study²⁰⁴, sponsored by the US EPA and the US FDA, concerning a single carcinogenic chemical in an effort to determine the answer to the question of the relevance of using high doses to low doses, it was found by US Government scientists, as officials of federal regulatory policy, that:

“There should be no debate over a key principle that has shaped both our investigations and the regulatory posture of the FDA and EPA, namely that no level of exposure greater than zero to a toxic substance can be assumed to be without potentially harmful effects... The evidence from the ED₀₁ study... has provided a massive and overwhelming experimental profile and a data base which lends support to regulatory policies”.

The California Air Resources Board²⁰⁵ Report to the Scientific Review Panel on Benzene, Nov. 27, 1984, wrote:

“In accordance with the provisions of the Health and Safety Code Section 39661, The Scientific Review Panel, in reviewing the Report to the Scientific Review Panel on Benzene, has considered the public comments received regarding the report finds each of the following propositions to be prudent interpretations of the available evidence:

- a) benzene should be treated as a carcinogen that may act at all doses without any threshold level;*
- b) health effects, other than cancer, are not anticipated at current ambient benzene exposure levels; and*
- c) under reasonable conservative estimates, the added lifetime cancer risk from ambient exposures is not negligible”.*

In 1993, the Collegium Ramazzini wrote to William D. Wagner of ACGIH in a letter dated September 10, 1993:

“It is the opinion of the physicians and health professional scientists that the recommendation reached by ACGIH in 1990 is correct, and exposure must be limited to 0.1 ppm TLV-TWA... To set the standard of exposure to benzene any higher than 0.1 ppm presents a needless and preventable cancer danger to the lives and health of American working men and women... The United States’ rôle as a leader in world health would be compromised by recommending a higher standard”.

Aksoy is a physician, haematologist, and oncologist who published over 50 original papers on human cancers caused by high levels of benzene. Even so, Aksoy²⁰⁶ himself stated in his

1994 paper entitled “Benzene and Malignancies” that “Benzene is the only chemical which causes haematological abnormalities and malignancies. There is no safe level for this chemical. Therefore, benzene should be used only when there is no other possibility”.

The Scientific Review Panel Regarding the Report on Benzene (Source: University of California, Davis. Submission of Report to the Scientific Review Panel on Benzene by Emil M. Mrak, Chancellor Emeritus, to Gordon Duffy, State Air Resources Board, Sacramento, CA)

Specifically, the Scientific Review Panel finds each of the following propositions to be prudent interpretations of the available evidence:

- 1) benzene is a human carcinogen;
- 2) benzene should be treated as a carcinogen that may act at all doses without any threshold level;
- 3) health effects, other than cancer, are not anticipated at current ambient benzene exposure levels; and
- 4) under reasonable conservative estimates, the added lifetime cancer risk from ambient exposures is not negligible.

For these reasons, we agree that benzene should be listed by the Air Resources Board as a toxic air contaminant having no threshold level.

While the Scientific Review Panel finds the dose-response analysis prepared by the Department of Health Services (DHS) to be scientifically acceptable, we submit the following comments and recommended changes regarding the dose-response analysis.

Using extrapolation procedures recommended by the EPA and Interagency advisory groups, DHS has estimated that the lifetime risk of cancer from exposure to benzene ranges between 22 and 170 cases per million per ppb. The Scientific Review Panel concurs with DHS’s evaluation, but wishes to emphasize several points.

Recommended workplace concentration limits of benzene over time in the USA

The threshold limit value-time weighted average (TLV-TWA) for benzene in 1946 was 100 ppm; in 1947, 50 ppm; 1948-1956, 35 ppm; 1957-1976, 25 ppm; 1977-1987, 10 ppm; it is currently 1 ppm. In July of 1990, the ACGIH recommended that the TLV-TWA for benzene be reduced to 0.1 ppm. In 1993, the Collegium Ramazzini recommended that the occupational standard of exposure to benzene be limited to 0.1 ppm or less, and in 2003, recommended benzene be limited to 0.04 ppm (Table 18).

Occupational and environmental exposure to benzene

Most of the occupational exposure to benzene occurs from a variety of products and solvents. Individuals who are heavily exposed to benzene include those in the fields of painting, printing, gluing, leather working (shoes), rubber working, petroleum refining, petrochemical plants, gasoline use and storage, coke production and use, coal, transportation, and workers in organic solvent facilities.

Table 18 - Occupational benzene standards

Year	Recommended by	Standard
1946	ACGIH	100
1947	ACGIH	50
1948-1956	ACGIH	35
1957-1976	ACGIH	25
1977	ACGIH	10
1986	ACGIH	10
1987	OSHA	1
1986	NIOSH	0.1 (proposed)
1990	ACGIH	0.1 (proposed)
1993	Collegium Ramazzini	0.1 (recommended)
2003	Collegium Ramazzini	0.04 (recommended)

In the general population, exposure to benzene comes from household solvents, automobiles, automotive exhaust, storage sites, hazardous waste sites, industrial facilities, smoking, paint, marking pens, tape, foods, and many more. There is tremendous variability in susceptibility of individuals exposed to benzene. Individuals with respiratory disease, cardiac disease, diabetes mellitus, infants, pregnant women, individuals on certain medications, and the elderly are at increased risk of developing adverse symptoms and may be at increased risk of developing cancers fol-

Table 19 - Benzene levels in naphtha solvents

Product name	Parts per million (ppm)	Information source
Naphtha	10,000-20,000	Elkins and Pagnotto ²⁰⁷
Naphtha	Up to 93,000	Pagnotto <i>et al</i> ²⁰⁸
Naphtha	1,000-2,000	Chevron MSDS 3/18/00
Naphtha	2,000-5,000	Shell Corp. MSDS
VM& P naphtha	1,000	Carpenter <i>et al</i> ²⁰⁹
VM& P naphtha	1,000	NIOSH
Naphtha	39,500	Elkins <i>et al</i> ²¹⁰
VM& P naphtha	1,000	Elkins (G-059A) (OSHA Testimony)

Table 20 - Benzene levels in toluene, xylene, and ethylbenzene

Product name	Parts per million (ppm)	Information source
Toluene	2,000-10,000	Shell Oil Corp., 1977
Toluene	1,000	Shell Oil Corp., 1977
Toluene	1,000	General Electric Corp., 1978
Toluene	1,000	Dupont Corp., 1978
Toluene	5,000	Dupont Corp., 1978
Toluene	5,000-50,000	Shell Oil Corp., 1977
Toluene	1,000	General Electric Corp., 1978
Toluene + xylene	5,000-50,000	Boenheim and Person, Chapter 19, Petroleum Hydrocarbon Solvents, 1975
Xylene	1,000	Dupont (Memo to John Coleman 3/27/78)
Ethylbenzene	300	Shell Oil Corp., 1978
Ethylbenzene	887	General Electric Corp., 1978

lowing exposure to benzene. The measured concentrations of a variety of solvents and products commonly used are shown in Tables 19-23. It is important to note that individuals are often exposed to mixtures of chemicals and solvents. Such exposures can produce synergistic effects. Table 24 shows examples of synergistic and additive effects between combinations of toxic compounds.

Benzene interacts with other chemicals. Ethanol, acetone, toluene, xylene, PCBs, and phenobarbital are known to effect toxicity and metabolism of benzene. Ethanol increases haematotoxic effects of benzene²¹⁵. Interaction of benzene with other aro-

Table 21 - Benzene levels in organic solvents

Chemical	Parts per million (ppm)
Butadiene ^a	100
Butene ^a	100
Cumene ^a	20,000
Cyclohexanol ^a	266-9,600
Cyclohexanol C ^a	20-2,000
Dichloropentadiene ^a	12,900
Isoprene ^a	100
Monochlorobenzene ^a	10-800
Piperylene ^a	2,700
Hexane ^b	37,000
Hexane C ^b	36,000

^a Shell Oil Corp., March 1, 1978, OSHA, Benzene Standard Analysis

^b Shell Oil Corp., 1977

Table 22 - Benzene levels in solvents and products

Product	Parts per million (ppm)	Information source
Rubber solvent	15,000	Elkins (Docket 059A) OSHA Testimony
Stoddard solvent	1,000	Elkins (Docket 059A) OSHA Testimony
Shell rubber solvent	10,000	Shell Oil Corp., 1997
140° flash aliphatic	700	Elkins (Docket 059A) OSHA Testimony
Liquid wrench	300,000	Mobil Oil Corp., 1977
Varsol (Stoddard solvent)	1,000	Carpenter <i>et al</i> ²¹¹
140° flash aliphatic solvent	700	Carpenter <i>et al</i> ²¹²
Rubber solvent	15,000	NIOSH, 1978
“Varnish makers”	1,000	NIOSH, 1978
Stoddard solvent	1,000	NIOSH, 1978
Mineral spirits	1,000	B.F. Goodrich, OSHA Testimony, 1977
Mineral spirits	2,000	General Electric, OSHA Testimony, 1977
VM & P naphthol	1,000	General Electric, MSDS
Solvasol 1	> 1,000	Mobil Oil, 1977
Solvasol 2	> 1,000	Mobil Oil, 1977
Slop oil	> 1,000	Mobil Oil, 1977
Asphalts	> 1,000	Mobil Oil, 1977
Shell Sol BJ-77EG	21,000	Shell Oil Corp., 1977
Shell DAN	19,000	Shell Oil Corp., 1977
Shell Sol BJ 19EG	15,000	Shell Oil Corp., 1977

Table 23 - Benzene levels in solvents and products

Product	Parts per million (ppm)	Information source
Calibrating fluid	5,000	General Electric, 1978
Hydraulic fluids	1,000	General Electric, 1978
Unland screen developer	5,000	General Electric, 1978
Mineral spirits	2,000	General Electric, 1978
Lacquer thinner	5,000	General Electric, 1978
Rubber cement	1,400	General Electric, 1978
Kerosene	4,000	General Electric, 1978
Vinyl thinner	5,900	General Electric, 1978
Robber solvent	13,000	General Electric, 1978
Hexane	3,000	General Electric, 1978
Trimethylbenzene	5,000	Dupont
C9 Aromatics	150	Monsanto
Dicyclopentadiene	12,290	Monsanto
Ethylbenzene	310	Monsanto

matic hydrocarbons may result in enhanced toxicity. Acute inhalation exposure to a mixture of toluene and xylene causes additive respiratory and central nervous system toxicity^{216,217}. The combined effect of m-xylene and methylethyl ketone (2-butanone) when contaminated with benzene produces a synergistic induction of microsomal enzymes²¹⁸. Administration of aspirin to pregnant rats exposed to xylene causes greater than additive po-

tentiation of maternal and foetal toxicity²¹⁹. In addition, xylene acts as a promoter or cocarcinogen for induction of skin tumours²¹⁹. This finding is relevant to petrochemical workers who are exposed to polyaromatic hydrocarbons, xylene, crude oil, and ultraviolet light.

Conclusion

In 1991, Mehlman²²⁰ reported in the American Journal of Industrial Medicine that “Because we do not know of any safe benzene level above zero, the problems that have been plaguing the health protection process in both the occupational and environmental setting relative to benzene can perhaps be best resolved by setting current recommended maximum occupational levels of exposure to 0.004 to 0.1 ppm and, to the extent possible, avoiding any exposure at all to benzene and benzene-containing products”.

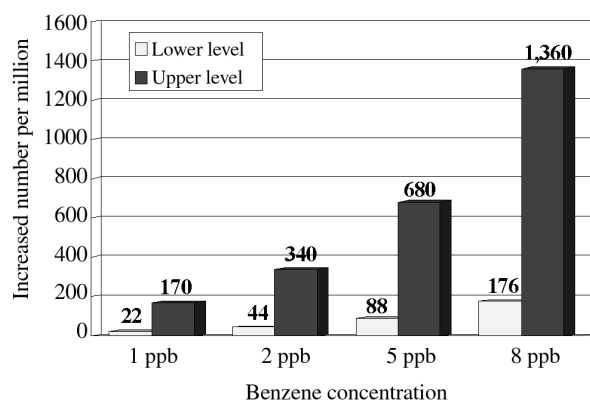
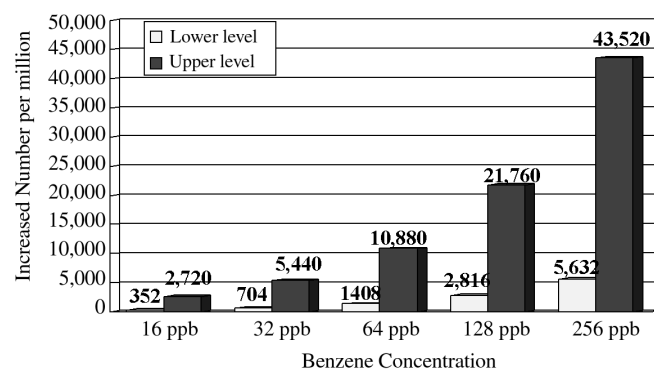
There is no debate that benzene causes all haematopoietic and lymphoreticular cancers including aplastic anaemia, multiple myeloma, and all types of leukaemias and lymphomas. We now have sufficient evidence that benzene causes cancer in a variety of organs including kidney, stomach, colon and other organs. Recent data demonstrate that humans develop significant increases in cancer at levels of 16 ppb or lower (figs. 2, 3). Thus, we can conclude, with a great degree of scientific certainty, that there is no safe level for benzene above zero.

Table 24 - Selected types of interactions between toxic compounds

Pair of toxic exposure	Kind of interaction	Result
Cigarette smoking + asbestos	Synergistic	Lung cancer ^a
Cigarette smoking + uranium (radon)	Synergistic	Lung cancer ^a
Cigarette smoking + carbon monoxide	Synergistic	Cardiac damage ^a
Cigarette smoking + β -naphthylamine	Additive or synergistic	Bladder cancer
Carbon monoxide + methylene chloride	Synergistic	Cardiac damage ^a
Sulphur oxides + air particulate	Synergistic	Chronic obstructive pulmonary disease
Benzene + toluene	Antagonistic	Chromosomal damage
Benzene + radiation	Additive or synergistic	Leukaemia
Carbon tetrachloride + ethyl or isopropyl alcohol	Synergistic	Hepatic and renal damage ^a
Noise + solvent exposure	Additive or synergistic	Hearing loss ^b

^a Indicates interaction is well established (Trief and Corrigan²¹³)

^b From Morata²¹⁴

**Fig. 2.** Expected cancers due to benzene exposure at levels of 1-8 ppb.**Fig. 3.** Expected cancers due to benzene exposures at levels of 16-256 ppb. The exponential rise in risk can be seen.

Acknowledgement

Special thanks for their review of this manuscript and valuable suggestions and contributions are due, in alphabetical order, to William Au, John Bailar III, Eula Bingham, Nachman Brautbar, Ronald L. Melnick, James E. Huff, Peter Infante, Marvin Legator, Robert Rinsky, Morando Soffritti, and Lorenzo Tomatis. Special thanks also go to my wife, Karyl Norcross Mehlman, M.D., Ph.D., for her help with preparation, organization and editing of this manuscript.

References

- Hamilton A. The growing menace of benzene (benzol) poisoning in American industry. *JAMA* 1922; 78: 627-30.
- ACGIH. Notice of intended changes-benzene. *Appl Occup Environ Hyg* 1990; 5: 453-63.
- IARC. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 7. Some anti-thyroid and related substances, nitrofurans, and industrial chemicals. Lyon: IARC, 1974, 203-21.
- IARC. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 29. Lyon: IARC, 1982.
- Maltoni C, Scarnato C. Le prime prove sperimentali dell'azione cancerogena del benzene. *Gli Ospedali della Vita* 1977; 4: 111-3.
- Maltoni C, Scarnato C. First experimental demonstration of the carcinogenic effects of benzene. Long-term bioassays on Sprague-Dawley rats by oral administration. *Med Lav* 1979; 70: 352-7.
- Maltoni C, Conti B, Cotti G, *et al.* Benzene: an experimental multipotential carcinogen. The up-to-date results of the long-term bioassays performed at the Bologna Institute of Oncology. *Istituto Superiore di Sanità Report No. ISSN-0391-1675*, 1982, 1-55.
- Maltoni C, Conti B, Scarnato C. Squamous cell carcinomas of the oral cavity in Sprague-Dawley rats, following exposure to benzene by ingestion. First experimental demonstration. *Med Lav* 1982; 73: 441-5.
- Maltoni C, Cotti G, Valgimigli L, *et al.* Zymbal gland carcinomas in rats following exposure to benzene by inhalation. *Am J Ind Med* 1982; 3: 11-6.
- Maltoni C. Myths and facts in the history of benzene carcinogenicity. In Mehlman MA. *Advances in Modern Environmental Toxicology*. Vol. 4. Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing Co., Inc., 1983, 1-15.
- Maltoni C, Conti B, Cotti G. Benzene. A multipotential carcinogen. Results of long-term bioassays performed at the Bologna Institute of Oncology. *Am J Ind Med* 1983; 4: 589-630.
- Maltoni C, Conti B, Cotti G, *et al.* Benzene as an experimental carcinogen: up-to-date evidence. *Acta Oncol* 1983; 4: 141-64.
- Maltoni C, Conti B, Perino G, *et al.* Further evidence of benzene carcinogenicity: results on Wistar rats and Swiss mice, treated by ingestion. In Maltoni C, Selikoff IJ. *Living in a chemical world*. Ann NY Acad Sci 1987; 534: 412-26.
- Maltoni C, Ciliberti G, Conti B, *et al.* Benzene an experimental multipotential carcinogen: results of the long-term bioassays performed at the Bologna Institute of Oncology. *Environ Health Perspect* 1989; 82: 109-24.
- Poklis A, Burkett C. Gasoline sniffing. A review. *Clin Toxicol* 1977; 11: 35-41.
- Mehlman MA. Carcinogenicity and toxicity of benzene. In Mehlman MA. *Advances in Modern Environmental Toxicology*, Vol 4. Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing Co., Inc., 1983.
- Mehlman MA. Benzene: scientific update. *Am J Ind Med* 1985; 7: 361-5.
- Mehlman MA. Carcinogenicity and toxicity of benzene. In Mehlman MA. *Advances in Modern Environmental Toxicology*, Vol. 14. Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing Co., Inc., 1985.
- Mehlman MA. Benzene: occupational and environmental hazards - scientific update. In Mehlman MA. *Advances in Modern Environmental Toxicology*, Vol. 16. Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing Co., Inc., 1989.
- Mehlman MA. Dangerous properties of petroleum refining products: carcinogenicity of motor fuels (gasoline). *Teratog Carcinog Mutagen* 1990; 10: 399-408.
- US Environmental Protection Agency. Regulatory Strategies for the Gasoline Marketing Industry 49FR31706. *Federal Register*, August 8, 1984.
- US Environmental Protection Agency. Evaluation of the potential carcinogenicity of benzene. Review Draft. Carcinogen Assessment Group. Office of Health and Environmental Assessment. OHEA-C-073-29. 1986.
- Huff JE. Toxicology and carcinogenesis studies of benzene (CAS No. 71-43-2) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). Technical Report No. 289. National Toxicology Program/National Institute of Environmental Health Sciences. Research Triangle Park, NC, 1986.
- Huff J, Eastin W, Roycroft J, *et al.* Carcinogenesis studies of benzene, methylbenzene, and dimethyl benzenes. *Ann NY Acad Sci* 1988; 534: 427-40.
- Huff JE, Haseman JK, De Marini DM, *et al.* Multiple site carcinogenicity of benzene in Fisher 344 rats and B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect* 1989; 82: 125-63.
- Huff J. Applicability to humans of rodent-specific sites of chemical carcinogenicity: tumors of the forestomach and of the hardyrian, preputial, and Zymbal glands induced by benzene. *J Occup Med Toxicol* 1992; 1: 109-41.
- Huff J. Chemicals studied and evaluated in long-term carcinogenesis bioassays by both the Ramazzini Foundation and the National Toxicology Program: in tribute to Cesare Maltoni and David Rall. *Ann NY Acad Sci* 2002; 982: 208-30.
- MacFarland H. Chronic gasoline toxicity. In MacFarland C, Holdsworth J, MacGregor R, *et al.* The toxicity of petroleum hydrocarbons. Washington, DC: American Petroleum Institute, 1982.
- Swenberg J, Short B, Borghoff S, *et al.* The comparative pathobiology of alpha 2μ-globulin. *Nephropathol Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 97: 35-46.
- Lock E, Stonard M, Elcombe C. The induction of omega and beta oxidation of fatty acids and effect of alpha 2μ-globulin content in the liver and kidney of rats administered TMP. *Xenobiotica* 1987; 17: 513-22.
- Kloss M, Cos M, Norton R, *et al.* Sex dependent differences in the disposition of [14C]-2,2,4-trimethylpentane in Fischer 344 rats. In Bach P, Lock E. *Renal heterogeneity and target cell toxicity*. Sussex, England: John Wiley & Sons. Ltd., 1985, 489-92.
- Carbonneau M, Lock E, Straser J, *et al.* 2,2,4-Trimethylpentane-induced nephrotoxicity. I. Metabolic disposition of TMP in male and female Fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987; 91: 171-81.
- Melnick RL. An alternative hypothesis on the role of chemically induced protein droplet (alpha 2μ-globulin) nephropathy in renal carcinogenesis. *Regul Toxicol Pharmacol* 1992; 16: 111-25.
- Kohn MC, Melnick R. A physiological model for ligand-induced accumulation of alpha 2μ-globulin in male rat kidney: roles of protein synthesis and lysosomal degradation in the renal dosimetry of 2,4,4-trimethyl-2-pentanol. *Toxicology* 1999; 136: 89-105.
- Brody H, Rip MR, Vinten-Johansen P, *et al.* Map-making and myth-making in Broad Street: the London cholera epidemic, 1854. *Lancet* 2000; 356: 64-8.
- McMichael AJ. Carcinogenicity of benzene, toluene and xylene: epidemiological and experimental evidence. *IARC Sci Publ* 1988; 85: 3-18.
- Thorpe JJ. Epidemiologic survey of leukemia in persons potentially exposed to benzene. *J Occup Med* 1974; 16: 375-82.
- McMichael AJ, Spiritas R, Kupper LL, *et al.* Solvent exposure and leukemia among rubber workers: an epidemiologic study. *J Occup Med* 1975; 17: 234-9.
- McMichael AJ, Andjelkovic DA, Tyroler HA. Cancer mortality among rubber workers: an epidemiologic study. *Ann NY Acad Sci* 1976; 271: 125-37.
- Rushton L, Anderson MR. A case-control study to investigate the association between exposure to benzene and deaths from leukaemia in oil refinery workers. *Br J Cancer* 1981; 43: 77-84.
- Paustenbach DJ, Price PS, Ollison W, *et al.* Reevaluation of benzene exposure for the Pliofilm (rubberworker) Cohort, (1936-1976). *J Toxicol Environ Health* 1992; 36: 177-231.
- Utterback DF, Rinsky RA. Benzene exposure assessment in rubber hydrochloride workers: a critical evaluation of previous estimates. *Am J Ind Med* 1995; 27: 661-76.

43. Rinsky RA, Young RJ, Smith AB. Leukemia in benzene workers. *Am J Ind Med* 1981; 2: 217-45.
44. Crump K, Allen B. Quantitative estimates of risk of leukemia from occupational exposure to benzene. Exhibit 152 (Appendix B) Docket H-059b, Benzene. Washington, DC: Occupational Safety and Health Administration, 1984.
45. University of North Carolina. Preliminary Environmental Survey Report, St. Marys, OH. November 11, Exhibit 187.B.6, Docket H-059, Benzene. Washington, DC: Occupational Safety and Health Administration, 1977.
46. Rinsky RA, Smith AB, Hornung R, *et al.* Benzene and leukemia: an epidemiologic risk assessment. Cincinnati: National Institute for Occupational Safety and Health, 1986.
47. Infante PF. Benzene: an historical perspective on American and European setting. In Harremoes P, Gee D, MacGarvin M, *et al.* Late lessons from early warning: the precautionary principle 1896-2000. Copenhagen: European Environmental Agency, 2001, 38-51.
48. Wong O. Risk of acute myeloid leukaemia and multiple myeloma in workers exposed to benzene. *Occup Environ Med* 1995; 52: 380-4 (letter).
49. Wong O. An industry wide mortality study of chemical workers occupationally exposed to benzene. I. General results. *Br J Ind Med* 1987; 44: 365-81.
50. Wong O. An industry wide mortality study of chemical workers occupationally exposed to benzene. II. Dose response analyses. *Br J Ind Med* 1987; 44: 382-95.
51. Wong O. Risk of myeloid leukaemia and multiple myeloma in workers exposed to benzene-response. *Occup Environ Med* 1996; 53: 357-8 (letter).
52. Wong O. Re: Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 169-70 (letter).
53. Wong O. A critique of the exposure assessment in the epidemiologic study of benzene-exposed workers in China conducted by the Chinese Academy of Preventive Medicine and the US National Cancer Institute. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999; 30: 259-67.
54. Budinsky RA, DeMott RP, Wernke MJ, *et al.* An evaluation of modeled benzene exposure and dose estimates published in the Chinese-National Cancer Institute collaborative epidemiology studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999; 30: 244-58.
55. Bergsagel DW, Wong O, Bergsagel P, *et al.* Benzene and multiple myeloma: appraisal of the scientific evidence. *Blood* 1999; 94: 1174-82.
56. Teitelbaum DT, Brautbar N, LaDou J. Benzene and multiple myeloma: appraisal of the scientific evidence. *Blood* 2000; 95 (letter).
57. Goldstein BD, Shalot SL. The causal relation between benzene exposure and multiple myeloma. *Blood* 2000; 95: 1512-3 (letter).
58. Wong O, Raabe G. Ce/I type specific leukemia analyses in a combined cohort of more than 208,000 petroleum workers in the U.S. and United Kingdom, 1937-1989. *Regul Toxicol Pharmacol* 1995; 307: 32-41.
59. Infante PF. Benzene and leukemia: cell types, latency and amount of exposure associated with leukemia. *Adv Occup Med Rehabil* 1995; 1: 107-20.
60. Ott GM, Townsend JC, Fishbeck WA, *et al.* Mortality among individuals exposed to benzene. *Arch Environ Health* 1978; 33: 3-10.
61. Bond GG, McLaren EA, Baldwin CL, *et al.* An update of mortality among workers exposed to benzene. *Br J Ind Med* 1986; 43: 685-91.
62. Picciano D. Cytogenetic study of workers exposed to benzene. *Environ Res* 1979; 19: 33-8.
63. Gad-El-Karim MM, Ramanujam S, Ahmed AE, *et al.* Benzene myeloclastogenicity: a function of its metabolism. *Am J Ind Med* 1975; 7: 475-84.
64. Jerina CM, Daly JW, Witkop B. The role of arene oxide-oxepin systems in the metabolism of aromatic substrates. II. Synthesis of 3,4-toluene-4-2H oxide and subsequent "NIH shift" to 4-hydroxytoluene-3-2H. *J Am Chem Soc* 1968; 90: 6523-5.
65. Tunek A, Platt KL, Bentley P, *et al.* Microsomal metabolism of benzene to species irreversibly binding to microsomal protein and effects of modifications of this metabolism. *Mol Pharmacol* 1978; 14: 920-9.
66. Huff JE. Carcinogenesis results on seven amines, two phenols, and one diisocyanate used in plastics and synthetic elastomers. *Prog Clin Biol Res* 1984; 141: 347-63.
67. Tsutsui T, Hayashi N, Maizumi H, *et al.* Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells. *Mutat Res* 1997; 373: 113-23.
68. Kari FW, Bucher J, Eustis SL, *et al.* Toxicity and carcinogenicity of hydroquinone in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Food Chem Toxicol* 1984; 30: 737-47.
69. White MC, Infante PF, Walker B Jr. Occupational exposure to benzene: a review of carcinogenic and related health effects following the US Supreme Court Decision. *Am J Ind Med* 1980; 1: 233-43.
70. Holder BB. Cytogenetic study of workers exposed to benzene in the Texas division of Dow Chemical U.S.A. by DJ Kilian and RL Daniel (letter to PF Infante. NIOSH), 1978.
71. Stein Z, Susser M, Warburton C, *et al.* Spontaneous abortion as a screening device: the effect of fetal survival on the incidence of birth defects. *Am J Epidemiol* 1975; 102: 275-90.
72. Mulvihill JJ. Congenital and genetic diseases. In JF Fraumeni. Persons at high risk of cancer: an approach to cancer etiology and control. New York: Academic Press Inc., 1975, 352-7.
73. US Environmental Protection Agency. Environmental assessment: short-term tests for carcinogens, mutagens and other genotoxic agents. Washington, DC: US Government Printing Office, 1979, 29.
74. Santos-Mello R, Cavalcante B. Cytogenetic studies on gas station attendants. *Mutat Res* 1992; 280: 285-90.
75. Lan Q, Li G, Zhang L, *et al.* Analysis of lymphocyte subsets among workers exposed to benzene in China. *Proceedings of the AACR*, Vol 42, 2001.
76. Ishimaru T, Okada H, Tormiyasu T, *et al.* Occupational factors in the epidemiology of leukemia in Hiroshima and Nagasaki. *Am J Epidemiol* 1971; 93: 157-65.
77. Aksoy M. Hematotoxicity and carcinogenicity of benzene. *Environ Health Perspect* 1989; 82: 193-7.
78. Decoufflé P, Blattner WA, Blair A. Mortality among chemical workers exposed to benzene and other agents. *Environ Res* 1983; 30: 16-25.
79. Delore P, Borgomano C. Acute leukemia in the course of benzene poisoning: the toxic origin of certain acute leukemias and their relationship to severe anemia. *J Med Lyon* 1928; 9: 227-33.
80. Goguel A, Cavigneaux A, Bernard J. Les leucémies benzeniques de la région parisienne entre 1950 et 1965 (étude de 50 observations). *Nouv Rev Fr Hematol* 1967; 7: 465-80.
81. Goldstein BD. Hematotoxicity in humans. In Laskin S, Goldstein BD. Benzene toxicity: a critical evaluation. *J Toxicol Environ Health* 1977; Suppl. 2: 69-105.
82. Infante PF, White MC. Projections of leukemia risk associated with occupational exposure to benzene. *Am J Med* 1985; 7: 403-13.
83. McMichael AJ, Spiritas R, Kupper LL. An epidemiological study of mortality within a cohort of rubber workers 1964-1972. *J Occup Med* 1974; 16: 458-64.
84. Rinsky R, Smith AB, Hornung R, *et al.* Benzene and leukemia: an epidemiological risk assessment. *N Engl J Med* 1987; 316: 1044-50.
85. Savitz DA, Andrews KW. Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic and hematopoietic cancers. *Am J Ind Med* 1997; 31: 287-95.
86. Schwartz E. Proportionate mortality ratio analysis of automobile mechanics and gasoline service station workers in New Hampshire. *Am J Ind Med* 1987; 12: 91-9.
87. Travis LB, Li CY, Zhang ZN, *et al.* Hematopoietic malignancies and related disorders among benzene-exposed workers in China. *Leuk Lymphoma* 1994; 14: 91-102.
88. Vianna NJ, Polan A. Lymphomas and occupational benzene exposure. *Lancet* 1979; 1: 1394-5.
89. Vigliani EC, Forni A. Benzene and leukemia. *Environ Res* 1976; 11: 122-7.
90. Vigliani EC. Leukemia associated with benzene exposure. In Occupational carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1976; 271: 143-51.
91. Yin SN, Li GL, Tain FD, *et al.* A retrospective study of leukemia and other cancers in benzene workers. *Environ Health Perspect* 1989; 82: 207-14.
92. Yin SN, Li GL, Tain FD, *et al.* Leukemia in benzene workers: a retrospective cohort study. *Br J Ind Med* 1987; 44: 124-8.

