



## Il ruolo della ricerca scientifica per l'identificazione degli agenti cancerogeni professionali: il contributo del Centro di ricerca sul cancro Cesare Maltoni della Fondazione europea Ramazzini

The role of scientific research in the identification of occupational carcinogenic agents: the contribution of the Cesare Maltoni Cancer research center of the European Ramazzini Foundation

Morando Soffritti, Daniela Chiozzotto, Fiorella Belpoggi

Centro di ricerca sul cancro Cesare Maltoni, Fondazione europea di oncologia e scienze ambientali «B. Ramazzini», Bologna, Italia

Corrispondenza: Morando Soffritti; e-mail: crkdir@ramazzini.it

### Riassunto

I tumori costituiscono oggi uno dei maggiori problemi di sanità pubblica, sia per la dimensione epidemiologica sia per le cause che ne sono all'origine, rappresentate queste da tre fattori importanti quali: l'invecchiamento della popolazione, l'inquinamento dell'ambiente a livello generale e occupazionale, compresi comportamenti individuali incongrui, e la suscettibilità genetica individuale.

Le strategie fino a oggi perseguite per controllare i tumori hanno privilegiato il ruolo degli interventi terapeutici: i risultati ottenuti ne evidenziano i forti limiti. Al contrario, le conoscenze scientifiche acquisite indicano la necessità di riorientare le attuali strategie, attuando programmi di prevenzione finalizzati all'identificazione dei rischi cancerogeni (prevenzione primaria) e alla diagnosi precoce di lesioni preneoplastiche e neoplastiche (prevenzione secondaria).

In questa revisione viene presa in esame l'importanza della

prevenzione primaria nel controllo dei tumori, e in specifico si evidenziano:

- il ruolo degli esperimenti di cancerogenicità a lungo termine su roditori (ratti e topi) per identificare e predire i rischi cancerogeni e quindi il grande valore che tali studi hanno per la sanità pubblica;

- i maggiori programmi di saggi di cancerogenicità oggi in atto nel mondo, quello del National Toxicology Program (NTP) degli USA e quello della Fondazione Europea Ramazzini (FER), in Italia;

- l'importanza di osservare gli animali sperimentali fino alla loro morte spontanea per aumentare la sensibilità e specificità dei saggi, un approccio metodologico da sempre seguito dalla FER.

(*Epidemiol Prev* 2009; 33(4-5) Suppl 2: 57-67)

**Parole chiave:** agenti cancerogeni industriali, prevenzione primaria, saggi di cancerogenicità su roditori, mega-esperimenti

### Abstract

Nowadays tumours represent one of the major problems of public health, both for their epidemiological dimension as for the causes that are at their origin, represented by three important factors: people ageing, general and occupational environmental pollution, including incongruous individual behaviour, and individual genetic susceptibility.

The strategies followed till today in order to check tumours have privileged the role of therapeutic interventions: the results achieved show the great limits. On the contrary, current scientific experiences indicate the need to re-orientate present strategies, developing prevention programmes for the identification of carcinogenic risks (primary prevention), and early diagnosis of preneoplastic and neoplastic lesions (secondary prevention). In this review we discuss the importance of primary

prevention in tumour control and specifically we present:

- the role of long-term carcinogenic bioassays on rodents (rats and mice) in order to identify and predict the carcinogenic risks and then the great value that these studies have for public health;

- the two major programmes of carcinogenic bioassays: the National Toxicological Program (NTP) of the US government, and the one performed by the European Ramazzini Foundation (ERF), in Italy;

- the importance of observing the experimental animals until spontaneous death in order to improve the sensitivity and specificity of the assays, a way of working followed by ERF from the beginning.

(*Epidemiol Prev* 2009; 33(4-5) Suppl 2: 57-67)

**Key words:** carcinogenic industrial agents, primary prevention, carcinogenic rodents bioassays, mega-experiments

**Introduzione**

I tumori rappresentano da tempo uno dei maggiori problemi di sanità pubblica nei Paesi industrializzati, sia per la loro dimensione epidemiologica e per le ricadute sociali che ne derivano, in termini di qualità della vita e di costi economici, sia per le cause che ne sono all'origine.

