

# 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*

IORELLA 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. 2 - 2004

## COMMENTARY / COMMENTARIO

**Public health policy activity on the safe handling of hazardous anti-cancer drugs in the healthcare workplace / Attività di politica sanitaria pubblica nel trattamento sicuro di farmaci antitumorali pericolosi nei luoghi di lavoro sanitari**

M. McDiarmid

81

## CRITICAL REVIEWS / RIVISTE CRITICHE

### GENERAL TOPICS / ARGOMENTI GENERALI

**Impatto sanitario dell'esposizione ad amianto nel settore della costruzione e riparazione dei rotabili ferroviari / Health impact of asbestos exposure in the occupational sector of construction and repair of railway rolling stock**

P. Comba, R. Pasetto

87

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

### GENERAL TOPICS / ARGOMENTI GENERALI

**Life-time carcinogenicity bioassays of toluene given by stomach tube to Sprague-Dawley rats / Studi di cancerogenicità a lungo termine del toluene somministrato mediante sonda gastrica a ratti Sprague-Dawley**

M. Soffritti, F. Belpoggi, M. Padovani, M. Lauriola, D. Degli Esposti, F. Minardi

91

### ANATOMIC SITES / SEDI ANATOMICHE

Colon-rectum / *Colon-retto* (C18.9 - C20.9))

**Nuove prospettive nella prevenzione del carcinoma coloretale: lo screening delle lesioni precancerose mediante biopsia rettale e la chemioprevenzione con inibitori COX2 / New prospects in the prevention of colorectal cancer: the screening for precancerous lesions by rectal biopsy and chemoprevention with COX2 inhibitors**

S. Berretta, F. Catalano, M. Berretta, E. Barbagallo, R. Fisichella, S. Bonanno

103

Lung / *Polmone* (C34.9)

**Ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE) in the treatment of small cell lung cancer: a cooperative multicentre study / Ifosfamide, carboplatino ed etoposide (ICE) nel trattamento del microcitoma polmonare: studio cooperativo multicentrico**

V. Filipazzi, E. Piazza, M.T. Cattaneo, I. Luciano, B. Rho, G. Pavia, M.G. Corradini, G. Casalini, M. Maruzzi, A. Gambaro, N. Tosca, D. Legnani

107

Meninges / *Meningi* (C70.9)

**Anatomo-clinical contribution to the knowledge of the angiomatous meningiomas and the haemangiopericytomas of the arachnoid / *Contributo anatomo-clinico alla conoscenza dei meningiomi angiomatosi e degli emangiopericitomi dell'aracnoide***

L. Cuccurullo, F. Ferraraccio, M. Accardo, G. Iorio, F.A. Cioffi

111

Thyroid / *Tiroide* (C73.9)

**La chirurgia radioguidata nel carcinoma papillare della tiroide: identificazione del linfonodo sentinella / *Radio-guided surgery in papillary thyroid cancer: identification of sentinel lymph node***

R. Palmeri, C. Lorenzini, G. Melita, G. Currò, P. Melita

117

#### CLINICAL CASE REPORTS / *RESOCONTI DI CASI CLINICI*

Stomach and intestine / *Stomaco e intestino* (C16.9 - C17.9)

**Melanoma maligno gastrointestinale primitivo. Un caso clinico / *Primary gastrointestinal malignant melanoma. A case report***

G. Urciuoli, K. De Rocco, G. Fasano, A. Casaletto, M.T. Rossi, A. Morlino

121

Appendix / *Appendice* (C18.1)

**Il carcinoide dell'appendice: presentazione di un caso clinico in una giovanissima paziente / *Carcinoid of the appendix: case report in a very young patient***

M. De Falco, P. Sperlongano, D. Parmeggiani, D. Pisaniello, A. Miranda, G. Oliva, A. Lanna, M. Accardo, P.P. Podio, M.G. Lamendola

125

#### OBITUARY / *NECROLOGIO*

**Professor Luigi Giarelli**

L. Di Bonito

131

#### ANNOUNCEMENT / *ANNUNCIO*

**International Scientific Conference "Framing the future in the light of the past: living in a chemical word", Bologna, Italy, September 2005 / *Convegno Scientifico Internazionale "Inquadrare il futuro alla luce del passato: vivere in un mondo chimico", Bologna, Settembre 2005***

133

## Public health policy activity on the safe handling of hazardous anti-cancer drugs in the healthcare workplace

### *Attività di politica sanitaria pubblica nel trattamento sicuro di farmaci antitumorali pericolosi nei luoghi di lavoro sanitari*

Melissa A. McDiarmid

Occupational Health Program, School of Medicine, University of Maryland, Baltimore, MD, USA

#### Summary

The foundation of modern cancer chemotherapy, antineoplastic agents comprise several drug classes which achieve their therapeutic action largely through binding to cellular macromolecules, including DNA, and interrupting DNA or protein synthesis, resulting in cell death. Many of these drugs are well-characterized genotoxic and carcinogenic agents, comprising 12 of the 80-odd Group 1 IARC carcinogens. Toxic side effects of chronic treatment with these drugs have resulted in “therapy-related”, “second” malignancies in some patients. Theoretical risks to healthcare workers (HCWs) handling these drugs were first postulated based on their genotoxic characterization and toxic side effects observed in treated patients. More recently, evidence of reproductive toxicity in animals, treated patients and in epidemiologic studies of exposed HCWs has fueled concern regarding drug handling. In the last twenty years, the chain of evidence of worker exposure has been unambiguously completed with the documentation of pharmacy and clinic area drug contamination, recovery of drugs in the urine of HCWs handling them, and a large group of studies reporting excesses in various measures of mutagenicity in exposed HCWs. While safe handling guidance has been issued by many governments world wide, very recent environmental monitoring studies of cancer pharmacies and clinics have shown widespread drug contamination. These observations have renewed interest in the safe handling question in healthcare work settings and have raised critical public health policy considerations which are being re-visited now in scientific and government regulatory forums world-

#### Riassunto

Fondamento della moderna chemioterapia oncologica, gli agenti antineoplastici comprendono numerose classi di farmaci che esplicano la loro azione terapeutica attraverso il legame a macromolecole cellulari, compreso il DNA, e l'interruzione della sintesi del DNA o delle proteine, determinando così la morte della cellula. Molti di questi farmaci sono agenti cancerogeni e genotossici ben caratterizzati, tra cui 12 dei circa 80 cancerogeni inseriti dallo IARC nel Gruppo 1. Gli effetti collaterali tossici del trattamento cronico con questi farmaci hanno portato in alcuni pazienti a “secondi” tumori “correlati alla terapia”. I rischi teorici per gli operatori sanitari (OS) che manipolano questi farmaci sono stati inizialmente postulati in base alle loro caratteristiche genotossiche e agli effetti collaterali tossici osservati nei pazienti trattati. Più recentemente, prove di tossicità riproduttiva in animali, in pazienti trattati e in studi epidemiologici riguardanti OS esposti, hanno riaccessato la preoccupazione riguardo alla manipolazione dei farmaci. Negli ultimi 20 anni, la serie di prove dell'esposizione di lavoratori è stata completata inequivocabilmente con la documentazione di contaminazione da farmaci in area clinica e in farmacia, con il rinvenimento di farmaci nelle urine degli OS che li manipolano e con un gran numero di studi che riportano eccessi in varie misure di mutagenicità in OS esposti. Mentre da molti governi nel mondo sono state definite linee-guida per la manipolazione, studi molto recenti di monitoraggio ambientale in farmacie e cliniche oncologiche hanno mostrato una contaminazione diffusa. Queste osservazioni hanno rinnovato l'interesse nel problema della manipolazione sicura negli ambienti di lavoro sanitari e hanno sollevato nella politica sanitaria considerazioni critiche che si stanno ora rivalutando a livello mondiale in forum scientifici e legislativi. Questo articolo raccoglie la serie di prove che suggeriscono la necessità di intervenire a favore della sanità pubblica occupazionale e descrive l'applicazione

Received/Pervenuto 19.4.2004 - Accepted/Accettato 30.4.2004

Address/Indirizzo: Dr. Melissa A. McDiarmid, Occupational Health Program, School of Medicine, University of Maryland, 405, W. Redwood Street, Second Floor, Baltimore, MD 210201, USA

E-mail: mmcdiarm@medicine.maryland.edu

wide. This paper reviews the chain of evidence suggesting the need for occupational public health intervention and describes the application of the hierarchy of control technologies as an effective approach to minimize exposure. *Eur. J. Oncol.*, 9 (2), 81-86, 2004

**Key words:** chemotherapy, genotoxic effects, carcinogenic effects

della gerarchia delle tecnologie di controllo come un approccio efficace per minimizzare l'esposizione. *Eur. J. Oncol.*, 9 (2), 81-86, 2004

**Parole chiave:** chemioterapia, effetti genotossici, effetti cancerogeni

**Introduction: hazardous drugs**

Originating in the chemical warfare research of World War I, the modern era of cancer chemotherapy developed from observations of serious systemic effects in humans exposed to sulphur mustard gas. These effects included the development of leukopenia and aplastic bone marrow observed at autopsy. The first clinical use of these agents began in the late 1940s and now, more than fifty years later, the number of agents in common use exceeds forty. These drugs are the foundation of anti-cancer therapy and are increasingly finding therapeutic value in the treatment of non-cancer, chronic illnesses such as rheumatoid arthritis.

While these drugs are members of several chemically unrelated classes of agents, most exert their action by binding to cellular macromolecules including DNA, or through disruption of DNA and protein synthesis (fig. 1). The potential fates, which may befall a cell exposed to an antineoplastic drug, include transformation to malignant potential, mutation, cell death, or through repair,

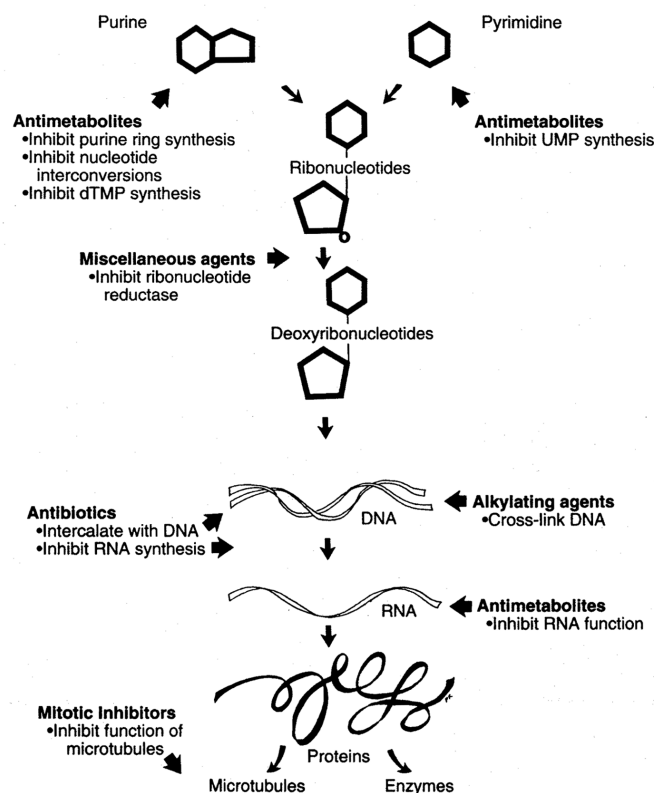
a normal cell may result<sup>2</sup>. Metabolic activation to an electrophilic intermediate allows binding to various cellular targets and results in both the drug's therapeutic and unwanted toxic side effects.

Table 1 summarizes the developmental toxicity and genotoxicity of the commonly used classes of antineoplastic drugs. These agents are 12 of 80-odd IARC Group 1 carcinogens; 9 of Group 2A and 10 of Group 2B<sup>4,7</sup>. Many antineoplastic drugs are also well-documented reproductive and developmental toxicants in animals and humans (primarily the alkylating agents and antimetabolites). These effects are also summarized in Table 1.

**Table 1** - Developmental toxicity and genotoxicity of some common anti-cancer agents<sup>a</sup>

Drug class	Developmental toxicity <sup>b</sup>		Genotoxicity <sup>b</sup>		
	Animal		Human	PM	CE
	T	E			
<b>Alkylating agents</b>					
BCNU	+	+		+	+
Busulfan	+		+	+	+
Chlorambucil	+	+	+	+	+
Cyclophosphamide	+	+	+	+	+
Ifosfamide	+	+	+	+	+
Nitrogen mustard	+	+	+	+	+
Thiotepa	+			+	+
Cis-diaminedichloroplatinum		+		+	+
<b>Antibiotics</b>					
Actinomycin	+	+		+	+
Adriamycin				+	+
Bleomycin				±	+
Daunomycin			+	+	+
<b>Antimetabolites</b>					
Cytosine arabinoside			+		
5-Fluorouracil	+	+	+		+
6-Mercaptopurine	+	+	+	+	+
Methotrexate	+	+	+	+	+
<b>Mitotic function</b>					
Vincristine	+	+	+	-	+
Vinblastine	+	+	+	-	+
Taxol	+	+	+		+
<b>Miscellaneous</b>					
DTIC (dacarbazine)	+	+		+	
Procarbazine	+	+	+	±	+
<b>Topoisomerase II function</b>					
Etoposide	+	+	+	+	

<sup>a</sup> Data summarized from Sorsa, Hemminky, Vainio<sup>3</sup> and McDiarmid<sup>1</sup>  
 T = teratogenic; E = embryotoxic; PM = point mutation; CE = chromosomal effects



**Fig. 1.** Site of action of some antineoplastic drugs. From McDiarmid<sup>1</sup>

## Health effects in treated patients

A lack of selectivity in toxic action allows damage to the growth and reproduction of a treated patient's normal cells as well as to their cancerous cells, manifesting acutely as nausea, vomiting, gastrointestinal and constitutional effects, and chronically as insult to the nervous and reproductive systems, as well as bone marrow effects including therapy-related (second) malignancies<sup>2,8</sup>. Currently these therapies are estimated to cause 10-20% of the approximately 10,000 new acute leukaemia cases per year<sup>9</sup>. These secondary leukaemias occur in cancer patients and non-cancer, chronic disease patients receiving anti-cancer drugs.

Side effects reported in therapeutically treated patients define the domain of potential unwanted health effects these drugs may cause at the high end of a theoretical human dose-response curve. At the outset of this discussion, it is important to recall that "the toxicity of cancer chemotherapy is the single most important factor limiting the use of drugs that might more often be curative if higher doses could be used"<sup>10</sup>. The level of toxicity of these drugs is higher than any other group of pharmacologic agents and is acceptable for a cancer patient because of the severity of a cancer illness and the benefit which may be derived through treatment.

It was concern for exposed HCWs' potential to develop cancer similar to the therapy-related malignancies, such as leukaemia observed in treated patients, that drove early efforts to limit occupational exposure. More recently, laboratory and epidemiologic evidence for biologically plausible adverse reproductive outcomes resulting from occupational exposure of HCWs to these agents have also been cited as reason to limit occupational exposure (Table 2).

In its 1988 monograph on the Hazards of Healthcare Workers, the National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) estimated that approximately 1 million HCWs had potential exposure to anti-cancer drugs<sup>24</sup>. A more inclusive estimate of potential workers exposed may be made by examining the "Life Cycle" of hazardous antineoplastic drugs and tallying potentially affected workers (Table 3).

This exercise identifies approximately 6 million workers. Though not all handle antineoplastics, a significant proportion does. The most exposed groups are probably pharmacy and nurs-

ing personnel who reconstitute drug and administer intravenous infusions to patients. However, the elimination of these drugs in a metabolically active form in a treated patient's urine enlarges the number of direct caregivers potentially at-risk at the para-professional (nursing assistant) level of HCWs as well.

In estimating HCW populations potentially exposed globally, the World Health Organization (WHO) in their April 2003 World Cancer Report<sup>25</sup> estimate an increase of 50% in new cases of cancer to 15 million occurring by 2020. This implies an increase in HCWs handling hazardous drugs to treat this ballooning cancer population and also suggests a likely increase in exposure intensity (work load) for these workers.

## Evidence of HCW exposure

Theoretical risks to HCWs handling these drugs were postulated based on the toxic side effects observed in treated patients beginning in the mid-1970s as described above<sup>2,8</sup>. A landmark study in 1979 documented an exposure effect in HCWs and thus initiated a flurry of investigation to further characterize HCW risk. In that study, Falck *et al*<sup>26</sup>, using the salmonella reversion (Ames) test, demonstrated that the urine of nurses handling anti-cancer drugs was mutagenic compared to office worker controls. This mutagenic measure was shown to increase over the workweek and to decrease over the weekend hiatus from work exposure. Since that first report, many, though not all, subsequent studies of HCWs have documented similar findings using a variety of mutagenic test systems<sup>14,27</sup> including reports of a dose-response in mutagen-induced sister chromatid exchange (SCE) measures in exposed pharmacy workers as a function of lifetime duration of drug handling<sup>1,28</sup>.

Importantly, the recovery of drug (cyclophosphamide) from the urine of exposed nurses was first reported by a Canadian investigator in 1984<sup>29</sup>, dispelling any remaining doubt that drug absorption was indeed occurring in HCWs. In the ensuing 15 years, several other groups have documented recovery of drug (cyclophosphamide, ifosfamide, fluorouracil, methotrexate and cisplatin) in the urine (or blood) of exposed HCWs<sup>30</sup>. By far, the drug most often sampled for has been the alkylating agent, cyclophosphamide (CTX). While a number of laboratory methods for CTX

**Table 2** - Summary of studies of adverse reproductive outcomes in workers exposed to antineoplastic drugs

Year	Author	Population	Outcome <sup>a</sup>		
			Birth defect	Fetal loss	Other findings
1985	Hemminki <i>et al</i> <sup>11</sup>	ONC nurses	*	-	
1985	Selevan <i>et al</i> <sup>12</sup>	ONC nurses		*	
1986	Taskinen <i>et al</i> <sup>13</sup>	Pharm Mfgr		+	
1987	Rogers <i>et al</i> <sup>14</sup>	ONC nurses		*	
1988(a)	McDonald <i>et al</i> <sup>15</sup>	RN + MDs	*		
1988(b)	McDonald <i>et al</i> <sup>16</sup>	RN + MDs		-	
1990	Stucker <i>et al</i> <sup>17</sup>	ONC nurses		*	
1992	Skov <i>et al</i> <sup>18</sup>	ONC nurses	+	-	+ Ectopic preg.
1993	Stucker <i>et al</i> <sup>19</sup>	ONC nurses			+LBW, -SGA
1995	Shortridge <i>et al</i> <sup>20</sup>	ONC nurses			* Menstrual dysfunction
1997	Valanis <i>et al</i> <sup>21</sup>	Pharm + RNs			* infertility (F); +(M)
1999	Valanis <i>et al</i> <sup>22</sup>	RN, pharm (M+F)		*(F); +(M)	
1999	Peelen <i>et al</i> <sup>23</sup>	ONC nurses/prep staff	-/*	-	+/*LBW

<sup>a</sup> + = effect seen, - = no effect seen; \* = statistically significant effect seen; F = female; M = male; LBW = low birth wt; SGA = small for gestational age



**Table 3** - Exposure opportunities in “Life Cycle” of hazardous drugs

Exposure pathway in life of the drug	Population affected	Numbers <sup>a</sup>	SIC <sup>b</sup> /OES <sup>c</sup>
Drug development/manufacturing	Manufacturing personnel	212,000	2830
	R & D personnel	199,500	8731
Transport/distribution	Transporters	184,597	4210
	Drug distributors	197,702	5722
Healthcare facility pharmacy	Pharmacists	174,540	32517
	Pharmacy techs	145,430	32519
Drug administration	Hospital-based registered nurses	2,000,000	32502
	Outpatient clinic-based	1,600,000	8011
Home care	Home care	925,000	8082
Waste stream issues	Hospital/clinic/home		
- Patient waste	Nursing aides/orderlies/attendants	1,255,210	66008
- Chemical contaminated equipment, tubing, packaging, etc.	- Spill responders - Family		

<sup>a</sup> = Numbers given are totals employed in given SIC or OES. Those potentially exposed to hazardous drugs are a subset

<sup>b</sup>OES = Occupational Employment Statistic, from 1997 National Occupational Employment and Wage Estimates, Bureau of Labor Statistics, Washington DC (5 digit codes)

<sup>c</sup>SIC = Standard Industry Codes, from County Business Patterns 1997 (Mid March employee numbers) Issued September 1999, US Department of Commerce, US Census Bureau, Washington DC, CD-CBP-97 (4 digit codes)

recovery in biologic fluids have been used, detection with tandem mass spectrometry is preferred due to its specificity and sensitivity (0.1 ng/ml of urine)<sup>31,32</sup>.

A summary of these studies, primarily conducted in Europe, reveals that hazardous anti-cancer drugs are commonly detected in HCWs' urine and even more distressing, CTX and other anti-neoplastic drug have been recovered from pharmacy workers not directly handling the drugs themselves<sup>33,34</sup>. Detection can be minimized by using safe handling precautions and reconstituting drug in a biologic safety cabinet<sup>35</sup>. This implies fugitive aerosol or (more likely) work surface contamination with drug allowing transfer of contamination to other workers.

## Policy implications

The chain of evidence described above that documents the severity of the hazard, widespread exposure opportunity and several million HCWs at risk has prompted action from both HCW professional organizations and public health agencies.

In response to this evidence, the US Occupational Safety and Health Administration (OSHA) issued (1986)<sup>36</sup> and then updated<sup>37,38</sup> Safe Handling Guidance for Hazardous Drugs. The agency adopted the term “hazardous” drug which was first used by the American Society of Hospital (now Health Care System) Pharmacists (ASHP) in their 1990 monograph on Safe Handling. ASHP described four characteristics of a drug that would suggest it should be handled by HCWs with caution. These criteria are found in Table 4 and refer to a drug's carcinogenicity, genotoxicity, reproductive effects or acute toxicity at “low” doses<sup>39</sup>. Thus, the designation of a drug to be handled as potentially hazardous was criteria based, determined by its characteristics, rather than its class. This allowed non-cancer therapy drugs to be considered for special handling, such as anti-viral agents and some biologics, based on their toxicity profiles.

**Table 4** - ASHP hazardous drug criteria

1. Genotoxicity (i.e., mutagenicity and clastogenicity in short-term test systems).
2. Carcinogenicity in animal models, in the patient population, or both as reported by IARC.
3. Teratogenicity or fertility impairment in animal studies or in treated patients.
4. Evidence of serious organ or other toxicity at low doses in animal models or treated patients.

More recently, evidence has documented that widespread drug contamination is occurring in oncology pharmacy and clinical areas, even when the safe handling guidance was being observed<sup>35,40,41</sup>. As a result, the NIOSH has sponsored a multi-disciplinary work group to review the existing guidance and, in light of new data accrued, make updated recommendations on hazardous drug safe-handling which is based on the industrial hygiene “hierarchy of control technologies”. These address use of engineering controls providing containment of fugitive drug aerosol by working within a biologic safety cabinet (BSC) or other containment; good work practices to minimize spills, breakage of vials and generation of aerosols; and use of personal protective apparel and equipment such as gloves, gowns and eye protection. These elements are then to apply, as appropriate, to each venue of hazardous drug use in healthcare, from bulk drug receiving to pharmacy preparation, patient administration and waste handling.

Updates in safe handling practice in North America coincide with a resurgence of interest and concern about preventable HCW exposure in Europe and the Pacific. Guidelines for Safe Handling are being promulgated by individual nations<sup>42,43</sup> and professional groups in the European Union. The core elements of most existing guidelines reflect the hierarchy of control technologies: engineering controls, administrative and work practice controls and personal protective apparel and equipment. Both academic inves-

tigation and public health deliberation are on going to address the current gaps in understanding of and compliance with safe handling practice.

At the International Society of Oncology Pharmacy Practice (ISOPP) meeting in Turin, Italy in April 2004, an interdisciplinary session was held to review the state of the science and policy regarding these drugs. Because apparent environmental contamination and HCW exposure is occurring despite the existence of safe handling guidelines worldwide, it appears that it is the public health assurance function which is the weak link and requires address in this case. This core function described by the Institute of Medicine, 1988 Monograph on the Future of Public Health<sup>44</sup> provides for society necessary services or conditions to reach agreed upon goals. In this case, the agreed upon goal would be the Safe Handling Guidelines which exist but are not widely adhered to. The assurance function may require regulation and the exercise of authority, but may also be achieved through influencing the recognized standard of professional practice or voluntary performance improvement, such as with the ISO 9000 program. It is clear that with regard to the unchecked exposure of HCWs to hazardous drugs, it is the assurance function that is lacking.

ISOPP colleagues in Turin deliberated alternative methods of assuring safe handling practices suggested by speakers from participating countries. In Germany, occupational public health authorities are considering promoting wipe sampling of work surfaces in pharmacies to determine contamination levels. This is based on evidence of widespread pharmacy contamination in a survey of 50 hospitals there<sup>45</sup>. Italian colleagues reported on urinary biomonitoring results of exposed HCWs<sup>46</sup>. Worker biomonitoring has been considered an assurance method to document safe handling compliance in some EU countries. Both approaches would provide feedback on adherence to safe handling guidelines and provide some assurance that exposure opportunities were being minimized (or not). Similar information sharing was conducted in a working group of pharmacy and academic colleagues who are the proponents of safe handling in their own countries and are together seeking policy solutions to protect HCWs from these therapeutically useful, but profoundly toxic drugs.

## Conclusion

Despite the almost 20 year history of safe handling guidance for hazardous anti-cancer drugs, recent evidence is consistently documenting on-going and widespread environmental contamination of healthcare work areas with fugitive drug aerosol. Severity of the hazard is well documented by the carcinogenicity and reproductive toxicity of many of these agents. The large number of healthcare workers potentially exposed and the growth in that work sector further suggest the need for a public health response. The likelihood of a successful intervention with applications of the hierarchy of control technologies is documented in the literature and provided the scientific evidence base for present safe handling guidelines.

The international dialogue at present concerns not if an intervention is needed, but how best to assure that the interventions (adherence to guidelines) are applied and protective. The focus of this controversy is comparing the benefit of environmental sampling to that of biologic monitoring. It is likely that a combination of assurance approaches will be necessary.

## References

1. McDiarmid MA. Occupational exposure to pharmaceuticals: antineoplastics, anesthetic agents, sex steroid hormones. In Paul M, Ed. Occupational and environmental reproductive hazards. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1993, 280-95.
2. Harris CC. Immunosuppressive anticancer drugs in man: their oncogenic potential. *Radiology* 1975; 114 (1): 163-6.
3. Sorsa M, Hemminki K, Vaino H. Occupational exposure to anticancer drugs: potential and real hazards. *Mutat Res* 1985; 154: 135-149.
4. International Agency for Research on Cancer. Monographs of the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 26. Some antineoplastic and immunosuppressant agents. Lyon: IARC, 1981.
5. International Agency for Research on Cancer. Monographs of the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs 1 to 42. Lyon: IARC, 1987.
6. International Agency for Research on Cancer. Monographs of the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 50. Some pharmaceutical drugs. Lyon: IARC 1990.
7. International Agency for Research on Cancer. Monographs of the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 76. Some antiviral and antineoplastic drugs, and other pharmaceutical agents. Lyon: IARC, 2001.
8. Davis HL Jr, Prout MN, McKenna PJ, *et al.* Acute leukaemia complicating metastatic breast cancer. *Cancer* 1973; 31 (3): 543-6.
9. Karp JE, Sarkodee-Adoo CB. Therapy-related acute leukaemia. *Clin Lab Med* 2000; 20 (1): 71-81, ix.
10. Schilsky RL, Yarbrow JW. Toxicity of chemotherapy. In Perry MC, Yarbrow JW, Ed. Pharmacology of antineoplastic drugs. Grune & Stratton, Inc (Harcourt Brace Jovanovich, Publishers), 1984, 21-2.
11. Hemminki K, Kyrönen P, Lindbohm ML. Spontaneous abortions and malformations in the offspring of nurses exposed to anaesthetic gases, cytostatic drugs, and other potential hazards in hospitals, based on registered information of outcome. *J Epidemiol Community Health* 1985; 39 (2): 141-7.
12. Selevan SG, Lindbohm ML, Hornung RW, *et al.* A study of occupational exposure to antineoplastic drugs and fetal loss in nurses. *N Engl J Med* 1985; 313 (19): 1173-8.
13. Taskinen H, Lindbohm ML, Hemminki K. Spontaneous abortions among women working in the pharmaceutical industry. *Br J Ind Med* 1986; 43 (3): 199-205.
14. Rogers B. Health hazards to personnel handling antineoplastic agents. *Occup Med* 1987; 2 (3): 513-24.
15. McDonald AD, McDonald JC, Armstrong B, *et al.* Congenital defects and work in pregnancy. *Br J Ind Med* 1988; 45 (9): 581-8.
16. McDonald AD, McDonald JC, Armstrong B, *et al.* Fetal death and work in pregnancy. *Br J Ind Med* 1988; 45 (3): 148-57.
17. Stucker I, Caillard JF, Collin R, *et al.* Risk of spontaneous abortion among nurses handling antineoplastic drugs. *Scand J Work Environ Health* 1990; 16 (2): 102-7.
18. Skov T, Maarup B, Olsen J, *et al.* Leukaemia and reproductive outcome among nurses handling antineoplastic drugs. *Br J Ind Med* 1992; 49 (12): 855-61.
19. Stucker I, Mandereau L, Hemon D. Relationship between birthweight and occupational exposure to cytostatic drugs during or before pregnancy. *Scand J Work Environ Health* 1993; 19 (3): 148-53.
20. Shortridge LA, Lemasters GK, Valanis B, *et al.* Menstrual cycles in nurses handling antineoplastic drugs. *Cancer Nurs* 1995; 18 (6): 439-44.
21. Valanis B, Vollmer W, Labuhn K, *et al.* Occupational exposure to antineoplastic agents and self-reported infertility among nurses and pharmacists. *J Occup Environ Med* 1997; 39 (6): 574-80.
22. Valanis B, Vollmer WM, Steele P. Occupational exposure to antineoplastic agents: self-reported miscarriages and stillbirths among nurses and pharmacists. *J Occup Environ Med* 1999; 41 (8): 632-8.
23. Peelen S, Roeleveld N, Heederik D, *et al.* Toxic effects on reproduction in hospital personnel. Reproductieve-toxische effecten bij ziekenhuispersoneel. Amsterdam: Elsevier, 1999.
24. Department of Health and Human Services (DHHS), NIOSH. Guidelines for protecting the health and safety of health care workers. 1988. Washington, DC: US Government Printing Office.
25. World Health Organization (WHO). World Cancer Report. 2003.