93. Yin SN, Linet MS, Hayes RB, *et al.* Cohort study among workers exposed to benzene in China: general methods and resources. *Am J Ind Med* 1994; 26: 383-400.
94. Yin SN, Hayes RB, Linet MS, *et al.* A cohort study of cancer among benzene-exposed workers in China: overall results. *Am J Ind Med* 1996; 29: 227-35.
95. Adelstein AM. Occupational mortality: cancer. *Ann Occup Hyg* 1972; 15: 53-7.
96. Berger J, Manz A. Cancer of the stomach and the colon-rectum among workers in a coke gas plant. *Am J Ind Med* 1992; 22: 825-34.
97. Bond GG, Shellenberger RJ, Flores GH, *et al.* A case-control study of renal cancer mortality at a Texas chemical plant. *Am J Ind Med* 1985; 7: 123-39.
98. Brown LM, Moradi T, Gridley G, *et al.* Exposures in the painting trades and paint manufacturing industry and risk of cancer among men and women in Sweden. *J Occup Environ Med* 2002; 44: 258-64.
99. Brownson RC, Zahm SH, Chang JC, *et al.* Occupational risk of colon cancer. An analysis by anatomic subsite. *Am J Epidemiol* 1989; 130: 675-87.
100. Creppi MF, Demers PA, Puntuni R, *et al.* Mortality in a cohort of tannery workers. *Occup Environ Med* 1997; 54: 588-91.
101. Delahunt B, Bethwaite PB, Nacey JN. Occupational risk for renal cell carcinoma. A case-control study based on the New Zealand Cancer Registry. *Br J Urol* 1995; 75: 578-82.
102. Goldberg MS, Parent M-E, Siemietycki S, *et al.* A case-control study of the relationship between the risk of colon cancer in men and exposures to occupational agents. *Am J Ind Med* 2001; 39: 531-46.
103. Greene MH, Hoover RN, Eck RL, *et al.* Cancer mortality among printing plant workers. *Environ Res* 1979; 20: 66-73.
104. Hanis NM, Stavrakys KM, Fowler JL. Cancer mortality in oil refinery workers. *J Occup Med* 1979; 21: 167-74.
105. Hanis NM, Holmes TM, Shallenberger LG, *et al.* Epidemiologic study of refinery and chemical plant workers. *J Occup Med* 1982; 24: 203-12.
106. Hanis NM, Shallenberger LG, Donaleski DL, *et al.* A retrospective mortality study of workers in three major US refineries and chemical plants. Part 1. Comparisons with US population. *J Occup Med* 1985; 27: 283-92.
107. Hanis NM, Shallenberger LG, Donaleski DL, *et al.* A retrospective mortality study of workers in three major US refineries and chemical plants. Part II. Internal comparisons by geographic site, occupation, and smoking history. *J Occup Med* 1985; 27: 361-9.
108. Lagorio S, Forastiere F, Iavarone I, *et al.* Mortality of filling station attendants. *Scand J Work Environ Health* 1994; 20: 331-8.
109. Lundberg I, Milatou-Smith R. Mortality and cancer incidence among Swedish paint industry workers with long-term exposure to organic solvents. *Scand J Work Environ Health* 1998; 24: 270-5.
110. Miller BA, Silverman CT, Hoover RN, *et al.* Cancer risk among artistic painters. *Am J Ind Med* 1986; 9: 281-7.
111. Partanen T, Heikkilä P, Hernberg S, *et al.* Renal cell cancer and occupational exposure to chemical agents. *Scand J Work Environ Health* 1991; 17: 231-9.
112. Schnatter AR, Katz AM, Nicolich MJ, *et al.* A retrospective mortality study among Canadian Petroleum marketing and distribution workers. *Environ Health Perspect* 1993; 101 suppl. 6: 85-99.
113. Thomas TL, Decoufle P, Moure-Eraso R. Mortality among workers employed in petroleum refining and petrochemical plants. *J Occup Med* 1980; 22: 97-103.
114. Steineck G, Plato N, Norell SE, *et al.* Urothelial cancer and some industry-related chemicals: an evaluation of the epidemiological literature. *Am J Ind Med* 1990; 17: 371-91.
115. Silverman DT, Hoover RN, Albert S, *et al.* Occupation and cancer of the lower urinary tract in Detroit. *J Natl Cancer Inst* 1988; 70: 237-45.
116. Vineis P, Magnani C. Occupation and bladder cancer in males. A case-control study. *Int J Cancer* 1985; 35: 599-606.
117. Lindquist R, Nilsson B, Eklund G, *et al.* Increased risk of developing acute leukemia after employment as a painter. *Cancer* 1987; 60: 1378-84.
118. Hayes RB, Yin SN, Dosemeci M, *et al.* Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. *Chinese Academy of Preventive Medicine—National Cancer Institute Benzene Study Group. J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1065-71.
119. Health Watch - Eleventh Report. The Australian Institute of Petroleum Health Surveillance Program. The University of Adelaide Department of Public Health, Adelaide University, Australia, 2000, 1-75.
120. Goldstein BD. Is exposure to benzene a cause of human multiple myeloma? *Ann NY Acad Sci* 1990; 609: 225-30.
121. Morris PD, Koepsell TD, Daling JR, *et al.* Toxic substance exposure and multiple myeloma: a case control study. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76: 987-94.
122. Flodin U, Fredricksson M, Persson B. Multiple myeloma and engine exhausts, fresh wood, and creosote: a case-reference study. *Am J Ind Med* 1987; 12: 519-29.
123. Flodin U, Fredricksson M, Persson B, *et al.* Chronic lymphatic leukaemia and engine exhausts, fresh wood, and DDT: a case-referent study. *Br J Ind Med* 1988; 45: 33-8.
124. Cuzick J, De Stavola B. Multiple myeloma - A case-control study. *Br J Cancer* 1988; 57: 516-20.
125. Bethwaite PB, Pearce N, Fraser J. Cancer risks in painters: study based on New Zealand Cancer Registry. *Br J Ind Med* 1990; 47: 742-6.
126. Eriksson M, Karisson M. Occupational and other environmental factors and multiple myeloma: a population based case-control study. *Br J Ind Med* 1992; 36: 1210-1.
127. Heineman EF, Olsen JH, Pottern LM, *et al.* Occupational risk factors for multiple myeloma among Danish men. *Cancer Causes Control* 1992; 3: 555-68.
128. Pottern LM, Heineman EF, Olsen JH, *et al.* Multiple myeloma among Danish women: employment history and workplace exposures. *Cancer Causes Control* 1992; 3: 427-32.
129. Hansen ES. A follow-up study on the mortality of truck drivers. *Am J Ind Med* 1993; 23: 811-21.
130. LeVecchia C, Negri E, D'Avanzo B, *et al.* Occupation and lymphoid neoplasms. *Br J Cancer* 1989; 60: 385-8.
131. Figs LW, Dosemeci M, Blair A. Risk of multiple myeloma by occupation and industry among men and women: a 24-state death certificate study. *J Occup Med* 1994; 36: 1210-21.
132. Boffetta P, Stellam SD, Garfinkel L. A case-control study of multiple myeloma nested in the American Cancer Society prospective study. *Int J Cancer* 1989; 43: 554-9.
133. Torres A, Giralt M, Raichs A. Coexistencia de antecedentes benzolicos cronicos y plasmocitoma multiple. Presentacion de dos casos. *Sangre* 1970; 15: 275.
134. Aksoy M. Different types of malignancies due to occupational exposure to benzene: a review of recent observations in Turkey. *Environ Res* 1980; 23: 181-90.
135. Aksoy M, Erdem S, Dincol G. Clinical observations showing the role of some factors in the etiology of multiple myeloma. A study of 7 patients. *Acta Haematol* 1984; 71: 116-20.
136. Infante PF. Benzene and leukemia. The 0.1 ppm ACGIH proposed threshold limit value for benzene. *Appl Occup Env Hyg* 1991; 74: 403-13.
137. Wong O. An industry wide mortality study of chemical workers occupationally exposed to benzene. II. Dose response analysis. *Br J Ind Med* 1997; 44: 383-95.
138. Schottenfeld D, Warshauer ME, Zanbar AG, *et al.* A prospective study of morbidity and mortality in petroleum industry employees in the US. In Peto R, Schneiderman M. A preliminary report. Banbury Report No. 9. Quantification of occupational cancer. Cold Spring Harbor Laboratory, 1981, 247-65.
139. Nilsson R, Nordlinger R, Hörte L-G, *et al.* Leukemia and lymphoma in seamen and tankers. Tenth International Symposium on Epidemiology in Occupational Health. Milan-Como, Italy, Sept. 20-23, 1994.
140. Demers PA, Vaughan TL, *et al.* A case-control study of multiple myeloma and occupation. *Am J Ind Med* 1993; 23: 629-39.
141. Linet MS, Harlow SD, McLaughlin JK. A case control study of multiple myeloma in whites. Chronic antigenic stimulation, occupation, and drug use. *Cancer Res* 1987; 47: 2978-81.
142. Ireland B, Collins JJ, Buckley CF, *et al.* Cancer mortality among workers with benzene exposure. *Epidemiology* 1997; 8: 318-20.
143. Thomas TL, Waxweiler RJ, Moure RE, *et al.* Mortality patterns among workers in three Texas oil refineries. *J Occup Med* 1982; 24: 135-41.

144. Dryer E, *et al.* Exposures, hormones, heredity and the risk of non-Hodgkin's lymphoma: results from a case control study in Southern Sweden. *Blood* 2002; 100: 770.
145. Rego MA, Sousa CS, Kato M, *et al.* Non-Hodgkin's lymphoma and organic solvents. *J Occup Environ Med* 2002; 44: 874-81.
146. Fabbro-Peray P, Daures JP, Rossi JF. Environmental risk factors for non-Hodgkin's lymphoma: a population based case-control study in Languedoc-Roussillon, France. *Cancer Causes Control* 2001; 12: 201-2.
147. Persson B, Fredrikson M. Some risk factors for non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Occup Med Environ Health*. 1999; 12: 135-42.
148. Nilsson R, Nordlinder R, Horte LG, *et al.* Leukemia, lymphoma and multiple myeloma in seamen on tankers. *Occup Environ Med* 1998; 55: 517-21.
149. Fabbro-Peray P, Daures JP, Rossi JF. Environmental epidemiology of malignant lymphoma in Languedoc-Roussillon (South county of France). *Blood* 1997; 90 Suppl 1, 256.
150. Tatham L, Tolbert P, Kjeldsberg C. Occupational risk factors for subgroups of non-Hodgkin's lymphoma. *Epidemiology* 1997; 8: 551-8.
151. Weisenberger DD. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma: recent findings regarding an emerging epidemic. *Ann Oncol* 1994; 5 suppl 1: S19-S24.
152. Hardell L, Eriksson M, Degerman A. Exposure to phenoxyacetic acids, chlorophenols, or organic solvents in relation to histopathology, stage, and anatomical location of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 1994; 54: 2386-9.
153. Blair A, Linos A, Stewart PA, *et al.* Comments on occupational and environmental factors in the origin of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 1992; 52 suppl 19: 5501s-5502s.
154. Olson H, Brandt L. Risk of non-Hodgkin's lymphoma among men occupationally exposed to organic solvents. *Scand J Work Environ Health* 1999; 14: 246-51.
155. Brandt L. Leukemia and lymphoma risks from solvents. *Med Oncol Tumour Pharmacol Therap* 1987; 4: 199-205.
156. Wilcosky TC, Checkoway H, Marshall EG, *et al.* Cancer mortality and solvent exposure in the rubber industry. *Am J Ind Hyg* 1984; 12: 809-11.
157. Norseth T, Andersen A, Giltvedt J. Cancer incidence in the rubber industry in Norway. *Scand J Work Environ Health* 1983; 2 suppl 9: 64-71.
158. Keil U. Malignant lymphomas among rubber and tire industry workers: a case-control analysis within cohort study (p 284-285). *Dissertation Abstract International* 1981; 41: p 3400 B.
159. Delzell E, Sathicokumar N, Cole P, *et al.* A case control study of leukemia, non-Hodgkin's lymphoma, and multiple myeloma among employees of Union Oil Co. of California. Submitted to Union Oil Company of California, September 8, 1992.
160. Wong O. Statement Submitted to the OSHA Benzene Hearing, Environmental Health Associates, Inc., 1986.
161. Zoloth SR, Michaels DM, Villalbi JR, *et al.* Patterns of mortality among commercial pressmen. *Solvents in pressrooms. J Natl Cancer Inst* 1986; 76: 1047-51.
162. Checkoway H, Wilcosky T, Wolf P, *et al.* An evaluation of the associations of leukemia and rubber industry solvent exposures. *Am J Ind Med* 1984; 5: 239-49.
163. Hardell L, Eriksson M, Lenner P, *et al.* Malignant lymphoma and exposure to chemicals, especially organic solvents, chlorophenols and phenoxy acids: a case control study. *Br J Cancer* 1981; 43: 169-76.
164. Olin GR, Ahlbom A. The cancer mortality among Swedish chemists graduated during three decades. A comparison with the general population and with a cohort of architects. *Environ Res* 1980; 22: 154-61.
165. Berlin K, Edling C, Persson B, *et al.* Cancer incidence and mortality of patients with suspected solvent-related disorders. *Scand J Work Environ Health* 1995; 21: 362-7.
166. Hansen J, Olsen JH. Cancer morbidity among Danish female pharmacy technicians. *Scand J Work Environ Health* 1994; 20: 22-6.
167. Christie D, Robinson K, Gordon IL. A prospective study in the Australian petroleum industry. II. Incidence of cancer. *Br J Ind Med* 1991; 48: 511-4.
168. Capurro PU, Eldridge JE. Solvent exposure and cancer. *Lancet* 1978; 1: 942.
169. Tyroler HA, Andjelkovic D, Harris R, *et al.* Chronic diseases in the rubber industry. *Environ Health Perspect* 1976; 17: 13-20.
170. Aksoy M, Erdem S, Dincol G. Types of leukemia in chronic benzene poisoning: a study in thirty-four patients. *Acta Haematol* 1974; 5: 65-72.
171. Infante PF, Rinsky RA, Wagoner JK, *et al.* Leukemia in benzene workers. *Lancet* 1977; 2: 76-8.
172. Tareeff EM, Kontchalouskaya NM, Zorina LA. Benzene leukemias. *Acta UICC* 1963; 19: 751-5.
173. Browning E. Toxicity and metabolism of industrial solvents. New York: Elsevier Publishing Co., 1965, 3-65.
174. Monson RR, Nakano KK. Mortality among rubber worker. I. White male union employees in Akron, Ohio. *Am J Epidemiol* 1976; 103: 284-96.
175. Arp EW, Wolf PH, Checkoway H. Lymphocytic leukemia and exposures to benzene and other solvents in the rubber industry. *J Occup Med* 1983; 25: 598-602.
176. Monson RR, Fine LJ. Cancer mortality and morbidity among rubber workers. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61: 1047-53.
177. Aksoy M. Chronic lymphoid leukaemia and hairy cell leukaemia due to chronic exposure to benzene: report of three cases. *Br J Haematol* 1987; 66: 209-11.
178. Linos A, Kyle RA, O'Fallon T, *et al.* A case-control study of occupational exposures and leukemia. *Int J Epidemiol* 1980; 9: 131-5.
179. Lewis RJ, Gamble JF, Jorgensen G. Mortality among three refinery/petrochemical plant cohorts. I. 1970 to 1982 active/terminated workers. *J Occup Environ Med* 2000; 42: 721-9.
180. Zheng T, Blair A, Zhang Y, *et al.* Occupation and risk of non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *J Occup Environ Med* 2002; 44: 469-74.
181. Alderstein AM. Occupational mortality: cancer. *Ann Occup Hyg* 1972; 15: 53-7.
182. Lyng E, Anderson A, Nilsson R, *et al.* Risk of cancer and exposure to gasoline vapors. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 449-58.
183. Sinks T, Lushniak B, Haussler BJ, *et al.* Renal cell cancer among paperboard printing workers. *Epidemiology* 1992; 3: 483-9.
184. Schottenfield D, Warshauer ME, Zauber AG, *et al.* A prospective study of morbidity and mortality in petroleum industry employees in the US. In Peto R, Schneiderman M. A preliminary report. Banbury Report No. 9. Quantification of occupational cancer. Cold Spring Harbor Laboratory, 1981, 247-5.
185. Matanoski GM, Stockwell HG, Diamond EL, *et al.* A cohort mortality study of painters and allied tradesmen. *Scand J Work Environ Health* 1986; 12: 16-21.
186. Hu J, Mao Y, White K. Renal cell carcinoma and occupational exposure to chemicals in Canada. *Occup Med (Lond)* 2002; 52: 157-64.
187. Kadamani S, Asal NR, Nelson RY. Occupational hydrocarbon exposure and risk of renal cell carcinoma. *Am J Ind Med* 1989; 15: 131-41.
188. Siemietycki J, Dewar R, Nadon L, *et al.* Associations between several sites of cancer and twelve petroleum-derived liquids. Results from a case-referent study in Montreal. *Scand J Work Environ Health* 1987; 13: 493-504.
189. Asal NR. Risk factors in renal cell carcinoma. DHSS: NIH NCI 1-RO1CA31059-01-04. 1985.
190. Morgan RW, Wong O. An epidemiologic analysis of the mortality experience of Mobil Oil Corporation employees at the Beaumont, Texas, refinery. Submitted to Mobil Oil Corporation 10 April, 1984.
191. Blot WJ, Brinton LA, Fraumeni JF Jr, *et al.* Cancer mortality in US counties with petroleum industries. *Science* 1977; 198: 51-3.
192. Maizlich N, Beaumont J, Singleton J. Mortality among California highway workers. *Am J Ind Med* 1988; 13: 363-79.
193. Park R, Krebs J, Mirer F. Mortality at an automotive stamping and assembly complex. *Am J Ind Med* 1994; 26: 449-63.
194. Theriault G, Goulet L. A mortality study of oil refinery workers. *J Occup Med* 1979; 21: 367-70.
195. Chen R, Seaton A. A meta-analysis of painting exposure and cancer mortality. *Cancer Detect Prev* 1998; 22: 533-9.
196. Montanaro F, Ceppi M, Demers PA, *et al.* Mortality in a cohort of tannery workers. *Occup Environ Med* 1997; 54: 588-91.
197. Delzell E, Monson RR. Mortality among rubber workers. III. Cause specific mortality 1940-1978. *J Occup Med* 1982; 23: 677-84.
198. Hakama M, Kilpikari I. Cancer risk among rubber workers. *J Toxicol Environ Health* 1981; 6: 1211-8.

199. Li FP, Fraumeni JF, Mantel N, *et al.* Cancer mortality among chemists. *J Natl Cancer Inst* 1969; 43: 1159-64.
200. Aksoy M. Malignancies due to occupational exposure to benzene. *Am J Ind Med* 1985; 7: 395-402.
201. Hayes RB, Yin SN, Dosemeci M, *et al.* Mortality among benzene-exposed workers in China. *Environ Health Perspect* 1996; 104 suppl 6: 1349-52.
202. Hunter FH. Chronic exposure to benzene. II. The clinical effects. *J Ind Hyg Toxicol* 1939; 21: 331.
203. American Petroleum Industry. *Toxicology Review: Benzene, 1948.*
204. Staffa JA, Mehlman MA. *Innovation in Cancer Risk Assessment (ED₀₁ Study).* Chicago: Pathotox Pub, 1979.
205. California Air Resources Board. Report to the Scientific Review Panel on Benzene, Nov. 27, 1984.
206. Aksoy M. Benzene and malignancies. In Mehlman MA, Upton A. *Adv Modern Env Toxicol* 1994; 23: 1-9.
207. Elkins HB, Pagnotto LD. Benzene content of petroleum solvents. *AMA Archives of Industrial Health* 1956; 13: 51-4.
208. Pagnotto LD, Elkins HB, Brusch HG, *et al.* Industrial benzene exposures from petroleum naphtha. I. Rubber coating industry. *Am Ind Hyg Assoc J* 1961; 22: 417-21.
209. Carpenter CP, Kinkead ER, Geary DL Jr, *et al.* Petroleum hydrocarbon toxicity studies. II. Animal and human response to vapors of varnish maker's and painters' naphtha. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975; 32: 263-81.
210. Elkins HB, Comproni EM, Pagnotto LD. Industrial benzene exposures from petroleum naphtha. II. Pertinent physical properties of hydrocarbon mixtures. *Ind Hyg J* 1963; 99-102.
211. Carpenter CP, Kinkead ER, Geary DL Jr, *et al.* Petroleum hydrocarbon toxicity studies. III. Animal and human response to vapors of Stoddard solvent. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975; 32: 282-97.
212. Carpenter CP, Kinkead ER, Geary DL Jr, *et al.* Petroleum hydrocarbon toxicity studies. VIII. Animal and human response to vapors of "140 degrees Flash Aliphatic Solvent". *Toxicol Appl Pharmacol* 1975; 34: 413-29.
213. Trieff NM, Corrigan GE. Contemporary work-related environmental diseases. *Tex Rep Biol Med* 1975; 33: 107-44.
214. Morata TC. Study of the effects of simultaneous exposure to noise and carbon disulfide on workers' hearing. *Scand Audiol* 1989; 18: 53-8.
215. Nakajima T, Okuyana S, Yonekura I, *et al.* Effect of ethanol and phenobarbital administration on the metabolism and toxicity of benzene. *Chem Biol Interact* 1985; 55: 23-38.
216. Korsak Z, Sokal JA, Dedyk A, *et al.* Toxic effects of combined exposure to toluene and xylene in animals. I. Acute inhalation study. *Pol J Occup Med* 1988; 1: 45-50.
217. Korsak Z, Sokal JA, Gorny R. Toxic effects of combined exposure to toluene and *m*-xylene in animals. III. Subchronic inhalation study. *Pol J Occup Med Environ Health* 1992; 5: 27-33.
218. Liira J, Elovaara E, Raunio H, *et al.* Metabolic interaction and disposition of methylethylketone and *m*-xylene in rats at single and repeated inhalation exposures. *Xenobiotica* 1991; 21: 53-64.
219. Urgvary G, Tatria E. On the embryotoxic effects of benzene and its allyl derivatives in mice, rats, and rabbits. *Arch Toxicol* 1985; 8 suppl: 425-30.
220. Mehlman MA. Benzene health effects: unanswered questions still not addressed. *Am J Ind Med* 1991; 20: 707-11.

Tumori neuroendocrini: linee guida per la diagnosi e il trattamento

Neuroendocrine tumours: an update about diagnosis and treatment

Fernando Cirillo

Dipartimento di Chirurgia Generale, Unità Operativa di Chirurgia Generale, Azienda Ospedaliera "Istituti Ospitalieri", Cremona, Italia

Riassunto

I tumori neuroendocrini sono neoplasie considerate rare, anche se recenti osservazioni confermano un aumento di casi diagnosticati. Si tratta prevalentemente di tumori ben differenziati, con basso grado di malignità e con lunghe sopravvivenze, spesso caratterizzate dalla presenza di sintomi invalidanti difficilmente dominabili. Nel 20-30% dei casi sono invece tumori maligni metastatici e, nel caso di tumori indifferenziati, con prognosi sempre infausta a breve termine. La diagnostica radiologica e medico nucleare permettono una pianificazione del programma terapeutico in oltre il 50% dei casi. La diagnostica di laboratorio e l'immuno-(cito)isto-chimica consentono invece di valutare gli aspetti prognostici della malattia. Il trattamento chirurgico deve essere sempre considerato come scelta primaria quando curativo. La chemioterapia va riservata ai casi di malattia metastatica non aggredibile chirurgicamente e nelle forme indifferenziate. I tumori ben differenziati a basso indice di proliferazione possono invece avvantaggiarsi dall'uso degli analoghi della somatostatina. L'associazione analoghi della somatostatina e interferone α ha consentito un buon controllo della malattia nel carcinoma maligno. La chemoembolizzazione ha dato buoni risultati, col vantaggio di essere ripetibile nel tempo. La terapia radiometabolica può essere impiegata nella malattia avanzata, con un controllo ottimale dei sintomi anche per lungo tempo. Le forme familiari sono di solito caratterizzate da un basso grado di malignità che permette un approccio primariamente farmacologico alla malattia; in alcuni casi, la presenza di forme metastatiche autorizza ad una aggressività chirurgica, allo scopo di migliorare la qualità di vita e la sopravvivenza del paziente. Il trapianto di fegato può essere considerato in casi selezionati. Eur. J. Oncol., 9 (1), 37-47, 2004

Parole chiave: tumori neuroendocrini, carcinoide, tumore a cellule di Merkel, feocromocitoma

Received/Pervenuto 16.5.2003 - Accepted/Accettato 10.9.2003
Address/Indirizzo: Prof. Fernando Cirillo, Dipartimento di Chirurgia Generale, Unità Operativa di Chirurgia Generale, Azienda Ospedaliera "Istituti Ospitalieri", Largo Priori 1, 26100 Cremona, Italia
Tel. 0039/0372/405309 - Fax: 0039/0372/405617
E-mail: f.cirillo@neuroendocrini.it

Summary

Neuroendocrine tumours are considered rare neoplasias, even if recent observations confirm an increase of diagnosed cases. They are frequently well differentiated tumours, with low grade of malignancy and with long survival periods often characterized by the presence of disabling symptoms that are difficult to control. In 20-30% of cases, however, these are metastatic malignant tumours and, in the case of poorly differentiated tumours, always with an unfavourable short-term prognosis. Radiologic and nuclear imaging allow to plan a programme of therapy in over 50% of cases. On the contrary, laboratory and immuno-(cyto) histo-chemical diagnosis permit a prognostic evaluation of the disease. Surgical treatment, when curative, must always be considered as first choice therapy. Chemotherapy must be reserved to cases of metastatic disease and undifferentiated forms. Well differentiated tumours with a low proliferation index may obtain some improvement from the use of somatostatin analogues. The association of analogues with α -interferon have resulted in a good control of the disease in the malignant carcinoid. Chemoembolisation has given good results, with the advantage of being repeatable. Radiometabolic therapy may be employed in advanced disease, with a good control of symptoms even over a long period of time. Familial forms are usually characterized by a low grade of malignancy that permits a primarily pharmacological approach; in some cases the presence of metastatic forms justify a surgical aggressiveness, in order to improve the quality of life and survival of the patient. Liver transplant may be considered in selected cases. Eur. J. Oncol., 9 (1), 37-47, 2004

Key words: neuroendocrine tumours, carcinoid, Merkel cell carcinoma, pheochromocytoma

Introduzione

I tumori neuroendocrini (NET) sono comunemente ritenuti *rari*. La loro incidenza è bassa (0,5-1 caso/100000/anno); nel 70% dei casi sono ben differenziati e a basso grado di malignità, e caratterizzati da lunghe sopravvivenze. Nel caso producano sostanze peptidiche, questi tumori possono presentare un andamento clinico capriccioso, con presenza di sintomi invalidanti come la diarrea cronica refrattaria; talora recidivano anche a lunga distanza di tempo. Nel 20% circa dei casi si tratta invece di tumori francamente maligni, che metastatizzano prevalentemente per via ematica al fegato. I rimanenti tumori sono indifferenziati, di solito biologicamente asintomatici, con prognosi sempre infausta a breve termine e capaci di metastatizzare anche al tessuto cutaneo. I NET possono essere sporadici o con carattere di malattia familiare, diagnosticata in pazienti che appartengono a famiglie note per disordini ormonali.