Negli Stati Uniti, un maschio su due e una femmina su tre sono destinate ad ammalarsi di cancro nell'arco della vita. Sebbene la mortalità abbia cominciato a diminuire a partire dall'inizio degli anni Novanta, soprattutto nei maschi, il cancro è tuttora responsabile di circa 600.000 decessi, pari al 22,8% di tutta la mortalità statunitense.<sup>1</sup>

In Italia, i decessi per cancro sono oltre 150.000 l'anno e i casi incidenti oltre 300.000.<sup>2</sup> A Bologna e provincia, secondo i dati del periodo 1982-2004 dei Registri tumori di mortalità nominativa della Fondazione europea Ramazzini, i decessi per cancro sono in lieve diminuzione dal 1995, soprattutto negli uomini. Nonostante ciò, nel 2004 i decessi per cancro erano il 35,60% negli uomini e il 25,88% nelle donne, rispetto alla mortalità globale della Provincia (figure 1 e 2).<sup>3</sup>

Il cancro colpisce soprattutto le fasce di popolazione più anziana. Secondo l'Istituto nazionale del cancro degli Stati Uniti l'80% dei tumori è diagnosticato in persone di età superiore a 55 anni. Nella provincia di Bologna l'80% dei decessi per cancro si verifica dopo i 60-65 anni di età. Se si pensa che fra 25 anni il numero degli ultrasessantenni sarà il doppio dell'attuale, ci si deve preparare ad affrontare un drammatico aumento dell'incidenza dei tumori; negli Stati Uniti, per esempio, si prevede che si possa arrivare nel 2050 addirittura a un raddoppio del numero di casi rispetto all'attuale.<sup>4</sup>

Nonostante l'impegno scientifico e le risorse economiche profuse negli ultimi 35 anni, soprattutto per scoprire farmaci sempre più mirati alla cura di vari tipi di cancro a uno stadio clinico più o meno avanzato, negli Stati Uniti la percentuale

di sopravvivenza relativa a 5 anni, basata su dati dei pazienti censiti dal 1975 al 2004, non è sostanzialmente migliorata (tabella 1).<sup>5</sup> La lieve diminuzione della mortalità è soprattutto dovuta a quei tipi di tumore per i quali la diagnosi precoce ha un ruolo importante, come i tumori della cervice uterina, della mammella, della prostata e del colon-retto; oppure dipende, come nel caso dei tumori del polmone nell'uomo, dall'efficacia degli interventi di prevenzione primaria contro il fumo.

All'origine dell'aumento dell'incidenza e, quindi, della mortalità per cancro negli ultimi 50-60 anni hanno concorso due fattori principali e nuovi:

- l'aumento dell'attesa di vita (circa 10 anni per l'uomo e 15 anni per la donna);
- l'aumento della diffusione nell'ambiente generale e di lavoro di agenti e situazioni di rischio cancerogeno.