26. Falck K, Grohn P, Sorsa M, *et al.* Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. *Lancet* 1979; 1(8128): 1250-1.
27. Baker ES, Connor TH. Monitoring occupational exposure to cancer chemotherapy drugs. *Am J Health Syst Pharm* 1996; 53 (22): 2713-23.
28. McDiarmid MA, Kolodner K, Humphrey FE, *et al.* Baseline and mutagen-induced sister chromatid exchanges in lymphocytes of pharmacists handling anticancer drugs. *Environ Epi Tox* 2000; 2 (1): 254-60.
29. Hirst M, Tse S, Mills DG, *et al.* Occupational exposure to cyclophosphamide. *Lancet* 1984; 1 (8370): 186-8.
30. Sessink PJ, Bos RP. Drugs hazardous to healthcare workers. Evaluation of methods for monitoring occupational exposure to cytostatic drugs. *Drug Saf* 1999; 20 (4): 347-59.
31. Sessink PJ, Scholtes MM, Anzion RB, *et al.* Determination of cyclophosphamide in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1993; 616 (2): 333-7.
32. Sessink PJ, Vaes WH, van den Broek PH, *et al.* Influence of Aroclor 1254, phenobarbital, beta-naphthoflavone, and ethanol pretreatment on the biotransformation of cyclophosphamide in male and female rats. *Toxicology* 1996; 112 (2): 141-50.
33. Sessink PJ, Anzion RB, van den Broek PH, *et al.* Detection of contamination with antineoplastic agents in a hospital pharmacy department. *Pharm Weekbl Sci* 1992; 14 (1): 16-22.
34. Sessink PJ, Van de Kerkhof MC, Anzion RB, *et al.* Environmental contamination and assessment of exposure to antineoplastic agents by determination of cyclophosphamide in urine of exposed pharmacy technicians: is skin absorption an important exposure route? *Arch Environ Health* 1994; 49 (3): 165-9.
35. Sessink PJ, Wittenhorst BC, Anzion RB, *et al.* Exposure of pharmacy technicians to antineoplastic agents: reevaluation after additional protective measures. *Arch Environ Health* 1997; 52 (3): 240-4.
36. Occupational Safety & Health Administration (OSHA). Guidelines for antineoplastic (cytotoxic) drugs, OSHA Publication #8-1.1. 1986. Washington, DC.
37. Occupational Safety & Health Administration (OSHA). Controlling occupational exposure to hazardous drugs. 1995. Washington, DC.
38. Occupational Safety & Health Administration (OSHA). OSHA technical manual, TED 1-0.15A, Sect VI, Chapt II: Categorization of drugs as hazardous. 1999.
39. American Society of Hospital Pharmacists. ASHP technical assistance bulletin on handling cytotoxic and hazardous drugs. *Am J Hosp Pharm* 1990; 47: 1033-49.
40. Connor TH, Anderson RW, Sessink PJ, *et al.* Surface contamination with antineoplastic agents in six cancer treatment centers in Canada and the United States. *Am J Health Syst Pharm* 1999; 56 (14): 1427-32.
41. Schreiber C, Radon K, Pethran A, *et al.* Uptake of antineoplastic agents in pharmacy personnel. Part II: study of work-related risk factors. *Int Arch Occup Environ Health* 2003; 76 (1): 11-6.
42. HSE Information Sheet MISC 615. Safe handling of cytotoxic drugs. Health and Safety Executive. 2003.
43. OSHS - NZ OHSNZ. Guidelines for safe handling of cytotoxic drugs and related waste. 1997. Wellington, New Zealand, Occupational Safety & Health Service, Department of Labor.
44. Institute of Medicine. *The Future of Public Health*. Washington, DC: National Academy Press, 1988.
45. Schmaus G, Schierl R, Funck S. Monitoring surface contamination by antineoplastic drugs using gas chromatography-mass spectrometry and voltammetry. *Am J Health Syst Pharm* 2002; 59: 956-61.
46. Turci R, Sottani, C, Ronchi A, *et al.* Biological monitoring of hospital personnel occupationally exposed to antineoplastic agents. *Toxicol Lett* 2002; 134 (1-3): 57-64.

## Impatto sanitario dell'esposizione ad amianto nel settore della costruzione e riparazione dei rotabili ferroviari

### *Health impact of asbestos exposure in the occupational sector of construction and repair of railway rolling stock*

Pietro Comba, Roberto Pasetto

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

#### Riassunto

Lo scopo del lavoro è quello di descrivere i risultati degli studi epidemiologici nel settore delle carrozze ferroviarie in relazione all'esposizione ad amianto e definire le indicazioni di sanità pubblica conseguenti. I primi casi di mesotelioma nel settore, descritti nella letteratura internazionale, risalgono al 1960. Da allora numerosi studi hanno evidenziato un eccesso di rischio per le patologie amianto-correlate in lavoratori del settore, in particolare nel personale addetto alla costruzione e riparazione dei rotabili ferroviari. Tuttavia, casi di mesotelioma sono stati osservati anche in lavoratori come il personale viaggiante (esposizioni "in place") e in familiari di lavoratori (esposizioni "domestiche"). Infine, sono stati descritti alcuni casi di mesotelioma in soggetti residenti in prossimità di officine di rotabili ferroviari (esposizioni "ambientali"). Il problema è presente in diversi paesi. In Italia vi è una specificità legata all'ampia diffusione della specie di amianto "crocidolite" nel materiale usato per la costruzione dei rotabili ferroviari. Le indicazioni di sanità pubblica conseguenti alle evidenze acquisite si possono riassumere nei seguenti punti: 1) individuare gli esposti ad amianto nel settore e indirizzarli verso programmi di sorveglianza sanitaria; 2) favorire la collaborazione tra le ASL competenti per territorio e le organizzazioni dei lavoratori e/o loro familiari per l'identificazione di situazioni a rischio, la definizione del corretto percorso sanitario e l'attività di counselling; 3) assicurare a livello nazionale e regionale il necessario coordinamento per le iniziative locali e la condivisione di protocolli validati. Eur. J. Oncol., 9 (2), 87-90, 2004

**Parole chiave:** amianto, ferrovie, impatto sanitario, crocidolite

#### Summary

The purpose of the present paper is to describe the results of epidemiological studies of workers exposed to asbestos in the construction and repair of railroad carriages and to provide some public health recommendations. The first cases of mesothelioma described in the international literature in this sector date back to 1960. Since then several studies have found increased risks of asbestos-related disease among railroad carriage construction and repair workers. Furthermore, mesothelioma cases have been described among travelling personnel ("in place" exposure), in relatives of exposed workers ("domestic" exposure) and in subjects resident in the neighbourhood of construction and repair factories ("environmental" exposure). The problem is documented in several countries. The Italian situation has some peculiarities, due to the extensive use of crocidolite for the insulation of railway carriages. Public health recommendations deriving from this evidence may be summarized as follows: 1) workers who were exposed to asbestos in this sector should be traced and referred to qualified programmes of health surveillance; 2) local health authorities should cooperate with workers' organizations in order to detect previously unrecognised situations at risk, and to define correct procedures for follow-up and counselling; and 3) health authorities at the national and regional level should ensure validation and sharing of protocols and coordination of local initiatives. Eur. J. Oncol., 9 (2), 87-90, 2004

**Key words:** asbestos, railways, health impact, crocidolite

Received/Pervenuto 18.3.2004 - Accepted/Accettato 12.4.2004

Address/Indirizzo: Dr. Pietro Comba, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma, Italia - E-mail: comba@iss.it

## Introduzione

Obiettivo del presente lavoro è quello di esaminare le evidenze scientifiche relative al rischio di malattie da amianto, con particolare riferimento al mesotelioma maligno, fra i lavoratori addetti alla costruzione e riparazione delle carrozze ferroviarie e fornire indicazioni utili alla pianificazione di nuove indagini scientifiche ed alla programmazione di interventi di sanità pubblica.

Viene ricostruita l'evoluzione storica dell'acquisizione delle informazioni, e sono riportati i principali risultati, sia degli studi di coorte effettuati in Italia che delle principali casistiche internazionali sui mesoteliomi.

## Evidenze disponibili

La prima segnalazione di casi di mesotelioma fra gli addetti alla costruzione e riparazione dei rotabili ferroviari risale alla pubblicazione di Wagner *et al* nel 1960<sup>1</sup>, che è stata la prima indicazione a livello internazionale relativa all'associazione tra l'esposizione ad amianto e il mesotelioma maligno. Gli autori di quell'articolo scrivevano nella discussione relativa alla casistica: "I quattro casi industriali sono importanti. Due dei pazienti erano manutentori coibentatori delle caldaie di locomotive...". Mancuso<sup>2,3</sup> studiò una coorte di meccanici delle ferrovie che avevano lavorato tra il 1920 e il 1929, e mostrò che il 61% delle cause di

**Tabella 1** - Casi di mesotelioma da esposizione all'amianto usato nelle ferrovie in Italia

Tipo di esposizione	1986 <sup>a</sup>	1990 <sup>b</sup>	1997 <sup>c</sup>	2002 <sup>d</sup>	Totale 1986-2002
Professionale	7	+71	+74	+30	182
Ambientale sul posto di lavoro	-	3	-	-	3
Ambientale generale	-	-	2	+2	4
Familiare	-	2	+4	+4	10
<b>Totale</b>	<b>7</b>	<b>+76</b>	<b>+80</b>	<b>+36</b>	<b>199</b>

<sup>a</sup> Da Maltoni *et al*<sup>7</sup>

<sup>b</sup> Da Maltoni e Pinto<sup>8</sup>

<sup>c</sup> Da Maltoni e Pinto<sup>9</sup>

<sup>d</sup> Da Maltoni *et al*<sup>6</sup>

morte era dovuto a cancro polmonare e mesotelioma. Il rischio di tumori da amianto per i lavoratori del comparto ferroviario fu confermato da ulteriori studi svolti in Svezia<sup>4</sup> e negli USA<sup>5</sup>.

In Italia, Maltoni *et al*<sup>6</sup> hanno sinora descritto 199 casi di mesotelioma da amianto nel comparto ferroviario. Nella Tabella 1 si evidenziano i risultati della raccolta dei casi di mesotelioma di soggetti che avevano lavorato nel settore delle carrozze ferroviarie afferenti in questa casistica a partire dal 1986<sup>6,9</sup>.

Gli studi di coorte svolti in Italia e pubblicati nella letteratura scientifica sono riassunti nella Tabella 2. Tra questi studi, quello

**Tabella 2** - Principali risultati degli studi di coorte italiani relativi al settore della costruzione e riparazione dei rotabili ferroviari

Sito (autori)	N. soggetti (periodo follow-up)	Asbestosi		Tumore del polmone		Tumore maligno della pleura		Tumore del peritoneo	
		Oss.	Att.	Oss.	Att.	Oss.	Att.	Oss.	Att.
Foligno (Magnani <i>et al</i> <sup>10</sup> )	1037 (1967-1983)			11	12,70	1	N.S. <sup>a</sup>		
Verona (Magnani <i>et al</i> <sup>11</sup> )	2628 (1967-1980)			27	32,00	1	1,00		
Colleferro (Blasetti <i>et al</i> <sup>12</sup> )	276 (1968-1988)			8	6,20	2 <sup>b</sup>	0,20		
Pozzuoli (Menegozzo <i>et al</i> <sup>13</sup> )	1534 (1970-1989)	1	-	28 <sup>b</sup>	19,20	3 <sup>b</sup>	0,63	2 <sup>b</sup>	0,27
Arezzo (Battista <i>et al</i> <sup>14</sup> )	734 (1945-1997)			26	20,90	5 <sup>b</sup>	0,38		
Bologna (Gerosa <i>et al</i> <sup>15</sup> )	173 (1979-1997)			3	6,46	6 <sup>b</sup>	0,09		
Pistoia (Seniori Costantini <i>et al</i> <sup>16</sup> )	3739 (1960-2000)			139 <sup>b</sup>	114,60	10 <sup>b</sup>	2,24		
Padova (Simonato <i>et al</i> <sup>c</sup> )	1621 (1965-2001)			90 <sup>b</sup>	71,60	23 <sup>b</sup>	1,07		
Cittadella (Simonato <i>et al</i> <sup>c</sup> )	1190 (1970-2002)			33	28,00	3 <sup>b</sup>	0,46		

<sup>a</sup> Non significativo

<sup>b</sup> Limite inferiore dell'intervallo di confidenza del SMR > 100

<sup>c</sup> Comunicazione personale

con la popolazione di lavoratori più numerosa è stato pubblicato da Seniori-Costantini *et al*<sup>17</sup> ed è relativo all'industria Breda di Pistoia. Lo studio iniziale è stato successivamente oggetto di un'estensione del follow-up al 31 dicembre 2000, coprendo un arco temporale di 40 anni<sup>16</sup>. I risultati evidenziano un Rapporto Standardizzato di Mortalità (SMR) per il tumore della pleura di 445,6 basato su 10 casi osservati, con intervallo di confidenza al 95% (IC 95%) 213,7-819,5 ed un SMR di 121,3, IC 95% 101,9-143,2, per i tumori con sede primaria trachea, bronchi e polmone.

Una caratteristica comune alla diverse realtà produttive oggetto degli studi riportati in Tabella 2 è che i lavoratori delle coorti in esame non erano direttamente addetti alla coibentazione delle carrozze, ma operavano negli stessi ambienti in cui ditte specializzate, operanti in regime di appalto, effettuavano la coibentazione. Lo studio epidemiologico dei lavoratori addetti alla coibentazione è reso complesso dall'elevata mobilità di questi lavoratori e dal frequente susseguirsi di episodi di assunzione e licenziamento.

Un recente studio di coorte relativo alla società Davidson, che ha svolto in tutta Italia attività di coibentazione nell'industria, nell'edilizia, nel trasporto navale e nel settore ferroviario, ha mostrato significativi incrementi di mortalità per i tumori polmonari, pleurici e peritoneali<sup>18</sup>.

Il complesso delle evidenze degli studi di coorte indica, nei settori della costruzione e della riparazione dei rotabili ferroviari, un eccesso di rischio di mesotelioma maligno. Tale eccesso aumenta in relazione al crescere del periodo di follow-up. Inoltre, nelle coorti di grandi dimensioni e con lunghi periodi di follow-up, si evidenzia anche un eccesso di mortalità per carcinoma polmonare.

Nella Tabella 3 sono invece riassunte le evidenze prodotte nelle casistiche nazionali sui mesoteliomi pubblicate negli ultimi anni e relative ai diversi settori occupazionali legati ai rotabili ferroviari<sup>19-23</sup>. La classificazione dei settori lavorativi differisce tra i va-

ri archivi. Tuttavia, i dati per le occupazioni aventi a che fare con le carrozze ferroviarie, convergono nell'evidenziare il rischio di contrarre il mesotelioma.

### Valutazione delle evidenze

Fra gli addetti alla costruzione e alla riparazione di rotabili ferroviari vi è un significativo incremento del rischio di mesotelioma e di carcinoma polmonare.

Casi di mesotelioma pleurico sono stati inoltre segnalati fra i familiari dei lavoratori esposti (esposizione "domestica"), nel personale viaggiante (esposizione "in place"), e fra i residenti in prossimità di officine per la costruzione e riparazione delle carrozze (esposizione "ambientale").

Il problema è presente in diversi paesi, ma vi è una specificità italiana legata all'ampia diffusione della crocidolite nel materiale usato per la costruzione dei rotabili nel nostro Paese.

### Indicazioni per ulteriori studi

Attraverso il Registro Nazionale Mesoteliomi e la rete dei Centri Operativi Regionali, appare opportuno studiare l'andamento della curva epidemica del mesotelioma fra gli addetti alla costruzione e riparazione di rotabili, i loro familiari, nel personale viaggiante e fra coloro che risiedono in prossimità degli stabilimenti. E' inoltre opportuno censire le coorti di addetti alla produzione e riparazione di carrozze, effettuare studi di mortalità sulle coorti ancora non studiate ed aggiornare le coorti studiate negli anni '80 e '90.

Ove possibile, va determinato il contenuto di fibre di campioni del parenchima polmonare dei soggetti affetti da mesotelioma.

**Tabella 3** - Frequenza dei casi di mesotelioma nel settore delle ferrovie presenti nei registri mesoteliomi e in altri sistemi di archiviazione a livello nazionale, pubblicati negli anni 2001-2003

Paese	Sistema di raccolta	Anni	Frequenza relativa dell'esposizione o dei casi	Misure di associazione	Referenza
Germania	Registro nazionale mesoteliomi	1987-1999	1,7% (27/1605) <sup>a</sup>	-	19
Australia	Registro nazionale mesoteliomi	1986-2000	5,0% (101+49/3008) <sup>b</sup>	-	20
Italia	Registro nazionale mesoteliomi	1997	13,8% (11+1/115) <sup>c</sup>	-	21
Gran Bretagna	Health and Safety Executive (HSE)	1980-2000 (escluso il 1981)	1,4% (34+83+10+6+3+44/12821) <sup>d</sup>	PMR <sup>e</sup> 57,6; 525,6; 49,5; 41,5; 19,9; 111,7	22
Olanda	Archivio tenuto da due studi legali	1990-2000	2,7% (10+9/702) <sup>f</sup>	-	23

<sup>a</sup>Casi con esposizione nel settore costruzione carrozze ferroviarie

<sup>b</sup>Casi con esposizione nel settore ferrovie; 101 con esposizione singola, 49 con esposizione multipla

<sup>c</sup>Casi con esposizione nel settore economico « rotabili ferroviari »: 11 con esposizione singola, 1 con esposizione multipla

<sup>d</sup>Casi nei settori occupazionali attinenti i rotabili ferroviari (solo uomini): 34 lavoratori di stazioni ferroviarie, 83 addetti alla costruzione di veicoli, 10 lavoratori addetti ai binari, 6 controllori, 3 addetti alla segnaletica, 44 macchinisti

<sup>e</sup>PMR=100 tutte le occupazioni

<sup>f</sup>Casi appartenenti ai settori industriali: 10 costruttori e riparatori di rotabili ferroviari, 9 personale viaggiante nel settore delle ferrovie

## Indicazioni di sanità pubblica

Si rende necessario individuare tutti gli esposti all'amianto nelle attività di costruzione e riparazione delle carrozze, al fine di indirizzarli verso programmi di sorveglianza sanitaria in linea con le raccomandazioni nazionali e internazionali (es. progetto Breda di Pistoia<sup>24</sup>).

Va inoltre favorita la collaborazione fra le ASL competenti per territorio e le organizzazioni dei lavoratori e dei loro familiari per l'identificazione delle situazioni a rischio, la definizione del corretto percorso sanitario e l'attività di counselling.

Va infine assicurato a livello nazionale e regionale il necessario coordinamento fra le iniziative locali e la condivisione di protocolli validati.

## Conclusioni

Come in altri settori professionali, dove è stato utilizzato amianto come materia prima, anche nel settore della costruzione e riparazione dei rotabili ferroviari si è evidenziato nel tempo un aumento di rischio per le patologie amianto-correlate. Tale aumento risulta ben definito per quanto riguarda il mesotelioma. Inoltre, negli studi su popolazioni lavorative numerose e con lunghi periodi di follow-up, è stato evidenziato anche un eccesso di rischio per le neoplasie polmonari.

Casi di mesotelioma sono stati evidenziati anche in familiari di lavoratori e tra il personale viaggiante. Tali dati indicano la presenza di sorgenti di esposizioni significative anche in situazioni che non hanno comportato lavorazione diretta dell'amianto. Infine, alcuni casi sono stati associati ad esposizione propriamente ambientale, conseguente alla residenza in prossimità di impianti, dove l'amianto veniva direttamente utilizzato per la costruzione e riparazione dei rotabili ferroviari.

Il rischio direttamente o indirettamente associabile a tali lavorazioni è spiegato anche dal consistente utilizzo della crocidolite nella coibentazione delle carrozze ferroviarie. Tale fibra di amianto risulta, infatti, quella più reattiva nell'indurre il mesotelioma maligno sia negli studi sperimentali che in quelli epidemiologici<sup>25,26</sup>. Inoltre, nella casistica italiana dei mesoteliomi relativa all'anno 1997, il settore professionale relativo alla produzione e riparazione dei rotabili ferroviari è risultato il quarto per numero di nuovi casi<sup>21</sup>.

L'insieme di queste evidenze indica la necessità di mantenere alta l'attenzione verso questo settore produttivo, attraverso la sorveglianza epidemiologica, per evidenziare le situazioni a maggior rischio sul territorio. La sorveglianza epidemiologica dovrebbe essere integrata da programmi di sorveglianza sanitaria per il sostegno degli ex-lavoratori a rischio e dei loro familiari.

## Bibliografia

1. Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med* 1960; 17: 260-71.
2. Mancuso TF. Mesothelioma among machinists in railroad and other industries. *Am J Ind Med* 1983; 4: 501-13.
3. Mancuso TF. Mesothelioma among railroad workers in the United States. *Ann NY Acad Sci* 1991; 643: 333-46.

4. Ohlson CG, Klaesson B, Hogstedt C. Mortality of among asbestos-exposed workers in a railroad workshop. *Scand J Work Environ Health* 1984; 10: 283-91.
5. Schenker MB, Garshick E, Munoz A, *et al.* A population-based case-control study of mesothelioma deaths among US railroad workers. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 461-5.
6. Maltoni C, Lambertini L, Cevolani D, *et al.* I mesoteliomi da amianto usati nelle ferrovie italiane: resoconto di 199 casi. *Eur J Oncol* 2002; 7: 51-5.
7. Maltoni C, Lodi P, Masina A, *et al.* Mesoteliomi negli operai di Officine di Grandi Riparazioni (OGR) delle ferrovie dello stato italiano, esposti ad asbesto. Primo resoconto. *Acta Oncol* 1987; 7: 159-86.
8. Maltoni C, Pinto C. Mesotelioma da amianto usato nelle ferrovie, in Italia. *Acta Oncol* 1990; 11: 189-201.
9. Maltoni C, Pinto C. Mesotheliomas in some selected italian population groups. *Med Lav* 1997; 88: 321-32.
10. Magnani C, Nardini I, Governa M, *et al.* Uno studio di coorte degli addetti ad una officina di grandi riparazioni (OGR) delle ferrovie dello stato. *Med Lav* 1986; 77: 154-61.
11. Magnani C, Ricci P, Terracini B. A mortality historical cohort study in the Verona repair workshop of Italian railways. *Acta Oncol* 1989; 10: 201-7.
12. Blasetti F, Bruno C, Comba P, *et al.* Studio di mortalità relativo agli addetti alla costruzione di carrozze ferroviarie a Colleferro. *Med Lav* 1990; 81: 407-13.
13. Menegozzo M, Belli S, Bruno C, *et al.* La mortalità per cause correlabili all'amianto in una coorte di addetti alla costruzione di carrozze ferroviarie. *Med Lav* 1993; 84: 193-200.
14. Battista G, Belli S, Comba P, *et al.* Mortality due to asbestos-related causes among railway carriage construction and repair workers. *Occup Med* 1999; 49: 536-9.
15. Gerosa A, Ietri E, Belli S, *et al.* Alto rischio di morte per mesotelioma pleurico in un'Officina Grandi Riparazioni delle Ferrovie dello Stato. *Epidemiol Prev* 2000; 24: 117-9.
16. Seniori Costantini A, Ercolanelli M, Silvestri S, *et al.* Studio di coorte sugli addetti ad una Azienda di costruzione e riparazione di rotabili ferroviari (Breda): aggiornamento del follow-up del precedente studio al 31/12/2000. In Regione Toscana Giunta regionale. L'intervento sanitario per gli ex-esposti ad amianto della ditta Breda, Pistoia 2002, 10-20.
17. Seniori Costantini A, Innocenti A, Ciapini C, *et al.* Studio della mortalità degli addetti di un'azienda di produzione di rotabili ferroviari. *Med Lav* 2000; 91: 32-45.
18. Menegozzo M, Belli S, Borriero S, *et al.* Studio di mortalità di una coorte di coibentatori. *Epidemiol e Prev* 2002; 26: 71-5.
19. Neumann V, Gunther S, Muller KM, *et al.* Malignant mesothelioma - German mesothelioma register 1987-1999. *Int Arch Occup Environ Health* 2001; 74: 383-95.
20. Leigh J, Daidson P, Hendrie L, *et al.* Malignant mesothelioma in Australia, 1945-2000. *Am J Ind Med* 2002; 41: 188-201.
21. Nesti M, Marinaccio A, Chellini E, *et al.* La sorveglianza dei casi di mesotelioma maligno e la definizione delle esposizioni ad amianto: i dati ReNaM 1997. *Epidemiol Prev* 2003; 27: 147-53.
22. Health & Safety Executive. Mesothelioma occupation statistics: male and female deaths aged 16-74 in Great Britain, 1980-2000 (excluding 1981). Available on <http://www.hse.gov.uk/statistics/causdis/occ8000.pdf>
23. Burdorf A, Dahhan M, Swuste P. Occupational characteristics of cases with asbestos-related diseases in the Netherlands. *Ann Occup Hyg* 2003; 47: 485-92.
24. Ciapini C, Innocenti A. Le motivazioni dell'intervento sanitario per gli ex lavoratori della ditta BREDA. In Regione Toscana Giunta regionale. L'intervento sanitario per gli ex-esposti ad amianto della ditta Breda, Pistoia 2002, 7-9.
25. Minardi F, Maltoni C. Results of recent experimental research on the carcinogenicity of natural and modified asbestos. *Ann NY Acad Sci* 1988; 534: 754-61.
26. Hodgson JT, Darnton A. The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. *Ann Occup Hyg* 2000; 44: 565-601.



## Life-time carcinogenicity bioassays of toluene given by stomach tube to Sprague-Dawley rats

### *Studi di cancerogenicità a lungo termine del toluene somministrato mediante sonda gastrica a ratti Sprague-Dawley*

Morando Soffritti, Fiorella Belpoggi, Michela Padovani, Michelina Lauriola, Davide Degli Esposti, Franco Minardi  
Cancer Research Centre, European Ramazzini Foundation of Oncology and Environmental Sciences, Bologna, Italy

#### Summary

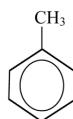
Toluene was administered by stomach tube, in olive oil solution, to male and female Sprague-Dawley rats, 7 weeks old at the start of the experiment, at a concentration of 0, 500, 800 mg/kg b.w., 4 days weekly, for 104 weeks; the animals were kept under observation until natural death or 130 weeks (Experiment BT 903 and BT 910). Overall, in our experimental conditions, toluene has been shown to cause an increase in: 1) total malignant tumours; 2) malignant tumours of the subcutaneous tissue; 3) malignant mammary tumours; 4) carcinomas of the oral cavity, lips and tongue; and 5) haemolymphoreticular neoplasias. On the basis of these data, toluene should be considered a potential carcinogenic agent for exposed populations. Eur. J. Oncol., 9 (2), 91-102, 2004

**Key words:** toluene, carcinogenicity, life-time bioassay, rat

#### Introduction

Toluene (methyl-benzene), produced during petroleum refining operations, is a clear, colourless, volatile and flammable liquid with a sweet, pungent, benzene-like odour.

Toluene (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>) has a molecular weight of 92.15 and its structural formula is:



Received/Pervenuto 20.2.2004 - Accepted/Accettato 21.3.2004  
Address/Indirizzo: Dr. Morando Soffritti, Cancer Research Centre, European Ramazzini Foundation of Oncology and Environmental Sciences, Bentivoglio Castle, 40010 Bentivoglio (BO), Italia

#### Riassunto

Il toluene è stato somministrato per sonda gastrica, in una soluzione di olio d'oliva, a ratti Sprague-Dawley, maschi e femmine, di 7 settimane di età all'inizio dell'esperimento, alle concentrazioni di 0, 500, 800 mg/kg p.c., 4 giorni alla settimana per 104 settimane; gli animali sono stati tenuti sotto osservazione fino a morte spontanea o 130 settimane (Esperimento BT 903 e BT 910). Complessivamente nelle nostre condizioni sperimentali, è stato dimostrato che il toluene provoca un aumento di: 1) tumori maligni totali; 2) tumori maligni del tessuto sottocutaneo; 3) tumori mammari maligni; 4) carcinomi del cavo orale, labbra e lingua; e 5) neoplasie emolinforeticolari. Sulla base di questi dati, il toluene dovrebbe essere considerato un potenziale agente cancerogeno per le popolazioni esposte. Eur. J. Oncol., 9 (2), 91-102, 2004

**Parole chiave:** toluene, cancerogenicità, studio a lungo termine, ratto

Toluene was discovered in 1835 by Pelletier and Walter as a degradation product obtained from heating the natural resin, balsam of Tolu, named from a small town in Colombia, South America. Until the Second World War, toluene was obtained primarily as a by-product of coke production. The need for large quantities of toluene in the production of trinitrotoluene (a constituent of many explosives) during the First World War, fostered its production from petroleum for the first time; the production was further increased during the Second World War<sup>1</sup>.

In 1996 worldwide production of toluene was nearly 18 million tonnes, of which nearly 7 million tonnes were produced in the USA<sup>2</sup>. Production capacity for toluene in Italy in 1994 was reported to be more than 495,000 tonnes<sup>3</sup>.

However, additional quantities of toluene are used with benzene and xylene to enhance the octane number of gasoline. It has been reported that in the 1980s more than 30 million tonnes of

toluene were consumed annually as a constituent of motor fuels<sup>4</sup>. Due to the declining use of methyl-tertiary-butyl ether (MTBE) as a fuel oxygenated additive, because of its known groundwater contamination and rodent carcinogenicity<sup>5-8</sup>, the production of toluene, blended with benzene and xylene to enhance gasoline octane numbers, will very likely increase. Data on other uses and the occurrence of toluene are given in Tables 1 and 2, respectively.