Nonostante il termine *raro*, autorizzato peraltro dai dati di una letteratura non più recente, l'incidenza di questi tumori è andata progressivamente aumentando, soprattutto nel corso della passata decade, come confermato da un'analisi condotta dalla Banca Dati Nazionale sulle Malattie Endocrine Gastro-Entero-Pancreatiche (Progetto GEP®) che, al termine del 1998, è riuscita a raccogliere 470 casi osservati in 45 Centri distribuiti su tutto il territorio nazionale¹⁻³.

Lo spazio occupato da questi tumori è andato dunque dilatandosi negli ultimi anni, trasformandosi in un problema col quale il clinico deve iniziare a misurarsi anche (e soprattutto) al di fuori dei grossi centri di riferimento oncologico.

Questo fatto ha portato molti pazienti a rivolgersi anche a piccoli centri, il più delle volte carenti di dotazioni tecnologiche e culturali adeguate.

Mancando linee guida standardizzate, si sono visti approcci diagnostici e terapeutici spesso opinabili, a volte anche molto costosi, con risposte alla malattia e sopravvivenze fra le più varie, inferiori alle risorse utilizzate e ai sacrifici richiesti al paziente, e comunque con scarso impatto sulla qualità di vita.

L'aumento del numero di casi diagnosticati negli ultimi anni rende ragione dell'attuale maggiore attenzione da parte del clinico nei riguardi di questa particolare patologia, con impiego di alcune nuove tecniche diagnostiche di *imaging* e di laboratorio, e con l'uso terapeutico di nuove molecole, anche con approccio radiometabolico, con un impatto favorevole sul decorso della malattia.

Diagnosi clinica

I NET vengono divisi in due distinte categorie, funzionanti e non funzionanti, in relazione alla capacità di produrre e secernere sostanze ormonali. Nell'80% dei casi, nelle forme digestive, i NET sono asintomatici, espressione di una mancata secrezione ormonale oppure di una inadeguata o patologica secrezione di precursori peptidici clinicamente incapaci di evocare una sintomatologia.

In questi casi, il tumore (o più frequentemente le sue metastasi) viene riconosciuto come *incidentaloma* nel corso di accertamenti radiologici richiesti per scopi diversi.

Nell'altro 20% i NET sono sintomatici, con risvolti clinici del tutto eterogenei e sindromi complesse⁴ (Tabelle 1, 2).

Tabella 1 - Sintomi e segni di più frequente osservazione nei NET digestivi

- Gastrite, gastro-duodenite, patologia ulcerosa peptica recidiva e resistente alla terapia farmacologica convenzionale (gastrinoma sporadico, sindrome di Zollinger Ellison, gastrinoma in ambito MEN1, altri tumori secernenti gastrina)
- Diarrea cronica refrattaria (carcinoide intestinale, carcinoide bronchiale, carcinoma midollare della tiroide, VIPoma, gastrinoma, glucagonoma, somatostatina, altri tumori secernenti peptici diarrogeni)
- Flushing (carcinoide intestinale, carcinoide gastrico, alcuni carcinomi neuroendocrini indifferenziati, alcuni VIPomi)
- Eritema necrolitico migrante o altre insolite manifestazioni cutanee (glucagonoma)
- Iperglicemia (glucagonoma, tumori secernenti glucagone)
- Ipoglicemia (insulinoma, tumori secernenti insulina)

Tabella 2 - Ipergastrinemia, diarrea cronica refrattaria, stati ipoglicemici: diagnosi differenziale

Ipergastrinemia		
Gastrinoma	++++	(>1000 pg/ml)
Gastrite atrofica	++++	
Iperplasia G antrale	++++	(>150 pg/ml)
Anemia pernicioza	++++	
Malattia peptica ulcerativa	+++	
Cancro gastrico	+++	
Iatrogena (post-vagotomica, resezione massiva piccolo intestino)	+++	
Artrite reumatoide	++	
Diabete mellito	+	
Insufficienza renale cronica	+	
Feocromocitoma	+	
Diarrea cronica refrattaria		
Insufficienza pancreatica		
Epatopatia cronica		
Sclerosi sistemica		
Diabete mellito		
Colon irritabile		
Infezioni intestinali (batteriche, virali, parassitarie)		
Morbo di Crohn		
Morbo celiaco		
Iatrogena (resezioni intestinali, enteriti post-attiniche, lassativi, biguanidi, citostatici)		
AIDS		
Stati ipoglicemici		
Pancreatiti acute e croniche		
Neoplasie extra-pancreatiche (sarcoma retroperitoneale)		
Malattie emoproliferative		
Alterata risposta insulare (ipertono vagale, tachialimentazione, diabete latente)		
Ipoglicemia iatrogena (eccessiva somministrazione di insulina o di ipoglicemizzanti orali)		
Disordini immunitari		
Assenza congenita di glucagone (malattia di Mc Quarrie)		
Ipopituitarismo (difetto di ormone somatotropo)		
Insufficienza surrenalica		
Insufficienza epatica		
Sostanze tossiche (alcol, funghi)		
Denutrizione, malassorbimento		

Sono state osservate anche forme di artrite reumatoide, acromegalia, sindrome di Cushing, cefalea, iperpiressia. Poiché un singolo clone cellulare può essere chiamato a produrre e secernere più peptidi, anche in momenti diversi della propria evoluzione naturale, ne viene che i sintomi descritti possono associarsi in modo sindromico.

Per le forme extra-digestive, nel caso di uno stato ipertensivo arterioso soprattutto nel paziente giovane, è indispensabile escludere la presenza di un feocromocitoma, anche extra-surrenalico (clinica, *imaging*, cataboliti urinari delle catecolamine), talvolta associato a sindrome familiare.

Lo studio del carcinoma polmonare, del carcinoma midollare della tiroide e del tumore a cellule di Merkel rientra nella normale sorveglianza in ambito rispettivamente pneumologico, endocrinologico e dermatologico. Dispnea, emottisi, *imaging* caratteristici associati talora a sindrome da carcinoma devono orientare verso la diagnosi di carcinoma polmonare. Una lesione tiroidea o cutanea sospetta possono orientare lo specialista ad una diagnosi anche in senso neuroendocrino.

Al di fuori della sporadicità della malattia neuroendocrina, il paziente dovrà essere valutato anche in ambito familiare (multiple endocrine neoplasia = MEN), escludendo nella parentela più vicina una possibile sindrome familiare.

Diagnosi per immagini e di laboratorio

Laboratorio

La diagnosi di laboratorio è utile nel tumore funzionante. Essa prevede la ricerca nel plasma di peptidi prodotti dalla neoplasia e/o di altri marcatori specifici di malattia.

I costi di gestione in questo settore della diagnostica, di solito medio-alti, hanno reso indispensabili scelte mirate da un lato al risparmio, dall'altro alla ricerca di kit sempre più specifici e sensibili.

Nella nostra esperienza, la ricerca di peptidi neoplastici oggi cade esclusivamente sulla gastrina plasmatica e sull'acido 5-idrossindolacetico urinario (5-HIAA). Si tratta di marcatori specifici di malattia, a basso costo, la cui titolazione non presenta problemi di ulteriore validazione. In particolare, la gastrina si presenta elevata nel plasma non solo nelle forme di gastrinoma sporadico, ma anche in alcune forme familiari (MEN1) e in numerosi altri tumori a secrezione mista; il 5-HIAA, catabolita urinario della serotonina, si può osservare a livelli molto elevati nelle urine dei pazienti affetti da sindrome da carcinoma⁵.

Fra i marcatori non peptidici, la scelta cade sulla enolasi neuro-specifica (NSE) e sulla cromogranina A; il primo, espresso dalla maggior parte delle cellule a differenziazione neuroendocrina nelle isoforme dell'enzima fosforilato idratasi, presenta una sensibilità variabile fra il 40-70%, il secondo fra il 70-90% dei casi^{6,7}. La cromogranina A (49 Kda), che insieme alla B e C appartiene alla famiglia delle granine, è costituita da 439 aminoacidi ed il gene che codifica la proteina è localizzato sul cromosoma 14.

Nella nostra esperienza, la ricerca della cromogranina A è risultata particolarmente sensibile nelle forme già metastatiche all'esordio clinico (fegato e polmoni) rispetto alle forme primitive localizzate con *grading* ben differenziato e con basso grado di malignità; nelle forme con alto grado di malignità e in quelle indifferenziate sono state osservate concentrazioni estremamente

elevate del marcatore, suggerendo l'opinione che il diametro tumorale, il *grading* avanzato e l'alto indice di proliferazione siano in grado di stimolare l'espressione della proteina. In particolare, in tutti i casi avanzati trattati, si è osservata una consistente caduta dei livelli plasmatici della cromogranina A rispetto ai valori basali, a dimostrazione che l'espressione della proteina è fortemente condizionata oltre che dallo stadio della malattia anche dalla risposta terapeutica.

È possibile affermare che alti livelli plasmatici di cromogranina A possono prestarsi bene come indicatori di prognosi infausta. Il marcatore presenta caratteristiche adatte sia per il monitoraggio del paziente in corso di trattamento, sia durante il follow up, dimostrando una concordanza fra la variazione dei livelli plasmatici di cromogranina A e l'evoluzione clinica della malattia.

Radiologia

I concetti di costo-beneficio valgono pure per l'*imaging* radiologico. Le metodiche radiologiche possono essere suddivise in differenti livelli in rapporto alla specificità, sensibilità, disponibilità e costo.

Al 1° livello si colloca l'ecografia, di basso costo e non invasiva, con sensibilità (per l'addominale) tra il 20 ed il 70% e specificità superiore al 90% dei casi; l'esame radiologico standard del torace e tutta la diagnostica digestiva con contrasto completano la batteria degli esami di 1° livello.

Esame di 2° livello è la TC spirale, con sensibilità superiore alla ecografia (85%) per lo studio addominale, ma con costi meno contenuti⁸⁻¹⁰.

A un livello superiore si colloca la RM, con sensibilità per la parte addominale mediamente sovrapponibile alla TC, a fronte però di costi maggiori^{11,12}.

L'angiografia diagnostica (per lo studio addominale) è un esame sensibile (15-90%) ma con complicanze medio-alte (0,6-2%) e costi poco contenuti. Per tali motivi, si consiglia di riservare l'uso di questa metodica ai casi con *imaging* negativo ma con forte sospetto clinico per NET. Lo stesso concetto vale per l'ecografia endoscopica (EUS) con sensibilità molto elevata (57-100%), assenza di complicanze ma costi medio-alti, da riservare ai casi radiologicamente negativi per lo studio pancreatico¹³.

Medicina nucleare

L'avvento di Octreoscan, che utilizza un analogo della somatostatina marcato con ¹¹¹In-pentetreotide, ha rivoluzionato l'approccio alla diagnosi di questi tumori. La metodica è in grado infatti di magnificare recettori per la somatostatina presenti sulla superficie cellulare di questi tumori, permettendo di individuare anche piccoli agglomerati neoplastici la cui definizione spesso risulta difficile con le convenzionali metodiche di *imaging*. La metodica permette anche una valutazione prognostica in rapporto alla densità recettoriale *in vivo*, consentendo inoltre di adottare in terapia gli analoghi della somatostatina¹⁴. Infine Octreoscan, grazie alla sua particolare sensibilità (58-100%), è in grado di modificare l'approccio terapeutico nel 21-47% dei casi¹⁵⁻¹⁸.

Una alternativa ad Octreoscan nella diagnostica medico-nucleare è rappresentata da MIBG (metaiodobenzilguanidina) marcato, che ha mostrato di essere un indicatore specifico e sensibile per numerosi NET¹⁹. Infine, l'uso della PET (Positron Emission Tomography) può essere riservato nel monitoraggio della terapia²⁰.

Anatomia patologica

L'anatomo-patologo riveste un ruolo strategico nello studio di questi tumori. Allo studio morfologico negli ultimi anni si è affiancato quello immuno-isto-chimico, in grado di dare informazioni anche in termini prognostici, dosando l'espressione di alcune proteine (NSE, cromogranina A, sinaptofisina, cheratine), alcune delle quali legate all'angioinvasività e alla proliferazione cellulare (ki67)²¹.

La raccolta con ago-aspirato per lo studio citologico (in particolare nel paziente metastatico) permette di studiare la malattia allo scopo di garantire un più corretto approccio terapeutico.

Endoscopia

Le metodiche endoscopiche rivestono un ruolo occasionale nella fase diagnostica, mentre ricoprono una parte importante nella veste *interventistica*, rivelandosi terapeutiche nei casi di NET (primitivi o recidivi) di piccole dimensioni e con basso grado di malignità (ECL del fondo gastrico, gastrinoma gastro-duodenale, carcinoide trabecolare del retto)²².

Genetica

Gli studi genetici sono indispensabili nelle forme familiari (MEN).

L'analisi genetica per l'identificazione della mutazione MEN1 risulta estremamente utile permettendo di individuare i soggetti potenzialmente malati. L'identificazione di portatori (asintomatici) di malattia può invece facilitare la diagnosi precoce e il trattamento della malattia, aiutando a ridurre sia la morbilità che la mortalità.

Va osservato che non sempre l'analisi mutazionale porta all'identificazione della mutazione in famiglie MEN1, per la presenza di sequenze regolatrici inattivate. Per questo motivo, l'accertamento clinico rimane ad oggi un prerequisito per l'indagine molecolare.

Quando non sia possibile l'esecuzione di un'analisi mutazionale, gli individui a rischio (parenti di 1° grado) dovrebbero essere sottoposti ad un'esauriente valutazione biochimica per accertare la presenza di una MEN1 ogni 3 anni dopo il quinto anno di vita²³.

Terapia chirurgica

La terapia chirurgica riveste un ruolo importante nel trattamento dei NET, sia quando abbia finalità curative con l'asportazione di una lesione primitiva non metastatica, sia quando interpreti il ruolo della palliazione nella malattia avanzata.

Criteri generali indispensabili per un corretto approccio chirurgico alla malattia sono la ricerca radiologica del tumore primitivo, lo studio delle eventuali localizzazioni metastatiche, la ricerca immuno-(cito)isto-chimica preoperatoria, quando possibile.

Malattia metastatica

Quando il tumore primitivo non presenta metastasi, l'asportazione radicale della lesione si configura come trattamento curativo. L'esplorazione chirurgica, anche con l'ausilio di US intraoperatoria per i NET digestivi, ha il compito di localizzare con preci-

sione la sede della lesione e di escludere altre lesioni secondarie²⁴.

Quando invece il tumore primitivo sia resecabile, ma coesistano lesioni metastatiche sincrone (di solito epatiche nei NET digestivi), si rende necessario pianificare il tipo di trattamento in relazione al numero, dimensioni e sede delle localizzazioni secondarie²⁵. Nel caso di lesioni multifocali epatiche, la chemioembolizzazione costituisce il trattamento di scelta^{26,27}; se invece le metastasi sono confinate ad uno dei due lobi epatici può essere presa in considerazione l'asportazione di uno o più segmenti di fegato, previa valutazione del rischio anestesiológico.

Gli interventi di citoriduzione (*debulking*) proposti da alcuni Autori²⁸⁻³⁰ possono trovare un loro impiego nella neoplasia funzionante allo scopo di ridurre la quantità di tessuto secernente e quindi di controllare i sintomi della malattia, garantendo al paziente una migliore qualità di vita ma non una maggiore sopravvivenza. Una citoriduzione palliativa efficace implica però la rimozione di almeno il 90% del tessuto neoplastico, aumentando in modo sostanziale il rischio di morbilità postoperatoria.

Quando invece è il tumore primitivo a non poter essere rimosso con criterio di radicalità, il trattamento chirurgico sarà unicamente rivolto alla correzione di un alterato transito intestinale e biliare adottando provvedimenti che potranno essere chirurgici (derivazione bilio-digestiva, gastroenterostomia, by-pass intestinale, ileo-colostomia), endoscopici (protesi biliari) o locali (derivazione biliare esterna).

Tumori endocrini del pancreas

Per i tumori endocrini pancreatici a sede unica localizzati alla testa, l'indicazione chirurgica è per la duodenocefalopancreasectomia (DCP) secondo la tecnica di Whipple o di Longmire-Traverso; fanno eccezione i tumori di piccole dimensioni, che possono essere enucleati con la conservazione della maggior parte di tessuto pancreatico sano³¹.

Nel caso di un tumore a carico del corpo o della coda pancreatica, il trattamento prevede rispettivamente la pancreasectomia sub-totale e la pancreasectomia distale. Nel caso di localizzazioni multifocali si rende invece indispensabile la pancreasectomia totale³².

Un caso particolare riguarda i tumori insulari nell'ambito di una malattia familiare (MEN 1) che di solito, per il frequente basso grado di malignità e l'asintomaticità della malattia, vengono trattati in modo conservativo. Fanno eccezione le neoplasie secernenti (in particolare il gastrinoma e l'insulinoma), il cui approccio chirurgico aggressivo, anche nella malattia metastatica, si rivela determinante allo scopo di aumentare la sopravvivenza del paziente³³.

Carcinoide gastrico

Tumori ben differenziati

La maggior parte (oltre il 90% dei casi) dei tumori endocrini della stomaco riportati in letteratura è costituito da tumori ben differenziati. Tra di essi una quota assolutamente minoritaria, di circa l'1%, è costituita da tumori della regione antrale, composti da cellule che producono gastrina. In tutti gli altri casi si tratta di tumori ECL (*enterochromaffin-like*).

I tumori a cellule ECL associati ad ipergastrinemia sono considerati benigni. Il loro trattamento può essere endoscopico se di

diametro <1 cm; quando invece le lesioni siano multiple e/o di diametro >1 cm, va posta l'indicazione all'antrectomia.

I tumori a cellule ECL associati a normogastrinemia sono invece considerati relativamente aggressivi, con metastasi linfonodali nel 55% dei casi ed epatiche nel 24%; per tale motivo, in questi casi, il trattamento deve essere il più possibile aggressivo.

Altri tumori (ipergastrinemici) si associano a sindrome di Zollinger-Ellison. Si tratta di tumori multicentrici di piccole dimensioni, associati a lesioni displastiche localizzate sul fondo gastrico in assenza di atrofia della mucosa oxintica. Il trattamento consiste nella rimozione endoscopica e nella attenta sorveglianza periodica per il controllo di eventuali lesioni precancerose^{34,35}.

Tumori scarsamente differenziati

Questi tumori costituiscono una frazione esigua di tutti i tumori neuroendocrini dello stomaco (6%). Si tratta di grossi tumori ulcerati, infiltranti e metastatici al momento della diagnosi. Di solito negativi alla cromogranina A, risultano positivi a NSE. Possono insorgere in associazione a qualsiasi altra patologia gastrica o sistemica in pazienti nella settima decade di vita, senza preferenza di sesso, e portano a morte il paziente a distanza di pochi mesi.

Si tratta di tumori altamente maligni che richiedono un approccio terapeutico aggressivo, sia chirurgico (quando possibile) che farmacologico.

Carcinoide intestinale

In considerazione della possibile multicentricità della lesione, è indispensabile l'esplorazione accurata di tutto l'addome allo

scopo di escludere eventuali localizzazioni metastatiche linfonodali o a carico del fegato³⁶. Il razionale chirurgico prevede l'asportazione del tumore primitivo, quando possibile, insieme ai linfonodi regionali^{37,38}. Vale la regola, quasi obbligatoria, che lesioni di diametro maggiore di 2 cm presentino un *trend* metastatico più consistente, richiedendo quindi una maggiore aggressività chirurgica²². La rimozione chirurgica di lesioni epatiche secondarie, possibile solo nel 10-25% dei casi³⁹, dovrà essere considerata in rapporto al numero, alle dimensioni, alla sede delle lesioni e al rischio anestesiológico.

In casi poco frequenti, il carcinioide del tenue può manifestarsi con una massiva enterorragia o con quadri di tipo infartuale.

Nei casi di carcinioide non funzionante, la neoplasia può manifestarsi con un quadro di tipo occlusivo dovuto alla crescita endoluminale del tumore^{40,41}. In questi casi, il trattamento chirurgico dovrà essere obbligatoriamente urgente (fig. 1).

Feocromocitoma

Il trattamento di scelta per il feocromocitoma primitivo è ancora la chirurgia.

Il tumore sporadico (*incidentaloma*) è di pertinenza del chirurgo quando la lesione sia di diametro >3 cm o nei casi di crescita rapida con produzione ormonale³³. La surrenectomia controlla l'ipertensione arteriosa nell'80% dei pazienti con tumore benigno (90% di tutti i feocromocitomi). La sopravvivenza è del 95% per il feocromocitoma benigno e del 45% per quello maligno⁴².

Nel feocromocitoma come forma familiare (MEN 2), la bilateralità è estremamente frequente (50%), di solito come manifestazione tardiva della sindrome (40%). Per tale motivo, di fronte al-

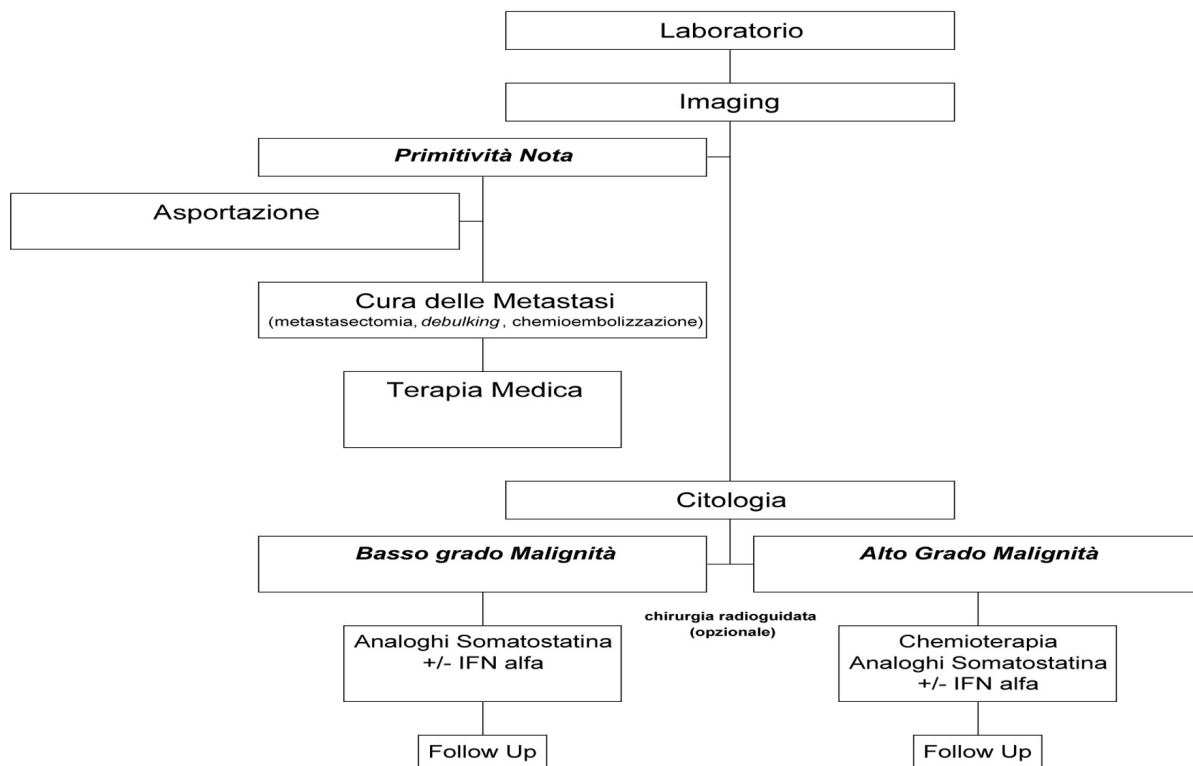


Fig. 1. Flow chart per il carcinioide intestinale.

la monolateralità della manifestazione, dovrà comunque essere presa in considerazione la possibilità di una surrenectomia bilaterale *d'ambled* allo scopo di prevenire recidive a distanza.

Feocromocitomi extra-midollari, più aggressivi, sono presenti nel 10% dei casi (2% intratoracici). Il trattamento è chirurgico (fig. 2).

Tumore a cellule di Merkel

Il ruolo della chirurgia per il tumore cutaneo a cellule di Merkel è diverso a seconda dello stadio della malattia.

Nel 1° stadio, l'escissione del tumore associata alla radioterapia (40-60 Gy) garantisce sopravvivenze a 5 anni nel 50% dei casi, inferiori nel 2° stadio dove sono già presenti metastasi linfonodali^{43,44}.

Le recidive (cutanea 23-60%; linfonodale 40-73%) sono di competenza chirurgica con l'integrazione della radioterapia a regimi più sostenuti; in altri casi, ma aneddotici, sono state riportate remissioni occasionali con intervalli liberi relativamente lunghi, con l'uso di infiltrazione locale di interferone α -2b o di *tumor necrosis factor* (TNF) o con ipertermia associata a basse dosi di radioterapia o associata a TNF- α , IFN γ e melphalan (fig. 3).

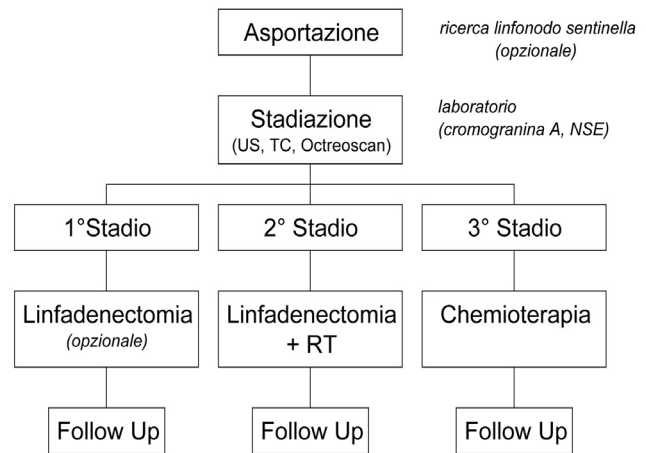


Fig. 3. Flow chart per il tumore a cellule di Merkel.

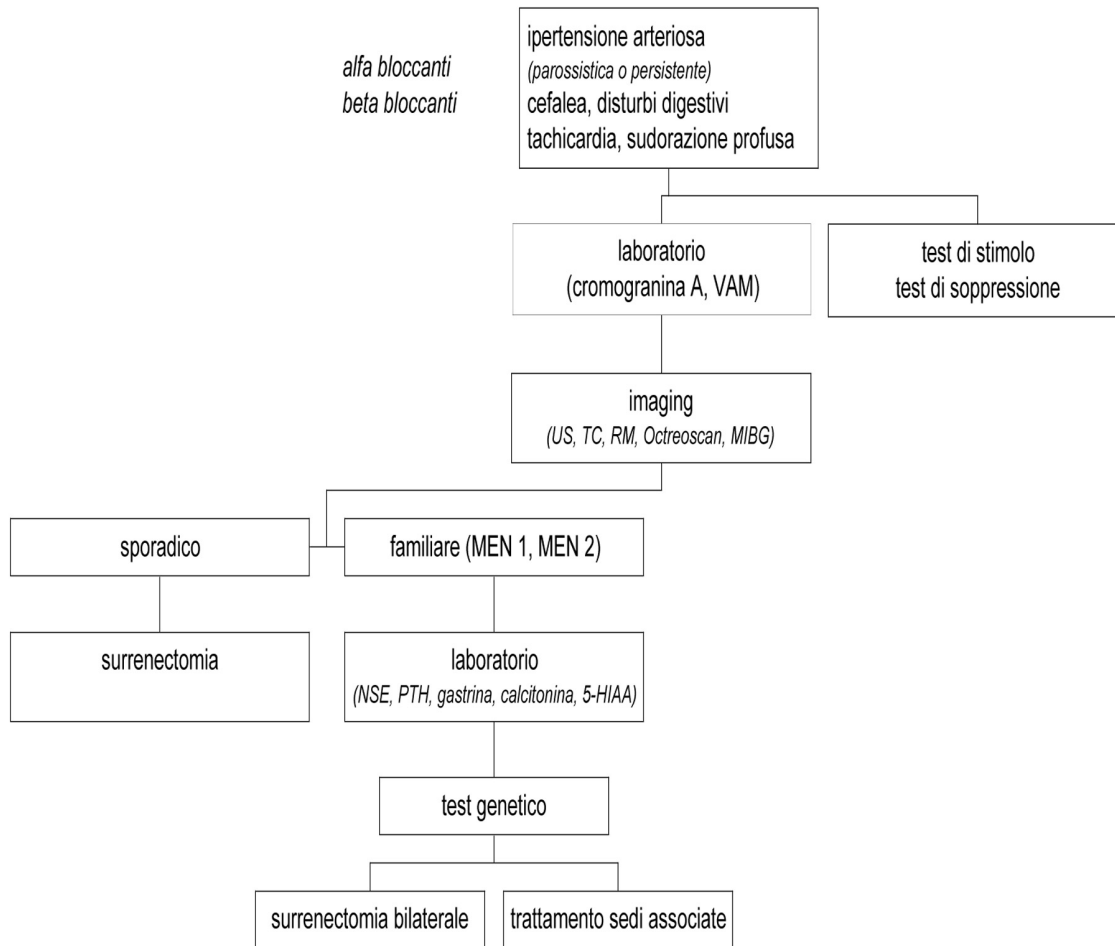


Fig. 2. Flow chart per il feocromocitoma.