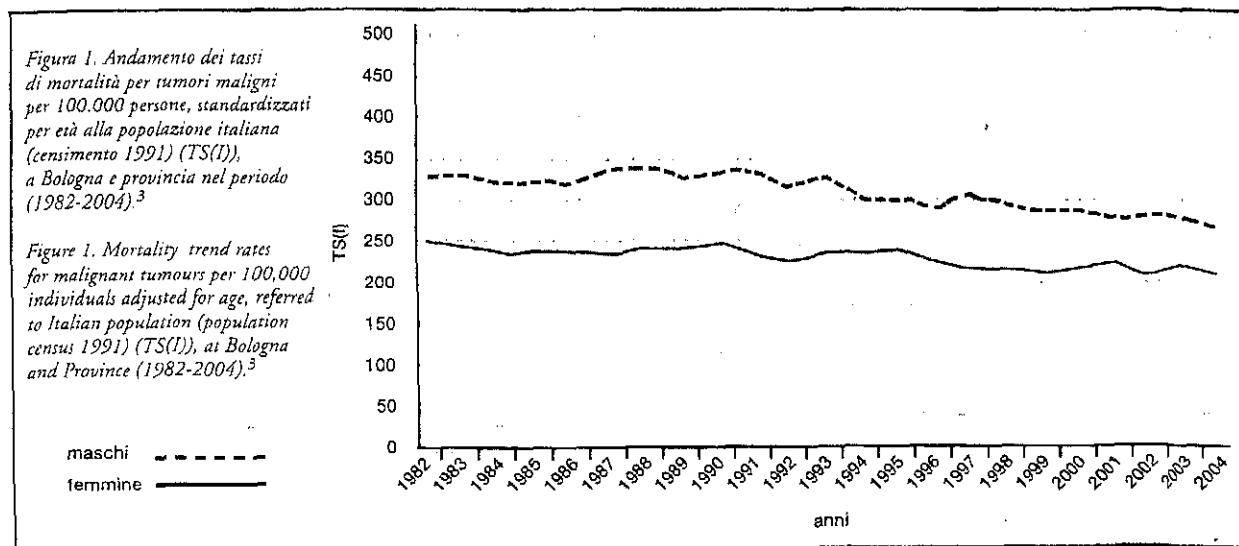
Per un terzo fattore, la predisposizione genetica, che pure può avere un ruolo nel processo cancerogenetico, è difficile pensare che abbia subito importanti modificazioni nel corso degli ultimi decenni.

Nel suo insieme, il processo di cancerogenesi può essere espresso, anche se abbastanza semplicisticamente, dalla seguente formula:<sup>6</sup>

$$C = f(P+Es+E)$$

dove il cancro (C) è una funzione (f) della predisposizione (P), dell'esposizione (Es) e dell'età (E) la quale, essendo aumentata l'attesa di vita soprattutto nei Paesi industrializzati, consente al potenziale cancerogeno ambientale una maggiore possibilità di esprimere i propri effetti, in particolare quelli ascrivibili alla sommatoria/sinergia dell'esposizione a basse e bassissime dosi di agenti cancerogeni.

Ora, non si può pensare di intervenire sulla predisposizione modificando il profilo genetico e, tanto meno, sull'età. La



possibilità di modificare l'attuale andamento dell'incidenza, e quindi della mortalità, dipende dalla capacità di identificare gli agenti e le situazioni di rischio cancerogeno ambientale, professionale e/o legati a stili di vita incongrui eliminando, o almeno riducendo, l'esposizione a essi.

### Rischi ambientali e cancro

La correlazione tra esposizione a rischi cancerogeni ambientali e cancro è sostenuta da molte evidenze, in particolare:

- l'elevata incidenza di alcuni tipi di tumore in alcune aree geografiche del pianeta rispetto ad altre;
- studi sugli emigranti da Paesi a bassa incidenza per un determinato tipo di tumore ad altri dove l'incidenza dello stesso tumore è più alta e dove, già in seconda/terza generazione l'incidenza si allinea con quella del nuovo Paese di residenza; è tipico l'esempio delle donne emigrate dal Giappone (a bassa incidenza di cancro mammario) agli Stati Uniti (a più alta incidenza di cancro mammario);
- studi di cancerogenicità a lungo termine su roditori (soprattutto ratti e topi) per l'identificazione dei potenziali effetti cancerogeni di agenti chimici, in particolare quelli di origine industriale: i due maggiori programmi di saggi di cancerogenicità su roditori esistenti al mondo, in specifico quello del National Toxicology Program del governo statunitense e quello della Fondazione europea Ramazzini di Bologna, hanno dimostrato che circa il 50% degli agenti studiati, e di cui sono stati pubblicati i risultati, sono cancerogeni;
- osservazioni cliniche e studi sperimentali hanno dimostrato che agenti chimici e fisici sono in grado di indurre alterazioni a livello dei tessuti fetali i cui effetti cancerogeni possono manifestarsi in età infantile e/o adulta; sono ben noti, per esempio, i casi di adenocarcinoma a cellule chiare della vagina in giovani donne esposte durante il periodo della loro vita fetale a dietilsilbestrolo, un estrogeno sintetico as-