When human volunteers were exposed by inhalation to low levels of toluene, approximately 50% of the inhaled toluene was absorbed<sup>18</sup>. When toluene is administered orally, it is virtually completely absorbed from the gastrointestinal tract<sup>19</sup>.

Toluene is metabolized to benzyl alcohol, which in turn is oxidised to benzaldehyde and subsequently to benzoic acid. Most benzoic acid is converted to hippuric acid, which is excreted in urine at a concentration of several grammes per litre<sup>20</sup>. Hippuric acid in urine is often used as a biomarker of exposure<sup>20</sup>.

In cytogenetic studies, performed in occupationally exposed populations, increases in chromosomal aberrations, micronuclei and DNA strand breaks, have been described<sup>21</sup>. These effects have also been observed in rats and mice in some studies, and in cultured mammalian cells<sup>21</sup>.

In an inhalation study, Fisher-344 rats (F344) were exposed to 0, 30, 100 or 300 ppm of toluene for 24 months. After that, the animals still alive were killed and necropsied. The results of this experiment did not show any evidence that toluene causes carcinogenic effects in F344 rats at the concentrations used<sup>22</sup>. As these industry exposures were quite low, NTP continued with their higher exposure studies<sup>23</sup>.

Long-term inhalation carcinogenicity bioassays on toluene were performed by the National Toxicology Program on rats and mice. Groups of 60 male and 60 female Fisher-344/N rats were exposed at 0, 600 or 1200 ppm of toluene, 6.5 hours/day, 5 days/week. Groups of 60 male and 60 female B6C3F1 mice were exposed at 0, 120, 600 or 1200 ppm with the same schedule. In both experiments the exposure to toluene lasted 103 weeks. After that, animals still alive were killed and necropsied. No significant increase in the incidence of neoplasms was observed in either experiment<sup>23, 24</sup>.

Epidemiological studies conducted on industrial groups exposed to toluene have been reported. Consistent findings have been reported regarding the increased risk of cancers of the gastrointestinal tract, namely oesophagus, colon and rectum<sup>25, 26</sup>. Increased mortality for cancer of the bone and connective tissue has been reported among rotogravure printing plant workers<sup>27</sup>. A sig-

**Table 1** - Toluene: uses<sup>a</sup>

- Most toluene, mixed with benzene and xylene, is used in gasoline blending.
- The largest single use of isolated toluene is in the production of benzene.
- The second largest use of toluene is in solvent applications, especially in the paint and coating industry and also in inks, adhesives and the leather industry.
- Isolated toluene is also used in several consumer products, such as sanitizing agents, household aerosols, paints and varnishes, paint thinner and antirust preservatives.
- It is also used as salt for food preservatives and cosmetic articles such as soaps, perfume flavors, creams and lotions.
- Other important chemical products made from toluene include: trinitro-toluene and related explosives, benzaldehyde and saccharin.

<sup>a</sup> From IARC<sup>9</sup>

**Table 2** - Toluene: occurrence

*Natural sources*  
Toluene occurs in nature in crude oil<sup>10</sup>, natural gas deposits and volatile emissions from volcanoes and forest fires<sup>11</sup>.

*Workplaces*  
Occupational exposures to toluene may occur in printing plants, trapezoid belt manufacturing, waste incinerators, plastic processing factories, rubber tyre vulcanisation, leather finishing, laboratories of histopathology and cytopathology, lithography, factories producing photographic albums and tarpaulins, fibrous glasswood plants, rubber coating plants; laminated kitchen counter, bathroom top and rubber sheet manufacturing, as well as among parquet floorers and shoemakers<sup>9</sup>.

- Air*
- Worldwide atmospheric emissions of toluene have been estimated to be 6.2 million tonnes; and the major contributions include: loss from refineries (40%), automobile exhaust (32%), solvents (16%), petroleum losses at sea (8%)<sup>12</sup>. According to the Environmental Protection Agency, in 2000, it was estimated that 38,000 tonnes of toluene were released into the environment in the USA, with most (37,000 tonnes) being released into the air<sup>13</sup>.
  - Toluene is transported rapidly from water, where it has low solubility, into the atmosphere.
  - In the vicinity of an automobile painting plant, levels of 0.06-0.6 mg/m<sup>3</sup> have been detected 1.6-16.5 km downwind of the painting facilities, as compared with 0.006 mg/m<sup>3</sup> upwind<sup>14</sup>.

- Water*
- The concentration of toluene in rainwater in the Federal Republic of Germany is reported to be 0.13-0.70 µg/l<sup>10,14</sup>.
  - Levels of 42-100 µg/l have been reported in well water in the vicinity of landfill sites in the USA<sup>10</sup>.
  - It has been found at concentrations of 1-5 µg/l in water samples from a number of rivers in eastern and mid-western USA; concentrations ranging up to 12 µg/l have been found in the Mississippi River near New Orleans; a concentration of 0.8 µg/l has been reported in the Rhine River in the Federal Republic of Germany, and of 1.9 µg/l in Switzerland<sup>4</sup>.

- Other*
- Toluene exists in an absorbed state in soil; biodegradation by microorganisms in the soil ranged from 63-86% after 20 days<sup>10, 15, 16</sup>.
  - Toluene concentrations of <1 mg/kg in 56 out of 59 samples of fish tested have been reported<sup>10</sup>.
  - Toluene was also detected at a concentration of 0.08-0.11 mg/kg in a few samples of maple syrup packaged in plastic containers<sup>17</sup>.

nificant increase in leukaemia was observed among workers of the chemical manufacturing industry in Shanghai<sup>28</sup>. The authors noted that the risk of leukaemia could also be related to the co-existence of exposure to benzene as a contaminant or constituent of many industrial solvents<sup>28</sup>. In an IARC summary of epidemiological findings, toluene exposure was mentioned in eight studies. However, considering the multiple exposure circumstances in most studies, and the weak consistency of findings, these results were not considered strong enough to conclude that there is an association between exposure to toluene and risk of cancer in humans<sup>21</sup>.

The available data on the toxicity and carcinogenicity of toluene have recently been reviewed and discussed extensively by Huff<sup>24</sup>.

In 1981, in the framework of an integrated experimental project to evaluate the comparative carcinogenic effects of toluene and other similar aromatic solvents, namely benzene, xylenes,

and ethylbenzene, a long-term bioassay was started on toluene, administered by ingestion (stomach tube) to Sprague-Dawley rats, at a dose of 500 mg/kg b.w. (Experiment BT 903). Preliminary results, 92 weeks on from the start of the experiment, were published in 1983<sup>29</sup>, and final results were summarized and published in 1985<sup>30</sup> and in 1997<sup>31</sup>.

In 1984, a second integrated project of long-term experiments was planned to measure the comparative carcinogenic effects between the same aromatic solvents and toluene, which was administered by ingestion to Sprague-Dawley rats at a dose of 800 mg/kg b.w. (Experiment BT 910). Some final results were published in 1997<sup>31</sup>.

The aim of this report is to refer more extensively all available information on both experiments performed in our laboratory on toluene, and to discuss the discrepancy with the results of other long-term bioassays on toluene as performed in other laboratories.

## Materials and methods

Toluene was supplied by an Italian petrochemical industry. The analytical characterization of toluene resulted in percentages, w/w, as follows: toluene: 98.34; paraffin: 0.83; benzene: 0.28; ethylbenzene: 0.52; m-xylene and p-xylene: 0.029. Extra virgin olive oil was used as a carrier of the compound.

Male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats were used from the colony of the Cancer Research Centre (CRC) of the Ramazzini Foundation (RF). This colony of rats has been employed for various experiments in the CRC/RF Laboratory for nearly 30 years. Historical data are available on about 15,000 historical controls, kept under observation for their life-span and submitted to systematic necropsies and standardized histopathological examinations. Data are thus available on the expected incidence of, and fluctuation in, the different types of tumour in control animals.

After weaning, at 4-5 weeks of age, the experimental animals were identified by ear punch, randomised in order to have no more than one male and one female of each litter in the same group, and housed in groups of 5 in makrolon cages (41 x 25 x 15 cm) with stainless-steel wire tops; a shallow layer of white wood-shavings served as bedding. The animals were kept in one single room, at 23 ± 2°C and 50-60% relative humidity.

Both experiments were performed according to the Good Laboratory Practices (GLP) and Standard Operating Procedures (SOP) of the CRC/RF.

The plans of the experiments are shown in Tables 3 and 4.

In the first experiment, toluene was administered by gavage in extra virgin olive oil solution, 4 days weekly (Monday and Tuesday; Thursday and Friday), for 104 weeks, at a dose of 500 or 0 mg/kg b.w. (Exp. BT 903). Experiment BT 903 was started in January 1981 and the biophase ended after 141 weeks with the spontaneous death of the last animal at the age of 148 weeks.

In the second experiment, toluene was administered in the same way at doses of 800 or 0 mg/kg b.w. (Exp. BT 910). Experiment BT 910 started in May 1984 and the biophase ended after 123 weeks, with the sacrifice of the animals still alive. Experiment BT 910 was truncated at this stage because the treatment markedly decreased male and female survivals compared to the control group. The solutions of both experiments were prepared weekly and stored at 4 °C. Control animals were given 1 ml of

**Table 3** - Long-term carcinogenicity bioassay on toluene, administered by stomach tube to male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats (Exp. BT 903): plan of the experiment

Group No.	Dose (mg/kg b.w. in olive oil)	Age at start (weeks)	Animals	
			Sex	No.
I	500	7	M	40
			F	40
			M+F	80
II	0 <sup>a</sup> (control)	7	M	50
			F	50
			M+F	100

<sup>a</sup> Olive oil alone

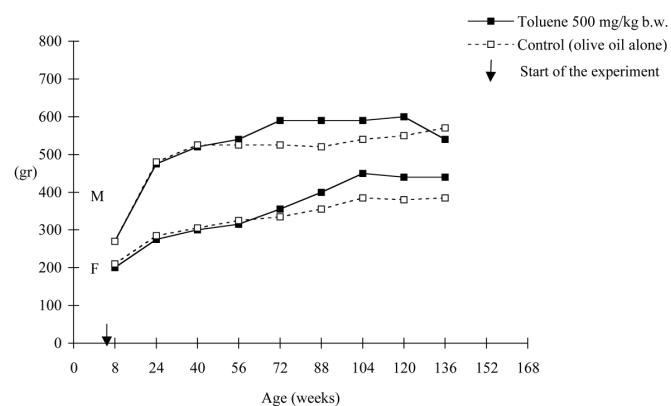
**Table 4** - Long-term carcinogenicity bioassay on toluene, administered by stomach tube to male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats (Exp. BT 910): plan of the experiment

Group No.	Dose (mg/kg b.w. in olive oil)	Age at start (weeks)	Animals	
			Sex	No.
I	800	7	M	50
			F	50
			M+F	100
II	0 <sup>a</sup> (control)	7	M	50
			F	50
			M+F	100

<sup>a</sup> Olive oil alone

olive oil alone. The animals of both experiments were kept under observation until death, under highly standardized housing and diet conditions. Individual animal weight was measured every 2 weeks from 7 weeks until 111 weeks of age, and then every 8 weeks until the end of the experiments. Animal status and behaviour were examined 3 times daily and the animals were examined every 2 weeks throughout experiments in order to detect and register all gross lesions.

Upon death, animals underwent systematic necropsy. Histopathology was routinely performed on the following organs and tissues: the brain, pituitary gland, Zymbal glands, submaxil-



**Fig. 1.** Mean body weight in male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats (Exp. BT 903)

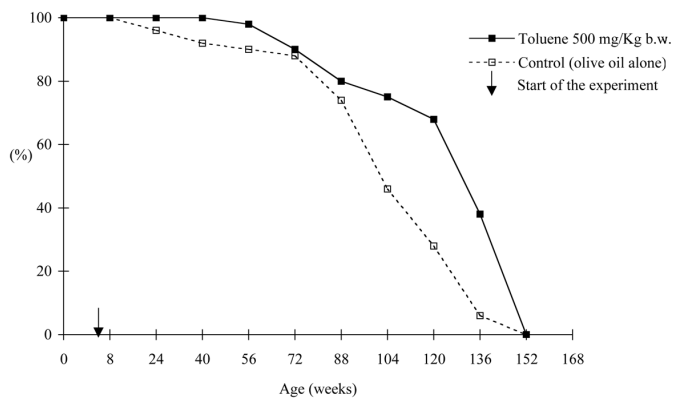


Fig. 2. Survival in male Sprague-Dawley rats (Exp. BT 903)

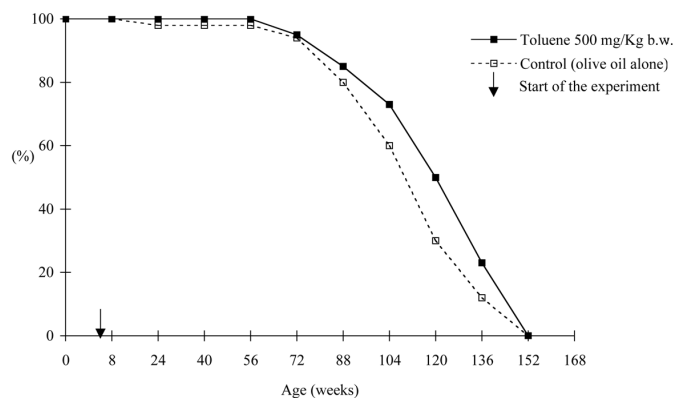


Fig. 3. Survival in female Sprague-Dawley rats (Exp. BT 903)

Table 5 - Long-term carcinogenicity bioassay on toluene, administered by stomach tube, to male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats (Exp. BT 903). Results: number and percentage of male and female Sprague-Dawley rats bearing various types of benign and malignant tumours <sup>a</sup>

Site	Histotype	Groups							
		I: 500 mg/kg b.w.				II: 0			
		Male		Female		Male		Female	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
Skin	Acanthoma	1	2.5	0	-	0	-	0	-
	Dermatofibroma	0	-	0	-	1	2.0	0	-
	Papilloma	0	-	0	-	0	-	1	2.0
	Squamous cell carcinoma	1	2.5	0	-	0	-	1	2.0
Subcutaneous tissue <sup>b</sup>	Fibroma	2	5.0	0	-	1	2.0	0	-
	Lipoma and fibrolipoma	3	7.5	1	2.5	1	2.0	0	-
	Liposarcoma	2	5.0	0	-	0	-	0	-
	Rhabdomyosarcoma	1	2.5	0	-	0	-	0	-
Mammary glands <sup>c</sup>	Adenoma	0	-	1	2.5	0	-	0	-
	Fibroma and fibroadenoma	2	5.0	27 (47)	67.5	2 (3)	4.0	17 (29)	34.0
	Adenocarcinoma	1	2.5	7 (9)	17.5	0	-	7	14.0
	Fibrosarcoma	0	-	3	7.5	0	-	0	-
Zymbal glands	Carcinoma	1	2.5	0	-	1	2.0	0	-
Nasal cavities	Carcinoma	0	-	1	2.5	0	-	0	-
Oral cavity and lips	Acanthoma	2	5.0	1	2.5	2	4.0	0	-
	Carcinoma	0	-	1	2.5	0	-	0	-
Lung	Adenoma	1	2.5	1	2.5	0	-	0	-
Stomach	- Forestomach	1	2.5	0	-	0	-	0	-
Liver	Hepatoma	0	-	1	2.5	0	-	1	2.0
	Cholangioma	0	-	1	2.5	1	2.0	0	-
	Hepatocarcinoma	2	5.0	0	-	3	6.0	0	-
Pancreas	Islet cell adenoma	5	12.5	2	5.0	0	-	0	-
Kidneys	Nephroblastoma	0	-	0	-	1	2.0	0	-
Pelvis	Squamous cell carcinoma	0	-	1	2.5	0	-	0	-
Prostate	Squamous cell carcinoma	1	2.5			0	-		
Testes	Interstitial cell adenoma	2	5.0			1	2.0		
	Embryonal carcinoma	1	2.5			0	-		

(Table 5 continued)

Table 5 cont.

Site	Histotype	Groups							
		I: 500 mg/kg b.w.				II: 0			
		Male		Female		Male		Female	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Ovaries	Granulosa cell tumour			2	5.0			0	-
	Adenocarcinoma			1	2.5			0	-
Uterus	Polyp			5	12.5			3	6.0
	Squamous cell carcinoma			1	2.5			0	-
	Adenocarcinoma			1	2.5			0	-
Vagina	Fibrosarcoma			1	2.5			0	-
Peritoneum	Mesothelioma	1	2.5	0	-	0	-	0	-
Pituitary gland	Adenoma	2	5.0	13	32.5	0	-	6	12.0
Thyroid gland	Follicular carcinoma	2	5.0	1	2.5	0	-	1	2.0
	C-cell carcinoma	1	2.5	1	2.5	0	-	0	-
Adrenal glands	Cortical adenoma	1	2.5	5	12.5	0	-	2	4.0
	Pheochromocytoma	14 (19)	35.0	4 (6)	10.0	20 (28)	40.0	11 (14)	22.0
	Cortical adenocarcinoma	2	5.0	3 (4)	7.5	0	-	0	-
	Pheochromoblastoma	1	2.5	0	-	0	-	0	-
Nervous system									
	- Brain								
	- Meninges								
	Neuroblastoma	1	2.5	0	-	0	-	0	-
	Oligodendroglioma	1	2.5	1	2.5	1	2.0	1	2.0
	Benign meningioma	0	-	2	5.0	1	2.0	0	-
Bones									
- Head	Osteoma	0	-	0	-	1	2.0	0	-
- Other	Osteosarcoma	1	2.5	0	-	0	-	0	-
	Osteochondrosarcoma	0	-	0	-	1	2.0	0	-
Soft tissues	Myxoma	0	-	0	-	1	2.0	0	-
Thymus	Squamous cell carcinoma	0	-	0	-	1	2.0	0	-
Spleen	Fibroangioma	1	2.5	0	-	0	-	1	2.0
Mediastinal lymph nodes	Angioma	0	-	0	-	1	2.0	0	-
Mesenteric lymph nodes	Fibroangioma	1	2.5	0	-	0	-	0	-
Haemolympho- reticular tissues <sup>d</sup>	Benign histiocytoma	1	2.5	0	-	0	-	0	-
	Lymphomas and leukaemias	3	7.5	7	17.5	3	6.0	1	2.0

<sup>a</sup> Between brackets the number of tumours (one animal can bear more than one tumour)

<sup>b</sup> See table 7

<sup>c</sup> See table 8

<sup>d</sup> See table 9

lary glands, Harderian glands, cranium (with oral and nasal cavities and external and internal ear ducts), tongue, pharynx, larynx, thymus and mediastinal lymph nodes, lung and mainstem bronchi, diaphragm, liver, spleen, pancreas, kidneys, adrenal glands, oesophagus, stomach (fore and glandular), intestine (three levels), urinary bladder, prostate, gonads, interscapular fat pad, subcutaneous and mesenteric lymph nodes and any other organs or tissues with pathological lesions.

All organs and tissues were preserved in 70% ethyl alcohol, except for the bones which were fixed in 10% formalin and then decalcified with 10% formaldehyde and 20% formic acid in water solution. The normal specimens were trimmed, following SOP at the CRC/RF Laboratory: i.e. parenchymal organs were dissect-

ed through the hilus to expose the widest surface, and hollow organs were sectioned across the greatest diameter(s). Any pathological tissue was trimmed through the largest surface, including normal adjacent tissue. Trimmed specimens were processed as paraffin blocks, and 3-5 micron sections of every specimen were obtained. Sections were routinely stained with haematoxylin-eosin. Specific stainings were performed when needed. All slides were examined microscopically by the same group of pathologists; a senior pathologist reviewed all tumours and any other lesion of oncological interest. All pathologists followed the same criteria of histopathological evaluation and classification. Multiple tumours of different type and site, or of different type in the same site, or of the same type in bilateral organs, or at distant sites



**Table 6** - Long-term carcinogenicity bioassay on toluene, administered by stomach tube, to male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats (Exp. BT 903). Results: total malignant tumours

Group No.	Dose (mg/kg b.w. in olive oil)	Animals		Malignant tumours			
		Sex	No.	Tumour-bearing animals		Tumours	
				No.	%	No.	Per 100 animals
I	500	M	40	18	<b>45.0*</b>	23	<b>57.5**</b>
		F	40	20	<b>50.0**</b>	33	<b>82.5**</b>
		M+F	80	38	<b>47.5</b>	56	<b>70.0</b>
II	0 <sup>a</sup> (control)	M	50	10	20.0	11	22.0
		F	50	10	20.0	11	22.0
		M+F	100	20	20.0	22	22.0

<sup>a</sup> Olive oil alone\* Statistically significant (p < 0.05) using  $\chi^2$  test\*\* Statistically significant (p < 0.01) using  $\chi^2$  test

\*\* Statistically significant (p &lt; 0.01) using Fisher-Snedecor test, df = 89

**Table 7** - Long-term carcinogenicity bioassay on toluene, administered by stomach tube, to male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats (Exp. BT 903). Results: tumours of the subcutaneous tissue

Group	Dose (mg/kg b.w. in olive oil)	Animals		Benign tumours				Malignant tumours			
		Sex	No.	Tumour-bearing animals		Tumours		Tumour-bearing animals		Tumours	
				No.	%	No.	Per 100 animals	No.	%	No.	Per 100 animals
I	500	M	40	5	<b>12.5</b>	5	<b>12.5</b>	3	<b>7.5</b>	3	<b>7.5*</b>
		F	40	1	<b>2.5</b>	1	<b>2.5</b>	0	-	0	-
		M+F	80	6	<b>7.5</b>	6	<b>7.5</b>	3	3.8	3	3.8
II	0 <sup>a</sup> (control)	M	50	2	4.0	2	4.0	0	-	0	-
		F	50	0	-	0	-	0	-	0	-
		M+F	100	2	2.0	2	2.0	0	-	0	-

<sup>a</sup> Olive oil alone

\* Statistically significant (p &lt; 0.05) using Fisher-Snedecor test, df = 89

**Table 8** - Long-term carcinogenicity bioassay on toluene, administered by stomach tube, to male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats (Exp. BT 903). Results: malignant mammary tumours

Group No.	Dose (mg/kg b.w. in olive oil)	Animals		Malignant mammary tumours			
		Sex	No.	Tumour-bearing animals		Tumours	
				No.	%	No.	Per 100 animals
I	500	M	40	1	<b>2.5</b>	1	<b>2.5</b>
		F	40	10	<b>25.0</b>	12	<b>30.0</b>
		M+F	80	11	<b>13.8</b>	13	<b>16.3</b>
II	0 <sup>a</sup> (control)	M	50	0	-	0	-
		F	50	7	14.0	7	14.0
		M+F	100	7	7.0	7	7.0

<sup>a</sup> Olive oil alone

of diffuse tissue (i.e. bones, skeletal muscle, etc.), were plotted as single/independent tumours. Multiple tumours of the same type in the same tissue and organ (including those of the bilateral organs) were plotted only once.

Statistical analysis was performed using the  $\chi^2$ , Fisher-Snedecor and Log-rank tests, in order to evaluate the level of significance in tumour incidence differences, between treated and control group. In particular, the last method assumes lethality of

**Table 9** - Long-term carcinogenicity bioassay on toluene, administered by stomach tube, to male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats (Exp. BT 903). Results: haemolymphoreticular neoplasias

Group No.	Dose (mg/kg b.w. in olive oil)	Animals			Animals with haemolymphoreticular neoplasias		
		Sex	No.	Corrected number	No.	% <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>
I	500	M	40	34 <sup>c</sup>	3	7.5	8.8
		F	40	39 <sup>d</sup>	7	17.5*	17.9*
		M+F	80	73	10	12.5	13.7
II	0 <sup>e</sup> (control)	M	50	39 <sup>c</sup>	3	6.0	7.7
		F	50	49 <sup>d</sup>	1	2.0	2.0
		M+F	100	88	4	4.0	4.5

<sup>a</sup> Percentages refer to the number at start

<sup>b</sup> Percentages refer to the corrected number

<sup>c</sup> Alive male rats at 75 weeks of age, when the first leukaemia was observed

<sup>d</sup> Alive female rats at 60 weeks of age, when the first leukaemia was observed

<sup>e</sup> Olive oil alone

\* Statistically significant ( $p < 0.05$ ) using  $\chi^2$  test

† Statistically significant ( $p < 0.05$ ) using Log-Rank test

the tumour and the statistical method is a log-rank test as described in Mandel<sup>32</sup> and Cox<sup>33</sup>.

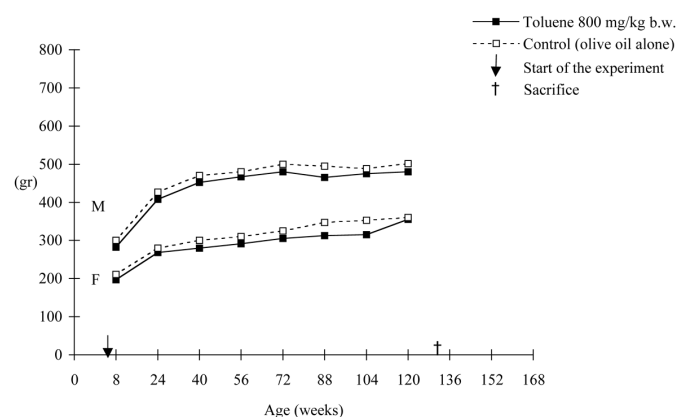
## Results

### 1. Experiment BT 903

Mean body weight was slightly increased in male and female treated rats compared to controls from 56 and 88 weeks of age, respectively (fig. 1).

A decreased survival was observed in control males and females from 88 weeks of age until the end of the experiment (figs. 2 and 3). The difference was more evident in males.

The occurrence of benign and malignant tumours is shown in Table 5. Differences observed between treated and control animals were: 1) an increase in total malignant tumours in male and female treated rats (Table 6); 2) an increase in subcutaneous malignant tumours among treated males (Table 7); 3) an increased incidence of malignant mammary tumours in treated females (Table 8); 4) an increased incidence of haemolymphoreticular neoplasias in treated females (Table 9).

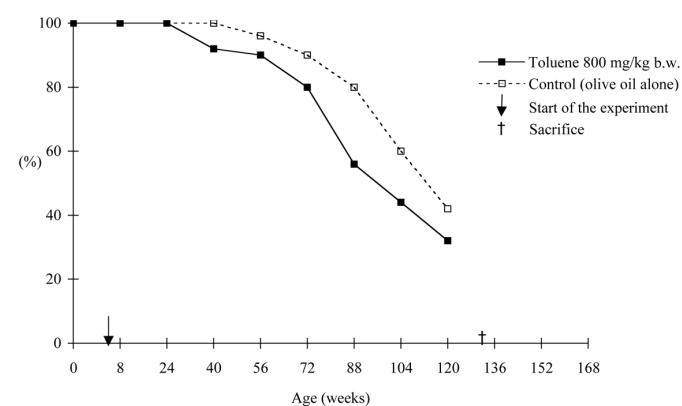


**Fig. 4.** Mean body weight in male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats (Exp. BT 910)

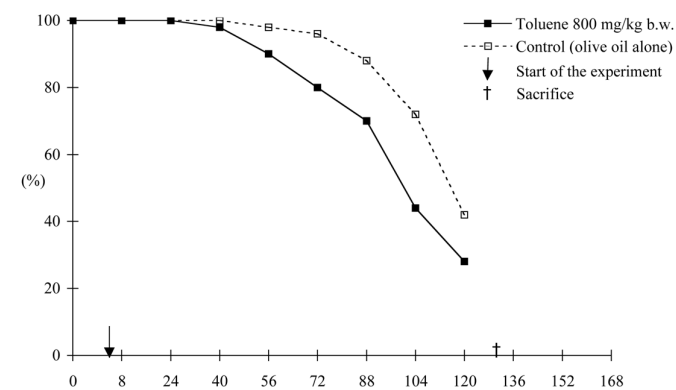
### 2. Experiment BT 910

No substantial differences were observed in mean body weight between treated and control rats (fig. 4).

An increase in mortality among male and female treated rats was observed from 24 until 130 weeks of age (figs. 5 and 6), when it was decided to truncate the experiment.



**Fig. 5.** Survival in male Sprague-Dawley rats (Exp. BT 910)



**Fig. 6.** Survival in female Sprague-Dawley rats (Exp. BT 910)

**Table 10** - Long-term carcinogenicity bioassay on toluene, administered by stomach tube, to male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats (Exp. BT 910). Results: number and percentage of male and female Sprague-Dawley rats bearing various types of benign and malignant tumours <sup>a</sup>

Site	Histotype	Groups							
		I: 800 mg/kg b.w.				II: 0			
		Male		Female		Male		Female	
No.	%	No.	%	No.	%	No.	%		
Skin	Acanthoma	0	-	0	-	1	2.0	0	-
	Dermatofibroma	1	2.0	0	-	0	-	0	-
Subcutaneous tissue	Fibroma	0	-	1	2.0	0	-	0	-
	Fibroangioma	0	-	0	-	1	2.0	1	2.0
	Fibrosarcoma	1	2.0	0	-	0	-	0	-
	Leiomyosarcoma	0	-	0	-	1	2.0	0	-
Mammary glands	Fibroma and fibroadenoma	0	-	11 (15)	22.0	2	4.0	23 (31)	46.0
	Adenocarcinoma	0	-	2	4.0	0	-	2	4.0
	Carcinosarcoma	0	-	0	-	0	-	1	2.0
	Fibrosarcoma	0	-	2	4.0	0	-	0	-
Zymbal glands	Squamous cell carcinoma	0	-	0	-	1	2.0	1	2.0
Ear ducts	Acanthoma	0	-	0	-	1	2.0	0	-
	Squamous cell carcinoma	1	2.0	0	-	0	-	1	2.0
Nasal cavities	Papilloma	0	-	1	2.0	0	-	0	-
	Squamous cell carcinoma	1	2.0	0	-	0	-	0	-
Oral cavity, lips and tongue <sup>b</sup>	Squamous cell carcinoma	7	14.0	3	6.0	0	-	1	2.0
Stomach - Forestomach	Acanthoma	0	-	0	-	1	2.0	0	-
	Squamous cell carcinoma	0	-	1	2.0	0	-	0	-
Liver	Hepatoma	0	-	1	2.0	2	4.0	0	-
	Cholangioma	0	-	1	2.0	0	-	0	-
	Hepatocarcinoma	0	-	0	-	2	4.0	0	-
Pancreas	Islet cell adenoma	2	4.0	1	2.0	2	4.0	1	2.0
Kidneys	Adenoma	0	-	1	2.0	0	-	0	-
	Adenocarcinoma	0	-	0	-	1	2.0	0	-
Testes	Interstitial cell adenoma	2 (3)	4.0			4 (5)	8.0		
Ovaries	Theca cell tumour			1	2.0			0	-
	Sertoli cell tumour			2 (3)	4.0			1	2.0
	Carcinosarcoma			0	-			1	2.0
	Malignant granulosa cell tumour			1	2.0			0	-
Uterus	Polyp			7	14.0			2	4.0
	Leiomyosarcoma			0	-			1	2.0
	Angiosarcoma			1	2.0			0	-
Pituitary gland	Adenoma	1	2.0	11	22.0	6	12.0	24	48.0
Thyroid gland	Adenoma	0	-	0	-	0	-	2	4.0
	C-cell carcinoma	0	-	2	4.0	1	2.0	0	-
Adrenal glands	Cortical adenoma	0	-	2	4.0	0	-	3	6.0
	Pheochromocytoma	15 (23)	30.0	7 (10)	14.0	11 (18)	22.0	9(14)	18.0
	Cortical adenocarcinoma	0	-	2	4.0	0	-	0	-
	Pheochromoblastoma	2	4.0	1	2.0	0	-	0	-
Nervous system	- Brain	0	-	2	4.0	0	-	0	-
	- Meninges	0	-	1	2.0	0	-	0	-

(Table 10 continued)

The occurrence of benign and malignant tumours is shown in Table 10. Differences observed between treated and control animals were: 1) an increased incidence of total malignant tumours in

treated male and female rats (Table 11); 2) an increased incidence of carcinomas of the oral cavity, lips and tongue in male and female treated animals compared to controls (Table 12).