Carcinoide polmonare

Carcinoide tipico e atipico

Tumore a basso grado di malignità, raro (1-2% di tutti i tumori polmonari), distinto in tipico e atipico^{45,46}. Rara la sindrome da carcinoide (2-7%); talvolta presente una sindrome di Cushing, con produzione di ACTH o di un *releasing* della corticotropina^{47,48}.

I carcinoidi tipici sono tumori benigni, di dimensioni inferiori a 3 cm, con un coinvolgimento linfonodale nel 5-15% dei casi. La sopravvivenza a 5 anni è stimata attorno al 90-98% dei casi.

I carcinoidi atipici presentano invece un decorso clinico più aggressivo, con dimensioni generalmente superiori ai 3 cm di diametro e riscontro di coinvolgimento linfonodale nel 40-48% dei casi. Le metastasi a distanza sono presenti nel 20% dei casi. La sopravvivenza a 5 anni è pari al 60%⁴⁹. La chirurgia rappresenta il trattamento di elezione, ed è conservativa nella maggior parte dei casi per la tendenza del carcinoide a non infiltrare i tessuti circostanti. Raramente è indicata la pneumonectomia, riservata a lesioni centrali di grosse dimensioni. La dissezione linfonodale è d'obbligo soprattutto per i carcinoidi atipici.

La resezione per via endoscopica, essendo frequentemente associata a rischio di emorragia, è riservata a pazienti ad alto rischio con ostruzione bronchiale sintomatica^{50,51}.

Carcinoma neuroendocrino a grandi cellule

Tumore scarsamente differenziato, ad alto grado di malignità, con prognosi peggiore rispetto al carcinoide tipico e atipico. La terapia d'elezione è chirurgica. Scarsa la chemioresponsività^{52,53}.

La nostra casistica (15 casi osservati negli ultimi 12 anni) consente di confermare una maggiore aggressività per le forme meno differenziate, che possono presentare quadri di malattia avanzata già all'esordio, riducendo drasticamente la percentuale di operabilità (53% dei casi nella nostra serie) costringendo all'adozione di provvedimenti di tipo farmacologico.

Chirurgia radioguidata

La metodica utilizza una gamma-camera, una sonda manuale e uno specifico radionuclide come tracciante (¹¹¹In-pentetreotide). Tale metodica implica esperienza e una forte collaborazione fra chirurgo e medico-nucleare.

L'indicazione principale è nella ricerca di una primitività occulta nella malattia metastatica.

La lenta *clearance* del tracciante radioattivo, che può permanere per lungo tempo in circolo (soprattutto nel fegato, milza e reni), può influenzare l'identificazione di lesioni molto piccole o con scarsa densità recettoriale. Il costo e la gestione del materiale limita l'indagine a pochi casi selezionati.

Manca ancora il riscontro di dati definitivi sulla qualità di vita e soprattutto sulla sopravvivenza dei pazienti trattati con questa metodica⁵⁴.

Terapia farmacologica

Il trattamento medico dei NET va considerato nella malattia metastatica. I farmaci utilizzati sono i chemioterapici, gli analoghi della somatostatina e gli interferoni.

Fra i chemioterapici, i più sensibili si sono dimostrati la streptozotocina (STZ), la doxorubicina (DOXO), il 5-fluorouracile (5-FU), la dacarbazina (DTIC) ed il metotrexate (MTX), meglio se in associazione.

Per i tumori digestivi si è osservato un comportamento diverso fra carcinoide e tumori endocrini del pancreas quando trattati con chemioterapici. Infatti, il carcinoide presenta risposte percentualmente molto basse (8-40%) con scarso intervallo libero. Diversamente, il trattamento con chemioterapici nei tumori pancreatici fa osservare risposte migliori (40-60%) con intervalli più lunghi (6-24 mesi)⁵².

Per i tumori indifferenziati, l'associazione di etoposide (VP16) e cisplatino (DDP) ha mostrato risposte particolarmente elevate (67% dei casi), con durata di risposta fino a 9 mesi⁵⁵⁻⁵⁸.

Negli ultimi 12 anni, presso il nostro Dipartimento, sono stati osservati 134 pazienti affetti da tumore neuroendocrino digestivo. Il trattamento chirurgico è stato praticato nel 65,6% dei casi, e la chemioterapia nel 19,4% dei casi. Le associazioni chemioterapiche STZ+DOXO nei tumori ben differenziati e VP16+DDP in quelli indifferenziati hanno mostrato complessivamente buone risposte. Il trattamento con analoghi della somatostatina è stato praticato nel 35,8% dei casi a dosaggio variabile, con un controllo dei sintomi in circa l'80% dei casi. Occasionalmente è stata osservata una risposta obiettiva, in particolare nei tumori con basso indice di proliferazione (ki67) e con un'alta densità *in vivo* per i recettori della somatostatina. Fra i pazienti affetti da carcinoide metastatico, il 5,9% è stato trattato con interferone α (IFN α), spesso in associazione con gli analoghi della somatostatina, con una risposta obiettiva media pari al 12% e controllo dei sintomi nel 77% dei casi. Dalle nostre osservazioni si può affermare che il trattamento chirurgico è da considerare come scelta prioritaria e curativa quando il tumore primitivo non sia metastatico; nei casi avanzati, la chirurgia citoreducente può essere presa in considerazione, purché seguita da altre terapie adiuvanti. La chemioterapia è utile soprattutto nei tumori scarsamente differenziati, particolarmente in quelli pancreatici. Al contrario, gli analoghi della somatostatina in associazione con IFN α hanno mostrato buone risposte obiettive nel trattamento del carcinoide metastatico. Infine, l'osservazione di una buona risposta obiettiva (spesso in corso di trattamento con analoghi della somatostatina) può essere messa in relazione ad uno stadio non avanzato della malattia o al basso grado di malignità del tumore⁵⁹.

Nel carcinoide polmonare la chemioterapia viene utilizzata con finalità palliative nel trattamento della malattia metastatica. I farmaci singolarmente considerati attivi sono 5-FU, DDP, DTIC, DOXO, VP16, STZ. La loro singola attività terapeutica non è superiore al 10-20%, ed anche in associazione le risposte non comportano lunghi intervalli liberi da malattia⁶⁰.

Per il feocromocitoma i chemioterapici più sensibili sono, fra gli altri, ciclofosfamide (CTX), vincristina e DTIC, con risposte parziali o complete nel 57% dei casi e durata media di 21 mesi⁶¹. Nel tumore a cellule di Merkel in fase avanzata le molecole più sensibili si sono dimostrate DDP, VP16, DOXO, con risposte iniziali sorprendenti (61%), ma con durata molto breve (3-12 mesi)⁶².

In un caso di tumore a cellule di Merkel riportato in letteratura, gli analoghi della somatostatina hanno mostrato una risposta completa⁶³.

Allo stato attuale delle conoscenze, la corretta strategia terapeutica del tumore a cellule di Merkel consiste nella radicale, aggressiva e precoce asportazione della neoplasia al suo stadio ini-

Tabella 3 - Risposta alla chemioterapia nel tumore di Merkel metastatico

Chemioterapico ^a	Pazienti	Risposta completa (%)	Risposta parziale (%)
D/CF/V D/CF/E D/CF±V±DTIC D/CF±V±P	26	38	31
Associazioni col platino (E,B,M,CB, D,5-FU,C)	9	44	11
Associazioni differenti (STZ,5-FU,P,V,D, L-PAM,CF,L,DTIC,M, CCNU,ACT-D)	11	27	18
Totale	46	36	20

^aACT-D, actinomicina-D; B, bleomicina; C, cisplatino; CB, carboplatino; CCNU, lomustina; CF, ciclofosfamide; D, doxorubicina; DTIC, dacarbazina; E, etoposide; 5-FU, 5-fluorouracile; L, leucovorin; L-PAM, melphalan; M, methotrexate; P, prednisona; STZ, streptozotocina, V, vincristina

ziale, allo scopo di ridurre la percentuale di recidive a distanza e di migliorare la sopravvivenza. Ciò è affidato principalmente alla chirurgia e alla radioterapia sequenziale, come pure confermato dalle nostre osservazioni. Il trattamento della malattia avanzata è invece affidato ai chemioterapici con i limiti di una eccessiva tossicità, di brevi periodi di remissione e di uno scarso impatto sulla sopravvivenza (Tabella 3).

Tenuto presente che la recidiva locale tende a comparire entro l'anno dall'asportazione del tumore primitivo, che le metastasi linfonodali compaiono in quasi la metà dei pazienti e che quelle a distanza si manifestano in oltre un terzo dei pazienti, diventa indispensabile adottare un trattamento in grado di bilanciare la richiesta di remissioni più lunghe con una migliore qualità di vita. In questo ambito, abbiamo osservato che il trattamento con analoghi della somatostatina ha garantito risposte interessanti in assenza di pesanti effetti collaterali, suggerendo una stretta relazione biologica fra il tumore e la somatostatina. L'attento studio dei fattori prognostici della malattia può aiutare a scegliere il trattamento più adatto allo scopo di garantire una efficace risposta terapeutica⁶⁴.

Gli analoghi della somatostatina (octreotide, lanreotide) hanno il loro razionale d'impiego nel controllo dei sintomi nella malattia funzionante⁶⁵. In particolare, è stato osservato che l'octreotide

è in grado di ridurre la secrezione dei mediatori neoplastici e di inibire la loro azione sui bersagli tissutali.

Così, con dosi variabili di octreotide (100-1500 µg/die) nel gastrinoma è stata osservata una risposta ai sintomi nel 90% dei casi con un controllo completo della gastrinemia; nel VIPoma, invece, si è osservata una risposta alla diarrea nel 56% dei casi con una riduzione della VIPemia pari al 60%. Nel carcinoma maligno intestinale, infine, il controllo dei sintomi è presente nel 60-88% dei casi con una riduzione >50% dei livelli urinari di 5-HIAA in oltre il 70% dei casi²². Contrastanti invece le risposte ai sintomi nell'insulinoma e nel glucagonoma.

Numerose osservazioni confermano inoltre che gli analoghi della somatostatina sono in grado di comportarsi come antiproliferativi⁶⁶, in particolare quando utilizzati a dosaggio elevato⁶⁷ (Tabella 4).

In assenza di un consenso definitivo capace di legittimare l'uso degli analoghi della somatostatina nella malattia metastatica, possono essere individuati alcuni indicatori prognostici, dove la dimostrazione *in vivo* di recettori specifici potrebbe suggerire l'impiego oltre ad avere, insieme alla differenziazione cellulare, un preciso significato prognostico con esiti il più delle volte favorevoli nei casi di neoplasia con alta densità recettoriale e buon grado di differenziazione (Tabella 5).

Gli interferoni e in particolare l'IFN α (2a, 2b), sono utilizzati in associazione agli analoghi nel trattamento del carcinoma avanzato, con risposte obiettive medie del 12,16% (0-39%) e risposte biochimiche medie del 41,45% (7-67%)²². L'IFN α si comporta come immunomodulante in sinergia con gli analoghi associati.

Chemoembolizzazione

Si tratta di una metodica che appartiene alla radiologia interventistica, adatta nei casi di malattia avanzata limitata al fegato. E' uno strumento efficace per il controllo dei sintomi con percentuali di risposta elevate in numerosi studi (80-100%); il controllo della malattia presenta una durata della risposta da 11 a 25 mesi^{26,27}. Fra le molecole più sensibili la DOXO.

Radiofrequenza

Utile nelle forme metastatiche pauci-nodulari limitate al parenchima epatico. Con l'uso di sonde dedicate (*cooled-tip* o *multi-hook design*) è possibile trattare lesioni di diametro anche superiore ai 3 cm. La metodica può essere integrata con altre forme terapeutiche nella malattia avanzata²⁷.

Tabella 4 - Analoghi della somatostatina: risposta obiettiva

Dose	Octreotide 50-6000 µg/die	Lanreotide 2250-15000 µg/die	Lanreotide 10 10 mg x 3 / mese	Lanreotide 30 30 mg x 2 / mese	RC-160 1,5 mg (infusione continua)
PR ^a	0-31%	14,1%	-	7,7%	-
SD ^b	40-63%	47%	90%	50%	68%
PD ^c	24-54%	52,4%	-	24,3%	24%
Pazienti	416	62	10	334	35

^aPR risposta parziale

^bSD stabilizzazione della malattia

^cPD progressione della malattia

Tabella 5 - Indicatori terapeutici per gli analoghi della somatostatina

Sintomi	Recettori	Trattamento
+	++	Buon controllo dei sintomi
+	-	Scarso controllo dei sintomi
+	+/-	Verifica terapeutica
-	++	Risposta obiettiva non prevedibile
-	-	Nessuna indicazione terapeutica
-	(tumore indifferenziato)	
-	+/-	Risposta obiettiva non prevedibile
-	(tumore ben differenziato)	Possibile presenza di altre classi recettoriali

Terapia radiometabolica

Il trattamento radiometabolico dei NET in fase avanzata prevede l'uso di sorgenti radioattive introdotte nell'organismo per via parenterale, orale o loco-regionale. ¹³¹I MIBG viene impiegata come linea avanzata nel trattamento del neuroblastoma, del feocromocitoma, del paraganglioma, del carcinoma midollare della tiroide e di alcuni NET digestivi.

¹¹¹In-DTPA-octreotide, DOTA-lanreotide e DOTA-tyr³-octreotide sono gli analoghi radiomarcanti in uso. La terapia radiometabolica può essere associata ad altre metodiche terapeutiche⁶⁸.

Considerazioni conclusive

L'*imaging* radiologico è oggi in grado di portare il chirurgo in sala operatoria con la certezza di incontrare il tumore neuroendocrino primitivo in oltre il 50% dei casi. Negli altri casi è indispensabile valutare l'opportunità di un'esplorazione chirurgica in termini di cura piuttosto che di palliazione, con uno sguardo attento alla qualità di vita del paziente. A questo proposito, la medicina nucleare è oggi in grado di aiutare a sciogliere il dilemma fra trattamento medico e chirurgico, orientando verso scelte terapeutiche differenti. Lo studio immuno-(cito)istochimico della neoplasia, anche preoperatorio, fornisce utili notizie di carattere prognostico, aiutando nella scelta terapeutica più adatta.

L'aspetto più importante per qualsiasi modalità di trattamento è la valutazione della sua efficacia in termini di successo terapeutico.

Senza dubbio gli analoghi della somatostatina hanno modificato drasticamente la qualità di vita dei pazienti affetti da neoplasie endocrine e, in molti casi segnalati, i benefici si sono osservati anche in termini di sopravvivenza.

La streptozotocina resta il chemioterapico che ha dato le risposte più significative, soprattutto in associazione ad altri citostatici.

Il ruolo degli interferoni, specie l'alfa, necessita ancora di un vaglio definitivo, anche se sono note le sue proprietà immunomodulanti e apoptotiche: l'associazione con gli analoghi della somatostatina e soprattutto con l'octreotide nel trattamento del carcinoma metastatico ha fatto osservare risultati molto interessanti, migliori di quelli ottenuti coi chemioterapici.

Al termine, per quanto non definitivi, si possono sintetizzare alcuni concetti.

- I tumori neuroendocrini sono neoplasie di riscontro oggi sempre più frequente, la cui corretta interpretazione può talvolta risultare non immediata per la partecipazione di sintomi e segni del tutto aspecifici (malattia peptica *no-responder*, diarrea, *flushing*, flogosi bronchiale recidiva, ipertensione arteriosa ingravescente, noduli cutanei o tiroidei di recente comparsa) o talora per l'assoluta mancanza degli stessi. La loro diagnosi è strettamente legata al riconoscimento di una specifica differenziazione immuno-isto-chimica della cellula in senso neuroendocrino.
- La proliferazione cellulare è di solito modesta, consentendo prognosi compatibili con lunghe sopravvivenze.
- L'ipersecrezione di peptidi da parte di uno specifico stipite cellulare può essere di tipo misto, avere andamento discontinuo e modificarsi nel corso della storia naturale della malattia.
- Alterazioni genetiche trasmissibili sono alla base dell'insorgenza di neoplasie endocrine multiple con aspetto familiare.
- Eseguiti gli esami di laboratorio, la malattia deve essere stadiata utilizzando tutte le metodiche disponibili, allo scopo di localizzare il tumore primitivo e le eventuali metastasi.
- Le forme non funzionanti sono diagnosticate in modo del tutto occasionale (sindrome occupante spazio, *incidentaloma*); esse devono essere stadiate meticolosamente come le forme attive.
- Le forme non funzionanti hanno di solito una crescita lenta; quelle funzionanti, anche quando diagnosticate precocemente, sono gravate da una prognosi peggiore, della quale sono il più delle volte responsabili i sintomi invalidanti della malattia. Indipendentemente dal grado di differenziazione, i NET digestivi presentano una sopravvivenza a 5 anni che varia dal 10 al 60%. Le forme familiari sono di solito caratterizzate da bassi indici proliferativi con una sopravvivenza media molto lunga, anche superiore ai 10 anni.
- I recettori per gli analoghi della somatostatina sono presenti soprattutto nei tumori ben differenziati. La presenza di recettori per EGF (*epidermal growth factor*), l'immunopositività per il PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) e per l'indice di proliferazione ki67 (>2%) si associerebbero ad un comportamento più aggressivo da parte del tumore.
- Con la sola eccezione per i tumori indifferenziati, che sono sempre soggetti ad una prognosi infausta, in tutti gli altri casi non si potrà prescindere dallo studio di tutti i fattori prognostici conosciuti espressi dalla cellula neoplastica quali, oltre al diametro della lesione, il *grading*, l'indice mitotico e di proliferazione cellulare (ki67), lo stato recettoriale *in vivo*, l'espressione di alcune sostanze (quali cromogranina A e NSE) e per ultimo l'angioinvasività, indispensabili per orientare in modo corretto la scelta terapeutica.
- Il trattamento dei NET deve essere, quando possibile, primariamente chirurgico; la malattia in fase avanzata si giova invece del trattamento farmacologico.
- Le metastasi epatiche non massive trovano indicazione all'asportazione in casi selezionati (numero, sede e dimensioni delle metastasi, attività biologica della malattia, rischio anestesilogico); le metastasi massive possono essere suscettibili di citoriduzione allo scopo di contenere i sintomi della malattia e per favorire il successo di una eventuale terapia adiuvante. La chemioembolizzazione è consigliata, dopo *debulking* chirurgico, per la bonifica delle metastasi residue.

- Il trattamento della recidiva epatica può essere chirurgico. La chemioembolizzazione ha dato buoni risultati col vantaggio di essere una metodica a basso rischio e ripetibile nel tempo.
- Le forme familiari (in particolare MEN 1) sono caratterizzate da lesioni molto piccole, multicentriche e non secernenti nella maggior parte dei casi. Il frequente basso grado di malignità, l'asintomaticità e la lunga storia naturale della malattia consigliano un approccio primariamente farmacologico al problema, con l'utilizzo di molecole (in particolare inibitori della pompa protonica, analoghi della somatostatina e citochine) in grado di influenzare in modo favorevole il controllo della malattia. Fanno eccezione le neoplasie secernenti (insulinoma e gastrinoma, presenti rispettivamente nel 20 e 50% dei casi), la cui asportazione anche nella malattia metastatica, si rivela determinante allo scopo di migliorare la qualità di vita e la sopravvivenza del paziente.
- Per valutare correttamente l'efficacia del trattamento medico è necessario prendere in considerazione tre diversi parametri: il controllo dei sintomi, la risposta tumorale e quella biochimica. La chemioterapia è più efficace nel trattamento dei tumori meno differenziati, anche se l'impatto sulla sopravvivenza a lungo termine è ancora molto modesto con gli schemi oggi in uso. Per i tumori ben differenziati, specie per il carcinoma, l'alternativa può essere l'associazione di analoghi della somatostatina con interferone α .
- L'efficacia degli interferoni è segnalata soprattutto nel trattamento dei carcinoidi maligni e nella sindrome da carcinoma. Rispetto alla chemioterapia, i risultati sono migliori sia in termini di risposta obiettiva che di qualità di vita. L'associazione di interferone α e analoghi della somatostatina sembra agire sinergicamente. È probabile una *facilitazione* farmacologica dell'interferone nei confronti di octreotide e lanreotide.
- La chemioterapia potrebbe dunque essere riservata solo ai casi di neoplasie metastatiche particolarmente aggressive, non suscettibili di trattamento chirurgico curativo per la presenza di localizzazioni multiple, anche a carico di segmenti ossei. La chemioterapia deve essere preferita anche nei casi di tumore a sede primitiva occulta con *grading* indifferenziato.
- Il trattamento con analoghi della somatostatina appare giustificato nel controllo dei sintomi e nei tumori secernenti già trattati chirurgicamente dove residui attività ormonale. In senso antiproliferativo, l'attività di queste molecole è correlata all'espressione di alcuni sottotipi recettoriali per la somatostatina (SSTR_{2,3,5}). Nonostante l'osservazione sperimentale e clinica di risposte interessanti, gli analoghi della somatostatina si comportano in modo imprevedibile e talora indipendente dallo stato recettoriale, chiamando in causa la presenza di altri sottotipi recettoriali non magnificati da Octreoscan, oppure un difetto di *internalizzazione* del messaggio recettoriale. Nella nostra esperienza, nel 4% dei casi con densità recettoriale assente si è osservata una risposta di stabilizzazione della malattia per lungo tempo⁵⁹.
- La terapia radiometabolica può essere impiegata nella malattia avanzata come linea estrema, capace di portare a un controllo ottimale dei sintomi anche per lungo tempo.
- In presenza di metastasi epatiche diffuse può essere preso in considerazione il trapianto di fegato in casi selezionati (tumore primitivo reseccabile, basso indice proliferativo). I dati mostrano un miglioramento della sintomatologia e della sopravvivenza.

Per quanto questi concetti possano oggi consentire una gestione equilibrata della patologia neuroendocrina, è indispensabile evitarne l'assolutizzazione. Infatti, i tumori neuroendocrini sono ancora oggi motivo di revisioni che contribuiscono a mostrare una nuova immagine della malattia svelandone aspetti stimolanti ancora da esplorare.

Bibliografia

1. De Angelis C, Tesio L, Rizzetto M, *et al.* Tumori neuroendocrini non pancreatici (parte 1) Banca Dati sulle Malattie Endocrine Gastroenteropancretiche (Progetto GEP). Milano: Excerpta Medica, 2002.
2. De Angelis C, Tesio L, Rizzetto M, *et al.* Tumori neuroendocrini pancreatici (parte 2) Banca Dati sulle Malattie Endocrine Gastroenteropancretiche (Progetto GEP). Milano: Excerpta Medica, 2002.
3. Ambrosi A, Iacobone M, Ferini A, *et al.* Epidemiologia dei tumori neuroendocrini gastroenteropancretici. In Cirillo F. I tumori neuroendocrini gastroenteropancretici. Manuale di diagnosi e trattamento, 3° ed. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, 2001, 1-19.
4. Cirillo F. Clinica e fisiopatologia dei tumori neuroendocrini gastroenteropancretici. In Cirillo F. I tumori neuroendocrini gastroenteropancretici. Manuale di diagnosi e trattamento, 3° ed. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, 2001, 75-104.
5. Cirillo F. Lo screening territoriale delle neoplasie GEP: esperienza e prospettive. In Lombardi L. I tumori neuroendocrini gastroenteropancretici: inquadramento clinico e prospettive terapeutiche. Roma: Mediprint, 1999, 42-44.
6. Seregini E, Ferrari L, Stivanello M, *et al.* Laboratory tests for neuroendocrine tumours. Q J Nucl Med 2000; 44: 22-41.
7. Prinz RA, Marangos PJ. Use of neurospecific enolase as a serum marker for neuroendocrine neoplasms. Surgery 1982; 92: 887-9.
8. Krudy AG, Doppman JL, Jensen RT, *et al.* Localization of islet cell tumours by dynamic CT: comparison with plain CT, arteriography, sonography and venous sampling. Am J Roentgenol 1984; 143: 585-89.
9. Van Hoe L, Gryspeerdt S, Marchal G, *et al.* Helical CT for the preoperative localization of islet cell tumours of the pancreas: value of arterial and parenchymal phase images. Am J Roentgenol 1995; 165: 1437-9.
10. Chung MJ, Chol BI, Han JK, *et al.* Functioning islet cell tumor of the pancreas. Localization with dynamic spiral CT. Acta Radiol 1997; 38: 135-38.
11. Ichikawa T, Peterson MS, Federle MP, *et al.* Islet cell tumor of the pancreas: biphasic CT versus MR imaging in tumor detection. Radiology 2000; 216: 163-71.
12. Van Hoe L, Gryspeerdt S, Baert AL. Functioning endocrine tumours of the pancreas: comparison of single-shot MRI and dual-phase helical CT. Eur Radiol 1997; 7: S142.
13. De Angelis C, Carucci P, Malcotti C, *et al.* Ruolo dell'ecoendoscopia nella localizzazione delle neoplasie neuroendocrine gastroenteropancretiche. In Cirillo F. I tumori neuroendocrini gastroenteropancretici. Manuale di diagnosi e trattamento, 3° ed, Milano: Casa Editrice Ambrosiana, 2001, 201-15.
14. Lima GF. Ruolo degli analoghi radiomarcanti della somatostatina nella diagnosi dei tumori neuroendocrini gastroenteropancretici. In Cirillo F. I tumori neuroendocrini gastroenteropancretici. Manuale di diagnosi e trattamento, 3° ed, Milano: Casa Editrice Ambrosiana, 2001, 217-44.
15. Termanini B, Gibril F, Reynolds JC, *et al.* Value of somatostatin receptor scintigraphy: a prospective study in gastrinoma of its effect on clinical management. Gastroenterology 1997; 112: 335-47.
16. Cadiot G, Bonnaud G, Lebtahi R, *et al.* Usefulness of somatostatin receptor scintigraphy in the management of patients with Zollinger-Ellison syndrome. Gut 1997; 41: 107-14.
17. Lebtahi R, Cadiot G, Sarda L, *et al.* Clinical impact of somatostatin receptor scintigraphy in the management of patients with neuroendocrine gastroenteropancretic tumours. J Nucl Med 1997; 38: 853-8.
18. Chiti A, Fanti S, Savelli G, *et al.* Comparison of somatostatin receptor imaging, computer tomography and ultrasound in the clinical management of neuroendocrine gastro-entero-pancreatic tumours. Eur J Nucl Med 1998; 25: 1396-403.