Sede	1975-1979	1980-1984	1996-2004
tutte le sedi	50	52	65
mammella (donna)	75	77	89
colon-retto	52	55	64
leucemia	36	39	51
polmoni e bronchi	13	13	15
melanoma della pelle	83	84	91
linfoma non-Hodgkin	48	53	65
ovaio	38	41	46*
pancreas	3	3	5
prostata	70	74	99
vescica	75	78	80

\*recenti cambiamenti nella classificazione del cancro ovarico hanno influenzato i tassi di sopravvivenza del periodo 1996-2004.

Tabella 1. Sopravvivenza relativa (%) a cinque anni, in tre periodi di tempo, per alcune sedi di cancro, negli Stati Uniti.

Table 1. Five years relative survival (%), during three time periods, by some cancer sites, in the US.

sunto, in passato, dalle madri per portare a termine gravidanze a rischio;<sup>7</sup>

■ i rischi cancerogeni dovuti a comportamenti e stili di vita incongrui: è noto da decenni che il fumo di sigaretta è responsabile dell'aumento del rischio di cancro, in particolare del polmone, ma anche del pancreas e della vescica; è significativo che la mortalità per cancro del polmone stia lentamente diminuendo nei maschi (che da tempo fumano di meno), ma permane stabile nelle donne (che ancora non hanno modificato la loro abitudine al fumo);

■ gli ambienti di lavoro sono quelli a maggior rischio di esposizione ad agenti potenzialmente cancerogeni. Secondo Doll e Peto<sup>8</sup> ogni anno, negli Stati Uniti, il numero di casi di tumore correlati a esposizioni professionali sarebbe almeno il 4% dei decessi per tumore il che, riferito alla mortalità attuale,

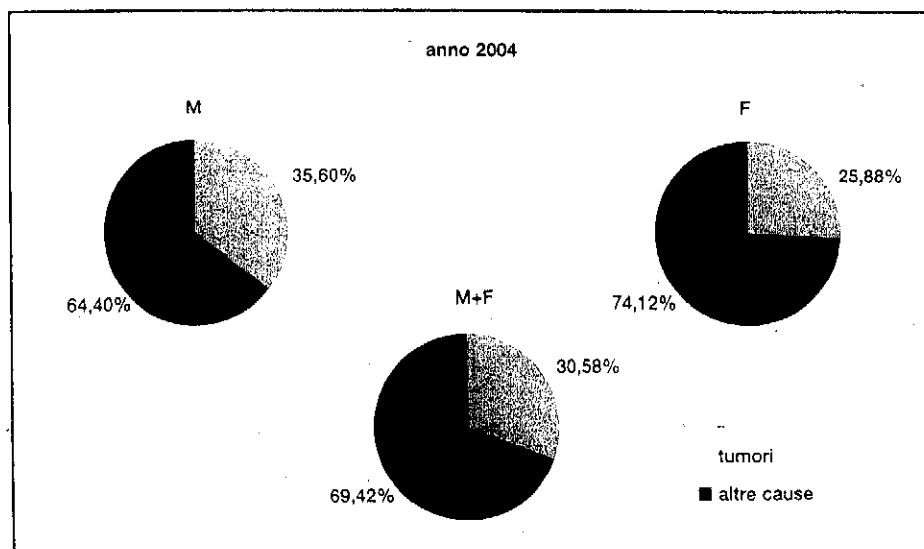


Figura 2. Mortalità per tumori maligni (%) nel 2004 nella Provincia di Bologna (M=maschi; F=femmine).<sup>3</sup>

Figure 2. Mortality caused by malignant tumours (%) in 2004 in the Province of Bologna (M=males; F=females).<sup>3</sup>

Tabella 2. Informazioni disponibili per la valutazione del rischio per differenti classi di agenti.