Table 10 cont.

Site	Histotype	Groups							
		I: 800 mg/kg b.w.				II: 0			
		Male		Female		Male		Female	
No.	%	No.	%	No.	%	No.	%		
Bones									
- Head	Osteosarcoma	1	2,0	1	2,0	0	-	0	-
Soft tissues	Lipoma	0	-	0	-	0	-	1	2,0
	Liposarcoma	0	-	0	-	2	4,0	0	-
Spleen	Fibroangioma	0	-	0	-	1	2,0	0	-
Mesenteric lymph nodes	Fibroangioma	0	-	0	-	0	-	1	2,0
Haemolymphoreticular tissues	Lymphomas and leukaemias	8	16,0	5	10,0	5	10,0	3	6,0

<sup>a</sup> Between brackets the number of tumours (one animal can bear more than one tumour)

<sup>b</sup> See table 12

**Table 11** - Long-term carcinogenicity bioassay on toluene, administered by stomach tube, to male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats (Exp. BT 910). Results: total malignant tumours

Group No.	Dose (mg/kg b.w. in olive oil)	Animals		Malignant tumours			
		Sex	No.	Tumour-bearing animals		Tumours	
				No.	%	No.	Per 100 animals
I	800	M	50	20	<b>40.0</b>	21	<b>42.0</b>
		F	50	15	<b>30.0</b>	24	<b>48.0</b>
		M+F	100	35	<b>35.0</b>	45	<b>45.0</b>
II	0 <sup>a</sup> (control)	M	50	12	24.0	13	26.0
		F	50	11	22.0	11	22.0
		M+F	100	23	23.0	24	24.0

<sup>a</sup> Olive oil alone

**Table 12** - Long-term carcinogenicity bioassay on toluene, administered by stomach tube, to male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats (Exp. BT 910). Results: carcinomas of the oral cavity, lips and tongue

Group No.	Dose (mg/kg b.w. in olive oil)	Animals			Animals with carcinoma		
		Sex	No.	Corrected number	No.	% <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>
I	800	M	50	32 <sup>c</sup>	7	<b>14.0*</b>	<b>21.9**</b>
		F	50	27 <sup>d</sup>	3	<b>6.0</b>	<b>11.1</b>
		M+F	100	59	10	<b>10.0</b>	<b>16.9</b>
II	0 <sup>c</sup> (control)	M	50	42 <sup>c</sup>	0	-	-
		F	50	39 <sup>d</sup>	1	2.0	2.6
		M+F	100	83	1	1.0	1.2

<sup>a</sup> Percentages refer to the number at start

<sup>b</sup> Percentages refer to the corrected number

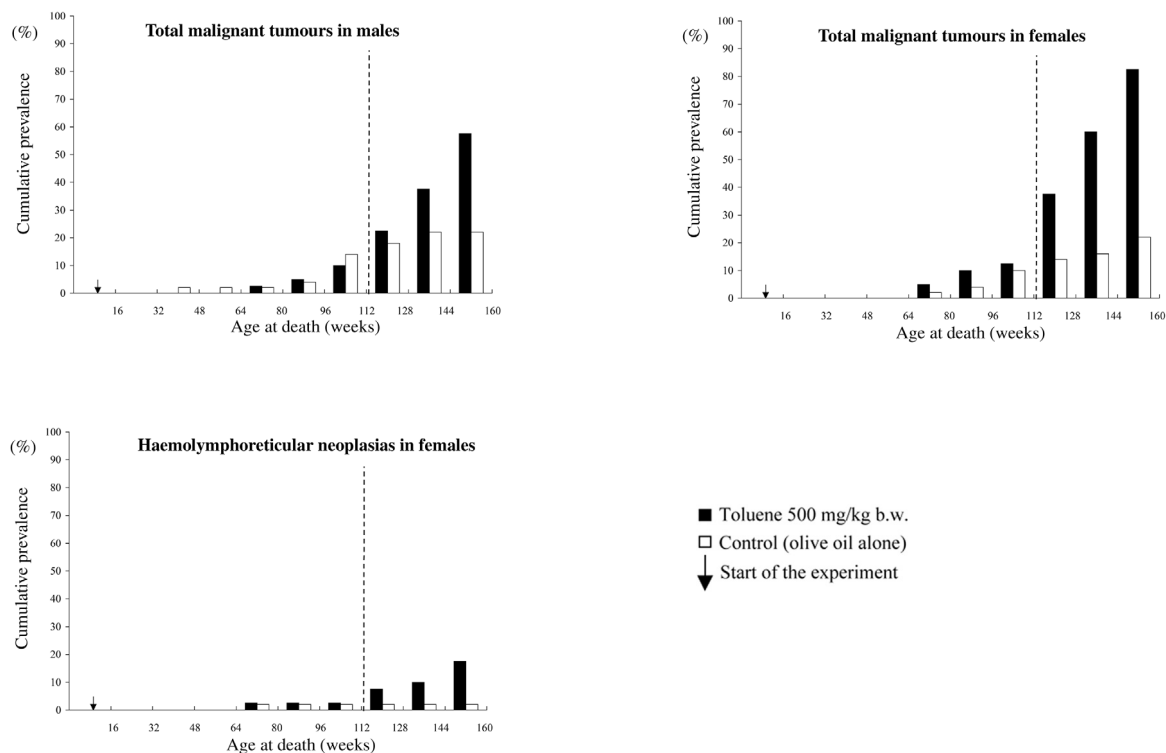
<sup>c</sup> Alive male rats at 78 weeks of age, when the first carcinoma was observed

<sup>d</sup> Alive female rats at 90 weeks of age, when the first carcinoma was observed

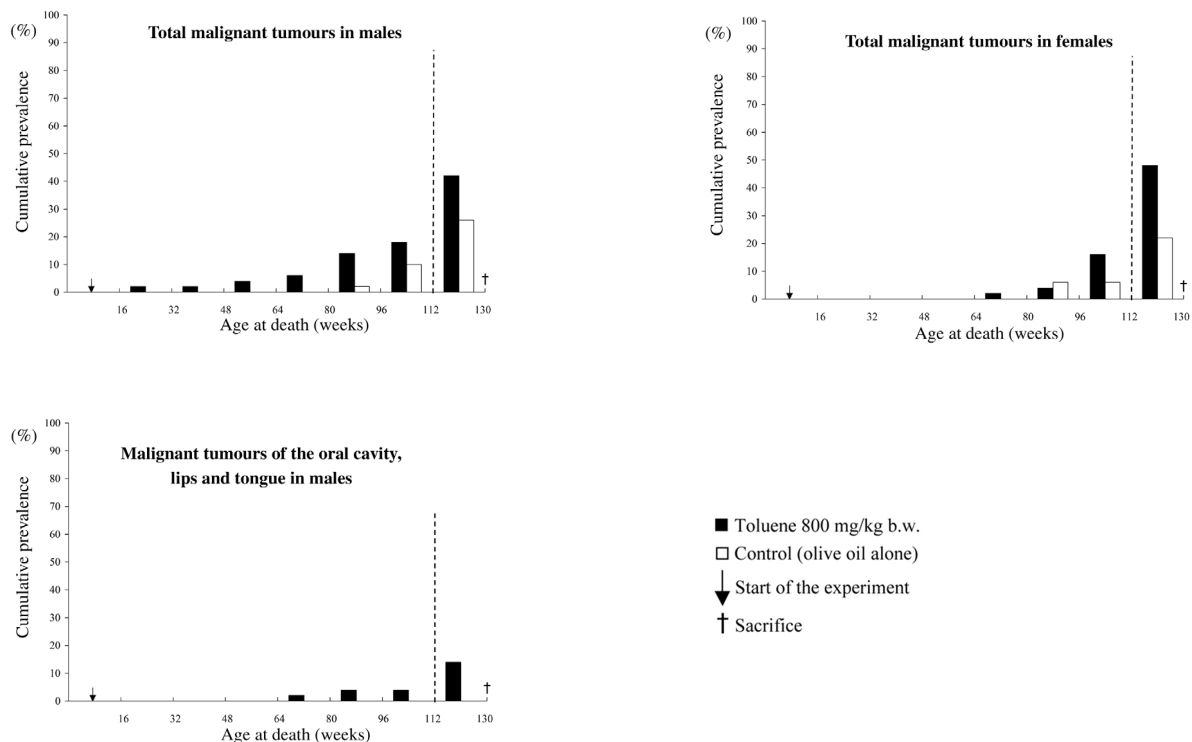
<sup>e</sup> Olive oil alone

\* Statistically significant ( $p < 0.05$ ) using  $\chi^2$  test

\*\* Statistically significant ( $p < 0.01$ ) using Log-Rank test



**Fig. 7.** Cumulative prevalence of total malignant tumours in males and females, and haemolymphoreticular neoplasias in females, histopathologically observed, by age at death, among the Sprague-Dawley rats treated with 500 mg/kg b.w. of toluene for 104 weeks, and then kept under control until spontaneous death (Exp. BT 903)



**Fig. 8.** Cumulative prevalence of total malignant tumours in males and females, and malignant tumours of the oral cavity, lips and tongue in males, histopathologically observed, by age at death, among the Sprague-Dawley rats treated with 800 mg/kg b.w. of toluene for 104 weeks, and kept alive until 130 weeks of age; then the animals still alive were killed (Exp. BT 910)



## Conclusions

In our tested experimental conditions, toluene has shown carcinogenic effects in both experiments, performed sequentially at different periods and dose levels.

In the first experiment treatment with 500 mg/kg b.w. of toluene for 104 weeks (Exp. BT 903), and observing animals until spontaneous death (the last animal died at the age of 148 weeks), caused an increase in total malignant tumours in males and females, and in malignant mammary tumours and haemolymphoreticular neoplasias in females. An increase in malignant tumours of the subcutaneous tissue was also observed in males. Higher mortality was observed among male and female Sprague-Dawley rats of the control group.

In the second experiment (Exp. BT 910), toluene was administered at 800 mg/kg b.w. for 104 weeks and the animals were observed until 130 weeks of age, when the experiment was truncated because of the higher mortality observed in males and females of the treated group. In this experiment, toluene induced an increase in the incidence of total malignant tumours and carcinomas of the oral cavity, lips and tongue, in male and female treated rats.

The two long-term inhalation bioassays on toluene performed by the industry<sup>22</sup> and the National Toxicology Program<sup>23</sup> did not show any carcinogenic effect of toluene. As Huff pointed out in his paper<sup>24</sup>, there are several differences between the experiment performed by these studies and that of the Ramazzini Foundation, namely:

1. different species;
2. differences in routes of exposure: oral versus inhalation;
3. differences in "bolus" oral dosing versus more extended inhalation exposure;
4. different exposure concentrations of 500 and 800 mg/kg b.w. versus up to 1200 ppm (estimated as 1350 mg/kg b.w. for rats over a longer period);
5. differences in length of experiment; although in all these studies animals were exposed for 104 weeks, the Ramazzini Foundation studies continued without exposure for roughly another six months.

This last factor is in our opinion crucial to reveal all the carcinogenic potential of an agent. As was pointed out by Huff<sup>24</sup> and by us<sup>35</sup>, the distinctive characteristic of the Ramazzini Foundation long-term carcinogenicity bioassays, namely to keep experimental animals under observation until natural death, could be the most influential factor in the difference between results. Had we truncated our toluene experiments at 112 weeks, as was done in the inhalation studies, we would never have appreciated the difference in tumour incidence between treated and control animals, and so failed to demonstrate the carcinogenicity of toluene. In fact, as shown in figures 7 and 8, the higher incidence of malignancies in treated animals was appreciated after 112 weeks of age.

## References

1. Cier HE. Toluene. In Kirk-Othmer encyclopaedia of chemical technology. New York, Interscience Publishers, 1969.
2. Ozokwelu ED. Toluene. In Kir-Othmer encyclopaedia of chemical technology. New York, John Wiley & Sons, 1997.
3. Fabri R, Graeser U, Simo TA. Toluene. In Gerhartz W and Yamamoto YS, eds, Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, 5<sup>th</sup> rev. Ed. Weinheim VCH Publishers, 1996, A27: 147-57.
4. Merian E, Zander M. Volatile aromatics. In: Hutzinger O. Handbook of environmental chemistry, Vol. 3, Part B. Anthropogenic compounds. Berlin: Springer, 1982, 117-61.
5. United States National Library of Medicine. Hazardous substances data bank (HSDB), Bethesda, MD, record No. 131, 1997.
6. Belpoggi F, Soffritti M, Maltoni C. Methyl-tertiary-butyl ether (MTBE). A gasoline additive causes testicular and haematopoietic cancers in rats. *Toxicol Ind Health* 1995; 11: 119-49.
7. Belpoggi F, Soffritti M, Filippini F, *et al.* Results of long-term carcinogenicity of methyl-tertiary-butyl ether. *Ann NY Acad Sci* 1997; 837: 77-95.
8. Bird MG, Burleigh-Flayer HD, Chun JS, *et al.* Oncogenicity studies of inhaled methyl-tertiary-butyl ether (MTBE) in CD-1 mice and F-344 rats. *J Appl Toxicol* 1997; 17 (S1): S45-S55.
9. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 47. Some organic solvents, resin monomers and related compounds, pigments and occupational exposures in paint manufacture and Painting. Lyon: IARC, 1989.
10. United States Environmental Protection Agency (US EPA). Health assessment document for toluene (Publ. No. PB84-100056). Washington, DC: US Department of Commerce, National Technical Information Service, 1983.
11. National Research Council. Vapor-phase organic pollutants. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1976.
12. Merian E. The environmental chemistry of volatile hydrocarbons. *Toxicol Environ Chem* 1982; 5: 167-75.
13. United States Environmental Protection Agency (US EPA). Toluene. In Toxic Release Inventory (TRI) Chemicals. TRI on-site and off-site reported releases (in pounds), for facilities in all industries, for all chemicals, US 2000, available on <http://www.epa.gov/cgi-bin/broker>, 2003.
14. International Programme on Chemical Safety. Toluene (Environmental Health Criteria 52). Geneva: World Health Organization, 1985.
15. Wilson JT, Enfield CG, Dunlap WJ, *et al.* Transport and fate of selected organic pollutants in a sandy soil. *J Environ Qual* 1981; 10: 501-6.
16. Wilson JT, McNabb JF, Wilson RH, *et al.* Biotransformation of selected organic pollutants in ground water. *Dev Ind Microbiol* 1983; 24: 225-33.
17. Hollifield HC, Breder CV, Dannison JL, *et al.* Container-derived contamination of maple syrup with methyl methacrylate, toluene, and styrene as determined by headspace gas-liquid chromatography. *J Assoc Off Anal Chem* 1980; 63: 173-7.
18. Löf A, Wigaeus Hjelm E, Colmsjö A, *et al.* Toxicokinetics of toluene and urinary excretion of hippuric acid after human exposure to <sup>3</sup>H<sub>2</sub>-toluene. *Br J Ind Med* 1993; 50: 55-9.
19. Baelum J, Molhave L, Honoe-Hansen S, *et al.* Hepatic metabolism of toluene after gastrointestinal uptake in humans. *Scand J Work Environ Health* 1993; 19: 55-62.
20. Henderson HF. Aromatic hydrocarbons-benzene and other alkylbenzenes. Toluene. In Bingham E, Cohorsen B, Powell CH, Eds. *Patty's toxicology*. New York: John Wiley & Sons, 2001.
21. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Vol. 71. Part II. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogenperoxide. Lyon: IARC, 1999.
22. Gibson JE, Hardisty JF. Chronic toxicity and oncogenicity bioassay of inhaled toluene in Fisher-344 rats. *Fundam Appl Toxicol* 1983; 3: 315-9.
23. United States National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of toluene (CAS No. 108-88-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies) (NTP TR 371); NIH Publ. No. 90-2826, Research Triangle Park, NC, 1990.
24. Huff J. Absence of carcinogenic activity in Fisher rats and B6C3F1 mice following 103-week inhalation exposure to toluene. *Int J Occup Environ Health* 2003; 9: 138-46.
25. Gerin M, Semiatycki J, Desy M, *et al.* Associations between several sites of cancer and occupational exposure to benzene, toluene, xylene, and styrene: results of a case-control study in Montreal. *Am J Ind Med* 1998; 34: 144-56.
26. Goldberg MS, Parent ME, Semiatycki J, *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.

27. Wiebelt H, Becker N. Mortality in a cohort of toluene exposed employees (rotogravure printing plant workers). *J Occup Environ Med* 1999; 41:1134-9.
28. Linet MS, Yin SN, Travis LB, *et al.* Clinical features of Haematopoietic malignancies and related disorders among benzene-exposed workers in China. *Environ Health Perspect* 1996; 104 (Suppl 6): 1353-1364.
29. 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.
30. Maltoni C, Conti B, Cotti G, *et al.* Experimental studies on benzene carcinogenicity at the Bologna Institute of Oncology: current results and ongoing research. *Am J Ind Med* 1985; 7: 415-46.
31. Maltoni C, Ciliberti A, Pinto C, *et al.* Results of long-term experimental carcinogenicity of the effects of gasoline, correlated fuels, and major gasoline aromatics on rats. In Bingham E & Rall DP, Eds. Preventive strategies for living in a chemical world. *Ann NY Acad Sci* 1997; 837: 15-52.
32. Mandel N. Evaluation of survival data on two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother* 1966; 50: 163-70.
33. Cox DR. Regression models and life-tables (with discussion). *J R Stat Soc* 1972; 24: 187-220.
34. 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 N Y Acad Sci* 2002; 982: 208-30.
35. Soffritti M, Belpoggi F, Minardi F, Maltoni C. Ramazzini Foundation cancer program: history and major projects, life-span carcinogenicity bioassay design, chemicals studied, and results. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 982: 26-45.

## Nuove prospettive nella prevenzione del carcinoma coloretale: lo screening delle lesioni precancerose mediante biopsia rettale e la chemioprevenzione con inibitori COX2

### *New prospects in the prevention of colorectal cancer: the screening for precancerous lesions by rectal biopsy and chemoprevention with COX2 inhibitors*

Salvatore Berretta\*, Filippo Catalano\*\*, Massimiliano Berretta\*\*\*, Emilia Barbagallo\*, Rossella Fisichella\*, Santo Bonanno\*

\* U.O. Clinica Chirurgica, Dipartimento di Chirurgia, Università degli Studi di Catania, Catania, Italia

\*\* Cattedra di Gastroenterologia, Università degli Studi di Catania, Catania, Italia

\*\*\* Dottorato di Ricerca in Oncologia, Catania, Italia

#### Riassunto

Gli Autori riportano la loro esperienza sulla chemioprevenzione del carcinoma coloretale mediante l'impiego degli inibitori COX2. Le persone sono state selezionate mediante la biopsia rettale al fine di identificare quegli individui con lesioni mucose precancerose (aumentata proliferazione delle cellule epiteliali nelle cripte ghiandolari della mucosa). Infatti le lesioni tumorali si sviluppano in un'area circoscritta del colonretto, ma l'intero grosso intestino risulta a rischio di crescita neoplastica, sicché la mucosa rettale è adatta allo scopo di ricercare lo stato iperproliferativo della mucosa. I risultati preliminari offrono incoraggianti prospettive che le lesioni premaligne possano regredire con la somministrazione degli inibitori COX2, ma solo studi clinici a lungo termine e randomizzati potranno confermare il ruolo di un siffatto trattamento per la chemioprevenzione del carcinoma coloretale. Eur. J. Oncol., 9 (2), 103-106, 2004

**Parole chiave:** carcinoma coloretale, chemioprevenzione, screening

#### Introduzione

Nei paesi industrializzati l'incidenza del carcinoma coloretale è al secondo posto, in ordine di frequenza, dopo il carcinoma del polmone; esso rappresenta la seconda causa di mortalità per cancro dopo i 50 anni, costituendo pertanto un rilevante problema sociale e di sanità pubblica. Le linee guida per la prevenzione secondaria di questo tumore sono codificate ma, in considerazione dei dati epidemiologici sulla sopravvivenza, continua ad essere

#### Summary

The authors report their experience on the chemoprevention of colorectal cancer with COX2 inhibitors. The people were selected by means of rectal biopsy in order to identify those with histologic precancerous mucosal lesions (increased proliferation of cryptic colonic epithelial cells). In point of fact, neoplastic lesions develop in a limited area of the colon-rectum, but the entire large bowel may be at risk for tumoural growth, so the rectal mucosa is suitable for the screening of hyperproliferative mucosal status. Preliminary results offer encouraging evidence that the premalignant epithelial proliferation can be reversed by the administration of COX2 inhibitors, but only long-term, randomised, clinical trials will be able to confirm the rôle of this treatment for colorectal cancer chemoprevention. Eur. J. Oncol., 9 (2), 103-106, 2004

**Key words:** colorectal cancer, chemoprevention, screening

pressante l'esigenza di potenziare le metodiche di screening e di realizzare la prevenzione primaria di suddetta neoplasia, al fine di migliorarne la prognosi. La possibilità di diagnosticare precocemente il carcinoma coloretale consente di eseguire un trattamento oncologicamente curativo: la sopravvivenza globale a 5 anni oscilla infatti intorno al 40%, ma aumenta fino all'80-90% nei casi diagnosticati in stadio iniziale (Dukes A).

Il colonretto è uno degli organi meglio studiati dal punto di vista della carcinogenesi, vuoi perché facilmente accessibile alle indagini di screening, vuoi perché la morbilità neoplastica a questo livello è molto alta. Le acquisizioni in merito sono il frutto di studi multidisciplinari, epidemiologici, clinici e di biologia molecolare.

Received/Pervenuto 30.1.2004 - Accepted/Accettato 29.3.2004  
Address/Indirizzo: Prof. Salvatore Berretta, Via G. Simili 29, 95127 Catania, Italia - E-mail: salvatore.berretta@libero.it

La carcinogenesi colica è la risultante di un insieme di fattori, in parte noti (cancerogeni, acidi biliari secondari, disordini dell'assetto lipidico, alterazioni della flora microbica, ecc.), che agiscono in maniera multisequenziale e che, modificando il delicato equilibrio tra oncogeni ed oncosoppressori, inzializzano quelle modifiche a carico della mucosa che condurranno all'insorgenza del tumore: l'epitelio normale, sollecitato dai cancerogeni, aumenta l'attività proliferativa (inizialmente nel fondo delle cripte ghiandolari), prima a livello microscopico e poi in maniera clinicamente rilevabile come adenoma; le tappe successive sono l'insorgenza della displasia, del carcinoma in situ ed infine del carcinoma invasivo. "Multistep" è l'appropriato termine anglosassone che caratterizza appunto la sequenza iperplasia-displasia-cancro.

Nell'ottica di migliorare la prevenzione primaria e secondaria del carcinoma coloretale, abbiamo realizzato un progetto di ricerca con l'obiettivo di selezionare, tra alcune categorie di soggetti a rischio, quelli che presentavano un qualche elemento di rischio più specifico, basato su reperti obiettivi e morfologici; in particolare abbiamo ricercato la eventuale presenza di alterazioni proliferative della mucosa coloretale.

Il razionale del nostro progetto parte dal presupposto che la mucosa del retto si può considerare come lo specchio dello stato di salute di tutta la mucosa coloretale, sicché abbiamo praticato biopsie *at random* di questo tratto del tubo digerente in aggiunta alle altre indagini note; la metodica risponde ai criteri richiesti per un programma di screening, in quanto di facile esecuzione, non dispendiosa e realizzabile ambulatoriamente con scarso dispendio di tempo.

Lo stato iperproliferativo della mucosa rettale, cui ben si addice il termine di "mucosa attivata", è caratterizzato dalla comparsa di microadenomi e dall'ispessimento plurifocale dell'epitelio di rivestimento delle cripte della mucosa; queste alterazioni aumentano proporzionalmente al tempo di esposizione della mucosa coloretale alle sostanze cancerogene, come è stato dimostrato sperimentalmente da Bird nel 1987<sup>1</sup>. La mucosa coloretale attivata viene considerata il primo gradino della carcinogenesi colica, "*early step in the multistep process*", per dirla con le parole di Shpitz *et al*<sup>2</sup>.

Tra l'altro, agli inizi degli anni '90, sono stati identificati importanti eventi biochimico-molecolari implicati nella crescita e nella sopravvivenza delle cellule cancerose: è stata infatti scoperta una nuova classe di enzimi ciclo-ossigenasici, denominati COX2, che, a differenza degli enzimi COX1, intervengono nella biosintesi di prostaglandine sia ad azione pro-infiammatoria che pro-proliferativa<sup>3</sup>; sono enzimi regolatori chiave che intervengono nelle biosintesi delle prostaglandine mediante l'ossidazione dell'acido arachidonico<sup>4-6</sup>.

Una sovraespressione di prostaglandine e di enzimi COX2 è dimostrabile sia nei tessuti infiammatori che in molti tumori epiteliali umani, tra cui gli adenomi ed il carcinoma del colonretto, l'esofago di Barrett con displasia grave ed il carcinoma dell'esofago<sup>7-11</sup>. Una sovraespressione di enzimi COX2 tra l'altro è correlata al fenomeno della neoangiogenesi tumorale ed alla resistenza all'apoptosi<sup>12,13</sup>: con la mediazione degli enzimi COX2, viene stimolata la produzione della proteina denominata BCL2, il cui effetto è quello di agire in senso antiapoptotico; mentre viene ridotta quella della proteina denominata Cadherina E che viceversa agisce in senso proapoptotico<sup>14-16</sup>. Inoltre la PGE2 inibisce i linfociti ed i natural killers, abbassando così la sorveglianza immunitaria<sup>15</sup>. Da questi dati emerge un nesso tra infiammazione cronica e

carcinogenesi mediato per l'espressione della COX2<sup>17</sup>, ma soprattutto traspare il ruolo importante della COX2 nelle fasi salienti (promozione, crescita, invasività) dello sviluppo tumorale<sup>15, 18, 19</sup>.

Ciò premesso, nel presente lavoro riportiamo la nostra iniziale esperienza relativamente all'impiego della biopsia rettale nello screening di alcune categorie di soggetti a rischio per il carcinoma coloretale, al fine di individuare quelli che presentano segni istologici di iniziali lesioni mucose con significato precanceroso; questo sottogruppo, così selezionato, è stato avviato per un trattamento di chemioprevenzione a base di inibitori COX2.

## Materiali e metodi

Il criterio di eleggibilità da noi adottato per lo screening delle lesioni precancerose mediante biopsia del retto si è basato sul fattore età, assodato che dopo i 50 anni tutti i soggetti rientrano in una categoria di rischio generico per l'insorgenza del carcinoma coloretale; inoltre abbiamo esteso lo screening anche a soggetti di età compresa tra i 40-50 aa., purchè rientranti in una categoria di rischio intermedio per la presenza dei seguenti specifici fattori: familiarità per il carcinoma del colonretto, dello stomaco e della mammella, obesità, fumo, diabete in associazione a severi disordini dell'assetto lipidico, alimentazione abitudinaria ricca in grassi animali e priva di scorie, frutta e verdure. Abbiamo scartato dal nostro studio i soggetti che avevano eseguito nel corso degli ultimi due anni una terapia prolungata a base di FANS: diversi studi epidemiologici hanno infatti dimostrato una correlazione inversa tra incidenza di carcinoma coloretale ed il regolare impiego di farmaci anti-infiammatori non steroidei (NSAIDs), inclusa l'aspirina, che agiscono bloccando la tappa metabolica dell'ossigenazione dell'acido arachidonico, inibendo così la sintesi delle prostaglandine<sup>19-22</sup>; in altri termini, questa categoria di farmaci riduce statisticamente del 30-50% il rischio di insorgenza del carcinoma coloretale per l'effetto antiproliferativo sulla mucosa coloretale, sicché il programma di screening sarebbe stato falsato.

Inoltre abbiamo scartato i soggetti etichettabili ad alto rischio per uno dei seguenti motivi:

- pregresso adenoma villosa o pregresso carcinoma coloretale;
- malattia infiammatoria cronica intestinale che dura da oltre 10-15 anni;
- sindrome ereditaria non polipoide (Lynch tipo I e tipo II), poliposi adenomatosa familiare, sindromi di Gardner e di Turcot.