19. Castellani MR, Chiti A, Seregni E, *et al.* Role of ¹³¹I-metaiodobenzylguanidine (MIBG) in the treatment of neuroendocrine tumours. *Q J Nucl Med* 2000; 44: 77-87.
20. Eriksson B, Bergström M, Örlfors H, *et al.* Use of PET in neuroendocrine tumours: *in vivo* applications and *in vivo* studies. *Q J Nucl Med* 2000; 44: 68-76.
21. Solcia E, Kloppel G, Sobin LH. Histological typing of endocrine tumours. In WHO International histological classification of tumours. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2000.
22. Cirillo F. Trattamento dei tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici. In Cirillo F. I tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici. Manuale di diagnosi e trattamento, 3° ed, Milano: Casa Editrice Ambrosiana, 2001, 293-344.
23. Morelli A, Falchetti A, Brandi ML. I tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici nell'ambito delle neoplasie endocrine multiple. In Cirillo F. I tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici. Manuale di diagnosi e trattamento, 3° ed, Milano: Casa Editrice Ambrosiana, 2001, 123-32
24. Volpi D, Meroni L, Rozzi G, *et al.* Diagnostica per immagini dei tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici. In Cirillo F. I tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici. Manuale di diagnosi e trattamento, 3° ed, Milano: Casa Editrice Ambrosiana, 2001, 155-200.
25. Falconi M, Bettini R, Salvia R, *et al.* Trattamento chirurgico dei tumori neuroendocrini del pancreas. In Cirillo F. I tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici. Manuale di diagnosi e trattamento, 3° ed, Milano: Casa Editrice Ambrosiana, 2001, 345-63.
26. Perry LJ, Stuart K, Stokes KR, *et al.* Hepatic arterial chemoembolization for metastatic neuroendocrine tumours. *Surgery* 1994; 116: 1111-7.
27. Cantore M, Zamagni D, Rozzi G. Il trattamento loco-regionale delle endocrinopatie del tratto digestivo. In Cirillo F. I tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici. Manuale di diagnosi e trattamento, 3° ed, Milano: Casa Editrice Ambrosiana, 2001, 387-404
28. McEntee GP, Nagorney MD, Kvols LK, *et al.* Cytoreductive hepatic surgery for neuroendocrine tumours. *Surgery* 1990; 108 (6): 1091-6.
29. Carty SE, Jensen RT, Norton JA. Prospective study of aggressive resection of metastatic pancreatic endocrine tumours. *Surgery* 1992; 112 (6): 1024-32.
30. Norton JA. Surgical management of carcinoid tumours: role of debulking and surgery for patient with advanced disease. *Digestion* 1994; 55 (3): 98-103
31. Falconi M, Bonora A, Bassi C, *et al.* Non-functioning pancreatic endocrine tumours. In Dervenis CG, Bassi C. Pancreatic tumours. Stuttgart: Thieme Verlag, 2000, 54-61.
32. Modlin IM, Schmid SW, Tang LH, *et al.* Endocrine tumours of the pancreas. In Dervenis CG, Bassi C. Pancreatic tumours. Stuttgart: Thieme Verlag, 2000, 332-53.
33. Skogseid B. Multiple endocrine neoplasia type I. Clinical genetics and diagnosis. In Arnold A. Endocrine neoplasms. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1997, 383-406.
34. Ahlman H, Kölby L, Lundell L, *et al.* Clinical management of gastric carcinoid tumours. *Digestion* 1994; 55 (3): 77-85.
35. Åkerström G. Management of carcinoid tumours of the stomach, duodenum and pancreas. *World J Surg* 1996; 20: 173-82.
36. Åkerström G, Makridis C, Johansson H. Abdominal surgery in patients with midgut carcinoid tumours. *Acta Oncol* 1991; 30: 547-53
37. Box JC, Watne AL, Lucas GW. Small bowel carcinoid: review of a single institution experience and review of the literature. *Am Surg* 1996; 62: 280-6.
38. Öhrvall U, Eriksson B, Juhlin C, *et al.* Method for dissection of mesenteric metastases in mid-gut carcinoid tumours. *World J Surg* 2000; 24: 1402-8.
39. Galland RB, Blumgart LH. Carcinoid syndrome: surgical management. *Br J Hosp Med* 1986; 35: 166-70.
40. Stinner B, Kisker O, Zielke A, *et al.* Surgical management for carcinoid tumours of small bowel, appendix, colon, and rectum. *World J Surg* 1996; 20: 183-8.
41. Basson MD, Ahlman H, Wängberg BO, *et al.* Biology and management of the midgut carcinoid. *Am J Surg* 1993; 165: 288-97.
42. Kenady DE, Mc Grath PC, Sloan DA, *et al.* Diagnosis and management of pheochromocytoma. *Curr Op Onc* 1997; 9: 61-7.
43. Nathu RM, Mendenhall WM, Parson JT. Merkel cell carcinoma of the skin. *Rad Oncol Invest* 1998; 6: 233-9.
44. Ott MJ, Tanabe KK, Gadd MA, *et al.* Multimodality management of Merkel cell carcinoma. *Arch Surg* 1999; 134: 388-93.
45. Arrigoni MG, Woolner LB, Bernatz PE. Atypical carcinoid tumours of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1972; 64: 413-21.
46. Travis WD, Linnoila RI, Tsokos MG, *et al.* Neuroendocrine tumours of the lung with proposed criteria for large cell neuroendocrine carcinoma. An ultrastructural, immunohistochemical, and flow cytometric study of 35 cases. *Am Surg Pathol* 1991; 5: 529-53.
47. Kvols LK. The carcinoid syndrome: a treatable malignant disease. *Oncology (Williston Park)* 1988; 2: 33-41.
48. Pass HI, Doppman JL, Nieman L, *et al.* Management of the ectopic ACTH syndrome due to thoracic carcinoids. *Ann Thorac Surg* 1990; 50: 52-7.
49. Capella C, Heits PU, Höfler H, *et al.* Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung pancreas and gut. *Virchows Arch* 1995; 425: 547-60.
50. Vadasz P, Palfy G, Egervary M, *et al.* Diagnosis and treatment of bronchial carcinoid tumours : clinical and pathological review of 120 operated patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993; 7: 8-11.
51. Dusmet M, Kneally MF. Bronchial and thymic carcinoid tumours: a review. *Digestion* 1994; 55: 70-6.
52. Hammond ME, Sause WT. Large cell neuroendocrine tumours of the lung. Clinical significance and histopathologic definition. *Cancer* 1985; 56: 1624-9.
53. Colby TV, Koss MN, Travis WD. Small cell carcinoma and large cells neuroendocrine carcinoma. Atlas of Tumor Pathology. Tumours of the Lower Respiratory Tract, 3rd ed, fascicle 13. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1980
54. Cirillo F, Bottini A, Lima G, *et al.* Chirurgia radioguidata nel trattamento dei tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici. *Minerva Chir* 2000; 55: 517-21.
55. Moertel GC, Kvols LK, O'Connell MJ, *et al.* Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin. *Cancer* 1991; 68: 227-32.
56. Seitz JF, Perrier H, Giovannini M, *et al.* Cancers neuroendocrines anaplasiques avancés: intérêt de l'association VP16-CDDP. *Bull Cancer* 1995; 82: 433-44.
57. Yakendji K, Ducreux M, Duviliard P, *et al.* L'efficacité de l'association etoposide (VP16) et cisplatine (CDDP) dans les tumeurs neuroendocrines (TNE) peu différenciées d'origine digestive. *Bull Cancer* 1995; 82: 433-8.
58. Mitry E, Baudin E, Ducreux M, *et al.* Treatment of poorly differentiated neuroendocrine tumours with etoposide and cisplatin. *Br J Cancer* 1999; 81 (8): 1351-5.
59. Cirillo F. Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumours: 11 years of clinical experience. *Intl J Med Biol Environ* 2001; 29 (2): 129-41.
60. Artale S, Bajetta E, Buzzoni R, *et al.* Tumori neuroendocrini del polmone. *Argomenti di Oncologia* 1999; 20: 369-72.
61. Letizia C, Scuro L, Cerci S. Feocromocitoma. In Andreani D, Tamburra G. Manuale di terapia delle malattie endocrine e metaboliche. Roma: Antonio Delfino Editore, 2000, 225-34.
62. Voog E, Biron P, Martin JP, *et al.* Chemotherapy for patients with locally advanced or metastatic Merkel cell carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 2589-95.
63. Cirillo F, Filippini L, Lima GF, *et al.* Tumore a cellule di Merkel: segnalazione di un caso e trattamento con octreotide. *Minerva Chir* 1997; 52: 1359-65.
64. Cirillo F, Buononato M, Lima GF, *et al.* Clinical experience on eight cases of Merkel cell carcinoma. *Tumori* 2003; 89: 146-51.
65. Debas HT, Gittes G. Somatostatin analogue therapy in functioning neuroendocrine gut tumours. *Digestion* 1993; 54 (1): 68-71.
66. Lamberts SWJ, Krenning EP, Reubi JC. The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumours. *Endocrine Rev* 1991; 12 (4): 450-82.
67. Anthony L, Johnson D, Hande K, *et al.* Somatostatin analogue phase I trial neuroendocrine neoplasms. *Acta Oncol* 1993; 32: 217-23.
68. Chiti A. La terapia radiometabolica nei tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici. In Cirillo F. I tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici. Manuale di diagnosi e trattamento, 3° ed, Milano: Casa Editrice Ambrosiana, 2001, 405-15.

Centri di lettura dello screening citologico in Emilia Romagna^a

Reading centres of cytological screening in Emilia-Romagna, Italy

Roberta Rapezzi*, Sonia Prandi**, Valeria Cocchi***, Alba Carola Finarelli****, Carlo Naldoni*****, Arrigo Bondi*****

* Laboratorio Analisi, Settore di Citodiagnostica, Azienda USL Bologna Nord, Ospedale di Budrio, Budrio (BO), Italia

** Centro di Citologia Cervico-Vaginale, Azienda Ospedaliera di Reggio Emilia, Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia, Italia

*** UO di Anatomia, Istologia e Citologia Patologica, Istituto "F. Addarii", Azienda Ospedaliera di Bologna, Policlinico S.Orsola Malpighi, Bologna, Italia

**** Assessorato alla Sanità, Regione Emilia Romagna, Bologna, Italia

***** UO di Anatomia, Istologia Patologica e Citodiagnostica, Azienda USL Imola, Imola (BO), Italia

Riassunto

Dopo 4 anni dall'attivazione del programma della Regione Emilia-Romagna per la prevenzione del tumore del collo dell'utero, un programma "multicentrico partecipato" che coinvolge 1.143.950 donne, è stato riproposto ai Centri di lettura dello screening, da parte del Gruppo di Coordinamento Regionale per il controllo di qualità in citologia, un questionario conoscitivo. Dalla comparazione dei dati rilevati nel 1997 (anno di inizio del programma) con i dati 2001, emerge che: 1) il numero dei centri di lettura si è contratto ed è passato da 21 a 16; 2) attualmente i lettori impegnati nella lettura del Pap test sono 75 (80% laureati) con un carico di lavoro ipotetico stimato di 29 esami/die, in linea con i dati nazionali rilevati dal GISCI; 3) tutti i Centri adottano come Controllo di Qualità (CdQ) interno il confronto cito-istologico e la revisione dei preparati precedenti a lesioni intraepiteliali squamose (SIL); ri-

Summary

Four years after the inception of the Emilia-Romagna regional programme for the prevention of cervical cancer (a "participating multi-centre" programme involving 1,143,950 women) another cognitive questionnaire has been circulated to the screening reading centres, by the Regional Coordination Group for quality control of cytology. In a comparison of data from 1997 (the year in which the programme was set up) with data from 2001, it has emerged that: 1) the number of centres has fallen from 21 to 16; 2) there are currently 75 authorised Pap test readers (80% of whom are graduates) with a hypothetical workload of 29 examination readings per day, in line with the national statistics from GISCI; 3) all centres are adopting as internal quality control (QC), cito-histological comparisons and the revision of slides preceding squamous intraepithelial lesions (SIL); but these are rather dissimilar to other QC; 4) regarding external QCs, thanks to the intervention of the Regional Coordination Group for cytology quality control, all the centres participate in the reading of standard sets, and take part in the ensuing discussion on the results of these readings; the contextual presentation

Received/Pervenuto 22.9.2003 - Accepted/Accettato 22.12.2003

Address/Indirizzo: Dr. Roberta Rapezzi, Servizio di Anatomia e Istologia patologica e Citodiagnostica, AUSL Bologna, Largo B. Nigrisoli 2, 40133 Bologna, Italia - Tel. 0039/051/6478542 - Fax 0039/051/647860
E-mail: roberta.rapezzi@ausl.bologna.it

^aI dati presentati in questa pubblicazione sono tratti dai programmi di screening oncologici della Regione Emilia - Romagna (SCRER) ed in particolare dal programma di screening per la diagnosi precoce dei tumori del collo dell'utero.

Hanno collaborato all'invio dei dati:

- i responsabili dei progetti di screening per la diagnosi precoce del cervicocarcinoma della Regione Emilia-Romagna delle AUSL di Bologna Città (M. Manfredi), Bologna Nord (N. Collina), Bologna Sud (P. Cristiani), Cesena (M. Farneti), Ferrara (D. Davi), Forlì (A. Amadori, F. Falcini), Imola (A. Bondi), Modena (M. Turci), Parma (M. Zatelli, P. Salvini), Piacenza (G. Limonta, P.G. Dataro), Ravenna (P. Schincaglia), Reggio Emilia (S. Prandi), Rimini (A. Ravaioli, F. Desiderio);

- i componenti del sottogruppo regionale controlli di qualità in citologia ed istologia: M. Camerlò, G.P. Casadei, V. Cocchi, G. Collina, A. D'Errico, S. Negri, R. Rapezzi, Bologna; C. Di Gregorio, Carpi; F. Nuzzo, B. Tabarri, Cesena; M. Aldi, Faenza; D. Beccati, A.L. Delazer, Ferrara; M. Liverani, L. Saragoni, Forlì; A. Amadori, G. Galanti, Imola; C. Ghirardini, Mirandola; G. De Aloisio, F. Rivasi, Modena; M. Gabrielli, Parma; R. Foroni, N. Orsi, Piacenza; D. Sama, C. Sintoni, Ravenna; G. Gardini, S. Prandi, Reggio Emilia; P. Fulgenzi, M. Ricci, Rimini.

sulta piuttosto disomogenea l'applicazione di altri CdQ; 4) per quanto riguarda i CdQ esterni, grazie all'intervento del Gruppo di Coordinamento Regionale per il controllo di qualità in citologia, tutti i Centri partecipano alla lettura del set standard ed alla successiva discussione assembleare dei dati da questa scaturiti; la presentazione contestuale dei casi maggiormente controversi permette non solo di valutare la concordanza diagnostica dei centri, ma è anche un momento di approfondimento diagnostico nonché di autovalutazione della performance individuale. *Eur. J. Oncol.*, 9 (1), 49-54, 2004

Parole chiave: screening, carcinoma della cervice, centri di lettura, CdQ, carico di lavoro

Introduzione

Già negli anni '70 alcune realtà della Regione Emilia-Romagna, come Bologna e provincia, hanno dato inizio ad una campagna di prevenzione dei tumori del collo dell'utero che prevedeva solo inizialmente la chiamata attiva delle donne, e che si affidava poi ad una partecipazione spontanea.

Nel 1986 l'Assessorato alla Sanità della Regione Emilia-Romagna ha finanziato un progetto sperimentale che prevedeva l'impiego dei soli archivi elettronici delle anagrafi comunali per realizzare le chiamate di screening presso l'USL 23 di Imola ed il controllo della copertura tramite record individuali relativi ai dati di screening.

Nel 1996 lo stesso Assessorato alla Sanità ha promosso l'attivazione di un programma di screening citologico su tutto il territorio della Regione, sulla base di un *modello multicentrico partecipato*, in grado di coinvolgere 1.143.950 donne fra i 25 ed i 64 anni.

Sulla base di questo programma le 13 Aziende Sanitarie della Regione sono state lasciate libere di organizzare il programma di screening rivolto alle donne residenti nel rispettivo territorio, e contemporaneamente sono state coinvolte in iniziative che mirano ad un confronto attivo fra i centri per giungere alla condivisione dei criteri definiti nel modello.

I risultati regionali vengono inoltre confrontati con quelli di altre realtà italiane rilevate dal GISCI (Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma)¹.

Il programma regionale prevede un sistema di sorveglianza al quale aderiscono tutti i Centri di Screening delle AUSL, che ha permesso di raccogliere indicatori generali di processo e di fornire una valutazione di impatto sulla popolazione interessata mediante alcuni indicatori di esito.

I dati regionali vengono inoltre messi a confronto con quelli rilevati dal GISCI nelle altre Regioni Italiane^{1,2}.

E' stato inoltre attivato un Gruppo Regionale di Coordinamento e Controllo di Qualità che ha redatto, discusso e condiviso un protocollo diagnostico/terapeutico per i tumori della cervice e sono stati costituiti dei sottogruppi operativi per mettere in atto iniziative di garanzia e promozione della qualità nei vari settori dello screening.

Materiali e metodi

Nel gennaio 1997 il Sottogruppo per il Controllo della Qualità (CdQ) in Citologia ha sottoposto ai coordinatori dei programmi di

of the most controversial cases allows not only for the evaluation of diagnostic agreement among centres, but also provides the occasion for in-depth diagnosis, and the self-evaluation of individual performances. *Eur. J. Oncol.*, 9 (1), 49-54, 2004

Key words: screening, cervical cancer, reading centres, CdQ, workload

prevenzione dei tumori del collo dell'utero un questionario conoscitivo con la finalità di rilevare le forze in campo impegnate nella lettura dei Pap test di screening ed i controlli di qualità adottati dai centri di lettura.

A distanza di 4 anni lo stesso sottogruppo ha riproposto la scheda di rilevazione già precedentemente adottata per valutare eventuali variazioni.

Nella scheda vengono richiesti :

- 1) per ogni Azienda il numero dei centri di lettura citologica;
- 2) per ogni centro di lettura:
 - la qualifica ed il numero degli operatori coinvolti nella interpretazione dei Pap test;
 - l'impegno dedicato allo screening da ogni lettore in termini di orario e di percentuale di attività;
 - i CdQ interni ed esterni adottati.

Non hanno risposto al questionario, nel 1997, due centri di lettura, mentre nel 2001 non ha risposto un centro di lettura.

Risultati

Confrontando i dati relativi ai centri di lettura (Tabella 1), si nota che le Aziende Ospedaliere coinvolte nei programmi di screening passano da un numero di 5 nel 1997 (Bologna, Modena, Parma, Reggio Emilia, Ferrara) a 4 (Bologna, Modena, Parma, Reggio Emilia), mentre il numero complessivo dei centri di lettura passa dai 21 del 1997 ai 16 attuali.

Operatori coinvolti nella lettura del Pap test

Nei 16 centri individuati per la lettura dei test di screening sono attivi complessivamente 76 operatori così suddivisi: 18 anatomo-patologi, 41 biologi, 15 citotecnici e 2 medici anatomo-patologi con rapporto libero professionale. Nella fig. 1 è rappresentata la suddivisione delle varie qualifiche professionali coinvolte. Complessivamente il personale laureato rappresenta l'80%. Non è possibile il confronto col 1997, perché allora l'indagine non riguardava la sola lettura. L'impegno dedicato alla lettura dello screening è comunque molto diverso fra le varie professionalità: è scarso per i patologi e maggiore per i biologi ed i citotecnici. I due anatomo-patologi con rapporto libero professionale sono impegnati nello screening o come revisori con un impegno di lettura ridotto o come operatori dedicati esclusivamente alla lettura dei Pap test a seconda delle necessità dei programmi in cui operano.

Complessivamente il 16% di tutto il personale considerato svolge un'attività di lettura dedicata completamente allo scree-

Tabella 1 - Centri di lettura nella Regione Emilia-Romagna

Centri di lettura di screening - 1997 (Tot. 21)		Centri di lettura di screening - 2001 (Tot. 16)
Anatomia Patologica, Osp. Bellaria Anatomia Patologica, Osp. Maggiore Istituto Addarii, Azienda Ospedaliera Bologna	AUSL Bologna Città	Anatomia Patologica, Osp. Bellaria Anatomia Patologica, Osp. Maggiore
Laboratorio Citodiagnostica Bo-Sud Istituto Addarii, Azienda Ospedaliera Bologna	AUSL Bologna Sud	Istituto Addarii, Azienda Ospedaliera Bologna
Laboratorio Citodiagnostica Bo-Nord Istituto Addarii, Azienda Ospedaliera Bologna	AUSL Bologna Nord	Istituto Addarii, Azienda Ospedaliera Bologna
Centro Privato Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Parma	AUSL Parma	Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Parma
Centro di citologia, Azienda Ospedaliera Reggio Emilia	AUSL Reggio Emilia	Centro di Citologia, Azienda Ospedaliera Reggio Emilia
Ostetricia e Ginecologia, Azienda Ospedaliera Ferrara Citologia Portomaggiore Citologia Cento	AUSL Ferrara	Centro di Citodiagnostica, AUSL Ferrara
Servizio di Citopatologia, Osp. Mirandola e Finale Emilia Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Modena Laboratorio analisi, Osp. Pavullo	AUSL Modena	Servizio di Citopatologia, Osp. Mirandola e Finale Emilia Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Modena Laboratorio analisi, Osp. Pavullo
Anatomia Patologia, Osp. Forlì	AUSL Forlì	Anatomia Patologica, Osp. Forlì
Anatomia Istologia Patologica, Osp. Imola	AUSL Imola	Anatomia Istologia Patologica, Osp. Imola
Anatomia e Istologia Patologica, Osp. Piacenza	AUSL Piacenza	Anatomia e Istologia Patologica, Osp. Piacenza
Anatomia Patologica, Osp. Ravenna Anatomia Patologica, Osp. Faenza	AUSL Ravenna	Anatomia Patologica, Osp. Ravenna Anatomia Patologica, Osp. Faenza
Istologia e Anatomia Patologica, Osp. Cesena	AUSL Cesena	Istologia e Anatomia Patologica, Osp. Cesena
Anatomia Patologica e Citodiagnostica, Osp. Rimini	AUSL Rimini	Anatomia Patologica e Citodiagnostica, Osp. Rimini

ning (100% dell'impegno), il 51% un'attività prevalente per lo screening (dal 50% al 90%), mentre il restante personale, cioè il 33%, esercita un'attività non prevalente per lo screening, compresa fra il 5% e il 40% (fig. 2).

Stima del carico di lavoro

Per realizzare lo screening in Emilia-Romagna è necessario garantire alla popolazione bersaglio almeno un Pap test ogni tre

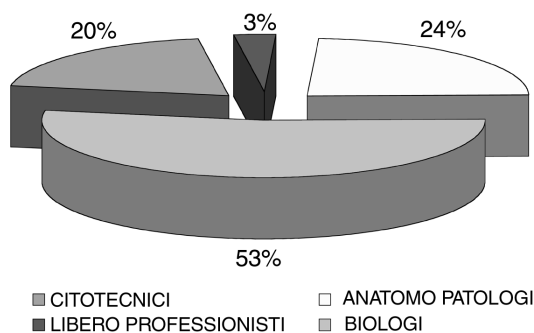


Fig 1. Qualifica degli operatori coinvolti nella lettura dei Pap test di screening nel 2001.

anni: il carico teorico annuale è quindi di 381.317 esami (1.143.950:3). Considerando una *compliance* (o adesione complessiva data dalle rispondenti all'invito e dalle presentazioni spontanee) del 71% e la necessità di ripetere l'8% degli esami, sono effettivamente stimabili 292.394 test per anno. Da questo carico di lavoro occorre sottrarre l'attività attribuibile al centro di lettura che non ha partecipato alla rilevazione dei dati: si possono quindi considerare attendibili 282.394 Pap test per anno.

Nella Tabella 2 sono riportati i calcoli teorici di stima del numero di operatori che effettivamente svolgono attività di lettura di screening: le percentuali di impegno riportate nel questionario so-

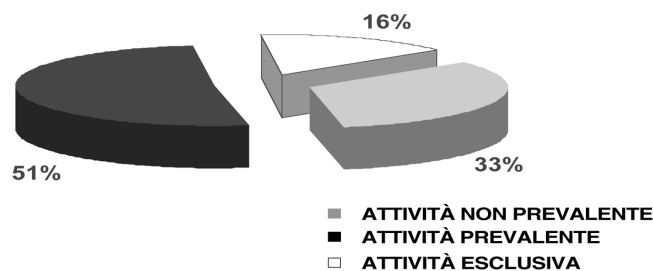


Fig 2. Suddivisione dei lettori del Pap test in relazione all'impegno dedicato allo screening

Tabella 2. Attività nei centri di lettura della Regione Emilia-Romagna

Qualifiche operatori			
Patologi		20	
Biologi		41	
Citotecnici		15	
Totale		76	
Lettori teorici			
			42
Carico di lavoro			
Popolazione bersaglio	1.143.950		
Donne da esaminare per anno (teorico)	381.317		
Adesione allo screening	71%		
Donne coinvolte	270.735		
Ripetizioni	8%		
Totale esami da fare	292.394		
Carico stimato per Osp. Bellaria	10.000		
Carico di lavoro stimato (complessivo): numero di vetrini per anno			282.394^a
Debito orario annuo per operatore (230 giorni lavorativi stimati x 6 ore die)			1.380
Vetrini letti in un anno, per lettore			6.724
Vetrini letti per ora			4,87

^a Dal carico di lavoro complessivo è stata sottratta la quota che si stima venga eseguita presso il centro di lettura dell'Ospedale Bellaria che non ha partecipato alla rilevazione dei dati

no state applicate a tutti i 76 operatori rilevati. Dai lettori con impegno non prevalente sono stati sottratti 15 revisori (stima di uno per centro) ed il numero dei lettori disponibili è stato calcolato computando che per "impegno prevalente" si intende il 70% del tempo individuale speso per la lettura dello screening, mentre per quello non prevalente si intende del 30% di tale tempo. Risultano in questo modo, in regione, 42 lettori teorici a tempo pieno, ognuno dei quali sopporta un carico di lavoro di 6.724 Pap test a fronte di un debito orario annuo medio di 1.380, in grado di leggere 4,8 esami l'ora, cioè poco più di 29 al giorno.

Controlli di Qualità

I CdQ rilevati col questionario sono quelli previsti nel protocollo della regione Emilia-Romagna per la citologia cervico-vaginale di screening, che sono compresi anche nelle linee guida europee³. Nelle fig. 3 e 4 sono rappresentate le frequenze di applicazione dei CdQ interno ed esterno rispettivamente (valori medi che comprendono tutti i centri regionali).

I CdQ interni (fig. 3) prevedono:

- il monitoraggio statistico delle diagnosi citologiche con distribuzione delle diagnosi per lettore;
- la rilettura di una quota randomizzata di negativi o di categorie specifiche anche mediante metodi automatici;
- l'introduzione di casi noti nella routine diagnostica;
- la lettura periodica di set standard rappresentativi di tutte le

principali categorie diagnostiche;

- le correlazioni cito-isto-colposcopiche o almeno cito-istologiche con revisione critica dei preparati discordanti;
- la lettura in doppio o *peer review* dei preparati riferiti a lesioni intraepiteliali squamose (SIL);
- il riesame dei preparati precedenti negativi in presenza di un ultimo striscio positivo;

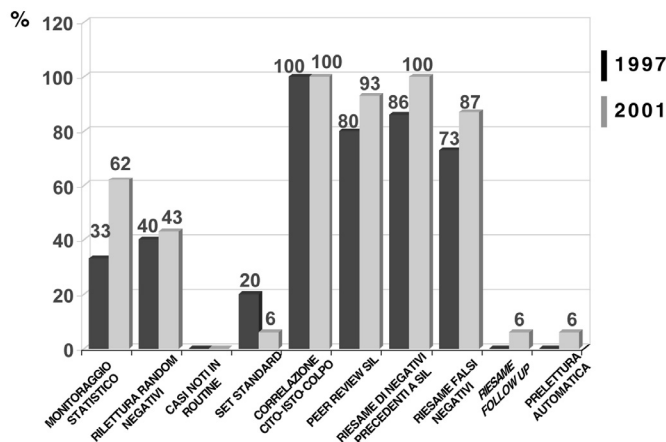


Fig 3. Frequenze di utilizzo dei diversi metodi di controllo di qualità intra-laboratorio.

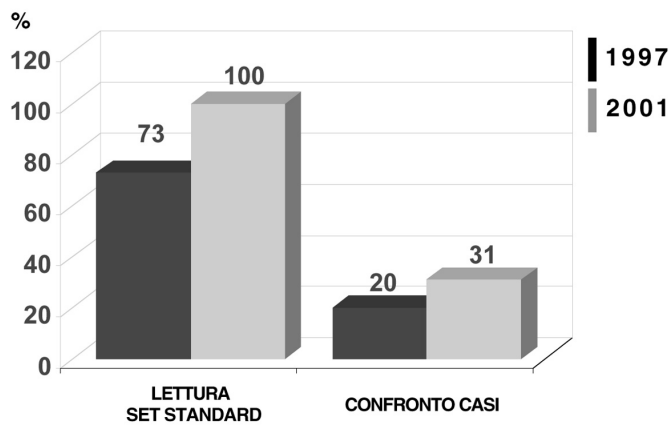


Fig 4. Frequenze di utilizzo dei diversi metodi di controllo di qualità inter-laboratorio.

– il riesame dei preparati citologici falsi negativi.

I CdQ esterni (fig. 4) prevedono:

– la lettura di set standard;

– il confronto di casi.

Il gruppo di CdQ regionale ha promosso valutazioni di concordanza su set standard e riletture mirate di particolari casistiche, che sono risultate problematiche perché non confermate dall'esame istologico: si sono riesaminati collegialmente i preparati citologici ed istologici, si è costruito un atlante di immagini digitali su CD⁴ e si sono realizzati incontri di audit e confronto dei parametri applicati⁵.

Discussione

La modifica intervenuta nel numero delle Aziende Ospedaliere e dei centri di lettura mette in evidenza alcune differenze nelle strategie organizzative adottate dalle AUSL nei confronti dell'esecuzione dei test di screening:

- 1) razionalizzazione delle risorse interne, con la selezione dei centri di lettura come nella AUSL di Bologna Città, dove i centri di lettura sono attualmente due, o nell'AUSL di Parma, che ha ora un unico centro di riferimento, oppure con l'accorpamento di più strutture per dar vita ad un unico centro aziendale come nell'AUSL di Ferrara;
- 2) affidamento della lettura ad un centro esterno all'Azienda, come avviene per le AUSL di Bologna Nord e Bologna Sud, che hanno optato per lo stesso Servizio dell'Azienda Ospedaliera di Bologna.

Nell'analisi delle professionalità che intervengono nella lettura primaria si nota uno scarso coinvolgimento dei citotecnici ed un prevalente coinvolgimento di personale laureato (80%).

Considerando i dati del primo e tuttora più completo studio che analizza in Italia il carico di lavoro in citologia cervico-vaginale di screening⁶, si può notare che i dati rilevati in Emilia-Romagna sono entro la variabilità descritta per la maggioranza dei laboratori del nostro Paese, e sono compatibili con le linee guida raccomandate dalle autorità sanitarie italiane⁷.