Table 2. Available informations for risk assessment for different categories of agents.

Categoria	Agenti	Informazione			
		completa		nessuna	
pesticidi e ingredienti inerti usati nelle loro formulazioni	3.350	335	10	1.273	38
cosmetici	3.410	68	2	1.910	56
farmaci	1.815	327	18	454	25
additivi alimentari	8.627	431	5	3.968	46
altri composti chimici in commercio	48.523	0	0	38.439	79
<b>totale</b>	<b>65.725</b>	<b>1.161</b>	<b>1,8</b>	<b>46.044</b>	<b>70,1</b>

Da: US National Academy of Sciences, 1984.

equivarrebbe a circa 24.000 decessi. Altre stime indicano una percentuale più alta, pari al 10%, equivalente a circa 60.000 decessi.<sup>9,10</sup> Tuttavia queste percentuali sottostimano il rischio, che invece potrebbe essere tra il 15-20%.<sup>11</sup> In Italia, sulla base delle suddette percentuali, il numero di decessi per tumore causati da esposizione ad agenti cancerogeni durante l'attività lavorativa potrebbe variare da 6.000 a 30.000, oppure 15.000, se si considera più verosimile una percentuale del 10%.

Le stime di Doll e Peto, effettuate nel 1981 e citate per oltre 30 anni, erano basate sulla mortalità per cancro relativa agli anni Settanta, limitata a lavoratori statunitensi bianchi di età inferiore a 65 anni e a situazioni espositive tipiche degli anni Cinquanta, quindi non estrapolabili a situazioni diverse.<sup>12</sup> Un'ulteriore dimostrazione della sottostima della dimensione dei tumori professionali è data dal fatto che essa è basata su sedi di cancro quali il polmone e la vescica, notoriamente correlati a una forte componente di esposizione professionale, mentre non si tiene nella dovuta considerazione il contributo del rischio di tumore per altri organi e tessuti.<sup>13</sup> Un tipico esempio è la sottostima del rischio cancerogeno da esposizione ad amianto, di cui è riconosciuta la specificità del tumore sentinella, il mesotelioma, mentre molto più controversa è la correlazione con l'aumento del rischio di cancro di laringe, polmone, reni, colon.<sup>14-17</sup> Un altro esempio è il riconoscimento della specificità dell'angiosarcoma del fegato in lavoratori esposti a cloruro di vinile, mentre il rischio per altri tipi di tumore, come l'epatocarcinoma e il carcinoma del polmone, è sottostimato; in esposti alla formaldeide è riconosciuta la specificità del rischio di carcinomi dei seni nasali, ma sottostimato il rischio di leucemie e linfomi. A questi potrebbero essere aggiunti tanti altri esempi.

**Il ruolo della prevenzione primaria e della ricerca scientifica per l'identificazione degli agenti cancerogeni**

I tumori sono una patologia complessa, dovuta all'azione separata di fattori endogeni o esogeni di varia natura, o concomitante di ambedue i tipi, che in varie fasi della vita possono determinare una trasformazione cellulare che si può manifestare, oggi soprattutto tra le persone più anziane, con lesioni

patologiche preneoplastiche, neoplastiche benigne, neoplastiche maligne localizzate o neoplastiche maligne diffuse.