Dal mese di novembre 2001 all'aprile 2004 abbiamo sottoposto a screening 302 soggetti, dei quali:

- 202 a rischio generico per il fattore età;
- 72 a rischio intermedio (32 dei quali di età compresa tra i 40 ed i 50 anni);
- 13 con familiarità per carcinoma coloretale;
- 11 con familiarità per carcinoma della mammella;
- 4 con familiarità per carcinoma gastrico.

Mediante biopsie perendoscopiche a livello del retto, abbiamo selezionato il sottogruppo di soggetti con atteggiamenti iperproliferativi della mucosa ("attivata"); a questo punto, dopo avere espletato le ulteriori indagini diagnostiche rivolte ad esplorare tutta la mucosa coloretale, per escludere l'esistenza a monte di lesioni più avanzate, abbiamo sottoposto i suddetti soggetti ad un trattamento di chemioprevenzione a base di inibitori COX2 e con-



testualmente li abbiamo inseriti in un programma di sorveglianza più intenso (biopsie rettali ogni 4 mesi per il primo anno e successivamente ogni 6 mesi) per monitorare l'andamento delle lesioni istologiche.

## Risultati

Nei 302 soggetti sottoposti alle indagini di screening secondo il nostro progetto (biopsie rettali e pancolonscopia), in 29 di essi abbiamo riscontrato un atteggiamento iperproliferativo nel fondo delle cripte ghiandolari (mucosa rettale "attivata"), così articolati:

- in tre casi (uno dei quali con familiarità per carcinoma gastrico e l'altro con disordini dell'assetto lipidico) è stata riscontrata contestualmente la presenza di un carcinoma del colon (2 nel sigma, 1 nel retto), per cui si è proceduto con l'intervento chirurgico;
- in dieci casi è stata dimostrata la presenza sincrona di polipi adenomatosi a monte, sicchè, eseguita la polipectomia, i pazienti sono stati successivamente trattati secondo il protocollo della chemioprevenzione;
- nei rimanenti 16 casi non esistevano altre lesioni a monte, ma i soggetti rientravano nella categoria di rischio per età (7 casi) o di rischio intermedio (dieta ricca in grassi animali e povera in scorie), per cui anche questi hanno iniziato la chemioprevenzione.

Sui risultati è prematuro esprimere giudizi; in particolare, per valutare l'effetto della chemioprevenzione occorrono lunghi tempi di osservazione; solo in cinque casi, nei quali il trattamento è durato oltre 12 mesi, abbiamo constatato, rispetto ai primi riscontri istologici, la regressione delle alterazioni iperproliferative a carico delle cripte ghiandolari. I tre pazienti operati per carcinoma colorettales sono stati esclusi dal nostro studio, in quanto inviati per la chemioterapia adiuvante; i rimanenti casi sono tutt'ora oggetto di osservazione e follow-up da parte nostra.

## Discussione e conclusioni

Pur con i limiti dovuti al ristretto numero di casi e ad i tempi relativamente brevi di osservazione, riteniamo già da ora che il nostro progetto possa offrire delle prospettive aggiuntive nella prevenzione del carcinoma del colonretto, perché mira a selezionare un sottogruppo di soggetti con mucosa attivata dall'azione delle sostanze cancerogene. Questi soggetti, insieme a quelli con lesioni proliferative più avanzate (sottoposti a polipectomia endoscopica di polipi adenomatosi), oltre ad essere meritevoli di una sorveglianza più accurata, a nostro avviso sono i candidati ideali per un trattamento di chemioprevenzione. Anche i pazienti sottoposti a resezione oncologicamente radicale per cancro, una volta ultimato il protocollo terapeutico previsto, contestualmente al follow up possono divenire candidati per un simile trattamento in modo da prevenire l'insorgenza di un carcinoma metacrono.

Il riscontro, in 13 dei nostri casi, di segni istologici di mucosa rettale attivata contestualmente a lesioni proliferative mucose più avanzate (10 adenomi, 3 carcinomi), è in accordo con le osservazioni in merito presenti in letteratura, secondo cui la mucosa "attivata" è un fenomeno plurifocale, un substrato da cui si potranno sviluppare nel tempo uno o più adenomi o il cancro.

Sulla base di quanto riportato nella parte introduttiva, l'impiego degli inibitori COX2 è senz'altro più adatto e specifico in senso antiproliferativo, rispetto ai comuni FANS. Segnaliamo in tal senso che sono in corso dei trials internazionali che impiegano gli inibitori COX2 nella chemioprevenzione della poliposi adenomatosa familiare, i cui risultati preliminari sono stati favorevoli<sup>23-26</sup>.

In conclusione, questo nostro lavoro rimane uno studio di fattibilità, che dovrà richiedere ulteriori dati e conferme mediante una ricerca di tipo randomizzato; riteniamo comunque che la prevenzione primaria del carcinoma colorettales potrà migliorare adottando lo schema proposto dal nostro studio: biopsia rettale al fine dello screening delle lesioni precancerose e della selezione dei soggetti per la chemioprevenzione.

## Bibliografia

1. Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 1987; 37: 147-51.
2. Shpitz B, Hay K, Bruce WR, *et al.* Natural History of Aberrant Crypt Foci. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 763-7.
3. Kujubu DA, Fletcher BS, Vamum BC, *et al.* TIS 10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclo-oxygenase homologue. *Biol Chem* 1991; 266: 12866-72.
4. Wahle KW. Dietary regulation of essential fatty acid metabolism and membrane phospholipid composition. *Biochem Soc Trans* 1990; 18: 775-8.
5. Breyer MD, Hao C, Qi Z. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors and the Kidney. *Curr Opin Crit Care* 2001; 7 (6): 393-400.
6. Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2; 10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300 (2): 367-75.
7. Patrignani P, Panara MR, Sciulli MG, *et al.* Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by non steroidal anti-inflammatory drugs. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48: 623-31.
8. Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998; 104: 413-21.
9. Morris CD, Armstrong GR, Bigley G, *et al.* Cyclooxygenase-2 expression in the Barrett's Metaplasia-Dysplasia-Adenocarcinoma Sequence. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 990-6.
10. Kalgutkar AS, Zhao Z. Discovery and design of selective cyclooxygenase-2 inhibitors as non-ulcerogenic, anti-inflammatory drugs with potential utility as anti-cancer agents. *Curr Drug Targets* 2001; 2 (1): 79-106.
11. Rex DK. Screening for colon cancer and evaluation of chemoprevention with coxibs. *J Pain Symptom Manage* 2002; 23 (suppl 4): 41-50.
12. Chan TA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. *Lancet Oncol* 2002; 3 (3): 166-74.
13. Aotake T, Lu CD, Chiba Y, *et al.* Changes in angiogenesis and tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 1999; 5 (1): 135-42.
14. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, *et al.* Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994; 107: 3569.
15. Eschwege P, Deledinghen V, Camilli T, *et al.* La cyclo-oxygenase-2 : nouvelle cible dans le traitement des cancers epitheliaux. *Presse Med* 2001; 30: 507-17.
16. Hartwich A, Konturek SJ, Zuchowicz M, *et al.* Helicobacter pylory infection, gastrin, cyclooxygenase-2 and apoptosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7 (5): 1246-50.
17. Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 1990; 76: 655-63.
18. Dang CT, Shapiro CL, Hudis CA. Potential role of selective COX-2 inhibitors in cancer management. *Oncology (Huntingt)* 2002; 16 (5 suppl 4): 30-6.



19. Reddy BS, Rao CV. Novel approaches for colon cancer prevention by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002; 21 (2): 155-64.
20. Goke MN. COX-2- independent antiproliferative action of acetylsalicylic acid in human colon cancer cells. *Eur J Clin Invest* 2002; 32 (11): 793-6.
21. Yu HG, Huang JA, Yang YN. The effects of acetylsalicylic acid on proliferation, apoptosis and invasion of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cells. *Eur J Clin Invest* 2002; 32 (11): 838-47.
22. Bernstein CN, Eaden J, Steinhart AH, *et al.* Cancer prevention in inflammatory bowel disease and the chemoprophylactic potential of 5-aminosalicylic acid. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8 (5): 356-61.
23. Ricciardiello L, Roda E, Bazzoli F. Chemoprevention in colorectal neoplasias: what is practical and feasible? *Dig Dis* 2002; 20 (1): 70-2.
24. Kawamori T, Wakabayashi K. COX-2 and prostanoid receptors: good targets for chemoprevention. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002; 21 (2): 149-53.
25. Giardiello FM, Yang VW, Hylind LM, *et al.* Primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis with sulindac. *N Engl J Med* 2002; 346 (14): 1054-9.
26. Bresalier RS. Primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis with sulindac: more questions than answers. *Gastroenterology* 2002; 123 (1): 379-81.

## Ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE) in the treatment of small cell lung cancer: a cooperative multicentre study

### *Ifosfamide, carboplatino ed etoposide (ICE) nel trattamento del microcitoma polmonare: studio cooperativo multicentrico*

Virginio Filipazzi<sup>1</sup>, Elena Piazza<sup>1</sup>, Maria Teresa Cattaneo<sup>1</sup>, Isa Luciano<sup>3</sup>, Benedetto Rho<sup>6</sup>, Gianfranco Pavia<sup>4</sup>, Maria Grazia Corradini<sup>5</sup>, Giovanni Casalini<sup>7</sup>, Massimiliano Maruzzi<sup>2</sup>, Anna Gambaro<sup>1</sup>, Nicoletta Tosca<sup>1</sup>, Delfino Legnani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Oncology, "L. Sacco" Hospital, Milan, Italy

<sup>2</sup>Thoracic/Chest Department, "L. Sacco" Hospital, Milan, Italy

<sup>3</sup>Department of Oncology, Hospital of Gorgonzola (MI), Italy

<sup>4</sup>Department of Oncology, "S. Carlo" Hospital, Paderno (MI), Italy

<sup>5</sup>Department of Oncology, "Salvini" Hospital, Rho (MI), Italy

<sup>6</sup>Thoracic/Chest Department, "Salvini" Hospital, Garbagnate (MI), Italy

<sup>7</sup>Department of Medicine, Hospital of Manerbio (BS), Italy

#### Summary

**Background.** Carboplatin and etoposide are given as standard chemotherapy regimen in small cell lung cancer (SCLC) and the addition of ifosfamide to this combination has been a logical step to improve their effectiveness. The authors describe their experience with an ICE schedule in SCLC patients. **Patients and methods.** One hundred and eight patients, 48 with limited disease (LD) and 60 with extensive disease (ED), were treated according to the following schedule: ifosfamide 1.6 g/m<sup>2</sup> days 1-3 + carboplatin 300 mg/m<sup>2</sup> day 1 + etoposide 100 mg/m<sup>2</sup> days 1-3 for 4 cycles every 28 days, followed by radiation therapy for LD patients. **Results.** In 100 evaluable patients we recorded 16 (37%) complete responses (CR) and 23 (53%) partial responses (PR) in LD patients, and 11 (20%) CR and 25 (44%) of PR in the ED ones. Dose intensity was 70% of that scheduled, and the main toxicity (grade 3-4 WHO) was haematological, of which 35% neutropenia, 15% anaemia and 10% thrombocytopenia. The median survival time was 22 months for LD and 11 months for ED, while the 2 year survival rate was 44% in LD patients and 15% in ED. **Conclusions.** The ICE regimen confirmed its efficacy and tolerability, and the schedule adopted showed good dose intensity without high-grade toxicity. Eur. J. Oncol., 9 (2), 107-110, 2004

**Key words:** chemotherapy, small cell lung cancer, ICE regimen

#### Riassunto

**Finalità.** L'associazione chemioterapica carboplatino ed etoposide è considerata lo standard di trattamento del microcitoma polmonare (small cell lung cancer-SCLC). L'aggiunta della ifosfamide è un passaggio logico per aumentarne l'efficacia. Gli autori descrivono la loro esperienza con lo schema ICE nei pazienti con SCLC. **Pazienti e metodi.** Centootto pazienti, 48 con malattie limitata (LD) e 60 con malattia estesa (ED), sono stati trattati con lo schema ICE: ifosfamide 1,6 g/m<sup>2</sup> gg 1-3, etoposide 100 mg/m<sup>2</sup> gg 1-3 e carboplatino 300 mg/m<sup>2</sup> g 1, ogni 4 settimane per 4 cicli, seguiti da radioterapia per i LD. **Risultati.** Su cento pazienti valutabili sono state osservate 16 (37%) risposte complete, 23 (53%) risposte parziali mentre per ED 11 (20%) risposte complete e 25 (44%) risposte parziali. L'intensità di dose somministrata è stata il 70 % di quella programmata e le tossicità principali (grado 3-4 WHO) sono state ematologiche, con 35% di neutropenia, 15 % di anemia e 10 % di piastrinopenia. La sopravvivenza mediana è stata di 22 mesi per LD e 11 mesi per ED, mentre la sopravvivenza a 2 anni è stata del 44% per LD e del 15% per ED. **Conclusioni.** Lo schema ICE conferma la sua efficacia e tollerabilità, e la schedula prescelta consente una buona intensità di dose senza tossicità di alto grado. Eur. J. Oncol., 9 (2), 107-110, 2004

**Parole chiave:** chemioterapia, microcitoma polmonare, schema ICE

Received/Pervenuto 2.1.2004 - Accepted/Accettato 20.2.2004

Address/Indirizzo: Dr. Virginio Filipazzi, U.O. Oncologia Medica, Ospedale "L. Sacco", Via G.B. Grassi 74, 20147 Milano, Italia

Tel: 0039/02/39042492 - Fax:0039/02/39042509

E-mail: doc.gino@libero.it

## Introduction

Lung cancer is the main cancer-related cause of death. In 2000 it accounted for over one million deaths worldwide, while an increasing number of new cases is diagnosed every year, especially among women<sup>1</sup>. Today a minority of patients survive for over one year after diagnosis and less than 15% for 5 years. Small cell lung cancer (SCLC) accounts for 20-25% of all new cases of lung cancer.

At diagnosis 40% of subjects show limited disease (LD), i.e. disease confined to the thorax area; the remaining 60% of patients already have one or more sites of metastasis at the time of diagnosis, involving liver, bone, brain or bone marrow (extensive disease, ED). With chemotherapy plus radiotherapy and the use of prophylactic brain irradiation (PBI), the median survival of LD patients is 18 months and up to 20% of them may survive for over 2 years, while without treatment the median survival is only 6-12 weeks. With combination chemotherapy the median survival of ED patients is 7-9 months and few (if any) patients live more than 2 years<sup>2</sup>. Twenty years of clinical trials on such patients actually improved survival by two months only.

The current standard chemotherapy regimen encompasses etoposide plus cisplatin or carboplatin. If performed for 4-6 cycles this schedule is probably the most effective and tolerable treatment for SCLC, as reported in a recent metanalysis<sup>3</sup>, whereby in 36 randomized trials between 1980 and 1998 the association etoposide + cisplatin boosted the survival rate.

The addition of ifosfamide to a carboplatin-etoposide combination has been a logical step, since it can be given safely in high dose infusion in association with mesna, to prevent drug-induced uro-toxicity; it is furthermore extremely effective against SCLC, both alone and in combination with either etoposide or carboplatin<sup>4,5</sup>. Smith *et al* in 1990 recorded around 100% of response with high-grade toxicity in ICE chemotherapy, but these results did not lead to a longer responses duration or survival<sup>6</sup>.

We report our experience with modified dosage of ICE combination given to a large group of SCLC patients in order to evaluate both its effectiveness and tolerability.

## Patients and methods

This study takes into account a number of new cases of SCLC diagnosed in Northern Milan hospitals between 1996 and 2000, chosen according to the following inclusion criteria: cytologically or histologically confirmed SCLC, age under 70 years, LD or ED, no prior radiotherapy or chemotherapy, measurable lesions, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status 0-2 and adequate organ functions. Tumour staging was based on the results of total body CT scan, fiberoptic bronchoscopy (possibly with biopsy), bone scan and bone marrow aspiration to assess possible infiltration. Exclusion criteria were: infection, uncontrolled diabetes and heart, kidney or liver failure. The patients signed informed consent forms, were treated as outpatients and were given the ICE regimen according to the following schedule: ifosfamide 1.6 g/m<sup>2</sup> days 1-3 iv in 500 ml dextrose solution + carboplatin 300 mg/m<sup>2</sup> iv in 250 ml saline solution day 1 and etoposide 100 mg/m<sup>2</sup> iv in 250 ml saline solution days 1-3. Four cycles were planned every 28 days. Uroprotection by mesna was given at 1600 mg iv *tris in die* (TID) or orally in double dose; as

antiemetic drugs ondansetron 8 mg iv + metoclopramide 20 mg iv days 1-3 plus dexamethasone 8 mg only day 1 were used. Tumour response was evaluated according to WHO criteria<sup>7</sup> through a total body CT scan after 4 cycles of treatment. LD patients in complete response (CR), partial response (PR) or stable disease (SD) underwent radiotherapy (RT) of the chest. ED patients in CR, PR or SD completed 6 cycles of chemotherapy and then underwent follow-up. Second line chemotherapy was an option at the relapse of disease. For CR patients the use of PBI was recommended and in selected patients the surgical option was considered.

The goals were to assess the response rate in LD and ED patients, to record median survival time and to evaluate the toxicity and tolerability of this regimen.

Survival was recorded from diagnostic data and evaluated by the Kaplan-Meyer method.

## Results

We enrolled 108 patients (79 male and 29 female), 48 LD and 60 ED. Metastasis sites were: bone 16, node 18, liver 18, brain 14, adrenal glands 9, lung 6, bone marrow 8, pleural effusion 6, skin 6 and multiple sites 24. ECOG performance status was 0 in 66 patients, 1 in 27 patients and 2 in 15 patients, mean age 57 years (40-70). Only one hundred patients (43 LD and 57 ED) were eligible for response because 8 patients did not complete the schedule treatment on account of toxicity, early death or progression of disease.

The eligible patients' characteristics are shown in Table 1. A total of 489 cycles of chemotherapy with a median of 4.8 for any patient (range 4-6) were performed. Thirty patients had to put off treatment because of neutropenia and dose intensity was 70% of that scheduled. Thirty-nine LD patients underwent chest radiotherapy (RT), with 50 Gy in fractionated dose, and 20 ED patients underwent palliative RT for bone and brain involvement.

PBI was performed in 11 CR patients with 30 Gy whole brain irradiation, while 6 patients underwent radical surgical resection after chemotherapy (5 lobectomies and 1 pneumonectomy).

After 4 courses of chemotherapy (CT), progression of disease was recorded in 17 patients (17%) (1 LD and 16 ED) while SD was recorded in 8 patients (8%). For LD patients an overall re-

**Table 1** - Patients' characteristics

Number		108
Assessable for toxicity		108
Assessable for response		100
Sex (M/F)		79 / 29
Mean age (range)		57 years (40 - 70)
PS (ECOG)	0	66
	1	27
	2	15
Stage	LD	48
	ED	60

sponse rate of 90% was achieved with a 37% of CR, the median time to progression (mTTP) was 12 months (range 4-24), the median survival time (MST) was 22 months and the 2-year survival rate was 44% (20/43).

For ED patients an overall response rate of 63% was obtained, with a 20% of CR, the mTTP was 6 months (range 3-18), the MST was 11 months and the 2-year survival rate was 15%.

The overall response rate of all patients was 75%, with 27% of CR; the median survival time was 13 months and 2-year survival rate was 30%. The results are shown in Table 2.

The overall survival rate at three years was 12% (2 ED + 10 LD); 8 patients are still alive but only 6 are disease-free and 4 of them (66%) have undergone resection. The survival times are shown in fig. 1. The sites of recurrence recorded in CR patients were: central nervous system 8 (2 after PBI), liver 4, bone 6 and node 3. The toxicity shown in Table 3 was moderate, only 5 pa-

tients (5%) did not complete scheduled treatment due to severe toxicity. The main toxicity (grade 3-4) was haematological, with 35% of neutropenia treated by granulocyte-colony stimulating factors, 15% of anaemia treated with epoetin alpha and 10% of thrombocytopenia. All patients experienced reversible alopecia, while other side effects, such as sporadic pneumonia, mucositis and emesis, were noticed. Only one treatment-related death was recorded in an ED patient with respiratory failure, pneumonia and sepsis after the second cycle of CT. A decrease of PS was recorded during the treatment, but only in patients showing disease progression. Second-line chemotherapy, based on cisplatin combination, anthracyclines or topoisomerase inhibitors, was performed in 48 patients with a partial response rate of around 40%.

## Discussion

Combination chemotherapy is the cornerstone of SCLC treatment. With the use of CT, the survival outcome of SCLC patients is now four or five times the rate of those who are given no therapy. Thoracic irradiation and PBI are a valuable addition in selected patients. In rare circumstances, upfront surgery may still play a rôle in the management of patients with very limited disease (stage I-II)<sup>8</sup>. The chemotherapy regimens most widely used include: cisplatin or carboplatin and etoposide (PE), cyclophosphamide, doxorubicin and vincristine (CAV), ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE), while according to recent metaanalyses the regimens with three or more drugs do not seem to offer any advantage versus standard doublets<sup>9</sup>.

Combination chemotherapy with ICE was developed from the significant single agent activity and the marked efficacy of two-drug combination<sup>10</sup>. High dose ICE is also used in several studies with bone marrow transplantation to overcome drug resistance and eradicate minimal residual disease<sup>11</sup>.

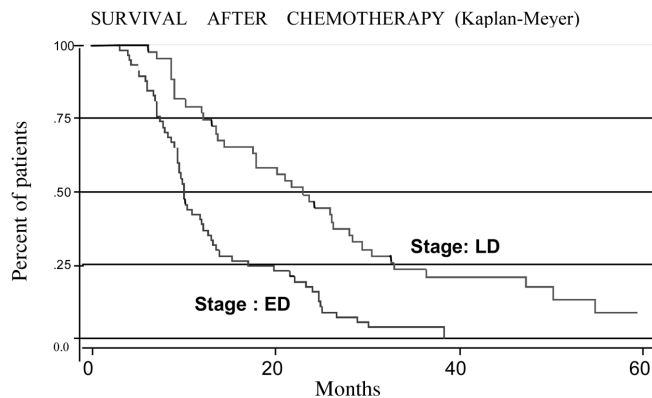
In a 1990 study, Smith *et al*<sup>6</sup> administered carboplatin 400 mg/m<sup>2</sup> iv day 1 + etoposide 100 mg/m<sup>2</sup> iv days 1-3 and ifosfamide 5 g/m<sup>2</sup> as 24 hours infusion with mesna day 1, on a small group of patients and recorded an over 90% response rate (RR), with median survival time of 19 months for LD and 9.5 months for ED, while the 2-year survival rate was 24% and 14% respectively. Haematological toxicity was described as severe in 100% of patients, with 2 deaths due to toxicity (7%) and 72% of patients requiring dose reduction.

The myelosuppressive effect of these drugs often requires close monitoring and supportive care. Our schedule, with different drug doses, shows the highest efficacy in granting survival, with top tolerability results; the use of haemopoietic growth factors improves the dose intensity by as much as 70% and ameliorates the management of side effects, with only one treatment-related death. This chemotherapy schedule should be administered only by physicians experienced in avoiding and managing drug-related toxicity, because of the potential risk of major morbidity and occasionally of mortality.

A major problem is that of the resistance to chemotherapeutic agents that cannot be ascribed to the MDR1 gene only. After several courses of CT, SCLC cells gain strength by a selection process that results in the growth of resistant cells, where resistance may be either natural or attributable to spontaneous or drug-induced mutations. Many *in vitro* cells showed smaller drug

**Table 2** - Results after 4 cycles of chemotherapy

Stage	N.	CR (%)	PR (%)	SD (%)	PD (%)	MST (months)	2 year survival (%)
LD	43	16 (37)	23 (53)	3 (8)	1 (2)	22	44
ED	57	11 (20)	25 (44)	5 (9)	16 (28)	11	15
Total	100	27 (27)	48 (48)	8 (8)	17 (17)	13	30



**Fig. 1.** Survival by stage.

**Table 3** - Toxicity (WHO)

Side effects	Grade 3 N. pts. (%)	Grade 4 N. pts. (%)
Alopecia	100 (92.5)	-
Neutropenia	27 (25.0)	11 (10.1)
Anemia	10 (9.2)	7 (6.3)
Thrombocytopenia	7 (6.3)	4 (3.7)
Stomatitis	8 (7.4)	1 (0.9)
Neurologic	2 (1.8)	-
Emesis	5 (4.6)	-
Cystitis	2 (1.8)	-
Liver dysfunction	2 (1.8)	-
Constipation	1 (0.9)	-
Infections	3 (2.7)	1 (0.9)
Hypotension	1 (0.9)	-

amounts or were inactivated by cell detoxification systems<sup>12</sup>. New agents and strategies such as nitroimidazole compounds are under evaluation in order to enhance the effectiveness of chemotherapeutic drugs. It is possible to associate etanidazole to ICE chemotherapy, as demonstrated in the phase I study, without other toxicity-induced symptoms<sup>13</sup>.

As for RT, many studies seem to suggest that the early administration of thoracic radiotherapy (TRT) concurrently with PE chemotherapy might be the treatment of choice<sup>14</sup>. In our experience, RT was performed sequentially after CT with 50 Gy in fractionated dose and our data are similar to those reported in the literature regarding most toxic regimens such as V-ICE +XRT<sup>15</sup>.

PBI should now be considered a part of standard treatment in CR patients<sup>16</sup>. The brain was assumed to be a pharmacological sanctuary where sub-clinical metastases were protected from cytotoxic drugs by the blood-brain barrier<sup>17</sup>. In several studies a significantly reduced risk of intracranial tumour spread was observed with PBI. However, a non-significant impact of PBI on survival was recorded in all studies and only complete responders in the LD stage could have any survival benefit from PBI. In our LD patients PBIs were performed in only 11 of 16 CR patients, because the others refused the therapy for fear of the risk of cognitive side effects. We recorded metastases in the brain of 18 subjects but only in 2 of them after PBI.

The selection criteria for potential surgical candidates usually exclude patients with such adverse prognostic factors as bulky disease, superior vena cava syndrome and pleural effusion. CT followed by surgery led to higher survival rates as compared to CT+RT. Such positive results, not surprisingly, were found in patients with no malignant cells in the surgical specimen. Pathologic complete response ranged from 4 to 37%, but at present there is no justification for surgical resection of SCLC after chemotherapy outside the context of a clinical trial<sup>18</sup>.

In our group, surgical options were chosen in 6 young (< 50 years), CR patients. In two cases (33%) no residual disease was detected in the surgical specimen, whereas in the other 4 a mix of SCLC and adenocarcinoma cells was found, which confirms that SCLC is often associated to non-small cell lung cancer. All the resected patients recorded an overall survival of more than 24 months and 4 are still alive and disease-free. The overall survival rate of our group of patients is within the range reported in the literature but, against a rapidly-dividing tumour like SCLC, the administration of chemotherapy at shortened intervals may also be a rational approach.

This strategy will be next targeted by our cooperative study group on SCLC treatment.

## References

1. Grenlee RT, Murray T, Buldea S., *et al.* Cancer statistics 2000. *Cancer J Clin* 2000; 50: 12-3.
2. Ardizzoni A, Grossi F. Update on treatment of small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2000; 11: 101-8.
3. Mascaux C, Paesmans M, Berghmans T, *et al.* A systematic review of the role of etoposide and cisplatin in the chemotherapy of small cell lung cancer with methodology assessment and meta-analysis. *Lung Cancer* 2000; 30: 23-36.
4. Ettinger DS. Overview of ifosfamide in small cell lung cancer. *Semin Oncol* 1992; 19: 59-67.
5. Loehrer PJ, Ansar R, Gonin G, *et al.* Cisplatin plus etoposide with and without ifosfamide in extensive small cell lung cancer: a Hoosier oncology group study. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2594-9.
6. Smith IE, Perren SA, Ashley J, *et al.* Carboplatin, etoposide and ifosfamide as intensive chemotherapy for small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1990; 8: 899-905.
7. Millar AB, Hoogstraten B, Staquet M, *et al.* Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981; 47: 207-14.
8. Livingston RB, Moore TN, Heibrun L, *et al.* Small cell carcinoma of the lung. Combined chemotherapy and radiation. A southwest oncology group study. *Ann Intern Med* 1978; 88: 194-9.
9. Chute JP, Chen T, Feigal E, *et al.* Twenty years of phase III trials for patients with extensive-stage small cell lung cancer: perceptible progress. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1794-801.
10. Tatcher N. Ifosfamide/Carboplatin/Etoposide (ICE) regimen in small cell lung cancer. *Lung cancer* 1993; 9: 51-67.
11. Woll PJ, Tatcher N, Lomax L, *et al.* Use of hematopoietic progenitors in whole blood to support dose dense chemotherapy: a randomized phase II trial in small cell lung cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19: 712-9.
12. Sajio N. Molecular mechanism of drug resistance of lung cancer. *Lung cancer* 1994; 11 suppl 1: 205-6.
13. Strauss L, Shulman BA, Teicher N, *et al.* ICE chemotherapy with dose escalation of the drug resistance modulator etanidazole for advanced lung cancer. *Lung cancer* 1994; 11 suppl 1: 475.
14. Murray N, Coy P, Pater JL, *et al.* The importance of timing for thoracic irradiation in the combined modality treatment of limited stage small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11: 336-44.
15. Anderson H, Burt P, Stout R, *et al.* V-ICE for small cell lung cancer: 5 years results. *Lung cancer* 1994; 11 suppl 1: 674.
16. Auperin A, Arriagada R, Pignon JP, *et al.* Prophylactic cranial irradiation for patients with small cell lung cancer in complete remission. *N Eng J Med* 1999; 341: 476-84.
17. Brewster AE, Hopwood P, Burt PA, *et al.* Single fraction prophylactic cranial irradiation for small cell lung cancer of the lung. *Radiother Oncol* 1995; 34: 132-6.
18. Shepard FA. Surgical treatment of SCLC. In Pass HI, Mitchell J, Turrisi AT. *Lung cancer: principle and practice*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999; 899.