I dati rilevati nel presente studio non distinguono fra scansione del vetrino e revisione e non viene calcolato il carico di lavoro del citopatologo, elemento ancora più controverso e di difficile

analisi del carico sul citoscreener^{6,7}. Inoltre non è stato rilevato il carico relativo all'allestimento ed alla colorazione dei preparati, che in alcune realtà è svolto dalle stesse persone che fanno poi la lettura. Si tratta quindi di una stima che, considerati i dati disponibili, era l'unica possibile.

L'analisi comparata dei dati relativi ai CdQ interni adottati nel 1997, rispetto a quelli attualmente in uso, mostra una netta crescita del monitoraggio statistico dei dati, segno di una migliore messa a punto dei sistemi informatici, ed un decremento della lettura del set standard interno comprensivo delle principali categorie diagnostiche che probabilmente appesantisce l'attività di lettura. Il 43% dei centri pratica tuttavia la riletture di una quota randomizzata di test negativi, pratica raccomandata negli USA^{3,8,9}, ma poco efficace nei confronti dei casi falsi negativi.

I metodi di CdQ più diffusi risultano essere la verifica della correlazione cito-colpo-istologica e il riesame dei test negativi precedenti a SIL. Nuove implementazioni rispetto ai dati forniti nel 1997 sono la lettura in doppio dei casi negativi in follow-up (Reggio Emilia) e la pre-lettura computer-assistita dei preparati^{10, 11}(Imola).

Le iniziative interlaboratorio promosse dal Sottogruppo Regionale per il Controllo di Qualità in Citologia per il CdQ esterno si basano principalmente sulla lettura di set standard¹², che coinvolge tutti i centri di lettura dello screening. Questo tipo di CdQ favorisce il confronto fra i centri sui parametri interpretativi, con l'obiettivo di migliorare la riproducibilità diagnostica.

Tramite i dati di sorveglianza regionali¹³ si è rilevata una diversa distribuzione statistica delle categorie diagnostiche nei vari programmi di screening per la valutazione di concordanza. Questo fattore è legato indubbiamente alla natura stessa dell'esame citologico la cui interpretazione è soggettiva e qualitativa, oltre che ad una diversa crescita culturale dei singoli operatori formati in scuole diverse e con esperienza lavorativa diversa.

La lettura dei set, che ha avuto all'inizio il significato di revisione di casi discordanti rispetto alla diagnosi istologica di riferimento, ha confermato rilevanti differenze interpretative in citologia così come in istologia. La scelta di costruire set di casi emblematici ha segnato una evoluzione dell'uso del set standard, che viene interpretato anche come evento formativo, oltre che un sistema di monitoraggio della concordanza diagnostica. Il confronto assembleare alla fine della lettura del set, con coinvolgimento attivo di molti operatori, ha portato ad un approfondimento morfologico dei casi presentati, ma anche all'autovalutazione delle *performance* personali.

La valutazione statistica della lettura del set ha evidenziato anche un fabbisogno formativo e di approfondimento di alcuni argomenti citologici ed istologici, da cui è scaturita una serie di incontri di formazione itineranti, organizzati su tutto il territorio regionale, così da rendere sempre più partecipi gli operatori in un coinvolgimento fattivo; infatti mentre all'inizio ognuno lavorava solo per il proprio screening provinciale, attualmente questa settoreialità pare decisamente superata e tutti ormai operano per la riuscita dello screening regionale.

Bibliografia

1. Segnan N, Ronco G, Ciatto S. Cervical cancer screening in Italy. Eur J Cancer 2000; 36: 2235-9.
2. Ronco G, Iossa A, Naldoni C, et al. A first survey of organized cervical

- cancer screening programs in Italy. GISCI working group on organization and evaluation. Gruppo Italiano Screening Citologico. Tumori 1998; 84: 624-30.
3. Coleman DV, Day N, Douglas G, *et al.* European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Eur J of Cancer 1993; 29A: S1-S31.
 4. Bondi A, Casadei G. P, Lanzaova G, *et al.* CitoReview. Compact Disk di supporto al controllo di qualità in citologia ed istologia nello screening per il carcinoma della cervice. 1.05: 19-1-2001. Bologna, CDS - Centro Documentazione per la Salute - Regione Emilia-Romagna.
 5. Bondi A, Prandi S, Monari F, *et al.* Inter-laboratory reproducibility of cytologic and histologic diagnosis in a regional screening programme in Italy. 14th International Congress of Cytology. 27-5-2001. Amsterdam: The International Academy of Cytology, abstract book 1: 41.
 6. Andron A, Dalla Palma P. Il carico di lavoro in citologia cervico-vaginale. Un compito complesso nella pianificazione dell'attività di laboratorio. Pathologica 2000; 92: 177-84.
 7. Cibas ES, Dean B, Maffeo N, *et al.* Quality assurance in gynecologic cytology. The value of cytotechnologist-cytopathologist discrepancy logs. Am J Clin Pathol 2001; 115: 512-6.
 8. Coleman DV, Baker R. Quality assurance in cervical cytopathology. Cytopathology 1997; 8: 350-3 (discussion 353-4).
 9. Mody DR, Davey DD, Branca M, *et al.* Quality assurance and risk reduction guidelines. Acta Cytol 2000; 44: 496-507.
 10. Cosentino A, Ghidoni D, Salemi M, *et al.* Uno studio interlaboratorio sull'impiego di PapNet nel controllo di qualità della citologia cervico-vaginale. Pathologica 1999; 91: 184-9.
 11. Ghidoni D, Amadori A, Folicaldi S, *et al.* Controllo di qualità in citologia cervico-vaginale mediante lettura computer-assistita. Bio-Informazioni Istocitopatologiche 1997; 9: 5-10.
 12. Cocchi V, Sintoni C, Carretti D, *et al.* External quality assurance in cervical/vaginal cytology. Interlaboratory agreement in the Emilia-Romagna region of Italy. Acta Cytol 1996; 40(3): 480-8.
 13. Fabbris E, Bucchi L, Folicaldi S, *et al.* Analisi della variabilità diagnostica intralaboratorio nel programma di screening cervicale di Imola. Pathologica 1998; 90: 127-32.

Influence of ultrasonic dissolution on the stability of cyclophosphamide powder for injection

Influenza della dissoluzione mediante ultrasuoni sulla stabilità di ciclofosfamide in polvere iniettabile

Francesco Saverio Robustelli della Cuna*, Mariella Mella**, Annalisa Lanza***, Riccardo Gatti***, Anna Maria Goglio*

* Pharmacy Service, Salvatore Maugeri Foundation, Scientific Institute, Montescano (PV), Italy

** Organic Chemistry Department, University of Pavia, Pavia, Italy

*** Laboratory of Experimental Oncology, Salvatore Maugeri Foundation, Scientific Institute, Pavia, Italy

Summary

Aim. Cyclophosphamide is widely employed as cytotoxic agent both for conventional (<1 g/m²) and high dose (up to 7 g/m²) anticancer therapies. In Italy cyclophosphamide is available in vials containing 500 mg and 1 g of drug generally reconstituted with 25 ml and 50 ml of solvent, respectively (20 mg/ml). Both formulations are inconvenient for routine preparation due to the prolonged handling-time and the high amounts of solvent required for dissolution. **Materials and methods.** We evaluated the effects of ultrasonic treatment of cyclophosphamide to short the dissolution time and to reduce the amounts of solvent required in comparison with the traditional manual shaking. Commercially available formulations of cyclophosphamide (Endoxan® 500 mg, 1 g vials) were resuspended at 50 mg/ml in sterile water, 0.9% sodium chloride or 5% dextrose and treated for 5 min at 50°C in an ultrasonic bath. The solvent volumes were 10 ml for 500 mg vials and 20 ml for 1 g vials. After complete dissolution (visual inspection), the chemical stability of two concentrations (10 and 50 µg/ml) was determined using the high performance liquid chromatography method with UV detection and nuclear proton magnetic resonance. **Results.** No significant differences in chemical stability between the solutions obtained from the two different methods were found. **Conclusion.** Ultrasonic treatment allows the reduction of the amount of solvent to be dissolved and a significant shortening of dissolution time. Eur. J. Oncol., 9 (1), 55-60, 2004

Key words: cyclophosphamide chemical stability, ultrasonic dissolution, HPLC, NMR

Received/Pervenuto 21.11.2003 - Accepted/Accettato 30.12.2003

Address/Indirizzo: Dr. Francesco Saverio Robustelli della Cuna, Servizio di Farmacia, Fondazione Salvatore Maugeri, Via per Montescano 31, 27040 Montescano (PV), Italia - Tel: 0039/0385/247373

Fax: 0039/0385/247309 - E-mail: frobustelli@fsm.it

Riassunto

Finalità. La ciclofosfamide è ampiamente utilizzata come agente citotossico sia in terapie antitumorali convenzionali (inferiori a 1 g/m²) che in protocolli ad alte dosi (fino a 7 g/m²). In Italia la ciclofosfamide è commercializzata in fiale da 500 mg e da 1 g, che vanno solitamente disciolte in 25 ml e 50 ml di solvente, rispettivamente. Entrambe le formulazioni non si adattano all'utilizzo per le preparazioni di routine a causa dei tempi prolungati di manipolazione e della grande quantità di solvente richiesta per la loro dissoluzione. **Materiali e metodi.** Sono stati valutati gli effetti del trattamento con ultrasuoni della ciclofosfamide allo scopo di abbreviare i tempi di dissoluzione e di ridurre la quantità di solvente richiesta rispetto al metodo tradizionale di agitazione manuale. Due formulazioni di ciclofosfamide disponibili in commercio (Endoxan®, fiale da 500 mg e 1 g) sono state risospese a 50 mg/ml in acqua sterile, 0,9% cloruro di sodio o 5% destrosio e trattate per 5 min a 50°C in un bagno ad ultrasuoni. I volumi di solvente erano 10 ml per le fiale da 500 mg e 20 ml per le fiale da 1 g. Dopo completa dissoluzione (ispezione visiva), la stabilità chimica di due concentrazioni (10 e 50 µg/ml) è stata valutata mediante cromatografia liquida ad alta efficienza e risonanza magnetica nucleare. **Risultati.** Nessuna differenza significativa nella stabilità chimica è stata osservata tra le due soluzioni ottenute mediante i due diversi metodi. **Conclusioni.** Il trattamento con ultrasuoni permette di ridurre la quantità di solvente per la dissoluzione e di raggiungere una riduzione significativa del tempo di dissoluzione. Eur. J. Oncol., 9 (1), 55-60, 2004

Parole chiave: stabilità chimica della ciclofosfamide, dissoluzione mediante ultrasuoni, HPLC, RMN

Introduction

Cyclophosphamide (2-[bis(2-chloroethyl)amino]tetrahydro-2H-1,3,2-oxazophosphorine 2-oxide) (fig. 1) is an alkylating agent commonly employed in a wide range of cytotoxic regimens¹. Cyclophosphamide can be administered as a single agent both for conventional (<1 g/m²) and high-dose (up to 7 g/m²) chemotherapy or in combination regimens for the treatment of malignancies including breast cancer, non Hodgkin's lymphomas, acute leukaemia, multiple myeloma, and lung and bladder cancer¹. Cyclophosphamide monohydrate, a white powder², soluble in alcohol, benzene and poorly soluble in water is available in both parenteral and oral formulations. In Italy, the commercially available parenteral forms of cyclophosphamide (Endoxan[®]), containing 500 mg or 1 g of monohydrate and sodium chloride as excipient, are packaged in vials. Both formulations are inconvenient for routine preparation due to the prolonged handling-time and the high amounts of solvent required for dissolution. Injectable cyclophosphamide prepared for parenteral administration after adding the recommended amount of sterile water (25 ml for 500 mg vial and 50 ml for 1 g vial to reach a concentration of 20 mg/ml) must be vigorously shaken to obtain complete dissolution^{3,4}. The poor solubility of cyclophosphamide in aqueous solvents, the potential risks related to the breakage of vials during the shaking, the need for time reduction during the preparation of cyclophosphamide-containing regimens, have suggested the addition of a minor quantity of ethanol followed by dilution with water. Unfortunately, as a consequence of the presence of ethanol, venous irritation was observed during intravenous administration⁵. The possibility of heating cyclophosphamide solutions has also been investigated^{5,6}. Due to the low melting range of the drug² (48-52°C), solutions containing cyclophosphamide monohydrate can be heated to 50-80°C up to 15 min⁶. Under these conditions, the dissolution rate of warmed cyclophosphamide solutions did not change appreciably but at higher temperatures degradation occurred (range 80.9-92.8%). Furthermore, during prolonged heating of cyclophosphamide-containing solutions, the degradation process was accompanied by a decrease of pH (from 6.8 to 2.5)⁶. In order to achieve a more rapid dissolution of cyclophosphamide and to reduce the amount of solvent, as compared to the traditional manual shaking (MS) method, we investigated the effect of a brief treatment with ultrasound (UT) at 50°C. Vials with 500 mg or 1 g of cyclophosphamide were dissolved in 10 ml or 20 ml, respectively, instead of 25 ml for 500 mg vial and 50 ml for 1 g vial as suggested by the manufacturer's instructions. Moreover, dissolution rates and the percentage of drug recovery from injectable formulation were analyzed and tested as a function of the solvent (sterile water, 0.9% sodium chloride, 5% dextrose). Solvent choice was based on the needs of our current clinical practice. Solutions were analyzed by the high performance liquid chromatography (HPLC) method and the cy-

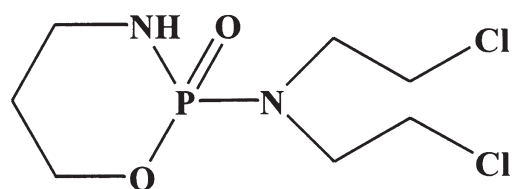


Fig. 1. Chemical structure of cyclophosphamide.

clophosphamide chemical structure was also confirmed after UT by Nuclear Proton Magnetic Resonance (¹H-NMR) assay. Finally the time for preparation spared by UT approach was recorded. The results obtained are herein presented.

Materials and methods

Chemicals

Cyclophosphamide Monohydrate 98% was purchased by Aldrich Chem. Co., Milw., (lot 08214HF); Endoxan.Asta 500 mg, (lot 1C226A) and Endoxan.Asta 1 g (lot 0L101A) were kindly provided by Asta Medica S.p.A, Milan, Italy. All solvents were HPLC-grade (BDH, Milan, Italy) and used without further purification. Ultrapure water was produced using Milli Q, Milli RO, Millipore. Deuterium oxide was provided by Euriso-Top, Saint-Aubain, France (lot D021B).

Study design

The study was designed to ascertain the capability of UT compared to MS in achieving a more rapid dissolution of cyclophosphamide with a concomitant reduction of the amount of solvent necessary for the preparation. For this purpose, from January to December 2001, at the Satellite Pharmacy of the Division of Medical Oncology of Fondazione Salvatore Maugeri, Pavia, Italy a total of 413 cyclophosphamide-containing preparations were monitored. Preparations were prospectively randomized between MS (n = 204) and UT (n = 209). The randomization list was generated using a computerized procedure with the Wichman and Hill algorithm⁷.

Preparation of HPLC samples

Triplicate samples of cyclophosphamide were prepared by diluting each commercially available formulation (Endoxan[®] 500 mg and 1 g vials) in three different aqueous solvents (sterile water, 0.9% sodium chloride, 5% dextrose) by the means of 2 different methods. Control samples, according to the manufacturer's indications^{3,4}, were reconstituted at 20 mg/ml and vigorously manually shaken until complete dissolution. According to the aim of the study, the second set of samples was reconstituted at a concentration of 50 mg/ml (solvent amount reduction 60%) and dissolved by 5 min of sonication to complete dissolution (Sonication System UST 211, serial number 643197). Both sets of solutions were visually examined in normal laboratory fluorescent light with the unaided eye. After dissolution, aliquots of 50 µl were withdrawn from each vial, diluted at the final concentration of 50 µg/ml (1:1000 for the UT-treated 50 mg/ml samples and 1:400 for the MS 20 mg/ml samples, respectively), and injected into the chromatographic system. A sample was prepared under aseptic technique using a vertical laminar air flow hood and the pH was determined at each analysis using a digital pH meter (H Basic 20, Crison strumenti, S.p.A., Modena, Italy).

HPLC assay of cyclophosphamide

A modification of the HPLC method described by Kensler *et al*⁸ was used to determine cyclophosphamide concentrations. The

instrumentation consisted of a delivery system, a variable-volume injector with a 50 μl loop and a variable wavelength ultraviolet detector operating at 210 nm. Due to the very low molar absorptivity of cyclophosphamide in the higher region, a low analytical wavelength was employed. The output was processed and manipulated using a Chem Station (Hewlett Packard, Milan, Italy). A reversed-phase column (Nucleosil C₁₈ column, 5 μm -particle size 250 X 4,6 mm, Thermoquest's Hypersil Division, Milan, Italy) was used at room temperature. The mobile phase, a mixture of acetonitrile and water (50:50 v/v) was degassed using an on-line membrane system and delivered with 1 ml/min flow rate; injection volume was 50 μl . Retention time of cyclophosphamide was 3.2 min. The selectivity of the HPLC method was tested by accelerated degradation heating of a 50 mg/ml cyclophosphamide solution at 85° C for 3 hours. Samples of 50 μl were withdrawn at 0, 1 and 3 hours and immediately analyzed. In accordance with the aims of this study, the method was validated in the concentration range between 5 and 80 $\mu\text{g/ml}$. The dilutions 5, 10, 25, 50 and 80 $\mu\text{g/ml}$ were prepared from stock solution (1000 $\mu\text{g/ml}$ analytical grade cyclophosphamide in acetonitrile), using a high-precision glass syringe with an appropriate volume of ultrapure water. The calibration curve was linear over the concentration range 5-80 $\mu\text{g/ml}$ and a mean regression correlation coefficient of 0.998 was obtained (data not shown). The intra-assay precision was reported in Table 1 as coefficient of variation calculated by the average calibration factor (n = 5) at 2 different nominal concentrations (10 $\mu\text{g/ml}$ and 50 $\mu\text{g/ml}$). The inter-assay variability values are reported in Table 2. The mean accuracy was reported as bias %, calculated by the assay of known increasing amount of analyte (from 5 to 80 $\mu\text{g/ml}$).

Preparation of NMR samples

NMR samples of commercially available cyclophosphamide were prepared and treated as described for HPLC analysis. After complete dissolution, 500 μl of each sample were removed from each vial, evaporated until dry with a under vacuum concentrator (Heto Holten A/S, Allerød, Denmark), resuspended in 750 μl of deuterium oxide and analyzed. Degraded samples were treated as described in the section on the HPLC method.

Table 1 - Intra-assay precision of HPLC analysis of cyclophosphamide

Nominal concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Predicted concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Accuracy ^a (% bias)
10	9.90	-0.91
10	9.72	-2.83
10	9.54	-4.63
10	10.18	1.84
10	10.46	4.58
Mean \pm SD	9.96 \pm 0.37	-0.39 \pm 3.67
50	50.51	1.01
50	49.87	-0.27
50	50.21	0.42
50	49.60	-0.80
50	50.25	0.50
Mean \pm SD	50.09 \pm 0.36	0.17 \pm 0.71

$$^a\% \text{ bias} = [(A_{\text{added}} - A_{\text{observed}}) / A_{\text{observed}}] \times 100$$

Table 2 - Inter-assay precision and accuracy of HPLC analysis of cyclophosphamide

Nominal concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Predicted concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Precision (% CV ^a)	Accuracy (% bias)
5	4.91 \pm 0.09	1.83	-1.85
10	9.96 \pm 0.33	3.30	-0.39
25	24.65 \pm 0.16	0.66	-1.41
50	50.09 \pm 0.32	0.63	0.17
80	83.02 \pm 1.80	2.17	3.77
Mean \pm SD		1.72 \pm 1.12	0.06 \pm 2.22

$$^a\% \text{ CV (coefficient of variation)} = (\text{SD}/\text{concentration observed}) \times 100$$

NMR assay of cyclophosphamide

The analyses were performed by recording the proton spectrum at 25° C by using a 300 Avance spectrometer (Bruker, Milan, Italy) and observing the ¹H at 300 MHz. Reference spectra (fig. 2) was obtained by dissolving an appropriate amount of analytical grade cyclophosphamide in deuterium oxide.

Analysis of data

The unpaired T-test⁹, for comparison of the results obtained from different dissolution techniques, was employed. The declared concentration of commercially available cyclophosphamide vials was set as 100% and subsequent concentrations were reported as percentage of the initial value. According to the Official Italian Pharmacopoeia¹⁰, degradation exceeding 10% of the initial value was considered an unacceptable loss of activity and the vial was discarded.

Results

The pH of cyclophosphamide solutions were 3.0 and 3.5 by UT and MS, respectively.

Cyclophosphamide solutions of 20 mg/ml obtained by MS or 50 mg/ml dissolved by UT were analyzed in parallel by HPLC and ¹H-NMR. The HPLC chromatograms in fig. 3 showed that the 2 cyclophosphamide peaks are perfectly equivalent (retention time 3.2 min). Similarly, the NMR spectra in fig. 4 showed no difference due to the two distinct dissolution methods.

To test the selectivity of the analytical methods applied, the cyclophosphamide degradation kinetics was analyzed by HPLC and ¹H-NMR. A cyclophosphamide solution of 50 $\mu\text{g/ml}$ was heated at 80° C for 3 hours. After 1 hour, the HPLC analysis showed one peak at 210 nm (retention time 1.4 min) with a degradation of 37% (fig. 5, B); after 3 hours, 68% of the drug was degraded (fig. 5, C). The chromatograms in fig. 5 showed that the degradation products did not interfere with the cyclophosphamide peak (retention time 3.2 min). Degraded solution was also analyzed by ¹H-NMR and the spectrum of the degradation product is shown in fig. 6. In accordance with previously published data¹¹, after prolonged heating, cyclophosphamide was degraded by hydrolysis of oxaphosphorine ring with consequent formation of more polar dihydroxy derivatives. The degradation pathway is shown in fig. 7.

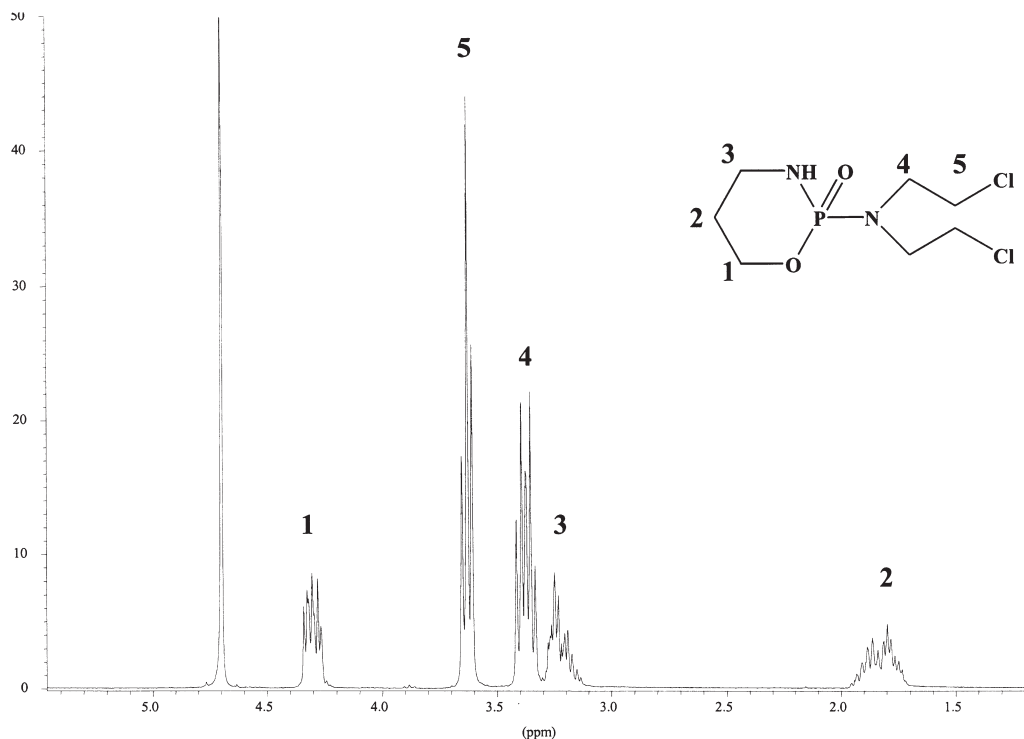


Fig. 2. NMR reference spectrum of cyclophosphamide. The number indicates the integral of proton peaks used for determination (ppm = parts per million).

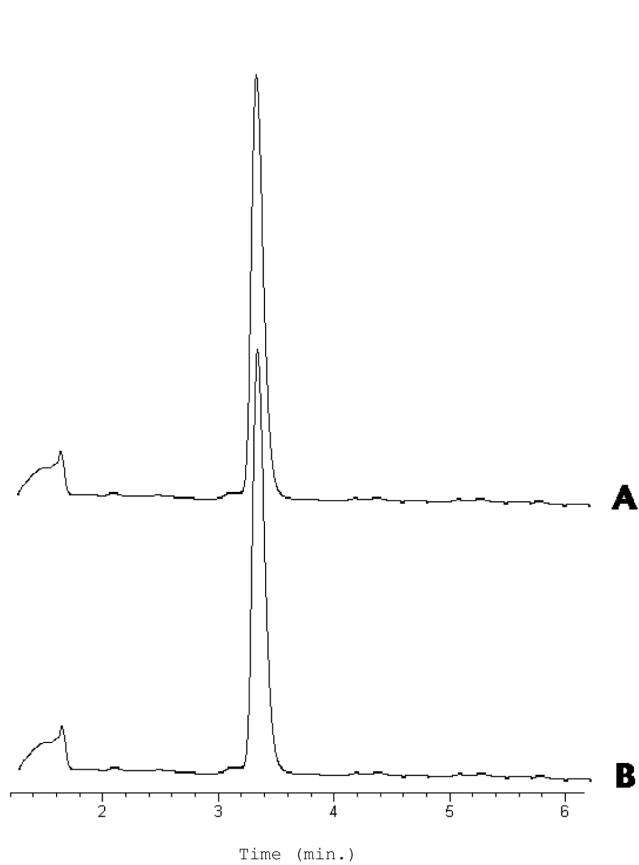


Fig. 3. Chromatograms of cyclophosphamide solutions obtained by manual shaking (A) or ultrasonic treatment (B).

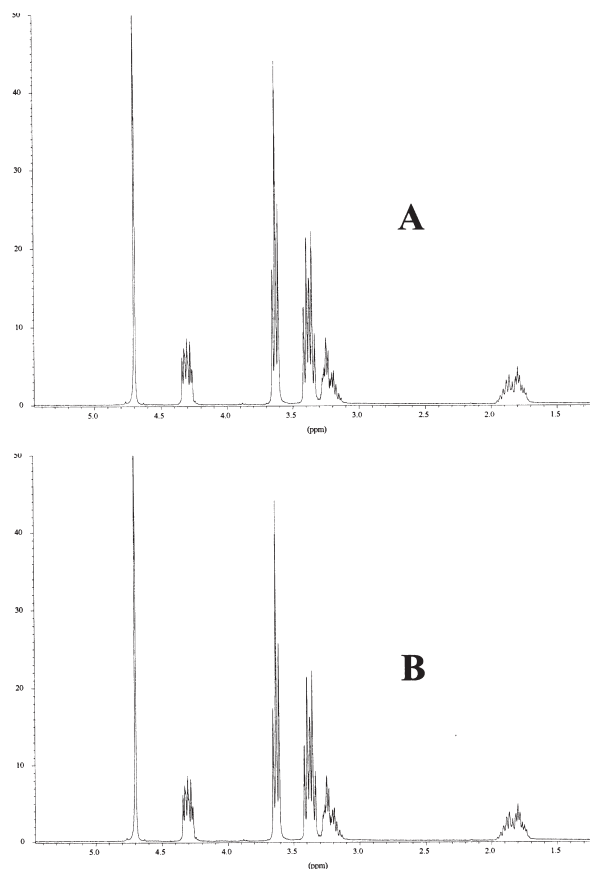
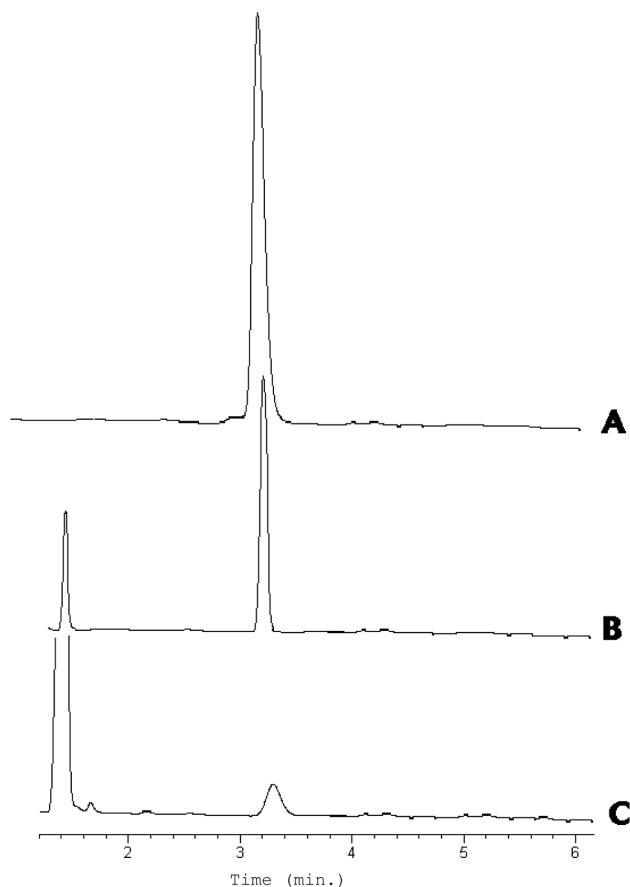


Fig. 4. NMR spectra of cyclophosphamide solutions obtained by manual shaking (A) or ultrasonic treatment (B) (ppm = parts per million).