Alla luce della perdurante evidenza di incapacità dei trattamenti terapeutici attualmente disponibili di controllare il cancro a uno stadio clinicamente diffuso, emerge la necessità, non più procrastinabile, di riorientare le strategie di controllo dei tumori e di finalizzare risorse economiche e umane a:

- identificare agenti e situazioni di rischio cancerogeno (prevenzione primaria) al fine di mettere in atto misure che riducano o annullino l'esposizione, soprattutto negli ambienti di lavoro;
- attuare iniziative di screening e sorveglianza oncologica per la diagnosi precoce delle lesioni preneoplastiche e neoplastiche localizzate di quei tessuti e organi per i quali è fattibile e congrua (prevenzione secondaria);
- attivare iniziative e strutture per l'assistenza a pazienti con malattia in stato avanzato e progressivo.

E' ovvio che la prevenzione primaria, il cui fine principale è la diminuzione dell'incidenza delle patologie tumorali, rappresenta, in termini di riduzione dei costi sanitari e miglioramento della qualità della vita, la scelta prioritaria.

Ma, se è vero che il processo cancerogenico dipende in larga misura dal ruolo della predisposizione, dell'ambiente e dell'età, e che per modificare l'attuale dimensione epidemiologica del cancro la strategia più congrua sarebbe quella di intervenire per ridurre l'esposizione ad agenti e situazioni di rischio cancerogeno ambientali, è altrettanto vero che a tutt'oggi le conoscenze su tali rischi sono ancora molto limitate.

Agli inizi degli anni Ottanta l'Accademia nazionale delle scienze statunitense pubblicò i risultati di un'indagine volta a censire le informazioni tossicologiche disponibili sui composti chimici in commercio ai fini di un'adeguata valutazione dei rischi (tabella 2).<sup>18</sup> Solo per il 2% circa dei composti esaminati erano reperibili informazioni tossicologiche soddisfacenti. A distanza di circa 20 anni, pur essendo disponibili da tempo adeguati strumenti scientifici per identificare e quantificare tali rischi, la situazione non si è sostanzialmente modificata.

L'identificazione degli agenti cancerogeni può essere perse-

guita utilizzando tre tipi di ricerche che presentano vantaggi, ma anche limiti intrinseci:

- studi di laboratorio a breve e medio termine;
- indagini epidemiologiche;
- studi di cancerogenicità a lungo termine su roditori.

#### Studi a breve e medio termine

Si tratta di ricerche sugli effetti tossici in vivo (acuti, subacuti e subcronici), o mutageni (su cellule batteriche e animali). Queste ricerche sono realizzate in tempi relativamente brevi ma, per quanto riguarda la cancerogenicità, forniscono solo dati indiretti, e non basati sull'effetto specifico finale (comparsa o meno di tumori). La loro funzione ha pertanto limiti precisi, anche se in taluni casi esse possono fornire, oltre che prime indicazioni orientative, anche utili informazioni sugli aspetti meccanicistici dell'azione degli agenti in studio.

#### Indagini epidemiologiche

Le indagini epidemiologiche oncologiche costituiscono la prova più diretta di cancerogenicità di un agente, o fattore, o situazione. Spesso però queste indagini trovano limiti precisi:

- alla loro fattibilità, a causa della dimensione troppo limitata delle popolazioni esposte, del follow-up troppo breve delle stesse, della mancanza o carenza dei dati sull'entità dell'esposizione, per le difficoltà a rintracciare l'universo degli esposti o un campione rappresentativo, eccetera;
- alla loro capacità di dare risultati chiari, per possibili fattori confondenti o, quando si tratta di agenti cancerogeni di bassa o medio-bassa potenza, per la difficoltà di disporre di gruppi di esposti di numero sufficiente e di controlli adeguati, o per carenze metodologiche.

Va infine considerato che, dato il lungo periodo di latenza dei tumori nell'uomo, l'identificazione epidemiologica offre un'informazione ritardata, in media, di decenni, durante i quali i vari agenti cancerogeni possono produrre i loro gravi effetti. Siccome il periodo di latenza è proporzionale alla durata della vita media dell'organismo, esso è proporzionalmente più breve nei roditori comunemente usati in laboratorio per saggi a lungo termine.