## Anatomo-clinical contribution to the knowledge of the angiomatous meningiomas and the haemangiopericytomas of the arachnoid

### *Contributo anatomo-clinico alla conoscenza dei meningiomi angiomatosi e degli emangiopericitomi dell'aracnoide*

Luigi Cuccurullo\*, Franca Ferraraccio\*, Marina Accardo\*, Giuseppina Iorio\*\*, Fernando A. Cioffi\*\*

\* Department of Morphopathology, II University, Naples, Italy

\*\* Department of Neurosurgery, II University, Naples, Italy

#### Summary

**Aim.** The haemangiopericytoma of the meninges is nowadays considered an anatomo-clinical entity with its own autonomous nosographical outline, quite different from that of meningiomas. Its identification may present some difficulties at the anatomo-clinical level, because it may be wrongly diagnosed as angiomatous meningioma. To dispel any doubt it is necessary to apply immunohistochemistry and electron microscopy methods in addition to histology. Considering these problems and other questions mentioned in the literature, the authors present a contribution to the present knowledge of meningeal haemangiopericytoma and trace the outline of its diagnostics, which is different from that of angiomatous meningiomas. **Materials and methods.** The authors present 6 cases of haemangiopericytoma and 14 cases of angiomatous meningioma. Methods of histology (haematoxylin-eosin, V. Gieson, PAS, Mallory, Gömori), immunohistochemistry (keratin, CEA, MIB-1, vimentin, laminin, smooth muscle-actin, CD34, CD31) and transmission electron microscopy have been applied. **Results.** The antigenic expressivity, shown by immunohistochemistry, and the ultrastructural outline give differential data which are useful in distinguishing the haemangiopericytoma of the meninges from the angiomatous meningioma. **Conclusions.** Through a careful integration of the above-mentioned methods, the authors are able to outline the differences between the two histotypes; they conclude, however that it is not possible to obtain a completely reliable differential diagnosis. Eur. J. Oncol., 9 (2), 111-116, 2004

**Key words:** angiomatous meningioma, haemangiopericytoma, desmosomes, intermediate filaments

#### Riassunto

**Finalità.** L'emangiopericitoma delle meningi è considerato attualmente un'entità anatomo-clinica con un proprio autonomo profilo nosografico, ben distinto da quello dei meningiomi. La sua identificazione può presentare difficoltà sul piano anatomo-clinico, poiché può essere erroneamente diagnosticato come meningioma angiomatoso. Per evitare incertezze è indispensabile applicare, oltre all'istologia, metodiche di immunostochimica e di microscopia elettronica. Gli Autori, tenuto conto di tale problematica e di quanto è riportato in letteratura, hanno creduto opportuno dare un contributo alla conoscenza degli emangiopericitomi delle meningi e tracciare il profilo della loro diagnostica differenziale rispetto ai meningiomi angiomatosi. **Materiale e metodi.** Gli Autori presentano 6 casi di emangiopericitomi delle meningi e 14 casi di meningiomi angiomatosi. Sono stati utilizzati metodi di istologia (ematossilina-eosina, V. Gieson, PAS, Mallory, Gömori), metodi di immunostochimica (citocheratina, CEA, MIB-1, vimentina, laminina, actina-muscolo liscio, CD34, CD31) e metodi di microscopia elettronica a trasmissione. **Risultati.** L'espressività antigenica rivelata mediante immunostochimica ed il profilo ultrastrutturale forniscono dati differenziali utili per distinguere gli emangiopericitomi delle meningi dai meningiomi angiomatosi. **Conclusioni.** Attraverso una ragionata integrazione dei suddetti metodi, gli Autori hanno potuto delineare differenze tra i due istotipi; nello stesso tempo, hanno condiviso l'assunto che è impossibile pervenire ad una diagnosi differenziale di assoluta certezza. Eur. J. Oncol., 9 (2), 111-116, 2004

**Parole chiave:** meningioma angiomatoso, emangiopericitoma, desmosomi, filamenti intermedi



## Introduction

The latest classification of cerebral tumours place the meningeal haemangiopericytoma (HPC) in a group different from that of angiomatous meningiomas. This distinction is justified because of the existence of different anatomico-clinical characteristics<sup>1,2</sup>; as a matter of fact, the meningeal HPC is aggressive, easily relapsing and may determine extra-cranial metastases<sup>3-5</sup>, on the contrary angiomatous meningioma has a slow growth and presents clinical-prognostic characteristics of benignity.

They also have a different histogenesis: while the HPC derive from pericytes, meningiomas originate from the cells covering the arachnoid<sup>6,7</sup>.

It is upon this basis that meningeal HPC is nowadays considered an anatomico-clinical entity, with its own autonomous nosographical outline, and is thus treated by the authors as a subject separate from meningioma. Although this distinction is very clear and evident on theoretical and systematic bases, it is more difficult to attain from the point of view of the diagnostic plan, because of the difficult and complex procedures which must be taken into account<sup>8-11</sup>. To this end, it would be necessary to integrate the methods of histology with those of immunohistochemistry and electron microscopy. Only with a logical application of such procedures is it possible to avoid the risk of underestimating the HPC by making a diagnosis of angiomatous meningioma based on clinical as well as radiological and histological evaluations<sup>4,5,11-13</sup>.

As well as histology it is necessary to use immunohistochemistry to trace the outline of HPC antigenic expressivity and compare it with that of angiomatous meningiomas; it will appear different, but above all it will emerge that the cells of HPC do not present that double store of epithelial and mesenchymal antigens, that is pathognomonic of meningoendothelial cells. Further data of differentiation may be obtained from ultrastructural observations; with electron microscopy it is possible to prove that some cytoplasmic characteristics (desmosomes, interdigitations, intermediate filaments), usually found in mature meningoendothelial cells, are completely absent in HPC cells. Further possible doubts in the above mentioned procedures of differential diagnosis, may depend on the fact that HPC cells are lacking in specific structures or antigens, so they are identifiable from their aspecific quality. On the other hand, clinical and instrumental diagnostics do not always present univocal differential aspects.

Nevertheless the biological behaviour of meningiomas appears extremely different to that of HPC, because they very frequently relapse and can originate intra-extra cranial metastases, whereas meningiomas are characterized by biologically benign lesions<sup>14-16</sup>.

Image diagnostics can only offer some of the presumptive elements which differentiate meningiomas from HPC.

Therefore at CT the lack of calcifications and the presence of a narrow dural plan can indicate the presence of an HPC<sup>16</sup>. MR seldom diagnoses a HPC, showing the presence of many flowvoids; on the contrary they show an haematic flow through meningeal and cortical vessels, with 1, 2 or 3 main vessels which originate little corkscrew vessels and an homogeneous persistent blush. Angiography provides a greater probability of detecting the presence of an HPC.

In some highly specialized centres further aspects, useful for a differential diagnosis, can be deduced by PET and [<sup>1</sup>H] magnetic resonance spectroscopy (MRS).

By PET, in fact, the HPC show a considerably increased up-

take of [<sup>11</sup>C]MET and a decrease in the utilization of the [<sup>11</sup>C]Glu, contrary to meningiomas, which show an increase in the utilization of the [<sup>11</sup>C]Glu.

Very recently [<sup>1</sup>H]MRS has offered the possibility of showing exclusively in the HPC a peak at 3.56 ppm due to the level of myoinositol.

The evident difficulties of a differential diagnosis between the two above-mentioned histotypes, together with the undeniable methodological and interpretative limits, have suggested to the authors a re-evaluation of the personal cases of HPC in order to compare them with the cases of angiomatous meningiomas.

## Materials and methods

This study deals with the analysis of 14 cases of angiomatous meningiomas and 6 cases of HPC of the meninges.

The cases were tested by histology, immunohistochemistry and transmission electron microscopy.

### Histology

The following methods were applied: haematoxylin-eosin, V. Gieson, PAS, Mallory's trichrome, silver impregnation according to Gömori.

### Immunohistochemistry

The following antigens were marked with monoclonal antibodies, after Stenberg's method: cytokeratin, CEA, MIB-1, vimentin, CD34, CD31, laminin, smooth muscle actin.

### Transmission electron microscopy

Fragments were drawn from the above mentioned surgical specimens; after fixation in buffered paraformaldehyde pH 7.2, they were embedded in Epon; afterwards thin and then ultrathin sections were prepared, and stained with uranyl acetate and lead citrate.

## Results

### Angiomatous meningiomas

The whole architecture of the neoplasm is characterized by a medium-density meningoendothelial tissue, permeated by a conspicuous number of vessels; they appear to be more numerous than the meningoendothelial ones in a lot of areas. They are thin, well structured and have more demarcated walls than the surrounding tissues; they are frequently thickened by hyaline material intramural deposits.

By observing thin sections, it is possible to notice that seemingly compact areas occupied only by thickened meningoendothelial cells are actually the seat of numerous small, sprouting capillaries or capillaries with adhering walls. The structural complexity of these vessels depends on their diameter, but they are all covered by an endless line of endothelia and are provided with a basal membrane.

The meningoendothelial cells are of medium size and in mutual contact, they present indistinct cellular boundaries, a large

quantity of slightly acidophil cytoplasm and a spheroidal nucleus.

The results obtained by marking the antigens present in the vessels and in the meningoendothelial cells are shown in Table 1.

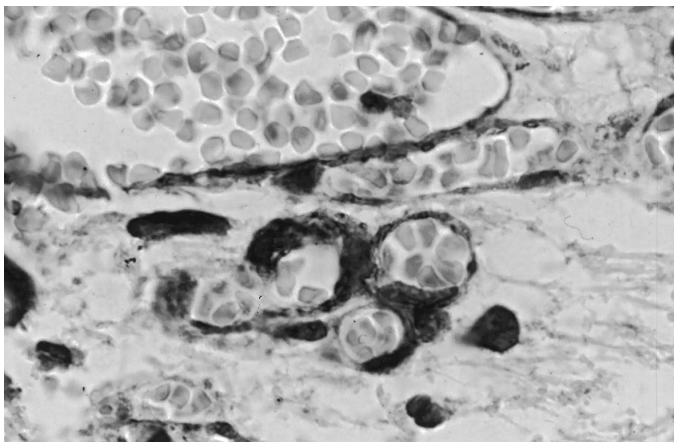
The antigenic expressivity follows the hyperexpressivity of the CD34 antigen due to endothelia and the smooth muscle-actin due to pericytes (figs. 1- 3).

The meningoendothelial population has been identified with certainty by means of the double antigenic patrimony: epithelial and mesenchymal. In no cases have we noticed any positivity to MIB-1 nuclear antigen.

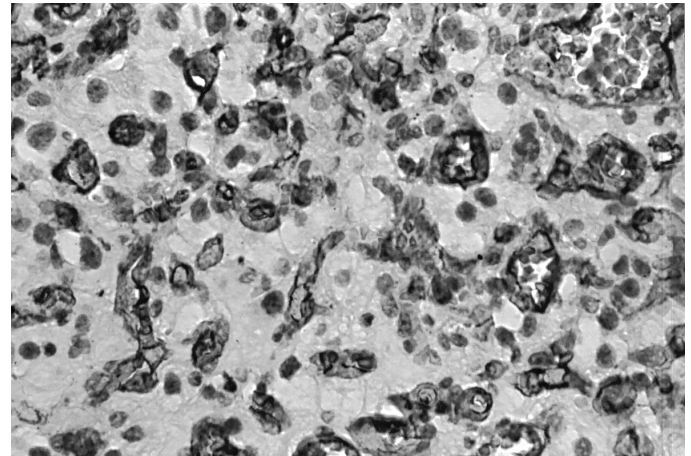
At transmission electron microscopy, the meningoendothelial part is represented by medium size cells with cytoplasmic extensions; they are arranged in such a way as to form images of interdigitation with the adjacent cells; the cells are very close together and joined by many desmosomes. Their cytoplasm is well-developed, full of organules and intermediate filaments. The capillaries are well structured, and are provided with an evident basal membrane and covered by a continuous endothelial line; these cells are globose, so that they stretch out the lumen. These elements have almost always a large cytoplasmic halo provided with numerous organules and pinocytosis vesicles. They are seldom reported in proliferating endothelia capillaries with pseudostratified arrangement (Table 2) (figs. 4-5).

**Table 1** - Immunohistochemistry marking

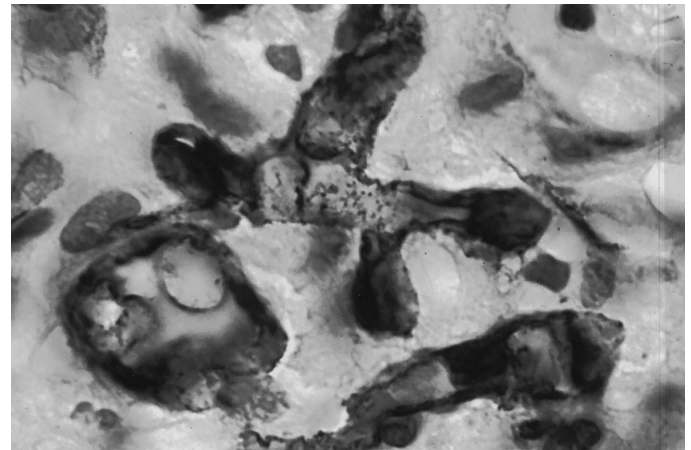
Marker	Angiomatous meningioma	Haemangiopericytoma of arachnoid
Vimentin	++	+-
Smooth muscle-actin	+	+
Laminin	-	+
Collagen IV	-	+
Rec. RE, RP	++	-
Factor VIII	+	-
Cea	+	-
CD34	+	-
CD31	+	-
VCAM	+	-
Ki67	-	+
S-100	+	-
GFAP	-	-
Keratin	+	-
EMA	+	-



**Fig. 1.** Angiomatous meningioma. The basal membrane of the vessels appears well demarcated. Laminin, 400x.



**Fig. 2.** Angiomatous meningioma. Little vessels with projecting, hypertrophic and endothelia well evidenced by this marking. CD34, 100x.



**Fig. 3.** Angiomatous meningioma. Little vessels surrounded by some positive pericytes for the smooth muscle actin. Smooth muscle actin, 630x.

**Table 2** - Ultrastructural aspects

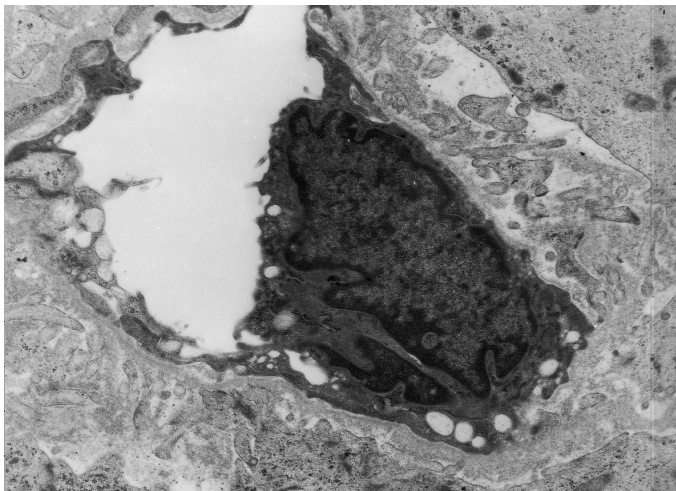
	Angiomatous meningiomas	Haemangiopericytoma of arachnoid
Interdigitations	+	-
Junctional structure	+	-
Intermediate filaments	++	+
Hyperplastic-hypertrophic endothelia	+	-
Basal membrane-like matter	+	-

*HPC of meninges*

The whole architecture of the neoplasm appears compact and uniform. It is the result of cords and cellular beams differently oriented and in mutual contact; they are crossed by many small vessels and virtual lumen capillaries. The cells are medium size, have an ovoid or round shape, and are in mutual contact; this cellular population is characterized by a delicate fibrillar network.

The muff-like arrangement around vessels and capillaries is very evident in many fields.





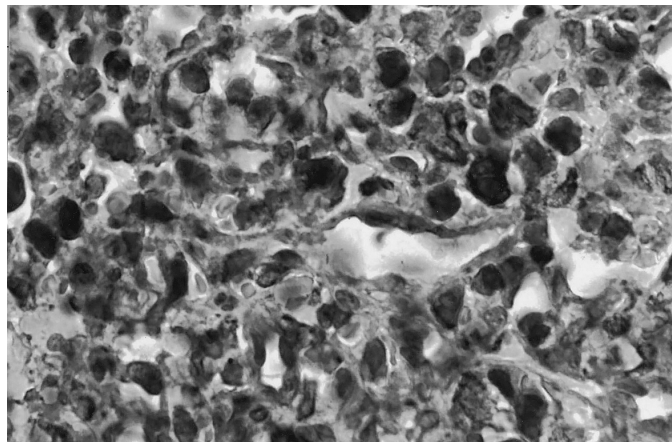
**Fig. 4.** Angiomatous meningioma. Capillary covered by hyperplastic endothelium. The meningoendothelial cells lean on the external surfaces by means of cytoplasmic prolongations. TEM, 4000x.



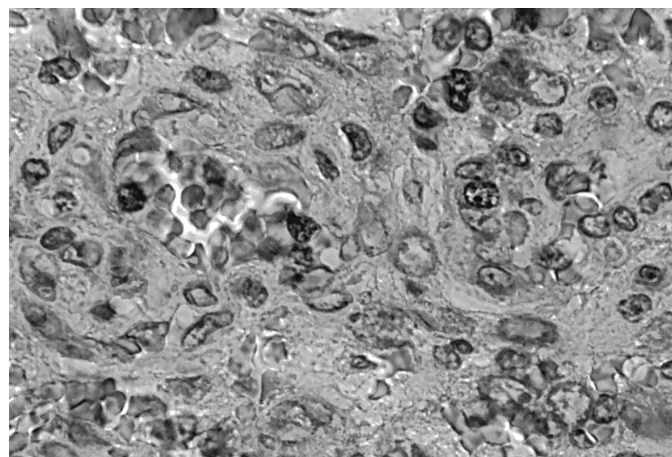
**Fig. 5.** Angiomatous meningioma. Capillary covered by pseudostratified endothelia. TEM, 4000x.

The vessels are well structured, covered with thin, flattened endothelia, and demarcated by a basal membrane; they are, and this is particularly the case of the capillaries, compressed, adherent and provided with a virtual lumen in areas with high cellular density or proliferations. The most important characteristics of the antigenic outline of the haemangiopericytomas examined are those of a considerable positivity to vimentin (fig. 7) and a clear and diffused negativity to epithelial antigens; the marked positivity of endothelial cells to CD34 and the positivity of haemangiopericyte cells to the smooth muscle-actin are reported here as minor characteristics. We have emphasized, by marking, the positivity to the nuclear MIB-1 antigen as being symptomatic of proliferative activity (Table 1) (fig. 6).

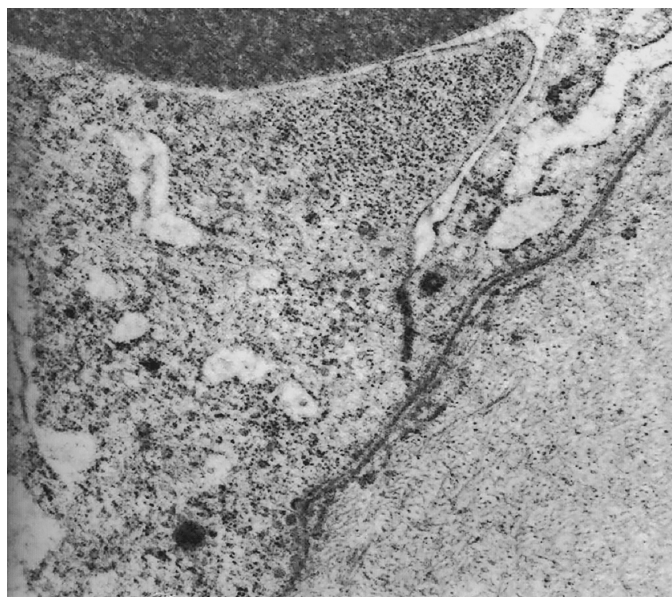
It is possible to prove by ultrastructural analysis that the cells of the cases examined are in mutual contact or are separated by amorphous and slightly electrondense material with thin strips.



**Fig. 6.** Haemangiopericytoma. Some nuclei result positive to the marking. Ki67 (MIB-1), 400 x.



**Fig. 7.** Haemangiopericytoma. The cytoplasm of many cells appears positively marked. Vimentin, 100x.



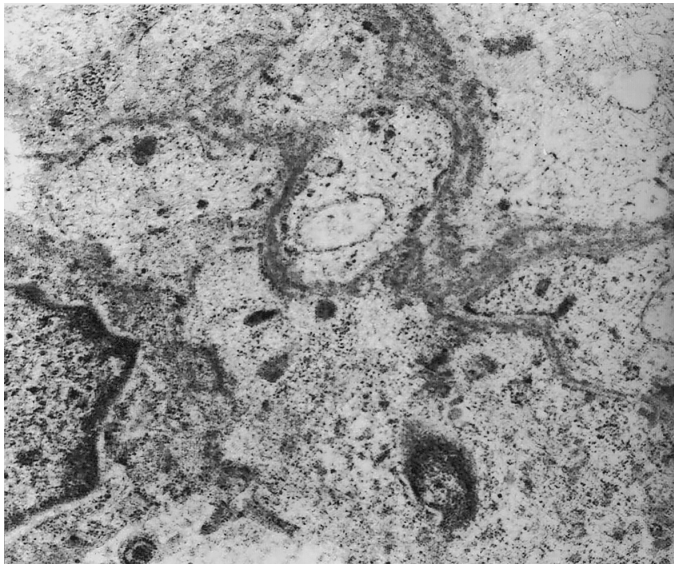
**Fig. 8.** Haemangiopericytoma. Haemangiopericytes placed in mutual contact. The cellular surfaces are smooth. TEM, 8000x.



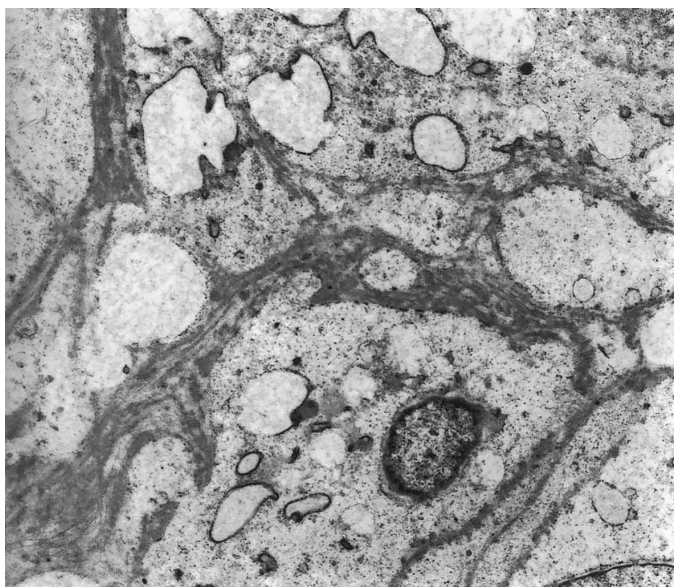
These elements are arranged in a circle around vessels, and their cellular body lies directly on the external surface of the vessels. Their cytoplasm is full of organules and also contains intermediate filaments, little bunches, and pynocytotic vesicles (Table 2).

These cells differ from the meningothelial ones because they present a smooth surface, without extension; they are in mutual contact but with no cohesion with the intercellular junction (fig. 8).

The vessels are well structured, covered with an endless line of laminar endothelia, lying on a well adapted basal membrane. Close behind the vessels and in the intercellular space one can find strias or deposits of amorphous material with ultrastructural characteristics similar to those of the basal membrane (figs 9a, b).



**Fig. 9a.** Haemangiopericytoma. Haemangiopericytes in mutual contact with the amorphous material in the intercellular spaces. TEM, 8000x.



**Fig. 9b.** Haemangiopericytoma. Haemangiopericytes in mutual contact without interdigitations. TEM, 8000x

## Conclusions

The antigenic expressivity, shown by immunohistochemistry, and the ultrastructural outline give differential data which are useful in distinguishing the HPC of the meninges from the angiomatous meningiomas.

The absence of epithelia and receptorial antigens in the HPCs is a noteworthy characteristic, because these antigens are clearly evident in angiomatous meningiomas. A minor characteristic that makes it difficult to identify HPC is the fact that these tumours have no antigenic pathognomic pattern which is easily recognisable<sup>12-17</sup>.

The differential diagnosis between these tumours and the angiomatous meningiomas lies, in short, in the absence of antigens in HPC, that are usually present in meningiomas. The same datum may be found at the ultrastructural level: the pericyte cells have no specific sub-cellular characteristic: they differ from the meningiomatous ones for the absence of desmosomes, cytoplasmic extensions and interdigitation.

Consequently, the differential diagnosis between the two histotypes may not be represented by a clear division, but by an uneven, segmented and often confused line. From an operative point of view it would be better to avoid a comparison based on the partial results of separate methodologies, thereby running the risk of attaining ambiguous, uncertain or even diverging responses. It is more effective to make a single comparison based on the global evaluation of results, in order to attain a definite judgement.

Some cases are mentioned in the literature, in which the diagnostic distinction presents considerable signs of uncertainty.

Robinson *et al*<sup>18</sup> have shown the presence of vessels covered by a muff of pericytes (pericytosis), in a specific case series of angiomatous meningioma.

Perry *et al*<sup>7</sup> have underlined the presence of epithelial antigens in HPC.

Nitte *et al*<sup>19</sup> have demonstrated that the amorphous, basal membrane-like matter, distributed in the intercellular space of HPC, can also be found in meningiomas.

Lastly one must remember that the cytoplasmic interdigitation, clearly evident in typical syncytial meningiomas, may be absent in the atypical or malignant forms, in which the meningoendothelial cells present a smooth surface, without interdigitation.

## References

1. Moss TH. Immunohistochemical characteristics of haemangiopericytoma meningioma: comparison with typical meningiomas, haemangioblastomas and haemangiopericytomas from extracranial sites. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1987; 13 (6): 467-80.
2. Torp SH, Lindboe CF, Granli US. Comparative investigation of proliferation markers and their prognostic relevance in human meningiomas. *Clin Neuropathol* 2001; 20 (5): 190-5.
3. Hara M, Aoyagy M, Nagashima G, *et al*. Recurrence in meningeal haemangiopericytomas. *Surg Neurol* 1998; 50 (6): 586-91.
4. Bouvier-Labit C, Liprandi A, Piercecchi MD, *et al*. Contribution of immunohistochemistry and electron microscopy for the diagnosis of meningeal hemangiopericytomas. 15 case reports. *Ann Pathol* 2000; 20 (5): 492-8.
5. Prakasha B, Jacob R, Dawson A, *et al*. Haemangiopericytoma diagnosed from a metastasis 11 years after surgery for "atypical meningioma". *Br J Roentgenol* 2001; 74 (885): 856-8.

6. Theunissen PH, Debets-Te Baerts M, Blaauw G. Histogenesis of intracranial haemangiopericytoma and haemangioblastoma. An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* 1990; 80 (1): 68-71.
7. Perry A, Scheithauer BW, Nascimento AG. The immunophenotypic spectrum of meningeal hemangiopericytoma: a comparison with fibrous meningioma and solitary fibrous tumor of meninges. *Am J Surg Pathol* 1997; 21 (11): 1354-60.
8. Nunnery EW, Kahn LB, Reddich RL, *et al.* Hemangiopericytoma: a light microscopic and ultrastructure study. *Cancer* 1981; 47 (5): 906-14.
9. Dietzmann K, von Bassanyi P, Warich-Kirches M, *et al.* Immunohistochemical detection of vascular growth factor in angiomatous and atypical meningiomas, as well as haemangiopericytomas. *Pathol Res Pract* 1997; 193 (7): 503-10.
10. Kroh H, Figols J, Sobieray A. Intracranial haemangiopericytomas. Histological and immunohistochemical study. *Folia Neuropathol* 1997; 35 (2): 121-7.
11. Kowalski PJ, Paulino AF. Proliferation index as a prognostic marker in haemangiopericytoma of the head and neck. *Head Neck* 2001; 23 (6): 492-6.
12. Winek RR, Scheithauer BW, Wick MR. Meningioma, meningeal hemangiopericytoma (angioblastic meningioma), peripheral hemangiopericytoma, and acoustic schwannoma. A comparative immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 1989; 13 (4): 251-6.
13. Probst-Cousin S, Bergmann N, Schroder R, *et al.* Ki67 and biological behaviour in meningeal haemangiopericytomas. *Histopathology* 1996; 29 (1): 57-61.
14. Barba I, Moreno A, Martinez-Perez I, *et al.* Magnetic resonance spectroscopy of brain hemangiopericytomas: high myoinositol concentrations and discriminations from meningiomas. *J Neurosurg* 2001; 94: 55-60.
15. Huang TY. Intracranial hemangiopericytoma: diagnosis, treatment and outcome. *Chinese Medical Journal (Taipei)* 2002; 65 (7): 305-6.
16. Tsou HK, Wang YC, Yang DY, *et al.* Intra-extracranial hemangiopericytoma: clinical manifestations, histopathological features, diagnosis, treatment, and outcomes. *Chinese Medical Journal (Taipei)* 2002; 65: 314-9.
17. Iwaki T, Fukui M, Takeshita I, *et al.* Hemangiopericytoma of the meninges: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Clin Neuropathol* 1988; 7 (3): 93-9.
18. Robinson JC, Challa VR, Jones DS, *et al.* Pericytosis and edema generation: a unique clinicopathological variant of meningioma. *Neurosurgery* 1996; 39 (4):700-7 (discussion 706-7).
19. Nitta H, Yamashita T, Yamashita J, *et al.* An ultrastructural and immunohistochemical study of extracellular matrix in meningiomas. *Histol Histopathol* 1990; 5 (3): 267-74.