Table 3 - Dissolution time of 20 mg/ml cyclophosphamide in water, 0.9% NaCl or 5% dextrose by manual shaking (MS)

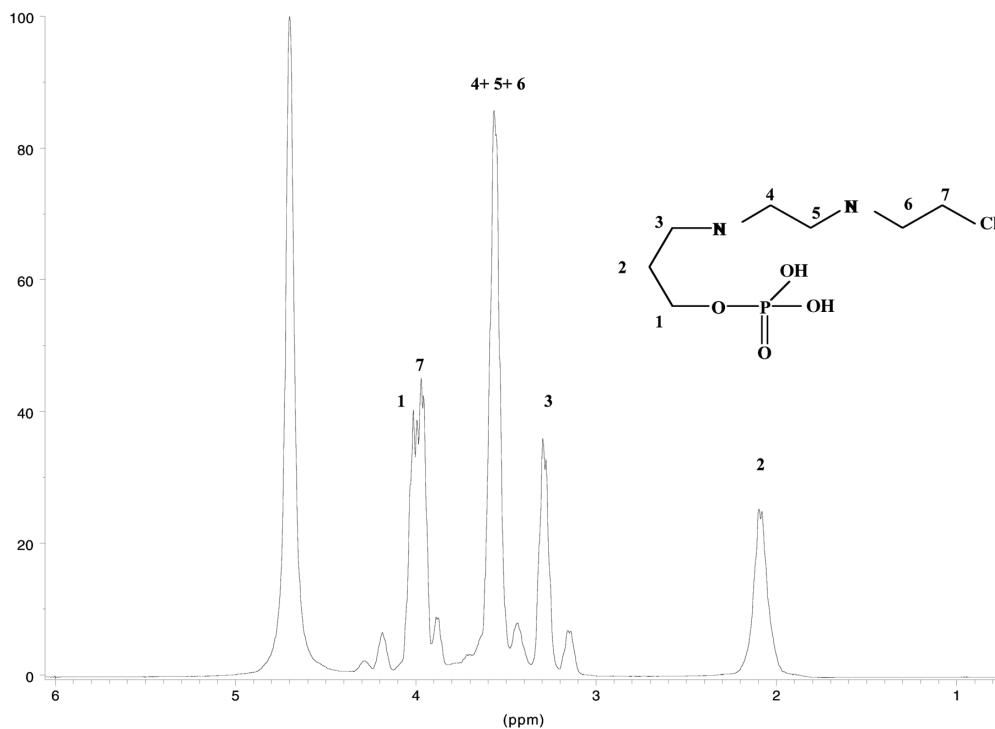
	Dissolution time ^a (min)		
	Water	0.9% NaCl	5% dextrose
500 mg	7.9±1.0	8.3±0.3	8.1±0.4
1 g	7.8±0.6	8.7±4.6	8.6±1.3

^aMean ± SD of 9 samples/solution.


Fig. 5. HPLC chromatograms of cyclophosphamide degradation kinetic: A, time 0; B, 1 hour (37% degradation); C, 3 hours (68% degradation).

The dissolution rate and percentage of drug recovery were analyzed as a function of 3 different solvents currently used in our clinical practice. The MS solubility of cyclophosphamide (20 mg/ml) measured as dissolution time was slightly improved in water as compared to dextrose or sodium chloride (Table 3). By the means of HPLC analysis, the percentage of recovery of cyclophosphamide with the two dissolution methods was also verified. The comparison between samples treated by MS (20 mg/ml) and those treated by UT (50 mg/ml) showed that the dissolution by UT (50°C for 5 min) achieved a statistically significant higher recovery of cyclophosphamide (Table 4) in both the commercially available formulations (500 mg and 1 g) and in all the 3 solvents (water, 0.9% NaCl and 5% dextrose).

To evaluate the influence of the UT approach on the preparation time, 413 cyclophosphamide-containing preparations were monitored. Sonication, in addition to a better drug recovery and to a 60% reduction in the amount of solvent, allowed a statistically significant reduction of preparation time for a series of cyclophosphamide-containing regimens (Table 5).


Fig. 6. NMR spectrum of degraded cyclophosphamide. The number indicates the integral of proton peaks used for determination (ppm = parts per million).

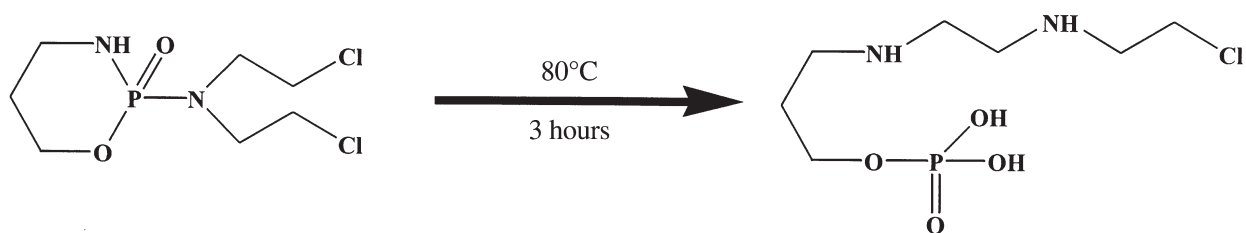


Fig. 7. Degradation pathway of cyclophosphamide after treatment at 80°C for 3 hours.

Table 4 - Mean values (+SD) of cyclophosphamide recovery after dissolution by manual shaking (MS) or by sonication (UT) in water, 0.9% NaCl or 5% dextrose.

	Cyclophosphamide recovery (% of control)					
	Water		0.9% NaCl		5% Dextrose	
	MS	UT	MS	UT	MS	UT
500 mg	87.5±7.6	97.4±3.9	92.0±9.7	101.6±1.1	94.0±2.9	98.1±0.6
<i>p values</i>	0.00813		0.0531		0.0246	
1 g	91.0±8.9	96.6±1.2	91.4±7.4	99.9±1.1	96.1±2.4	100.1±1.6
<i>p values</i>	0.03084		0.0543		0.00499	

Table 5 - Average dissolution time (±SD) of 413 cyclophosphamide-containing preparations: comparison between manual shaking (MS) and sonication (UT)

Regimens	MS		UT		<i>p values</i>
	No. of preparations	Dissolution time (min)	No. of preparations	Dissolution time (min)	
High-dose CTX ^a	22	68.5±15.35	25	15.8±3.62	<0.05
CMF 1-21 ^b	113	104.0±52.50	115	46.0±23.23	<0.05
CEOP ^c	37	61.0±29.76	41	24.0±13.17	<0.05
CMVC ^d	32	32.0±20.63	28	14.0±9.13	<0.05

^aHigh-dose CTX: Cyclophosphamide 7000 mg/m²

^bCMF 1-21: Cyclophosphamide 600 mg/m², Methotrexate 40 mg/m², 5-FU 600 mg/m²

^cCEOP: Cyclophosphamide 750 mg/m², Epirubicin 75 mg/m², Vincristine 1.4 mg/m², Prednisone 100 mg/m²

^dCMVC: 5-FU 600 mg/m², Epirubicin 75 mg/m², Cyclophosphamide 600 mg/m²

Conclusions

The long preparation times related to the low dissolution rate of the injectable formulation of cyclophosphamide, together with its wide use in our Institution for a series of chemotherapy regimens, prompted us to develop a method to speed up the reconstitution step. A drug degradation was obtained by heating cyclophosphamide solution, but venous irritation was recorded with the addition of a co-solvent like ethanol, as previously described by other authors^{5,6}. The UT dissolution technique enabled us to improve cyclophosphamide recovery and to reduce by more than half the dissolution times in comparison with the traditional MS method, without compromising drug stability. In addition to other ancillary aspects of preparation technique (removal of high-volume syringes and reduction in the number of piercings on the same bottle), the UT approach seems very useful in the everyday practice, especially when a high number of chemotherapy regimens containing cyclophosphamide are required.

References

- Fischer DS, Knobb MT, Durivage HJ. Chemioterapia antitumorale. Manuale Pratico. Milano: Masson, 1993..
- The Merck Index. 20th Edition. Merck & Co, 1996.
- Alwood M, Stanley A, Wright P. The cytotoxics handbook. Radcliffe Medical Press, 1997.
- Trissel LA. Handbook on injectable drugs. 12th Ed. American Society of Health System Pharmacists, 2002.
- Beijnen JH, Van Gijm R, Challa EE, *et al.* Chemical stability of two sterile, parenteral formulations of cyclophosphamide (Endoxan[®]) after reconstitution and dilution in commonly used infusion fluids. J Parenter Sci Technol 1992; 46 (4): 111-6.
- Brooke D, Scott JA, Bequette RJ. Effect of briefly heating cyclophosphamide solutions. Am J Hosp Pharm 1975; 32: 44-5.
- Dixon WJ, Brown MB. BMDP biomedical computer programs. Rel 7.0. Berkeley, Los Angeles: University of California, 1992.
- Kensler T, Behme J, Brooke D. High performance liquid chromatography analysis of cyclophosphamide. J Pharm Sci 1979; 68 (2): 172-4.
- Hintze J. NCCS 2001. Statistical Analysis System. Rel 2001.
- Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana, 11th ed. Roma: Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, 2002, 171.
- Gilard V, Martino R, Malet-Martino MC, *et al.* Chemical and biological evaluation of hydrolysis products of cyclophosphamide. J Med Chem 1994; 37: 3986-93.

Resoconto di un caso di metastasi gastriche da melanoma cutaneo

Report of a case of gastric metastases from skin melanoma

Francesco Tatulli, Antonio Caputi, Vincenzo Ciani, Giuseppe Chetta, Nicola Sasso
U.O. Chirurgia, Ospedale "V. Emanuele II", Bisceglie (BA), Italia

Riassunto

Il melanoma costituisce la neoplasia con il più rapido incremento d'incidenza dopo il carcinoma polmonare nelle donne. Il melanoma allo stadio iniziale ha una prognosi favorevole, mentre quello metastatico comporta una prognosi severa. Il tasso di sopravvivenza a 5 anni è del 95% per il melanoma allo stadio iniziale, ma la sopravvivenza mediana crolla a 5-8 mesi in presenza di metastasi. La sopravvivenza più breve si ha in presenza di metastasi viscerali. La resezione chirurgica di tali metastasi migliora la qualità di vita del paziente, che in genere perisce di ulteriore malattia metastatica in altro organo. Riportiamo un caso clinico di metastasi gastriche di un melanoma cutaneo asportato cinque anni prima. Eur. J. Oncol., 9 (1), 61-62, 2004

Parole chiave: melanoma, metastasi gastriche, gastrectomia

Introduzione

L'incidenza del melanoma è in forte aumento, per cui è prevedibile un aumento della prevalenza di pazienti affetti da melanoma metastatico. La neoplasia metastatizza per via linfatica ed ematica. Nella maggior parte dei casi le metastasi compaiono nei primi 2 anni dal trattamento iniziale ed incidono sfavorevolmente sulla prognosi quando sono sistemiche. Il trattamento chirurgico delle metastasi mira a migliorare la qualità di vita di tali pazienti, che successivamente periscono per metastasi a distanza, ed è possibile nel 10-25% dei casi. Le metastasi gastrointestinali sono clinicamente silenti, sebbene costituiscano un rilievo autoptico comune, e mostrano una tendenza alla comparsa plurima sincrona. Il trattamento chirurgico di tali lesioni è indicato nei pazienti a basso rischio ed è rappresentato dalla resezione o dalla derivazione palliativa.

Summary

Melanoma constitutes the neoplasm with the most rapidly increasing rate of incidence after lung carcinoma in women. Early stage melanoma has a favourable prognosis, whereas metastatic melanoma has a severe prognosis. The 5-year survival rate is 95% for early stage melanoma, but the median survival plummets to 5-8 months in the presence of metastases. The shortest survival rate occurs with visceral metastases. Surgical resection of such metastases improves the quality of life of the patient, who generally dies of further metastatic disease in other organs. We report a case of gastric metastases from a cutaneous melanoma resected five years before. Eur. J. Oncol., 9 (1), 61-62, 2004

Key words: melanoma, gastric metastases, gastrectomy

Riportiamo il caso di una paziente operata di gastrectomia subtotale per duplice lesione gastrica sincrona da metastasi di melanoma.

Caso clinico

Paziente di 80 anni, affetta da cardiopatia aritmica ben controllata, sottoposta cinque anni prima ad amputazione metatarso-falangea del V dito del piede destro per melanoma, del quale non è disponibile il referto istologico. La paziente è rimasta asintomatica fino alla comparsa di dolore addominale e vomito alimentare. All'esame obiettivo la paziente si presentava in discrete condizioni generali, apiretica. Sui quadranti addominali alti era palpabile una tumefazione leggermente dolente di consistenza parenchimatosa, poco mobile sui piani profondi, del diametro massimo di circa 5 cm. La cicatrice al piede destro era regolare; non si palpavano linfonodi superficiali patologici. Gli esami di laboratorio all'ingresso dimostravano solo una lieve anemia (Hb 10,9, Hct 31%, normali MCV, MCH, MCHC). La radiografia del torace non evidenziava lesioni di origine neoplastica. Veniva eseguita una TAC spirale multifasica, che non dimostrava lesioni al torace, evidenziava sulla piccola curva gastrica un ispessimento irregolare diffuso e non rilevava lesioni epatiche (con eccezione di un angioma) o linfonodali. All'EGDS era presente sulla parete

posteriore del corpo gastrico una vasta perdita di sostanza, di circa 5 cm di lunghezza, con fondo ricoperto di fibrina, margini irregolari e rilevati; a livello del piloro si riscontrava un'altra perdita di sostanza con caratteristiche sovrapponibili alla precedente, che stenottizzava parzialmente il piloro stesso e si continuava sulla parete anteriore del bulbo. Le biopsie endoscopiche erano costituite da frustoli di mucosa gastrica antrale infiltrati da neoplasia maligna mesenchimale ad elementi tendenzialmente fusati (immunoistochimica: actina m.1 -, LCA -, CK-LMW -, CK-PAN -, S-100 +, vimentina +/-).

La paziente era sottoposta a laparotomia mediana totale. L'esplorazione dell'addome evidenziava due voluminose neoformazioni gastriche del corpo e dell'antro-piloro substenosanti, con evidente gastrectasia a monte, ed una diffusa linfadenopatia perigastrica e al tripode celiaco, in assenza di ascite o lesioni epatiche. Si preferiva eseguire una resezione dello stomaco con conservazione del fondo, anziché una gastrectomia totale, sia per via della grande distanza tra il limite craniale della neoplasia ed il cardias che per l'età avanzata della paziente. Pertanto, si preparavano lo stomaco ed il digiuno per una gastrectomia subtotale sec. Billroth II. Il decorso post-operatorio era regolare sino alla settima giornata post-operatoria, quando compariva una transitoria insufficienza cardiaca non ischemica, risolta in nona giornata. La paziente era dimessa in tredicesima giornata dopo aver ripreso l'alimentazione per os ed una sufficiente canalizzazione alle feci. L'esame istologico evidenziava una duplice localizzazione secondaria gastrica di melanoma maligno amelanotico a cellule fusate (es. immunoistochimici: S-100 +++, HMB 45 +++, CD99-), estesa dalla lamina propria alla tonaca muscolare propria in profondità, e linfonodi esenti da neoplasia. La paziente rifiutava la terapia adiuvante post-operatoria proposta. Tuttavia, circa due mesi dopo era sottoposta ad una TAC *whole body* per comparsa di dispnea ingrossante, che dimostrava alcune metastasi al polmone sinistro per cui s'intraprendeva la somministrazione di dacarbazina ed interferone. Un'EGDS eseguita dopo sei mesi risultava nella norma. Ad un anno dall'intervento la paziente presenta dispnea persistente ed una cachessia neoplastica da severo coinvolgimento metastatico polmonare complicato da broncospasma diffuso.

Discussione

L'incidenza del melanoma aumenta ad una velocità non eguagliata da altre neoplasie, ad eccezione del carcinoma polmonare nelle donne. Sulla base di questo trend, è prevedibile un aumento della prevalenza di pazienti affetti da melanoma metastatico. La neoplasia metastatizza per via linfatica ed ematica. La via linfatica segue generalmente un pattern sequenziale, mentre le metastasi ematiche si disseminano casualmente e colpiscono il polmone, il fegato, l'encefalo, le ossa ed il tratto gastroenterico (g.e.). Un terzo di tutti i pazienti, pur se ben trattati inizialmente ha una ripresa di malattia loco-regionale o sistemica entro 5-10 anni. Nella maggior parte dei casi le metastasi compaiono nei primi 2 anni dal trattamento iniziale. In presenza di metastasi sistemiche la sopravvivenza mediana crolla a 5-8 mesi, con una sopravvivenza a 5 anni di appena il 6%¹. Sulla base della sede delle metastasi i pazienti possono essere suddivisi in tre gruppi con prognosi progressivamente ingrossante: cute/linfonodi/apparato g.e., polmone, fegato/encefalo/ossa².

Il trattamento chirurgico mira a migliorare la qualità di vita. Infatti, questi pazienti periscono dopo la comparsa di altre metastasi a distanza, generalmente per complicanze polmonari o neurologiche centrali. La chirurgia della malattia metastatica è possibile nel 10-25% dei casi. In alcuni pazienti è consigliabile un periodo di osservazione di alcune settimane per accertare la velocità di crescita tumorale e svelare nuove metastasi³.

Le metastasi gastrointestinali sono silenziose, e solo nell'1-7% dei casi di melanoma metastatico sono presenti manifestazioni cliniche. L'autopsia, invece, dimostra in genere la loro presenza in una percentuale che raggiunge anche il 58%. Il melanoma ha una predilezione speciale per l'apparato g.e.: il 50-70% delle metastasi in questo apparato è a partenza da un melanoma; la sede più frequentemente coinvolta è l'intestino tenue. È stata documentata la tendenza alla comparsa sincrona di due o più metastasi g.e., con una sopravvivenza prolungata fino a 5 anni dopo escissione multipla riportata da alcuni Autori⁴. I sintomi sono aspecifici, più frequentemente causati da un'anemizzazione da sanguinamento cronico, e meno comunemente da ostruzione o perforazione⁵. La sopravvivenza mediana va dai 2 agli 11 mesi. Il trattamento chirurgico è indicato nei pazienti a basso rischio ed è rappresentato dalla resezione o dalla derivazione palliativa.

Il caso su descritto riporta il caso di una localizzazione secondaria di melanoma di per se rara, che ha manifestato nella nostra paziente solo alcune caratteristiche tipiche della metastasi viscerale da melanoma. Infatti la localizzazione era caratteristicamente casuale e non preceduta da metastasi evidenziabili in rapporto con la sede originaria del melanoma, ed era duplice e sincrona; tuttavia ha colpito lo stomaco (non il tenue), manifestandosi con disturbi da ostacolato svuotamento gastrico in assenza di una significativa anemia ipocromica da perdita cronica. La gastrectomia subtotale ha permesso la risoluzione dei disturbi alimentari, in assenza di disturbi potenzialmente associati con un'asportazione totale dello stomaco in una paziente ottantenne. Il caso risulta tipico nel suo esito in quanto la paziente ha ottenuto sì una buona palliazione del suo disturbo digestivo, ma ad un anno dall'intervento è affetta da severa cachessia dovuta a metastasi a distanza (polmoni).

Bibliografia

1. Sharpless SA, Das Gupta TK. Surgery for metastatic melanoma. *Semin Surg Oncol* 1998; 14: 311-8.
2. Barth A, Wanek AL, Morton DL. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg* 1995; 181: 193-201.
3. Mansfield PF, Lee JE, Balch CM. Cutaneous melanoma: current practice and surgical controversies. *Curr Prob Surg* 1994; 31: 253-374.
4. Ricaniadis N, Konstadoulakis NM, Walsh D, et al. Gastrointestinal metastases from malignant melanoma. *Surg Oncol* 1995; 4: 105-10.
5. Tanabe KH, Souba WW. Melanoma. In Cameron JL. *Current surgical therapy*, 5th ed. St. Louise, Mo: Mosby 1995, 895-9.

Meningioma papillare. Profilo immunoistochimico e ultrastrutturale di un caso *Papillary meningioma. Immunohistochemical and ultrastructural study of a case*

Luigi Cuccurullo*, Marina Accardo*, Franca Ferraraccio*, Laura Columbano**, Fernando Antonio Cioffi**

* Dipartimento Assistenziale di Morfopatologia, II Università, Napoli, Italia

** Dipartimento di Neurochirurgia, II Università, Napoli, Italia

Riassunto

Finalità. Gli Autori hanno creduto opportuno presentare un caso di meningioma papillare per la relativa rarità di questo istotipo e per alcuni particolari caratteri morfologici degni di nota. Questo caso è stato studiato con tecniche di istologia, di immunoistochimica e di microscopia elettronica a trasmissione. Dopo la verifica ultrastrutturale circa la natura meningiomatosa-papillare del caso in esame, l'attenzione è stata rivolta soprattutto a tre aspetti: 1) la differenza di morfologia cellulare tra le zone "compatte" e quelle papillari; 2) la coesistenza di papille e di pseudorosette; 3) le possibili basi morfologiche dell'aggressività biologica di questo istotipo. **Materiali e metodi.** Sono state applicate tecniche di istologia (ematosilina-eosina, PAS, tricromica), di immunoistochimica (vimentina, fibronectina, CD34, GFAP, Ki67, progesterone, EMA) e di microscopia elettronica a trasmissione. **Risultati.** La diagnosi di meningioma papillare è stata verificata sia mediante marcatura per la vimentina sia mediante la microscopia elettronica. Sono stati identificati due tipi cellulari morfologicamente diversi: uno a livello della zona compatta, l'altro a livello delle papille. Sono stati evidenziati aspetti morfologici intermedi tra le pseudorosette e le papille ed è stata documentata la presenza di epiteli dismorfi e dismetrici, con scarsa coesione intercellulare. **Conclusioni.** Attraverso lo studio morfologico di questo caso è stato possibile verificare la natura della neoplasia, l'istogenesi delle papille e delle pseudorosette, e fornire un contributo circa alcuni fattori causali della particolare aggressività di questo tipo di meningioma. Eur. J. Oncol., 9 (1), 63-68, 2004

Parole chiave: meningioma papillare, pseudorosette, giunzioni intercellulari, interdigitazioni

Summary

Aim. The Authors consider it useful to present a case of papillary meningioma in consideration of the relative rareness of this histotype and of some particularly noteworthy morphological features. This case was studied with the aid of histological, immunohistochemical and transmission electron microscope techniques. After the ultrastructural study to determine the papillary-meningiomatous nature of the case, three important aspects were highlighted: 1) the different cell morphology between the "compact" and the papillary areas; 2) the co-existence of papillae and pseudorosettes; 3) the possible morphological bases of the biological aggressiveness of this histotype. **Materials and methods.** Histological (haematoxylin-eosin, PAS, trichrome) immunohistochemical (vimentin, fibronectin, CD34, GFAP, Ki67, progesterone, EMA) and transmission electron microscope techniques were applied. **Results.** The diagnosis of papillary meningioma was confirmed both by vimentin positivity and by electron microscopy. Two morphologically different cell types were identified: one in the compact area, the other in the papillae. Intermediate morphological aspects between the pseudorosettes and the papillae were identified. The presence of dysmorphic and dysmetric epithelia with scanty intercell cohesion was documented. **Conclusions.** The morphological study of this case showed the nature of the neoplasia, the histogenesis of the papillae and the pseudorosettes, and shed light on some of the factors which bring about the particularly aggressive nature of this type of meningioma. Eur. J. Oncol., 9 (1), 63-68, 2004

Key words: papillary meningioma, pseudorosettes, intercellular junctions, interdigitations

Received/Pervenuto 20.10.2003 - Accepted/Accettato 19.12.2003

Address/Indirizzo: Prof. Luigi Cuccurullo, Dipartimento Assistenziale di Morfopatologia, II Università, Via L. Armanni 5, 80138 Napoli, Italia

E-mail: luigi.cuccurullo@unina2.it

Introduzione

Già nel 1975, Ludwin Rubinstein e Russell, in uno studio su 17 casi di meningioma papillare, avevano riconosciuto a questo istotipo la dignità di autonomia e un comportamento anatomo-clinico di aggressività¹.

Il dato morfologico fondamentale è rappresentato dalla presenza di papille vere, ovvero di strutture che sono formate da un asse vasculo-stromale rivestito da cellule meningoteliali pluristratificate. Queste papille variano per spessore, per altezza e spesso si presentano ramificate o gemmanti; quelle più voluminose, e verosimilmente le più antiche, protrudono in una cavità contenente materiale amorfo ed elementi cellulari desquamati. Alla periferia di questa componente, considerata qualificante, si reperta una quota di neoplasia di aspetto solido, la quale è formata da cordoni e travate di cellule meningoteliali tra loro quasi a mutuo contatto o variamente intersecanti; questa popolazione cellulare è sostenuta e sepimentata da un delicato e rado graticciato fibrillare collagene.

In letteratura sono stati descritti anche casi aventi strutture con i caratteri delle pseudo-rosette; queste hanno un profilo simil-papillare, sono di piccola taglia e sono formate da un capillare rivestito da uno-due strati di elementi meningoteliali. A tal proposito Pimentel *et al*², nel presentare un caso di meningioma con pseudorosette, hanno sostenuto una sua maggiore aggressività biologica.

In letteratura sono stati riportati casi di meningioma papillare aventi caratteri morfologici che si discostano da quelli abituali; così Kasantikul *et al*³ hanno descritto un caso di meningioma papillare fornito di strutture simil-ghiandolari.

Inoltre Hojo *et al*⁴ hanno descritto un caso di meningioma papillare fornito di una sub-popolazione di elementi rabdoidi. Ancora, Vaquero *et al*⁵ hanno segnalato un altro caso in cui il tumore presentava un'ampia cavità cistica centrale.

Nei meningiomi papillari la popolazione cellulare dominante è rappresentata da cellule poligonali di media taglia, le quali hanno una discreta quota di citoplasma, bordi cellulari sfumati, nucleo sferoidale e normocromatinico; commiste alle precedenti si evidenziano piccole quote di cellule dismetriche e dismorfiche, le quali hanno quote variabili di citoplasma e sono centrate da nuclei displastici o atipici. Le cellule che rivestono le papille sono invece di forma cubico-cilindrica, hanno citoplasma ampio, omogeneo e leggermente diafano. Il grado di coesione intercellulare è molto variabile: nelle zone in cui essa è alta si repertano al microscopio elettronico strutture giunzionali ed interdigitazioni, in quelle in cui la coesione è minima o assente le suddette sub-strutture sono scarsamente sviluppate o assenti.

Mediante la marcatura secondo le tecniche d'immunoistochimica, queste popolazioni cellulari evidenziano uniformemente una netta positività per la vimentina e una negatività per la GFAP, per le citocheratine e per la fibronectina. Secondo quanto è riportato in letteratura, i reperti istopatologici ed immunoistochimici dianzi riassunti non forniscono comunque una diagnosi di certezza; questa può essere raggiunta solo mediante l'esame al microscopio elettronico evidenziando strutture giunzionali, interdigitazioni intercellulari e fascetti di filamenti intermedi⁶⁻⁸.

Particolare attenzione, in letteratura, è stata dedicata allo studio delle interrelazioni tra la particolare aggressività biologica del meningioma papillare ed i suoi peculiari caratteri morfologici. E' stato ritenuto che l'aggressività biologica di questo istotipo fosse legata alla presenza di papille, e il grado di malignità fosse con-

seguito allo sviluppo di quest'ultima componente. Stefanko *et al*⁹ hanno ritenuto che i meningiomi papillari siano recidivanti e metastatizzanti per la scarsa coesione delle loro cellule e per il tropismo vasale delle stesse. Brignolio *et al*¹⁰, in uno studio su 8 casi di meningioma papillare, hanno potuto constatare l'esistenza di gradi diversi di aggressività biologica, senza alcuna correlazione tra profilo morfologico e comportamento clinico. Attualmente è prevalente l'ipotesi secondo la quale la particolare aggressività di questo istotipo neoplastico, in analogia alle altre neoplasie, è correlata ai caratteri di atipia, di vascolarizzazione, nonché agli indici di proliferazione¹¹.

Questi dati, brevemente riportati, hanno suggerito agli Autori di presentare un caso di meningioma papillare occorso alla loro attenzione; le motivazioni sono dettate non solo dalla relativa rarità del reperto ma anche da alcuni particolari caratteri qui di seguito riportati:

- 1) la coesistenza nella stessa neoplasia di un'architettura rappresentata da aree compatte, da strutture papillari e da una vasta area cistica centrale;
- 2) la co-presenza di papille vere e di pseudorosette;
- 3) il polimorfismo delle popolazioni cellulari con presenza di elementi atipici;
- 4) la particolare morfologia delle cellule di rivestimento delle papille.