#### Saggi di cancerogenicità a lungo termine su roditori

Quando ben programmati e condotti, usando anche modelli animali idonei (quanto più possibile uomo-equivalenti) e riproducendo, se necessario, gli scenari espositivi dell'uomo, questi saggi sperimentali possono fornire indicazioni specifiche di cancerogenicità che, sulla base delle conoscenze disponibili, possono essere estrapolate all'uomo in termini qualitativi e quantitativi.<sup>19</sup> A sostegno della validità di questi saggi si possono portare alcune considerazioni.

- Nella storia della medicina e della biologia gli studi su animali, in particolare ratti e topi, hanno permesso di acquisire importanti conoscenze sui processi fisiologici, patologici

#### Agenti cancerogeni

1. aflatossina	13. formaldeide
2. 4-amminobifenile	14. melfalan
3. azatioprina	15. 8-metossipsoralene+UVA
4. 1,3-butadiene	16. mostarda azotata
5. clorambucil	17. myleran
6. clornafazina	18. estrogeni non steroidei
7. clorometil metil etere	19. silice cristallina
8. ciclosporina	20. radiazioni solari
9. pece di catrame	21. 2,3,7,8-tcdd
10. catrame di carbon fossile	22. tiotepa
11. ciclofosfamide	23. tricloroetilene
12. dietilstilbestroio	24. cloruro di vinile

Modificata da: Huff J. 1999.

*Tabella 3. Agenti chimici di cui è stata dimostrata la cancerogenicità prima sperimentalmente e poi sull'uomo.*

*Table 3. Chemical agents that are resulted carcinogenic first in experimental assays and then in humans.*

e comportamentali degli esseri umani. I risultati degli studi sperimentali hanno permesso di valutare l'efficacia e la tollerabilità di farmaci (fra cui anche quelli per curare il cancro) fondamentali per il miglioramento della qualità della vita. Da quando, nel 1915, Joseph Yamagiwa<sup>20</sup> aprì la strada della cancerogenesi chimica sperimentale inducendo tumori cutanei dell'orecchio di conigli dopo trattamento con applicazioni di catrame da carbone, numerosi contributi scientifici, prodotti negli ultimi 40 anni da vari ricercatori, hanno messo in evidenza le grandi potenzialità di questi studi e, soprattutto, hanno dimostrato quanto siano diffuse le similitudini biologiche fra le varie specie di mammiferi. Una revisione esaustiva della letteratura su questo argomento è stata pubblicata di recente.<sup>21</sup>

■ Tutti gli agenti dimostratisi cancerogeni sull'uomo mediante indagini epidemiologiche adeguate sono stati confermati in studi sperimentali.

■ Il tipo di relazione fra entità di esposizione all'agente cancerogeno e risposta neoplastica, oltre che le varie fasi evolutive del processo neoplastico, sono comparabili nell'animale e nell'uomo.

■ Infine, circa 1/3 degli agenti ritenuti cancerogeni per l'uomo erano già stati scoperti causare cancro negli animali sperimentali (tabella 3).<sup>22</sup>

Nonostante ciò, molto è stato fatto e detto, da parte di settori interessati e ricercatori sponsorizzati, per screditare il valore che questi studi hanno per la tutela della sanità pubblica. I luoghi comuni più frequentemente ricorrenti sostengono che:

- troppi agenti risultano cancerogeni sui roditori;
- le dosi di esposizione sono troppo elevate e quindi molto distanti dalla situazione reale dell'uomo;
- i saggi a lungo termine sono troppo costosi, eccetera.

A queste osservazioni David Rall, già direttore del National

toxicology program del governo statunitense, usava rispondere che:

- anche se questi studi sono costosi e richiedono molto tempo, dovrebbero essere condotti per tutti gli agenti chimici per i quali si prevede un'esposizione umana, quindi prima della loro commercializzazione;
- test alternativi possono avere rilevanza in un prossimo futuro, ma al momento non sono ancora stati attentamente valutati e validati;
- è inaccettabile che nel mondo scientifico si preferisca credere alle teorie anziché ai dati.