## La chirurgia radioguidata nel carcinoma papillare della tiroide: identificazione del linfonodo sentinella

### *Radio-guided surgery in papillary thyroid cancer: identification of sentinel lymph node*

Renato Palmeri, Cesare Lorenzini, Giuseppinella Melita, Giuseppe Currò, Paolo Melita

U.O.C. di Chirurgia Generale e Mininvasiva, D.A.I. di Scienze Chirurgiche, Dipartimento di Patologia Umana, Università degli Studi di Messina, Messina, Italia

#### Riassunto

Gli Autori considerano che, nel trattamento del carcinoma papillare della tiroide, è ancora fonte di dibattito se sia indicata o meno una linfadenectomia di principio. Per poter meglio studiare la malattia e selezionare i pazienti che potrebbero trarre beneficio da una dissezione linfonodale estesa, valutano l'attendibilità del linfonodo sentinella (LS) nella stadiazione del carcinoma papillare della tiroide e verificano la realizzabilità ed affidabilità di una chirurgia tiroidea radioguidata. In uno studio preliminare, gli Autori sottopongono a mappaggio del linfonodo sentinella 6 pazienti con carcinoma papillare della tiroide. In due casi il LS era positivo ed in un solo caso su due si associava ad altri linfonodi positivi. Nei tre casi con LS negativo anche gli altri linfonodi erano negativi. Gli Autori concludono che lo studio del LS è fondamentale per una corretta stadiazione della malattia e che può guidare il chirurgo nella scelta dell'opzione terapeutica più appropriata. Eur. J. Oncol., 9 (2), 117-119, 2004

**Parole chiave:** chirurgia radioguidata, carcinoma papillare della tiroide, linfonodo sentinella

#### Introduzione

Il carcinoma papillare della tiroide è un tumore ben differenziato di origine epiteliale che metastatizza comunemente ai linfonodi latero-cervicali.

Noguchi *et al*<sup>1</sup> riferiscono che il 70% dei pazienti con carcinoma papillare, nei quali è stata eseguita una linfadenectomia cervicale bilaterale, presentano metastasi linfonodali.

#### Summary

The authors consider the lymph nodes dissection for papillary thyroid cancer to be still a matter of debate. In order to properly study the disease and to select patients who could obtain an advantage from an extensive lymphadenectomy, the authors evaluate the reliability of the sentinel lymph node (SLN) in the staging of papillary thyroid cancer and verify the feasibility and efficacy of radio-guided thyroid surgery. In a preliminary study the authors perform a lymphatic mapping in 6 patients with papillary thyroid cancer. In two cases the SLN was positive and in one case out of two it was associated with other positive lymph nodes. In the three cases with negative SLN also the other lymph nodes were negative. The authors, in conclusion, believe that SLN is important for the correct staging of the disease and can direct the surgeon in the choice of the best treatment. Eur. J. Oncol., 9 (2), 117-119, 2004

**Key words:** radio-guided surgery, papillary thyroid cancer, sentinel lymph node

Il trattamento di scelta prevede una tiroidectomia totale o subtotale, una radioterapia metabolica post-operatoria con <sup>131</sup>I ed una terapia sostitutiva con ormoni tiroidei (l-tiroxina)<sup>2</sup>.

Considerata l'evoluzione favorevole che tali tumori presentano, se di piccole dimensioni e soprattutto nei pazienti di età inferiore ai 45 anni, risulta ancora fonte di dibattito se sia indicata o meno una dissezione linfonodale e quanto questa debba essere estesa<sup>1,2</sup>.

Diversi Autori, tra i quali Kelemen *et al*<sup>3</sup>, hanno applicato il concetto di linfonodo sentinella (LS) al carcinoma papillare della tiroide, al fine di poter meglio stadiazione la malattia ed individuare quel gruppo di pazienti ad alto rischio di recidiva che trarrebbe sicuro beneficio da una estesa dissezione linfonodale.

Received/Pervenuto 29.3.2004 - Accepted/Accettato 8.4.2004

Address/Indirizzo: Prof. Renato Palmeri, Via P. Umberto Compl. "Le Terrazze" sc. 2, 98121 Messina, Italia



La maggior parte dei lavori presenti in letteratura, riguardo l'individuazione del LS nel carcinoma papillare della tiroide, descrive l'utilizzo di coloranti vitali come il Patent Blu che consentono, nelle diverse serie, la localizzazione del LS solo nel 50-60% dei casi a causa dell'elevata velocità di migrazione del colorante lungo la catena linfatica<sup>4</sup>.

Catarci *et al*<sup>5</sup> hanno descritto per la prima volta l'utilizzo combinato di coloranti vitali e nanocolloidi radiomarcanti con Tc99m, dimostrando come questi siano in grado di identificare il LS nell'83% dei casi.

Scopo del nostro studio è valutare l'attendibilità del LS nella stadiazione del carcinoma papillare della tiroide e verificare la realizzabilità ed affidabilità di una chirurgia tiroidea radioguidata con la prospettiva di limitare, in futuro, la dissezione linfonodale solo ai casi con LS positivo, evitando di esporre i pazienti a basso rischio di recidiva ad un maggiore ed inutile rischio operatorio derivante dalla dissezione stessa.

## Pazienti e metodo

Dal gennaio 2001 al luglio 2003 abbiamo sottoposto a mappaggio del linfonodo sentinella 6 pazienti con carcinoma papillare della tiroide, diagnosticato preoperatoriamente tramite biopsia con agoaspirato (FNAB).

Criteri di inclusione nello studio erano la presenza di una neoplasia >1 cm di diametro e l'assenza di linfonodi apprezzabili clinicamente o ecograficamente. Tutti i pazienti sono stati informati sullo scopo del nostro studio ed hanno dato il loro consenso scritto.

In tutti i casi era indicato l'intervento chirurgico di tiroidectomia totale con dissezione linfonodale del compartimento centrale e giugulare omolaterale. Abbiamo proceduto all'individuazione e rimozione del linfonodo sentinella prima di eseguire la tiroidectomia e la dissezione linfonodale estesa.

Tre ore prima dell'intervento chirurgico il paziente è stato sottoposto ad iniezione intratumorale eco-guidata di 0,1 ml di un nanocolloide marcato con Tc99m (Nanocoll<sup>TM</sup>, Sorin Biomedica). Il dosaggio medio totale di tracciante iniettato è stato di 30 MBq. Subito dopo l'iniezione è stata eseguita una scintigrafia con gamma camera, al fine di visualizzare la neoplasia ed il suo drenaggio linfatico. In seguito il paziente è stato portato in sala operatoria per essere sottoposto in anestesia generale all'intervento programmato.

Individuata la lesione primitiva, abbiamo iniettato, direttamente nel tumore, un colorante vitale (Patent Blu) alla concentrazione di 0,1 ml/cm<sup>2</sup> al fine di facilitare l'individuazione del LS. Si è proceduto quindi alla mobilizzazione della tiroide e usando una sonda gamma rivelatrice portatile si è localizzato il primo linfonodo drenante la neoplasia (linfonodo sentinella, LS), che è stato asportato ed inviato per esame istologico separatamente. E' stata poi completata la tiroidectomia con dissezione linfonodale estesa del compartimento centrale e giugulare omolaterale. Al termine dell'intervento, prima di chiudere la cute, si è proceduto a controllo del campo operatorio con la sonda gamma rivelatrice portatile al fine di valutare la presenza di radioattività residua.

Tutti i linfonodi, inviati per esame istologico, sono stati valutati previa colorazione con ematossilina-eosina ed osservati al microscopio ottico. Inoltre si è proceduto ad esame immunohisto-

mico per la citocheratina 7 (CK-7) per l'individuazione delle micrometastasi.

## Risultati

L'utilizzo combinato intraoperatorio di un colorante vitale (Patent Blu) e di un nanocolloide marcato con Tc99m (Nanocoll<sup>TM</sup>) ha consentito l'individuazione di 1-2 linfonodi sentinella in cinque su sei pazienti (83% dei casi). In un caso si è assistito ad una rapida migrazione del tracciante radioattivo dalla ghiandola e ciò ha impedito la localizzazione del LS con la sonda gamma rivelatrice. In nessun caso alla fine dell'intervento si è rilevata radioattività residua sul campo operatorio. In tutti e sei i casi è stata confermata la diagnosi istologica di carcinoma papillare della tiroide. In tre casi il LS era negativo, in due casi era positivo. Nei tre casi con LS negativo anche gli altri linfonodi asportati dal comparto centrale e giugulare omolaterale sono risultati negativi. In uno dei due casi con LS positivo gli altri linfonodi erano positivi, mentre nell'altro caso sono risultati negativi.

## Discussione

Nonostante nel carcinoma papillare della tiroide le metastasi linfonodali sembrano avere un significato prognostico meno importante rispetto ad altre variabili come età del paziente, dimensioni del tumore e presenza di metastasi a distanza, recenti lavori dimostrano che, analizzando i pazienti per gruppi omogenei, i tassi di recidiva e la sopravvivenza a lungo termine sono statisticamente correlati allo stato linfonodale. Si è visto infatti che a differenza dei pazienti a basso rischio, nei quali lo stato linfonodale non influenza la sopravvivenza a lungo termine, nei pazienti ad alto rischio (età >45 anni e tumore di grandi dimensioni) la positività dei linfonodi regionali rappresenta un ulteriore ed aggravante fattore prognostico negativo<sup>6</sup>.

Una recente revisione su un ampio numero di casi ha dimostrato come la linfoadenectomia sia in grado di prolungare la sopravvivenza a lungo termine in quest'ultimo gruppo di pazienti<sup>7</sup>.

La maggior parte degli Autori concorda che linfonodi clinicamente o ecograficamente aumentati di volume in pazienti con carcinoma papillare sono altamente predittivi per metastasi linfonodali e senza alcun dubbio vanno asportati al momento dell'intervento. Anche i linfonodi clinicamente indenni ma con micrometastasi dovrebbero essere rimossi, ma purtroppo non è facile una loro identificazione preoperatoria ed è irrealizzabile l'esecuzione di un esame estemporaneo su tutti i linfonodi del collo<sup>8</sup>. Ecco perchè rimane tutt'oggi controverso quale sia il miglior trattamento dei linfonodi apparentemente indenni da malattia: linfoadenectomia del compartimento centrale e giugulare omolaterale profilattica o astensione da qualsiasi trattamento? Noi riteniamo errato seguire indiscriminatamente l'una o l'altra via.

Nel primo caso si sottoporrebbero tutti i pazienti a linfoadenectomia, ma se si stima che il 15% circa dei pazienti con carcinoma papillare ha in ogni caso linfonodi negativi, esporremmo questi ad un maggior rischio operatorio senza alcun significato. Nel secondo caso, invece, se consideriamo che nell'85% dei casi i linfonodi clinicamente indenni mostrano all'esame istologico la presenza di micrometastasi occulte, non avremmo trattato in modo radicale la neoplasia.

L'individuazione del primo linfonodo drenante il tumore si propone come soluzione al problema in quanto consente di stadare accuratamente la malattia. La metodica ha mostrato affidabilità già in altri campi dell'oncologia come nel melanoma e nel carcinoma della mammella<sup>9</sup>.

Nel carcinoma papillare della tiroide è stato localizzato il LS con l'uso di coloranti vitali che presentano, però, il grosso limite di migrare velocemente lungo la catena linfatica. Catarci *et al*, utilizzando un colorante vitale ed un nanocolloide, hanno ottenuto buoni risultati dimostrando la realizzabilità della metodica con una correlazione positiva tra stato linfonodale e LS nella quasi totalità dei casi<sup>5,10</sup>.

Nel nostro studio abbiamo identificato il LS con metodica combinata (colorante+nanocolloide radiomarcato) ed eseguito una dissezione linfonodale in tutti e sei i pazienti. In due casi il LS era positivo ed in un solo caso su due si associava ad altri linfonodi positivi. Tutti e tre i casi con LS negativo hanno mostrato anche gli altri linfonodi negativi. La correlazione positiva tra LS negativo e gli altri linfonodi è stata del 100%.

### Conclusioni

In presenza di linfonodi clinicamente indenni non sembra giustificato eseguire una linfadenectomia in modo indiscriminato in tutti i pazienti con carcinoma papillare della tiroide.

Lo studio del LS è fondamentale per una corretta stadiazione di malattia e può guidare il chirurgo nella scelta dell'opzione terapeutica più appropriata sul singolo paziente.

Riteniamo che solo i pazienti con LS positivo debbano essere sottoposti a linfadenectomia estesa.

Stiamo programmando uno studio multicentrico al fine di verificare l'attendibilità del LS e la sua correlazione con lo stato linfonodale nei pazienti con carcinoma papillare ad alto rischio di recidiva.

Sono necessari, ovviamente, un maggior numero di pazienti ed un maggior numero di anni di follow up a conferma di questo nostro studio preliminare.

### Bibliografia

1. Noguchi M, Kumaki T, Taniya T, *et al*. Bilateral cervical lymph node metastases in well-differentiated thyroid cancer. *Arch Surg* 1990; 125: 804-6.
2. Cady B. Presidential address: beyond risk groups-a new look at differentiated thyroid cancer. *Surgery* 1998; 124: 947-57.
3. Kelemen PR, Van Herle AJ, Giuliano AE. Sentinel lymphadenectomy in thyroid malignant neoplasms. *Arch Surg* 1998; 133: 288-92.
4. Rettenbacher L, Sungler P, Gmeiner D, *et al*. Detecting the sentinel lymph node in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med* 2000; 27: 1399-401.
5. Catarci M, Zaraca F, Angeloni R, *et al*. Preoperative lymphoscintigraphy and sentinel lymph node biopsy in papillary thyroid cancer. A pilot study. *J Surg Oncol* 2001; 77: 21-4.
6. Sanders LE, Cady B. Differentiated thyroid cancer. Reexamination of risk group and outcome of treatment. *Arch Surg* 1998; 133: 419-25.
7. Noguchi S, Nobuo M, Yamashita H, *et al*. Papillary thyroid carcinoma. Modified radical neck dissection improves prognosis. *Arch Surg* 1998; 133: 276-80.
8. Krag D. Minimal access surgery for staging regional lymph nodes: the sentinel-node concept. *Curr Probl Surg* 1998; 35: 950-1014.
9. Schraffordt Koops H, Doting E, de Vries J, *et al*. Sentinel node biopsy as a surgical staging method for solid cancers. *Radiother Oncol* 1999; 51: 1-7.
10. Arch-Ferrer J, Velazquez D, Fajardo R, *et al*. Accuracy of sentinel lymph node in papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 2001; 130: 907-913.



## Melanoma maligno gastrointestinale primitivo. Un caso clinico

### *Primary gastrointestinal malignant melanoma. A case report*

Giuliano Urciuoli, Katia De Rocco, Giovanni Fasano, Antonello Casaletto, Maria Teresa Rossi, Andrea Morlino  
Dipartimento Chirurgico, Azienda Ospedaliera "Ospedale S. Carlo", Potenza, Italia

#### Riassunto

Gli Autori presentano un caso di melanoma gastrointestinale primitivo. Il paziente da circa un anno lamentava sintomatologia dolorosa localizzata in fossa iliaca sinistra. L'ecografia dell'addome superiore evidenziava grossi linfonodi addominali; l'EGDS mostrava doppia ulcera gastrica sulla grande curva in prossimità dell'antro e duodenite erosiva bulbare; si eseguivano prelievi biotipici. La TAC dell'addome superiore evidenziava nel contesto mesenteriale la presenza di molteplici formazioni espansive dai profili netti e polilobulati, di verosimile natura linfoadenopatica; alla TAC della pelvi si osservava la presenza di nodulazione solida del diametro di circa 2,5 cm a sede retro-epivescicale; l'RX del colon mediante clisma opaco a doppio contrasto mostrava la presenza di diverticolosi del colon discendente. L'esame istologico delle biopsie gastriche era positivo per melanoma. Il paziente veniva sottoposto ad intervento chirurgico di omentogastrectomia totale e resezione ileale. L'esame istologico definitivo confermava la diagnosi di melanoma maligno pigmentato gastrico ed intestinale. Il paziente, dimesso chirurgicamente guarito, veniva affidato agli oncologi. Dopo circa tre mesi il paziente è deceduto. Eur. J. Oncol., 9 (2), 121-123, 2004

**Parole chiave:** melanoma gastrointestinale, omentogastrectomia, resezione ileale

#### Introduzione:

Gli autori, dopo l'osservazione ed il trattamento di un paziente maschio di 63 anni con un melanoma intestinale primitivo, analizzano i più importanti aspetti di questa patologia. Il melanoma maligno può presentarsi come lesione primitiva a carico della mu-

#### Summary

The authors present a case of primary malignant melanoma of the gastrointestinal tract. For about one year the patient had suffered from a painful symptomatology localized in the left iliac fossa. The ultrasound scan of the upper abdomen revealed large abdominal lymph nodes; the EGDS showed a double gastric ulcer on the great curve near the antrum and an erosive bulbar duodenitis; biopsy samples were taken. The TC scan of the upper abdomen showed, in the mesenteric context, the presence of multiple expansive lesions characterized by sharp and polylobulated borders of a probable lymphadenopathic origin. The TC scan of the pelvis showed the presence of solid nodules of about 2.5 cm in diameter located in the retro epivescical area, the Xr barium enema with double contrast of the colon revealed the presence of diverticulosis in the descending colon. The histological examination of the gastric biopsy was positive for melanoma. The patient underwent operation for complete omentumgastrectomy and ileal resection. The definite histological examination confirmed the diagnosis of gastric and intestinal pigmented malignant melanoma. The patient, once recovered from a surgical point of view, was discharged and entrusted to oncological care. After about three months the patient died. Eur. J. Oncol., 9 (2), 121-123, 2004

**Key words:** gastrointestinal melanoma, omentumgastrectomy, ileal resection

cosa digestiva. Si tratta di un tumore particolarmente raro ed estremamente aggressivo, associato ad una prognosi infausta. La distinzione tra melanoma gastrointestinale primitivo e metastatico può essere difficoltosa. Fa testo l'assenza di una primitività a carico della cute e dell'occhio e la mancata evidenza di lesioni metastatiche extraintestinali.

#### Caso clinico

Paziente di 63 anni di sesso maschile, ricoverato una prima volta circa otto mesi prima presso altro ospedale per sintomatologia dolorosa localizzata

Received/Pervenuto 2.10.2003 - Accepted/Accettato 10.1.2004  
Address/Indirizzo: Dr. Giuliano Urciuoli, U.O. Chirurgia Generale, Azienda Ospedaliera "Ospedale S. Carlo", Via P. Petrone, 85100 Potenza, Italia - Tel. 0039/0971/613513-612224-612226  
Fax. 0039/0971/612214 - E-mail: chirurgiauno.pz@tiscalinet.it

zato al quadrante inferiore sinistro dell'addome e diarrea. Dopo aver effettuato un esame Rx del colon mediante clisma opaco a doppio contrasto veniva dimesso con diagnosi di diverticolosi del colon discendente e relativa terapia medica. Non regredendo tale sintomatologia, giungeva alla nostra osservazione lamentando anche la presenza di melena. L'esame emocromocitometrico presentava i seguenti valori: GR: 3,79; GB: 10,40; HCT: 30,60; Proteine totali: 5,68; Albumina: 2,92. Venivano quindi eseguiti un'ecografia dell'addome superiore, un'esofagogastroduodenoscopia (EGDS) con biopsia gastrica, una TAC dell'addome superiore (fig. 1) e della pelvi ed un clisma opaco a doppio contrasto del colon, che ci permettevano di definire un quadro di melanoma intestinale diffuso; i markers tumorali erano nella norma. Per escludere l'origine del tumore da sede primitiva cutanea od oculare, il paziente veniva sottoposto a visita dermatologica ed oculistica che risultavano negative. Il paziente, pertanto, veniva sottoposto ad intervento di omentogastrectomia totale con anastomosi termino laterale con stapler nr. 21 e chiusura del moncone intestinale con GIA nr. 60. È stata eseguita un'anastomosi termino-laterale in duplice strato al piede dell'ansa, dopo resezione di un tratto di circa 20 cm interessato da grossa neof ormazione occludente il lume (figg. 2-4). Dimesso dopo circa 10 giorni, veniva inviato in reparto oncologico con l'esame istologico definitivo che confermava la presenza di melanoma maligno pigmentato a cellule epitelioidi, infiltrante a tutto spessore le pareti gastriche ed intestinali con metastasi linfonodali periviscerali.

Dopo circa tre mesi il paziente è deceduto.

## Discussione

Le neoplasie ileali sono molto rare, rappresentando l'1-2% dei tumori gastrointestinali. Molte di esse hanno origine metastatica. Il melanoma maligno è il più comune tumore metastatico del tratto gastrointestinale, mentre quello primitivo è molto raro ed è per questo che risulta difficile trovare casi riportati in letteratura.

Alcuni Autori sostengono che tali melanomi non sono mai primari ed altri cercano di dimostrarne l'eziologia. La più comune teoria sostiene che essi derivano dalle cellule del sistema APUD<sup>1-3</sup> e precisamente dalle cellule melanoblastiche della cresta neurale, che migrano a livello dell'ileo distale attraverso il canale onfalo-mesenterico<sup>2</sup>.

L'età d'insorgenza è di solito compresa tra la IV e VI decade di vita; il sesso maschile è quello più colpito (70%). I segni ed i sintomi più comuni sono rappresentati da vaghi dolori addominali, nausea, vomito e sanguinamenti cronici in forma di melena che raramente evolvono in gravi emorragie. Complicanze possono essere rappresentate da ostruzioni, intussuscezioni, diarrea, malassorbimento. La diagnosi precoce ed il trattamento chirurgico ga-



Fig. 1. TAC addome: presenza di molteplici formazioni espansive.



Fig. 2. Neoformazione melanomatosa occludente il lume di un'ansa ileale.

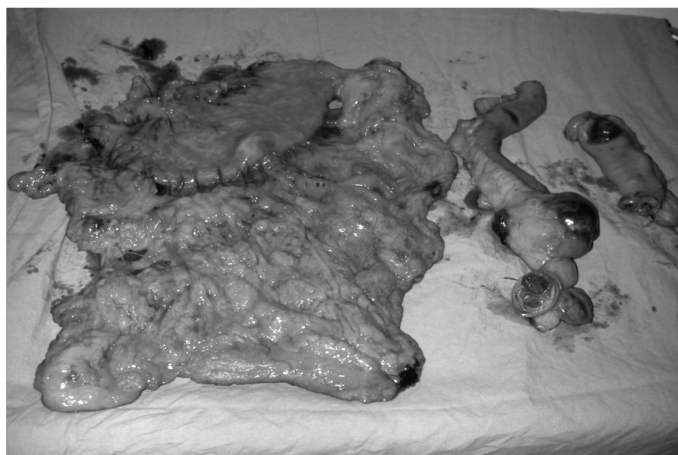


Fig. 3. Neoformazioni melanomatose diffuse a stomaco, omento ed anse ileali.



Fig. 4. Particolare di un'ansa ileale con evidenti disseminazioni melanomatose.

rantiscono le migliori opportunità per una efficace palliazione, ed in casi selezionati, per una buona sopravvivenza<sup>4</sup>.

### **Bibliografia**

1. Khosrwshahi E, Horvath W. Primary malignant melanoma of the small intestine. A case report. *Rontgenpraxis* 2002; 54 (6): 220-3.
2. Amar A, Jougon J, Edouard A, *et al.* Primary malignant melanoma of the small intestine. *Gastroenterol Clin Biol* 1992; 16 (4): 365-7.
3. Krausz MM, Ariel I, Behar AJ. Primary malignant melanoma of the small intestine and the APUD cell concept. *J Surg Oncol* 1978; 10 (4): 283-8.
4. Blecker D, Abraham S, Furth EE, *et al.* Melanoma in the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol* 2000; 95 (8): 2131.





## Il carcinoide dell'appendice: presentazione di un caso clinico in una giovanissima paziente

### *Carcinoid of the appendix: case report in a very young patient*

Massimo De Falco\*, Pasquale Sperlongano\*, Domenico Parmeggiani\*, Donatella Pisaniello\*, Angelo Miranda\*,  
Giuseppina Oliva\*, Antonio Lanna\*, Marina Accardo\*\*, Pier Paolo Podio\*, Maria Gaetana Lamendola\*\*

\* V Divisione di Chirurgia Generale e Tecniche Speciali Chirurgiche, Dipartimento di Scienze Anestesiologiche, Chirurgiche e dell'Emergenza,  
Seconda Università degli Studi, Napoli, Italia.

\*\* Dipartimento di Morfopatologia, Seconda Università degli Studi, Napoli, Italia

#### Riassunto

**Finalità.** Il carcinoide dell'appendice è tra i tumori neuro-endocrini la forma più frequente e meglio conosciuta. Tuttavia la diagnosi di tale neoplasia può presentare difficoltà o essere misconosciuta per assenza di sintomatologia specifica e/o per le dimensioni molto esigue della neoformazione. Inoltre, la sua certa identificazione richiede necessariamente moderni accertamenti morfologici quali indagini ultrastrutturali. Tali premesse hanno suggerito agli Autori di presentare un caso di carcinoide dell'appendice caratterizzato dall'assenza di ogni sintomatologia specifica e sottoposto tra l'altro a un dettagliato studio ultrastrutturale. **Caso clinico.** Paziente di 13 anni con sintomatologia dolorosa addominale riferibile ad appendicite subacuta; dopo l'intervento chirurgico di appendicectomia, il campione chirurgico è stato processato per la microscopia luce e per la microscopia elettronica a trasmissione. **Risultati.** I risultati istopatologici ed ultrastrutturali hanno evidenziato l'esistenza di un carcinoide insulare ed hanno documentato nel citoplasma granuli di secrezione specifici. **Conclusioni.** La storia clinica, i dati bio-umorali e i reperti morfologico-strutturali confermano la necessità di procedere, nei casi di carcinoide, ad un approccio diagnostico multidisciplinare con particolare attenzione alla ricerca ultrastrutturale dei granuli di secrezione. Eur. J. Oncol., 9 (2), 125-129, 2004

**Parole chiave:** tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici, carcinoide dell'appendice

#### Summary

**Aim.** The carcinoid of the appendix is the most prevalent and well-known neuroendocrine tumour. The diagnosis of this kind of tumour can be difficult: it is often an occasional diagnosis or a misdiagnosis because the tumour usually has a very small dimension and it is generally asymptomatic, or without specific symptoms. The histological identification of an appendix carcinoid requires modern technological support for morphological evaluation such as ultrastructural screening. On the basis of this scientific background, the authors have discussed a case report with clinical lack of specific symptoms and with a detailed and complete ultrastructural characterization. **Case report.** The patient was a 13 year old girl, presenting abdominal pain in the right iliac fossa, mimicking an acute appendicitis, who underwent to an appendicectomy; the surgical sample was processed for traditional light microscopy and for electronic transmission microscopy. **Results.** The histological and ultrastructural results have allowed the identification of an insular carcinoid of less than 1 cm, and have documented specific secretory granular inclusions in the cytoplasm. **Conclusions.** The clinical history, the bio-umoral data and the morphological and ultrastructural findings demonstrate the need, in the case of a suspect appendix carcinoid, for an integrated and multidisciplinary strategy, with particular attention given to the ultrastructural research of cytoplasmic specific granular secretions. Eur. J. Oncol., 9 (2), 125-129, 2004

**Key words:** gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours, carcinoid of the appendix

Received/Pervenuto 18.12.2003 - Accepted/Accettato 10.2.2004

Address/Indirizzo: Dr. Massimo De Falco, Via Bartolomeo Caracciolo  
46, 80136, Napoli, Italia - Tel. 0815498807- 5665246

E-mail: massimo.defalco@unina2.it

## Introduzione

Tra i tumori neuroendocrini dell'apparato digerente, i carcinoidi intestinali rappresentano sicuramente le forme più frequenti, pari al 55% circa dei casi; tuttavia, sono abbastanza rari in assoluto, rappresentando lo 0,4-1% di tutte le neoplasie a sede gastroenteropancreatica<sup>1-3</sup>.

La localizzazione a livello dell'appendice è quella più frequente<sup>4,5</sup>, di solito non associata a manifestazioni cliniche da "sindrome da carcinoidi"<sup>6</sup> e, pertanto, diagnosticata solo occasionalmente, a seguito di appendicectomia.

Trattasi di forme a comportamento biologico benigno nella gran parte dei casi (dimensioni inferiori o pari a 1 cm), ma non va sottovalutata la frequente capacità, per dimensioni maggiori ai 2 cm, di dare metastasi epatiche (70%), nonché la frequente associazione in tali casi di adenocarcinomi sincroni (20% casi) o metacroni (10%) ileo-colici<sup>7,8</sup>.

La recente osservazione occasionale di un caso, specificamente asintomatico, di carcinoidi dell'appendice in una giovanissima paziente, ci ha indotto ad una revisione dell'argomento, allo scopo anche di valutare il ruolo e la validità delle attuali possibilità diagnostiche-terapeutiche.

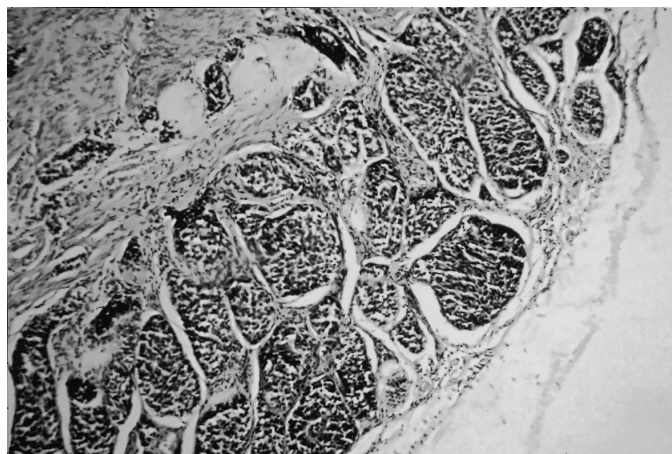
## Caso clinico

Una giovanissima paziente di 13 anni si è rivolta alle nostre cure lamentando da circa un mese una sintomatologia dolorosa addominale, talora di tipo crampiforme, insorgente saltuariamente in fossa iliaca destra ed irradiata all'epigastrio ed al mesogastrio, associata talora a vomito, mai a febbre e chiusura dell'alvo, che, invece, presentava fasi alterne di stipsi e diarrea. L'esame obiettivo dell'addome non evidenziava masse palpabili, ma faceva rilevare classica dolenzia in fossa iliaca destra, con McBurney positivo; nulla emergeva a carico degli altri quadranti addominali, non si rilevavano significative alterazioni negli esami biochimici di routine, una ecografia pelvica escludeva compartecipazioni annessiali (la paziente da circa 1 anno aveva mestruazioni regolari), un esame radiografico dell'apparato digerente evidenziava discinesia colica con mancata opacizzazione dell'appendice.