Caso clinico

Il caso clinico è quello della paziente I.A., di anni 54. L'inizio della sua storia risale al 1986. La paziente giungeva all'osservazione del neurochirurgo lamentando cefalea gravativa da circa due mesi; per tale motivo fu eseguita una TC dell'encefalo che evidenziava la presenza di un processo espansivo intracranico extracerebrale in regione temporo-parietale di sinistra (meningioma). La paziente fu sottoposta ad intervento chirurgico di craniotomia temporo-parietale sinistra per asportazione completa della neoplasia. Dopo circa dodici anni dal suddetto intervento, la paziente ritornò all'osservazione del neurochirurgo per la comparsa di una sindrome vertiginosa di tipo soggettivo; sottoposta a un esame TC dell'encefalo fu evidenziata una formazione recidivata nella medesima regione. Pertanto, fu nuovamente sottoposta ad intervento chirurgico con la possibilità dell'asportazione in toto (Simpson 1) della lesione, che si rivelò essere un meningioma atipico. Dopo un intervallo libero di cinque anni, la paziente ricorse di nuovo alle cure del neurochirurgo per grave cefalea; questa sintomatologia, dopo TC, si rivelò legata ad una neoformazione meningea recidivata. Fu rioperata e l'esame istologico del campione consentì la diagnosi di meningioma papillare con pattern trabecolare-papillare con stroma collagenosico, con frazione di cellule in proliferazione (Ki67-MiB-1) pari al 15%.

Materiale e metodi

Il materiale in esame è stato processato con metodi di istologia, immunoistochimica e microscopia elettronica a trasmissione.

I frammenti utilizzati per la microscopia ottica e per l'immunoistochimica sono stati fissati in formalina al 10% tamponata pH 7,4; dopo adeguata disidratazione e diafanizzazione i campioni sono stati inclusi in paraffina.

Le sezioni allestite per la microscopia ottica sono state colorate con i seguenti metodi: ematossilina-eosina, e.-V.Gieson, PAS, tricromica per il connettivo.

Le sezioni allestite per i metodi di immunoistochimica sono state sottoposte alle seguenti marcature: vimentina, fibronectina, CD34, GFAP, Ki67, EMA, progesterone.

I frammenti utilizzati per la microscopia elettronica sono stati fissati in paraformaldeide al 4% diluita in tampone fosfato 0,2 M a pH 7,4; dopo post-fissazione in osmio all'1% e dopo adeguata disidratazione i campioni sono stati inclusi in Epon. In via preliminare, dai suddetti blocchetti sono state allestite sezioni semifini, colorate con blu di toluidina.

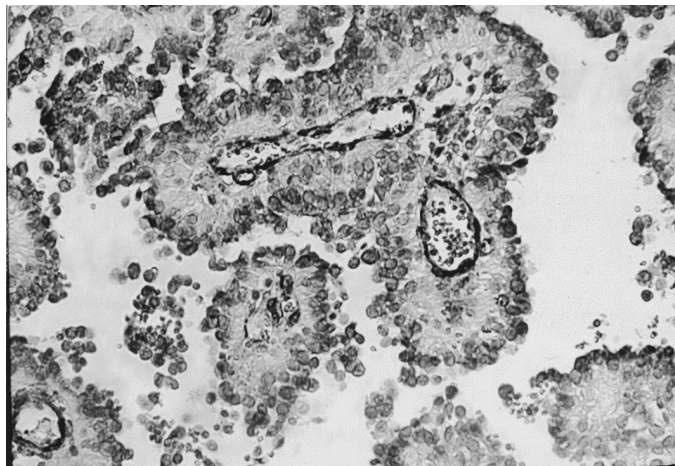


Fig. 1a. Meningioma papillare. Strutture papillari di taglia diversa, sezionate secondo l'asse trasversale. La papilla di maggiore dimensione si presenta ramificata. Il centro delle papille è occupato da un vaso beante. E.+ Fibronectina, 200x.

Dopo aver effettuato osservazioni orientative su questi preparati sono state approntate sezioni ultrasottili, le quali sono state contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo.

Reperto istopatologico

L'architettura d'insieme della neoplasia è costituita da due componenti, le quali sono strettamente commiste o si continuano l'una nell'altra senza barriere stromali.

La prima è presente soprattutto lungo la fascia periferica della neoplasia ed ha un aspetto compatto; la seconda occupa prevalentemente l'area centrale ed è costituita da papille che si aggettano in uno spazio cavo.

La quota compatta è formata da travate cellulari di spessore variabile, seppimentate da sottili e delicati tralci di fibrille collagene.

L'altra è data da papille monoassili di altezza diversa; ciascuna di queste è formata da un asse vasculo-stromale ricoperto da cellule neoplastiche disposte a strati sovrapposti; questi elementi frequentemente sono desquamati per una loro ridotta coesione intercellulare (fig. 1a, b, 2). Accanto alle suddette formazioni papillari si repertano piccole strutture riconoscibili come pseudorosette; infatti, esse sono costituite da un capillare ematico il quale è circondato a raggiera da uno o due strati di cellule colonnari che poggiano direttamente sulla membrana basale del vaso (fig. 3).

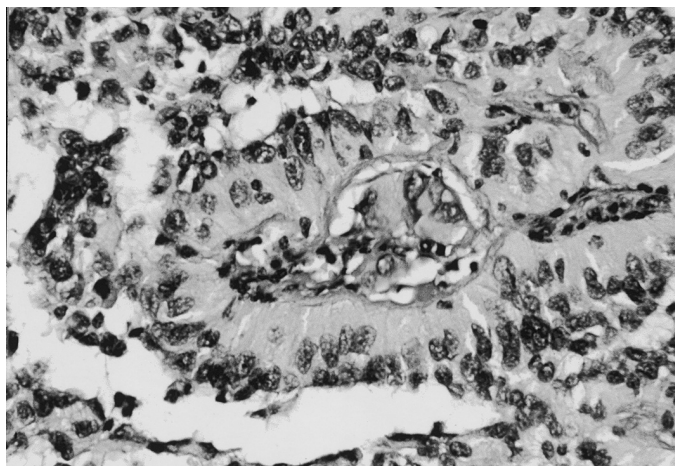


Fig. 2. Meningioma papillare. Nel contesto del core di una papilla si rileva la presenza di elementi flogistici mononucleati, in sede perivasale e negli interstizi stromali. E.-E., 400x.

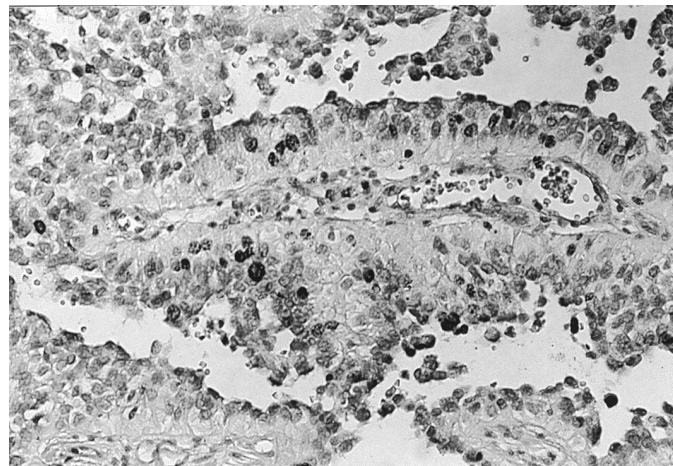


Fig. 1b. Meningioma papillare. Strutture papillari sezionate secondo l'asse longitudinale. Le cellule di rivestimento sono cubico-cilindriche e pluristratificate. E.-E., 200x.

Le suddette due componenti sono diverse anche per la morfologia delle loro popolazioni cellulari. La prima (quota compatta) è fornita da elementi di media taglia aventi un profilo irregolarmente poligonale; questi sono forniti di un discreto alone citoplasmatico, compatto ed eosinofilo, sono demarcati da una netta membrana cellulare, e sono centrati da un nucleo sferoidale, compatto e ipercromatinico. Queste cellule sono tra loro a mutuo contatto con limiti indistinti, acquisendo così aspetti pseudo-sinciziali (fig. 4). Mescolati ai suddetti elementi si repertano nidi o gruppi di elementi dimorfi, voluminosi e forniti di nucleo atipico e nucleolato.

Le papille e le pseudorosette sono rivestite da elementi di media-grossa taglia, aventi una forma sostanzialmente colonnare; queste cellule hanno ampio citoplasma cromofobo, chiaro, di aspetto a vetro smerigliato, delimitato da una netta membrana cellulare e centrato da un nucleo sferoidale, ipercromatinico. Questi elementi poggiano sullo stroma delle papille e sulla membrana basale dei capillari e sono tra loro a mutuo contatto, anche se con scarsa coesione. Lo stroma, ovunque molto esiguo, è rappresentato da un delicato graticciato fibrillare di sostegno con lieve rinforzo a livello dei vasi e a livello delle papille.

I vasi sono molto numerosi e distribuiti in modo disordinato; essi sono neoformati e sono rappresentati da arteriole pre-capillari, e soprattutto da capillari e venule post-capillari.

Spesso il core delle papille è occupato da formazioni vascolari caratteriz-

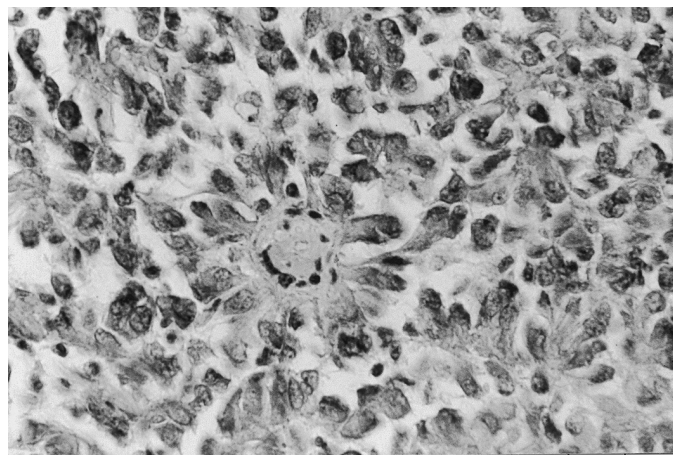


Fig. 3. Meningioma papillare. Formazione a pseudorosetta; un capillare è circondato da un monostrato di cellule cubico-cilindriche. E.-E., 400x.

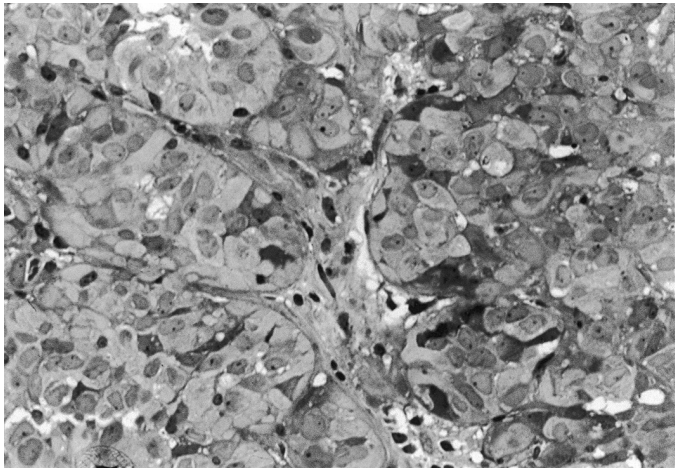


Fig. 4. Meningioma papillare. Le zone compatte della neoplasia sono costituite di cordoni cellulari seppimentati da sottili strie fibrillari. Semifine Blu di toluidina, 630x.

zate da un ampio vaso centrale circondato da capillari e venule gemmanti. Frequentemente i vasi di maggiore calibro hanno pareti ispessite sclero-iali e lume trombizzato; le venule post-capillari e i capillari sono spesso infiltrati da elementi flogistici linfomonocitari.

Infine, sono presenti zone di necrosi coagulativa; alcune di esse sono estese (macronecrosi), altre colpiscono poche unità cellulari (micronecrosi).

Immunoistochimica

Allo scopo di caratterizzare la natura della neoplasia in esame e di mettere in evidenza gli indici di attività proliferativa, sono state eseguite le marcature immunoistochimiche dei seguenti antigeni:

Vimentina

Si rileva una iperespressività di questo antigene in tutte le cellule neoplastiche. Le strutture vasculo-stromali non evidenziano alcuna positività (fig. 5).

Fibronectina

Evidente espressività di fibronectina a livello delle pareti dei vasi, dello stroma, degli interstizi stromali e delle cellule stromali. Questo antigene non è evidenziabile a livello delle cellule neoplastiche.

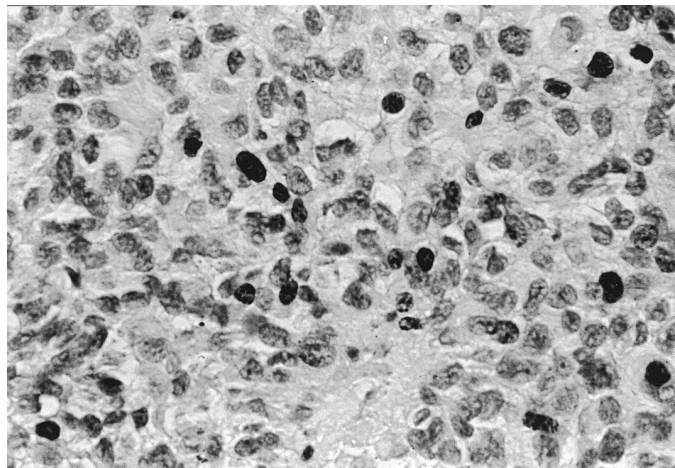


Fig. 5. Meningioma papillare. Marcatura immunoistochimica per la vimentina. Positività netta e diffusa a livello delle cellule con citoplasma compatto. Positività poco evidente a livello delle cellule vacuolizzate. Vimentina, 400x.

MIB-1

Sono apprezzabili positività focali dell'antigene MIB-1; tali positività sono ben nette e sono distribuite in egual modo sia a livello della quota compatta sia di quella papillare. Una maggiore espressività antigenica è apprezzabile a livello degli strati basali delle papille, dei cordoni cellulari e, in particolar modo, delle popolazioni peri-vascolari (fig. 6).

CD34

Questo antigene è espresso in modo netto e marcato a carico degli endoteli ematici presenti nella neoplasia. Tale espressività ha permesso di evidenziare lo stato di ipertrofia degli endoteli, la presenza di piccoli vasi collabiti, e l'esistenza di vasi con lume ampio, ectasico.

P53

Negativo.

EMA

Positività zonali per l'EMA sono state osservate a carico dei due citotipi evidenziati. Una maggiore espressività di questo antigene emerge a livello delle cellule delle papille.

Prog

Negativo.

Microscopia elettronica a trasmissione

Anche il profilo ultrastrutturale della neoplasia presenta due caratteri citologici diversificati a conferma di quanto è stato reperito al microscopio luce.

A livello delle zone compatte le cellule, disposte tra loro a mutuo contatto, sono fornite sia di apparati giunzionali sia di interdigitazioni, presenti con modalità variabili da campo a campo per numero e per distribuzione topografica.

Tali cellule hanno forma irregolarmente poligonale e sono ben demarcate da una netta membrana di contorno; la loro matrice citoplasmatica è compatta, ma ipodensa, accoglie un'esigua quota di organuli intracitoplasmatici, ed è attraversata da una cospicua componente di fibrille intermedie; queste prevalentemente occupano la fascia periferica delle cellule, si riuniscono in fascetti o si distribuiscono in modo isolato, spesso sfiocandosi e ramificandosi in modo apparentemente casuale (fig. 7 a, b).

Le cellule che rivestono le papille con forma cubico-cilindrica, con ampio citoplasma, sono tra loro a mutuo contatto senza il rinforzo di strutture giun-

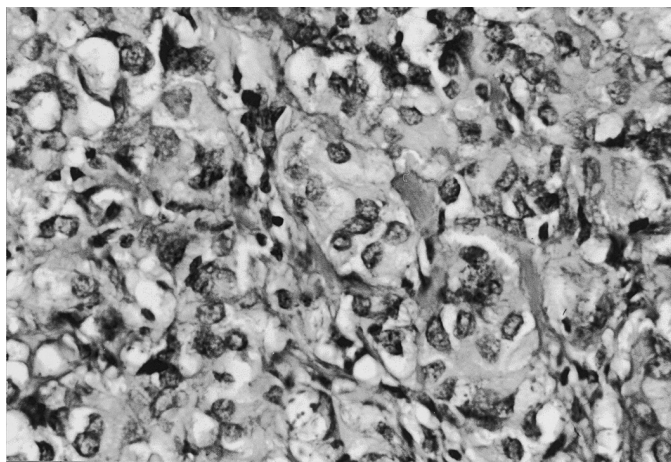
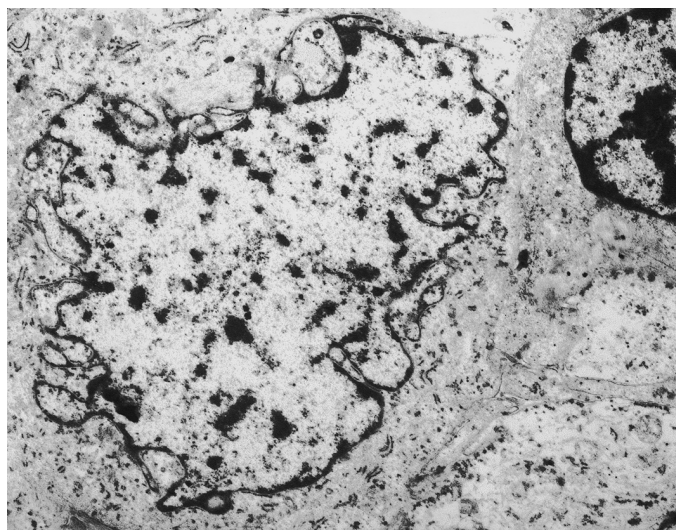
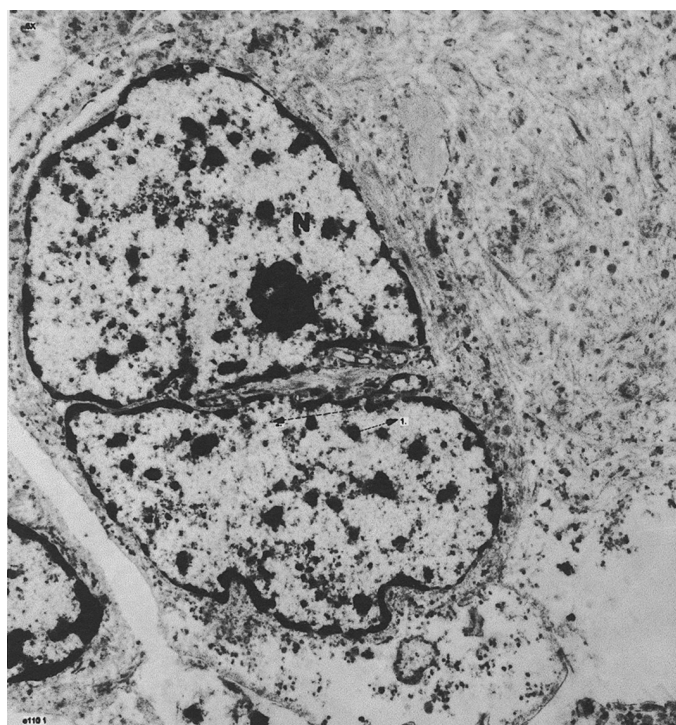


Fig. 6. Meningioma papillare. Marcatura istochimica per l'antigene Ki67. Molti nuclei evidenziano una densa e netta positività. Ki67, 400x.



a)



b)

Fig. 7. Meningioma papillare. Due cellule con citoplasma compatto e ricco di filamenti intermedi. A livello intercellulare si repertano rari desmosomi e piccole interdigitazioni. TEM, 10000x (fig. 7a), 4000x (fig. 7b).

zionali e interdigitazioni, la loro matrice citoplasmatica è chiara e contiene fasci di fibrille intermedie; si apprezza una sorta di polarità maturativa citoplasmatica in quanto queste strutture si accrescono di numero e si ispessiscono nel percorso eseguito dalle cellule dagli strati basali agli strati superficiali (fig. 8). Contestualmente a tali modificazioni si appalesa anche una progressiva riduzione del grado di coesione intercellulare con conseguenti fenomeni di desquamazione.

Le strutture a pseudorosetta sono caratterizzate al microscopio elettronico dall'esistenza di un mantello cellulare monostratificato o bistratificato che poggia direttamente sulla membrana basale del capillare; questa sub-popolazione cellulare ha caratteri ultrastrutturali simili a quelli descritti a livello delle papille.

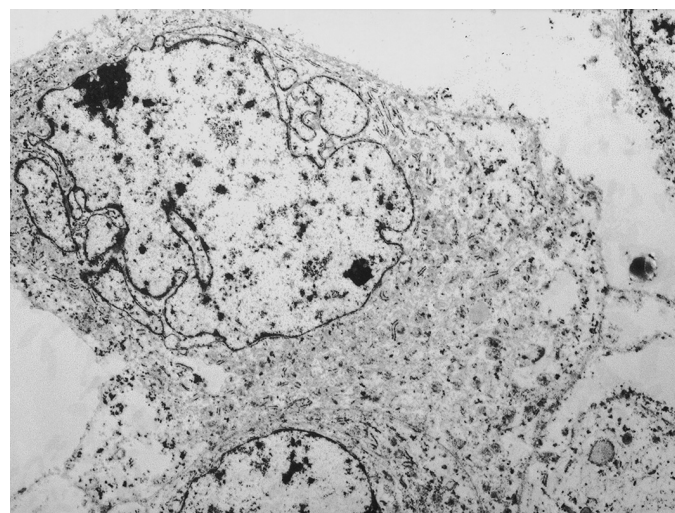


Fig. 8. Meningioma papillare. Cellula presente all'apice di una papilla. Il citoplasma è occupato in modo diffuso da filamenti intermedi. TEM, 4000x.

Conclusioni

Mediante questo caso (studiato analiticamente con tecniche di istologia, immunohistochemica e di microscopia elettronica) è stato possibile portare un contributo allo studio dei meningiomi papillari, sottolineandone alcuni peculiari aspetti morfo-biologici.

Un primo aspetto è dato dalla possibilità della coesistenza nello stesso tumore non solo di aspetti compatti e di aspetti papillari, ma anche dall'esistenza di una cavità cistica centrale. Un secondo aspetto è rappresentato dai rapporti topografici ed istogenetici tra le suddette due componenti; queste non solo si continuano l'una nell'altra per assenza di barriere, ma hanno un'istogenesi comune, poiché le papille derivano dai cordoni cellulari della porzione compatta.

Circa il comportamento biologico di aggressività di questo istotipo, è stato possibile in questo caso, localizzare i foci di attività proliferativa mediante la marcatura dell'antigene Ki67; è stato evidenziato che i suddetti focolai sono prevalentemente raccolti in sede peri-vascolare.

L'alto rischio di recidive o di metastasi a distanza di questo istotipo è una conseguenza non solo del grado di attività proliferativa, ma anche dei caratteri citologici dominanti (mitosi, atipie, etc)^{10,11}.

Circa le modalità attraverso le quali si concretizza tale aggressività biologica, è necessario innanzitutto tener conto, così come per gli altri meningiomi, dei livelli proliferativi e del grado di atipie delle cellule; contestualmente non deve essere respinta la teoria vasotropica⁹: è opportuno ricordare (così come in questo caso) che la coesione intercellulare a livello delle papille e delle strutture a rosetta è molto ridotta (mancano sia interdigitazioni, sia giunzioni intercellulari), le cellule sono desquamate e si ritrovano libere in cavità e a ridosso dei vasi, ed ancora, a livello delle strutture a pseudorosetta, gli strati cellulari di rivestimento sono separati dal lume del capillare solo dalla membrana basale e spesso tali elementi sono in attività proliferativa documentata dall'espressività dell'antigene Ki67.

E' corretto congetturare che questa situazione di scarsa coesione intercellulare, di attività proliferativa e di posizione peri-capillare favorisca la penetrazione delle cellule nel torrente circolatorio con possibilità di metastasi a distanza o di recidive in loco.

Bibliografia

1. Bruner JM, Tien RD, Enterline DS. Tumours of the meninges and related tissues. In Russel and Rubinstein's. Pathology of tumours of the nervous system, VI ed. Dorell D Bigner eds, 1998, 67-139.
2. Pimentel J, Albuquerque L, Tavora L. Meningioma with perivascular pseudorosettes: a morphological entity distinct from papillary meningioma? Clin Neuropathol 1988; 17(1): 41-4.
3. Kasantikul V, Punyavoravut V, Maneesry S, *et al.* Mucin-producing malignant meningioma with papillary and glandular patterns. J Med Assoc Thai 1995; 78(11) : 635-40.
4. Hojo H, Abe M. Rhabdoid papillary meningioma. Am J Surg Pathol 2001; 25 (7): 964-9.
5. Vaquero J, Zurita M, Coca S. Cystic papillary meningioma. Neuropathol Appl Neurobiol 2002; 28 (5): 418-21.
6. Fukushima T, Tsugu H, Tomonaga M, *et al.* Papillary meningioma with pulmonary metastasis. Case report. J Neurosurg 1989; 70 (3): 478-82.
7. Bouvier C, Zattara-Canoni H, Daniel L, *et al.* Cerebellar papillary meningioma in a 3-year-old boy: the usefulness of electron-microscopy for diagnosis. Am J Surg Pathol 1999; 23 (7): 844-8.
8. Al-Sarray S, King A, Martin AJ, *et al.* Ultrastructural examination is essential for diagnosis of papillary meningioma. Histopathology 2001; 38 (4): 318-24.
9. Stefanko SZ, Mackay WM. Papillary meningioma. Acta Neuropathol Suppl 1981; 7: 126-8.
10. Brignolio F, Favero M. Considerations on the malignancy of papillary meningioma. Clinico-pathological study of eight cases. Zentralbl Neurochir 1984; 45 (1): 79-84.
11. Pasquier B, Gasnier F, Pasquier D, *et al.* Papillary meningioma. Clinico-pathologic study of seven cases: review of the literature. Cancer 1986; 58 (2): 299-305.

Professor Olav Axelson (1937-2004)



Olav Axelson, Professor Emeritus of Occupational and Environmental Medicine and Fellow of the Collegium Ramazzini, died at 66 years of age in Kalmar on March 1st, 2004.

Professor Axelson was born in Ålingsås, Sweden, on May 1st, 1937, and received his university education in Gothenburg, where he completed his medical studies in 1964. He subsequently specialized in internal medicine (1970) and occupational medicine (1976). In the meantime he had started his scientific career at the Clinic of Occupational Medicine of the Örebro Hospital, where he was faced by the problem of lung cancer in metal miners, thus developing an innovative investigation on radon exposure in mines and lung cancer, which prompted his interest for epidemiological studies.

In 1977 he was appointed Professor of Occupational Medicine in Linköping, where he also served as senior physician at the Clinic of Occupational Medicine of the University Hospital. The stay in Linköping would last until 2002, when he retired. For over two decades, he devoted himself to research mainly focussed on cancer risk from exposure to radon in dwellings and to other ionising radiation, carcinogenic and neurotoxic effects of solvents, carcinogenic effects of pesticides. He designed and implemented

many epidemiological studies in these domains, which led him to develop interest and skill in epidemiological theory and methods, with special reference to the design of case-referent studies and in general issues in study validity, evaluation of bias and confounding and interpretation of non positive results.

His scientific production includes over 300 papers and a number of book chapters. He was very active in teaching and training and, *inter alia*, he followed 20 students some of whom from abroad for doctoral degrees.

Olav Axelson, furthermore, was a member of several national and international committees. Among the latter, he took part in several working groups of the International Agency for Research on Cancer (IARC) in Lyon, and in various committees appointed by the US National Research Council, Environmental Protection Agency (EPA) and National Cancer Institute (NCI).

He was a Fellow of the Collegium Ramazzini since 1985, and received the Ramazzini Award in 2003. His activity of lecturer and advisor led him to travel to many countries, including some developing countries, for which he felt a particular commitment. He was a reviewer for a number of international scientific journals and was repeatedly invited as an expert witness in the Courts in several countries.

In all these undertakings, Olav Axelson coupled an enormous scientific competence and expertise with a straightforward commitment to improvement of human health. His moral values, deeply rooted in the ethics of responsibility, led him to pursue an equitable sharing of environmental quality and a fair distribution of health within society and at planetary level. This meant for him, amongst other things, transparency of research conduction and evaluation, and prompt application of research findings in the interests of prevention, without unnecessary delays due to the interference of hidden or overt economic interests, against which he tirelessly fought.

Professor Axelson's scientific endeavour and moral lesson will enrich the new generations engaged in the promotion of health and the safeguarding of the environment.

Pietro Comba

Italian National Institute of Health
Rome, Italy

Francesco Forastiere

Department of Epidemiology
Health Authority, Rome, Italy

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 nè 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.