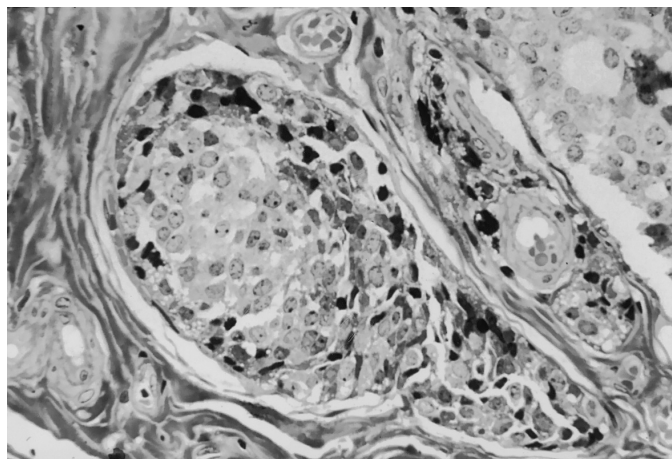
Sulla base di un sospetto clinico-radiografico di appendicite subacuta la paziente era avviata all'intervento di appendicectomia, che faceva rilevare appendice lunga, iniettata, mesoceliaca, con lieve ispessimento, aspecifico, a livello dell'apice. Negativa risultava la ricerca del diverticolo di Meckel e l'esplorazione annessiale. Come da nostra consuetudine, il pezzo era inviato all'esame istologico che confermava macroscopicamente il suddetto ispessimento apicale, ove era rilevata la presenza di un carcinoidi di tipo classico insulare (a nodi solidi), delle dimensioni di circa 1 cm., occupante a tutto spessore la parete, fino alla sierosa, con presenza di alcuni emboli neoplastici nei vasi linfatici. Il reperto istopatologico mostrava le seguenti alterazioni istomorfologiche:

- la parete dell'appendice era sede di gettoni cellulari neoformati (fig. 1);
- la mucosa appariva sporgente nel lume ed era sede di ulcerazioni e di marcata riduzione del patrimonio ghiandolare;
- la sottomucosa si presentava ispessita ed occupata a tutto spessore da nidi ed isolotti compatti di cellule neoformate ed in attività proliferativa (elementi di piccola taglia, isometrici, rotondeggianti, con scarso citoplasma eosinofilo, centrati da nuclei rotondi, eucromatinici, privi di nucleoli evidenti) (fig. 2);
- la componente neoplastica invadeva la tonaca muscolare sostituendo i fasci di fibre muscolari con isole compatte di cellule in proliferazione e piccoli focolai compatti di tali elementi erano presenti anche a livello della sierosa, affiorando sulla superficie di tale tonaca (fig. 3);
- il Grimelius evidenziava granuli argentaffini nel citoplasma delle cellule neoplastiche;
- al microscopio elettronico a trasmissione, il citoplasma delle cellule neoplastiche era occupato da formazioni sferoidali intensamente elet-

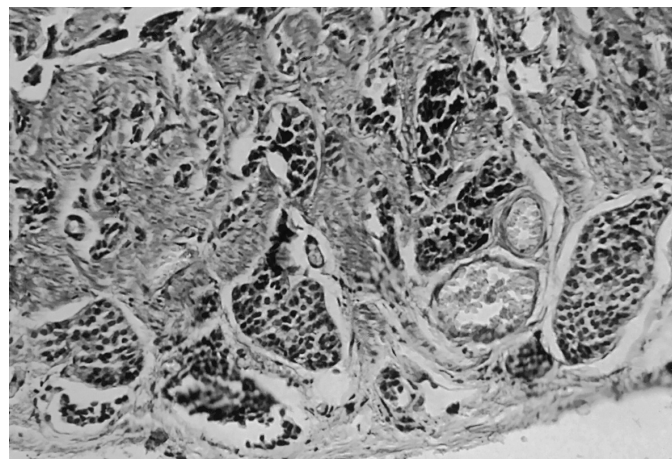
tropache, delimitate da una membrana monostrato, occupate da materiale amorfo distribuito quasi sempre in modo uniforme ed omogeneo (fig. 4-5).



**Fig. 1.** Carcinoidi dell'appendice. La parete appendicolare è sede di nidi ed isolotti di varia grandezza di cellule neoformate di piccola taglia. E-E., 100x.

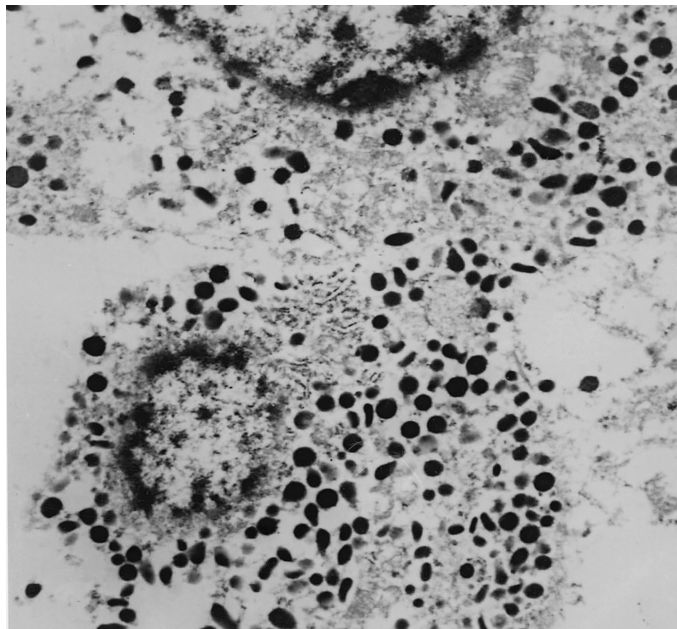


**Fig. 2.** Carcinoidi dell'appendice. I foci neoplastici sono circondati da un delicato graticcio fibrillare; i singoli elementi hanno nucleo sferoidale e scarso citoplasma. Semifine-Blu di toluidina, 400x.

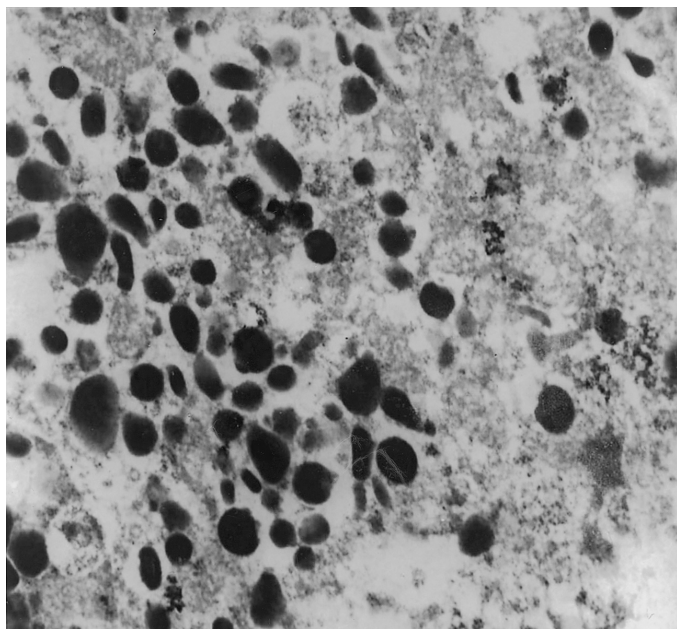


**Fig. 3.** Carcinoidi dell'appendice. Nidi solidi di cellule piccole, uniformi, separati da delicato stroma fibrillare, infiltrano la parete muscolare ed affiorano sulla sierosa. E-E., 100x.





**Fig. 4.** Carcinoide dell'appendice. Il citoplasma delle cellule neoplastiche è occupato da quote cospicue di formazioni elettrodense. TEM, 7000x.



**Fig. 5.** Carcinoide dell'appendice. Le formazioni elettrodense hanno un contenuto omogeneo, compatto e sono distribuite in modo apparentemente casuale nella matrice citoplasmatica. TEM, 20000x.

La paziente veniva quindi sottoposta a screening biomorale per la ricerca di indicatori biochimici dei tumori neuroendocrini digestivi (CgA; enolasi neurone specifica: NSE; acido 5-idrossiindolacetico: 5-HIAA), tutti risultati nei limiti della norma (era negativa anche la ricerca anamnestica di manifestazioni cliniche inquadrabili in una sindrome da carcinoidi), ad indagini di imaging addominale (ecografia e TC) che escludevano alterazioni epatiche ed a carico dei linfonodi addominali, nonché ad esame colonscopico (anch'esso negativo). La paziente era altresì sottoposta a scintigrafia con In-111-pentaoctotide (Octreoscan), che nelle rilevazioni sia precoci che tardive non evidenziava aree di accumulo patologico.

Nel corso del follow-up (12 mesi, con paziente in ottime condizioni generali ed in assenza di sintomatologia dolorosa addominale) i dosaggi degli indicatori biochimici sono sempre rimasti nella norma ed anche un Octreoscan di controllo è risultato negativo.

## Discussione

Il carcinoidi dell'appendice è la forma più frequente di carcinoidi digestivo (44-59%)<sup>1,2,9,10</sup> e rappresenta anche la quota più rilevante (60-70%) dei tumori dell'appendice; ha un riscontro spesso occasionale (0,4-0,5% delle appendicectomie)<sup>4,8,11,12</sup> e nella gran parte dei casi (60-70%) è localizzato alla punta<sup>2,13</sup>, presentandosi come un nodo unico in sede sottomucosa, con frequente interessamento della parete a tutto spessore e solo talora coinvolgimento del mesentere, con intensa reazione fibroblastica, tale da condizionare il rilievo di una massa palpabile in fossa iliaca destra e, in alcuni casi, un quadro oclusivo.

Nella gran parte dei casi, al contrario degli altri carcinoidi digestivi che colpiscono in media la IV decade, ha massima frequenza tra i 25 e 30 anni, colpendo in prevalenza il sesso femminile (forse ciò è anche collegato ad una maggiore frequenza di rilievi in corso di interventi per altre patologie, in particolare sugli annessi); nel caso in esame colpisce l'età molto giovanile della piccola paziente (13 anni), dato certamente insolito e raro<sup>14</sup>.

Pur essendo costituiti, come tutti i carcinoidi dell'ileo, da cellule argentaffini, ossia da cellule producenti 5-idrossitriptofano (5-HT), solo in una piccola percentuale di casi (4-8%)<sup>6,15</sup> si presentano come forme biologicamente attive (BINT o "malattia secernente"), ossia con una sintomatologia generale (flush cutaneo, diarrea, dispepsia, manifestazioni respiratorie di tipo asmatico) inquadrabile nell'ambito della sindrome da carcinoidi, la cui genesi è, secondo studi recenti, da riportare all'increzione in circolo non solo di serotonina, ma anche di altri peptidi vasoattivi (bradichinine, tachipsine). La presenza di una sintomatologia di tale tipo, dall'analisi della letteratura, è associata, solitamente, a maggiori dimensioni del tumore (>2 cm) ed a presenza di metastasi epatiche (la percentuale di metastasi è peraltro maggiore nella malattia secernente, raggiungendo all'incirca l'85%), assumendo, quindi, un significato prognostico negativo<sup>11,16,17</sup>.

Pertanto, la diagnosi è spesso occasionale (tali tumori sono individuati in corso di interventi sull'appendice o altra patologia addominale) e l'eventuale manifestazione clinica è legata tutt'al più alle complicanze infiammatorie o meccaniche determinate dall'accrescimento della lesione, con i quadri clinici dell'appendicite acuta o di un'occlusione intestinale, per compressione sull'ileo.

Per quanto concerne la diagnostica di laboratorio, va segnalata l'importanza della ricerca degli indicatori biochimici associati al tessuto neuroendocrino (CgA, NSE, 5-HIAA), sia per finalità diagnostiche (tuttavia, solo in una minoranza dei casi v'è un innalzamento significativo con evidente valenza prognostica; c'è netta relazione tra livelli all'atto della diagnosi di CgA e 5-HIAA e durata della sopravvivenza; inoltre è documentata una correlazione tra livelli circolanti di NSE ed estensione della malattia, non dipendente dall'attività secretoria), sia soprattutto nel follow-up e nel monitoraggio delle terapie antineoplastiche<sup>18,19</sup>.

E' stata individuata una relazione significativa tra le dimensioni del tumore primitivo ed il suo comportamento biologico, in particolare nei confronti della frequenza delle metastasi epatiche e dell'invasione loco-regionale (meno spiccato il trofismo per i

linfonodi rispetto alla via ematica). La grande maggioranza dei carcinoidi appendicolari ha dimensioni inferiori ad 1 cm (60-76%) e si è calcolato che per neoplasie di diametro rispettivamente inferiore ad 1 cm, compreso tra 1 e 2 cm, e superiore a 2 cm, la frequenza di metastasi è rispettivamente dello 0-2%, 50% e 80%<sup>20</sup>. Pertanto, la dimensione del tumore rappresenta il fattore prognostico più importante (la dimensione pari o al disotto di 1 cm è considerata indice di relativa benignità) e la strategia chirurgica e le diverse successive opzioni terapeutiche vengono modulate, solitamente, sulla base delle dimensioni del tumore primitivo e della presenza delle eventuali metastasi epatiche.

Per il trattamento di una lesione non metastatica v'è discreta concordanza tra i diversi Autori nel ritenere che, di fronte alla maggioranza dei casi di carcinoidi appendicolari con dimensioni inferiori ad 1 cm, onde evitare sovratrattamenti, basta la semplice appendicectomia a rendere la terapia chirurgica radicale (sopravvivenza a 5 anni del 99%)<sup>4,8,11</sup>; al contrario, dimensioni superiori ai 2 cm richiedono il ricorso ad una emicolectomia destra<sup>21</sup>. Per i casi intermedi è necessaria una modulazione della strategia chirurgica sulla base dell'analisi di diversi fattori ricavabili sia dall'esplorazione intraoperatoria (e dall'eventuale estemporanea, per i casi riconosciuti all'atto dell'intervento, come ad esempio lo studio dei margini o la tipizzazione di un linfonodo mesenterico), sia dall'inquadramento istologico ed immunostochimico definitivo. Numerosi sono i parametri proposti dai diversi Autori per cercare di standardizzare il trattamento in tali forme e tra essi vanno indubbiamente segnalati l'età dei pazienti (secondo alcuni Autori in pazienti giovani andrebbe prevista una strategia più aggressiva), l'invasione vascolare e/o linfatica e l'infiltrazione linfonodale<sup>22</sup>.

Certamente, in caso di scoperta occasionale, come nel nostro caso clinico, le indagini di imaging successivamente effettuate (US, TC spirale, RMN, clisma opaco) permettono una stadiazione completa della malattia (evidenza di metastasi epatiche, rilievo di adenocarcinomi sincroni o metacroni colici) e possono in alcuni casi orientare la tattica chirurgica verso reinterventi più demolitivi, alla luce dell'evidenziazione di tumefazioni delle stazioni linfonodali loco-regionali o d'ispessimenti del mesentere.

Recentemente un ruolo importante sembra potersi affidare all'Octreoscan, che a 24 ore permette di visualizzare distintamente l'intestino in almeno l'85% dei casi e che è entrata ormai nei protocolli diagnostici dei tumori neuroendocrini digestivi, sia per l'individuazione del tumore primitivo e/o delle localizzazioni secondarie (percentuali di positività del 96%)<sup>23</sup>, sia per il follow-up nei sospetti di recidiva<sup>24</sup>.

A seguito di reperto occasionale di carcinoidi dell'intestino, sono già descritti in letteratura casi di successo della metodica come unica indagine diagnostica in grado di mostrare precocemente la persistenza della malattia in sede intestinale, con presenza di metastasi linfonodali<sup>25</sup>.

Sulla base degli orientamenti di strategia chirurgica riportati in letteratura, nel caso in esame, nonostante la giovane età della paziente, abbiamo ritenuto l'appendicectomia un atto terapeutico radicale e curativo, alla luce innanzitutto delle dimensioni della neoplasia (circa 1cm), e della mancata diffusione loco-regionale, nonché dell'esito negativo sia delle indagini di staging postoperatorie, sia delle indagini biomorali volte all'individuazione di una "malattia secernente" (la cui presenza è notoriamente collegata ad una prognosi più sfavorevole), nonché dell'esito negativo dell'Octreoscan circa la persistenza loco-regionale della malattia,

con conferma della negatività del quadro clinico allo stesso controllo scintigrafico dopo sei mesi.

La scoperta solitamente occasionale del carcinoidi appendicolare e l'iter clinico-terapeutico che ne consegue consentono di ribadire la necessità di praticare sempre l'esame istologico dopo ogni appendicectomia e, in considerazione della relativa frequente associazione con carcinomi intestinali sincroni o metacroni (rispettivamente 20 e 10%), di porre l'accento sull'opportunità di uno stretto follow-up multidisciplinare, clinico-radiologico-biumorale.

## Conclusioni

Il carcinoidi appendicolare, forma più frequente tra i carcinoidi digestivi, viene generalmente scoperto occasionalmente, come confermato dalla recente osservazione di un caso clinico in una paziente dall'età insolitamente giovane (13 anni). Nella gran parte, se di piccole dimensioni (1 cm) ed in assenza di diffusione loco-regionale, ha un comportamento benigno (sopravvivenza a 5 anni del 90%), è solitamente inattivo dal punto di vista funzionale e la semplice appendicectomia rappresenta il *gold standard* della terapia.

Il fattore prognostico più importante è quindi la dimensione del tumore (nei casi sopra i 2 cm sono abbastanza frequenti le metastasi epatiche), mentre nel corso del follow-up un ruolo significativo può esser assunto dall'Octreoscan, capace di individuare precocemente la persistenza di malattia loco-regionale e la diffusione a distanza, e di modulare, quindi, il trattamento terapeutico (reinterventi più demolitivi, terapie complementari).

## Bibliografia

1. Percopo V. I tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici. Edises, 1995.
2. Cirillo F. I tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici. Manuale di diagnosi e trattamento, III ed. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, 2001.
3. Magari A. I carcinoidi intestinali: Nostra esperienza. In I tumori neuroendocrini, Mediprint Ed, 2000, 23-7.
4. Goldwin DJ. Carcinoid tumors: an analysis of 2837 cases. Cancer 1975; 36: 560-9.
5. Del Core R, Friere JR. Gastrointestinal neuroendocrine tumors. J Am Coll Surg 1994; 178: 187-91.
6. Solcia E, Sessa F, Rindi G, et al. Classification and histogenesis of gastroenteropancreatic endocrine tumors. Eur J Clin Invest 1990; 20: 172-81.
7. Zeiteb J, Nambein K, Kaplan EI, et al. Carcinoid tumors. A 37 years experience. Arch Surg 1982; 117: 732-7.
8. Moertel CG, Weiland LH, Nagorney DM, et al. Carcinoid tumors of the appendix: Treatment and prognosis. N Engl J Med 1987; 317: 1699-701.
9. Kaplan EI, Udekwu A. The carcinoid syndromes. In Friesen SR, Thompson NW (Eds) Surgical Endocrinology. Philadelphia: J.B.Lippincott, 1990, 181-94.
10. Moertel CG, Dockerty MB, Judd ES. Carcinoid tumors of the vermiform appendix. Cancer 1968; 21: 270-8.
11. Connor SJ, Hanna JB, Frizelle FA. Appendiceal tumors: retrospective clinicopathologic analysis of appendiceal tumors from 7970 appendicectomies. Dis Col Rectum 1998; 41: 75-80.
12. Bowmann GA, Rosenthal D. Carcinoid tumors of the appendix. Am J Surg 1983; 146: 700-3.
13. Soga J, Yakuwa Y. Globet cell carcinoids of the appendix: a statistical evaluation of the biological behaviors in 170 cases collected from the literature as compared to 456 ordinary type appendiceal carcinoids. J Exp Clin Cancer Res 1995; 14: 145-53.
14. Moertel CG, Weiland LH, Telander RL. Carcinoid tumors of the appendix in the first two decades of life. J Ped Surg 1990; 25: 1073-5.



15. Caponnetto A, Morino GF, Scorza V, *et al.* Il carcinoide dell'appendice. Presentazione di un caso. *Minerva Chir* 1991; 46: 461-3.
16. Janson ET, Holberg L, Strivsherg M, *et al.* Carcinoid tumors: analysis of prognostic factors and survival in 301 patients from a referral center. *Ann Oncol* 1987; 8: 685-90.
17. Ruanet P, Saingra B, Simon-Lafontaine J, *et al.* Prognostic factors of carcinoid tumors of the appendix smaller than two centimeters. *Surgery* 1993; 113 (5): 595.
18. Schurmann G, Raeth U, Wunderman B, *et al.* Serum chromogranin A in the prognosis and follow-up of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic tract. *World J Surg* 1992; 16: 697-702.
19. Prinz RA, Marangos PJ. Use of neuron-specific enolase as a serum marker for neuroendocrine neoplasm. *Surgery* 1982; 92 (5) : 887-9.
20. MacGillivray DC, Heaton RB, Rushin JM, *et al.* Distant metastasis from a carcinoid tumor of the appendix less than one centimeter in size. *Surgery* 1992; 111: 466-71.
21. Gouzi JL, Laigneau F, Delalande JP. Indications for right hemicolectomy in carcinoid tumors of the appendix. The French Associations for Surgical Research. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 176: 543-7.
22. Rotmund M, Kisker O. Surgical treatment of carcinoid tumors of the small bowel, appendix, colon and rectum. *Digestion* 1994; 55 (Suppl 3): 86-91.
23. Pauwels S, Jamar F, Leners N, *et al.* Indium-111 pentatreotide scintigraphy in detection of primary recurrent and metastatic gastroenteropancreatic (GEP) endocrine tumors. *J Nucl Med* 1992; 33: 976.
24. Krenning EP, Bakker WH, Breeman WAP, *et al.* Localization of endocrine related tumors with radioiodinated analog of somatostatin. *Lancet I*; 1989: 242-5.
25. Virotta G, Guerra UP, Cirillo F. Scintigrafia con 111 In-Pentetreotide. Limiti e vantaggi dell'applicazione in clinica. In Cirillo F. I tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici. Manuale di diagnosi e trattamento, III ed. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, 2001.



## Professor Luigi Giarelli (1920-2004)



Luigi Giarelli nacque a Bozzolo in provincia di Mantova l'11 giugno 1920. Completate le Scuole Magistrali, si iscrisse alla Facoltà di Pedagogia e, dopo qualche anno, anche alla Facoltà di Medicina a Parma. Concluse ambedue i cicli di studi, laureandosi sia in Pedagogia che in Medicina. In seguito prestò servizio presso l'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università di Parma e poi presso quelli di Padova e di Napoli. La maggior parte della sua opera fu dedicata all'Università di Trieste, la cui Facoltà di Medicina iniziò la sua attività nel 1967. Tra i docenti che assicurarono alla giovane Facoltà una solida impostazione, il prof. Giarelli ebbe un ruolo centrale. Gli studenti dei corsi di Anatomia Patologica potevano avvantaggiarsi del tirocinio pratico basato sulle autopsie e sulle esercitazioni di istopatologia.

In particolare il Professor Giarelli è stato animato da una fede incrollabile nel valore dell'autopsia. Questa pratica classica ha presentato negli ultimi decenni un inarrestabile declino, perfino nelle sedi dove l'alto tasso di autopsie rappresentava una tradizione ben consolidata. In controtendenza con ciò, l'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università di Trieste è stato sede di un'attività autoptica intensa, che arrivava a coprire il 70-90% dei decessi ospedalieri. Il Professor Giarelli eseguì personalmente decine di migliaia di autopsie. Era convinto che l'autopsia rappresentasse una fonte insostituibile di educazione non solo per lo studente, cosa abbastanza scontata, ma anche per il medico maturo. Il controllo della diagnosi clinica, una base sicura per le rileva-

zioni epidemiologiche, l'opportunità di studiare non malattie, ma persone malate con una costellazione di eventi morbosi erano importanti obiettivi di questa pratica. Il ruolo di Trieste in questo contesto ha avuto vari riconoscimenti internazionali, tra i quali va ricordato il convegno sul ruolo dell'autopsia nell'epidemiologia e nella ricerca medica, promosso dall'International Agency for Research on Cancer (IARC) nel 1990 proprio a Trieste. In particolare il legame tra autopsia ed epidemiologia era per il Professor Giarelli un assioma indubitabile. Un Registro Tumori le cui diagnosi non siano pienamente attendibili è destinato ad avere una scarsa validità. Da qui l'idea di un Registro Tumori fondato essenzialmente su dati autoptici, progetto alla cui realizzazione il Professor Giarelli ha dedicato una grande mole di energie. Le ricadute positive di tale approccio si sono rilevate in vari settori e particolarmente nell'ambito dei tumori indotti dall'asbesto.

Il Professor Giarelli ha fondato a Trieste la Scuola di Specializzazione in Anatomia Patologica, che è stata fonte di formazione per generazioni di medici provenienti da tutta Italia.

Fra i settori di studio particolarmente coltivati dal Professor Giarelli va citato quello della patologia oculare, una materia assai raramente considerata nell'ambito dell'Anatomia Patologica. Analizzando un enorme materiale di provenienza autoptica, il Professor Giarelli ha fornito agli specialisti della branca un quadro nuovo di questa patologia.

L'attività scientifica di Luigi Giarelli ha prodotto una gran mole di pubblicazioni, tra le quali vari trattati. Il suo desiderio di conoscenza non si è esaurito con l'età e fino agli ultimi mesi della sua vita ha lavorato instancabilmente. L'obiettivo di tali ultimi studi era quello di individuare i prodromi dell'epidemia di mesotelioma nell'area di Trieste. Analizzando scrupolosamente i verbali di oltre 15.000 autopsie effettuate a Trieste fino al 1966, poté rintracciare descrizioni del tumore fin dai primi anni '40.

Il Professor Giarelli era Fellow del Collegium Ramazzini dal 1983.

Il patrimonio spirituale lasciato alla sua Scuola perdurerà inalterato negli anni.

**Luigi Di Bonito**

Professore ordinario  
di Anatomia Patologica  
dell'Università di Trieste





Collegium Ramazzini

International Scientific Conference

## FRAMING THE FUTURE IN THE LIGHT OF THE PAST: LIVING IN A CHEMICAL WORLD

CONFERENCE CO-CHAIRS: PHILIP J. LANDRIGAN, MORANDO SOFFRITTI, MYRON A. MEHLMAN

18<sup>th</sup>-23<sup>rd</sup> September 2005

Castle of Bentivoglio, Bologna, Italy

The Collegium Ramazzini is an international academy, founded in 1982 by Irving J. Selikoff and Cesare Maltoni and other outstanding scientists from various nations, experts in the field of diseases correlated to the deterioration of the general living environment and to the risks generated by the working environment.

In 1985, in Bologna, the Collegium held the first international conference on "Living in a Chemical World".

In 1995, the second international conference was held in Washington and dealt with "Preventive Strategies for Living in a Chemical World".

Twenty years after the original conference, again in Bologna, the third international conference will be held on "Framing the Future in the Light of the Past: Living in a Chemical World", and will consider in particular the carcinogenic risks present in the general and occupational environment.

Representatives of the academy, of international agencies, and of various social groups will be invited to participate at the conference.

The proceedings of the conference will be published and will provide a source of new and useful information for experts in this sector, in particular for all those involved in the updating of regulations directed toward the protection of the environment and the health of mankind.

---

### PROGRAMME

---

**Sunday, September 18<sup>th</sup>, 2005, 5:00 p.m.**

INAUGURATION  
Bologna Town Hall

#### MAIN SCIENTIFIC THEMES

**Monday - Wednesday,  
September 19<sup>th</sup> - 21<sup>st</sup>, 2005**

I THEME: HIGH HEALTH HAZARD SECTORS  
OF WORK

1. Health care
2. Agriculture
3. Chemical manufacture
4. Construction/Insulation
5. Weapons destruction
6. Small workplace and shift work

II THEME: ENVIRONMENTAL CONTEXT OF  
HIGH HEALTH HAZARD WORK  
PROCESSES/SECTORS

1. Waste handling
2. Transport of hazardous materials
3. Community contamination
4. End user exposure
5. Diffusion to the developing world

III THEME: EXPOSURE EFFECTS  
MODULATIONS

1. Age
2. Stages of development
3. Genetic polymorphisms
4. Race
5. Life style
6. Diet
7. Child health

IV THEME: TOXIC AGENTS: OLD REVISITED  
AND NEW

1. Benzene
2. Gasoline additives (MTBE manganese and others)
3. Contamination of air/water/soil
4. Asbestos
5. Lead
6. Particulates (ultrafines)
7. Chlorinated solvents
8. Radiation
9. Endocrine disruptors

V THEME: TOOLS FOR PREVENTION

1. Long-term carcinogenic bioassays
2. Exposure monitoring
3. Biomarkers (Exposure/Effects)
4. Standard setting participation
5. IARC Monograph programme
6. "Reach" program
7. Late lessons from early warnings
8. Ethics

VI THEME: THE IMPACT OF  
ENVIRONMENTAL POLLUTION ON PUBLIC  
HEALTH COSTS

1. Societal impact of occupational diseases
2. Economical impact of occupational and environmental diseases
3. The role of prevention of environmental diseases in the lowering of health costs: the case of cancer

**Thursday September 22<sup>nd</sup>, 2004  
Science Writers Colloquium**

---

Organizers

COLLEGIUM RAMAZZINI

EUROPEAN RAMAZZINI FOUNDATION

NATIONAL RAMAZZINI INSTITUTE



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 FJJ. Neurological assessment of high grade astrocytomas following high dose radiotherapy as sole treatment. Clin Oncol 1995; 7: 273 (letter).

Resoconto scientifico o tecnico:

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

Articolo di giornale:

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

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

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

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

## RESOCONTI SU CASI CLINICI

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

## COMUNICAZIONI BREVI

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

## LETTERE ALL'EDITORE

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

## CORREZIONE DELLE BOZZE

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

## ESTRATTI

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

## ANNUNCI

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

## PUBBLICITÀ

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

## TRASFERIMENTO DEL COPYRIGHT

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