In conclusione si può affermare che:

- i risultati di studi a breve e medio termine, nel migliore dei casi, sono solo orientativi e meglio utilizzabili per studi meccanicistici, ma in nessun caso i loro risultati possono sostituire i saggi sperimentali a lungo termine di cancerogenicità;
- le indagini epidemiologiche forniscono teoricamente le informazioni più dirette (sebbene ritardate), ma trovano spesso ineliminabili ostacoli alla loro fattibilità, e spesso danno risultati non risolutivi, per inadeguatezze e carenze, metodologiche e non;
- se condotti adeguatamente, i saggi sperimentali sono relativamente rapidi e altamente predittivi circa gli effetti sull'uomo (è anche vero che studi di questo tipo non correttamente impostati e condotti rappresentano un fattore di confusione).

Considerato che esistono strumenti validi per l'identificazione di agenti cancerogeni, come i saggi a lungo termine, è sorprendente che questi non siano utilizzati tempestivamente e appieno per valutare la cancerogenicità o meno di agenti presenti in maniera ubiquitaria.

### I maggiori programmi internazionali di saggi di cancerogenicità su roditori

Per consentire l'estrapolazione dei dati sperimentali alla situazione umana la programmazione e la conduzione degli esperimenti devono rispondere ad alcuni requisiti fondamentali che riguardano: il modello animale, il numero dei livelli di dose/concentrazione/intensità espositiva, le vie espositive di trattamento, il numero di animali per sesso e per gruppo, l'età de-

Sede	US NTP	CRCCM/FER
n. agenti studiati e valutati	503	112
evidenza di cancerogenicità		
chiara	53%	44%
equivoca	14%	16%
nessuna	31%	40%
saggi inadeguati	2%	-

Tabella 4. Risultati dei due maggiori programmi internazionali di saggi di cancerogenicità su roditori.

Table 4. Results of the two major international programmes of carcinogenic bioassays on rodents.

gli animali all'inizio del trattamento, la durata del trattamento, la durata e la conduzione dell'esperimento, l'accuratezza e la consistenza nella valutazione delle lesioni patologiche e, molto importante, la disponibilità di dati adeguati riguardanti le patologie spontanee in un ampio numero di controlli storici. Al mondo esistono due grandi programmi di studi sperimentali di cancerogenicità a lungo termine finalizzati all'identificazione e quantificazione dei rischi cancerogeni ambientali, in particolare di origine industriale. Il primo, promosso dal National toxicology program (NTP) del governo statunitense, è iniziato nel 1980 grazie all'intuizione e all'impegno dell'allora direttore David Rall. Il secondo è quello condotto nei laboratori del Centro di ricerca sul cancro Cesare Maltoni della Fondazione europea Ramazzini (CRCCM/FER). Il numero degli agenti studiati e i risultati ottenuti dai due rispettivi programmi sono riportati nella tabella 4.<sup>22,23</sup>

Una direttiva dell'Unione europea emanata nel 1979 (numero 79/831) e riguardante la sicurezza delle sostanze nuove immesse nel mercato, stabiliva fra l'altro la necessità di una valutazione preventiva della loro tossicità, compresa la genotossicità e la cancerogenicità.<sup>24</sup>

### Il programma di esperimenti di cancerogenicità a lungo termine del CRCCM/FER

Il programma del CRCCM/FER fu iniziato nei laboratori del Castello di Bentivoglio a metà degli anni Settanta da Cesare Maltoni (allora direttore dell'Istituto di oncologia «F. Addari» di Bologna) che, grazie alla sua profonda cultura oncologica e contrariamente alle convinzioni allora correnti, intuì che:

- il cancro poteva essere efficacemente combattuto se si fossero conosciuti e rimossi, o ridotti, gli agenti e le situazioni causali;
- gli esperimenti di cancerogenicità a lungo termine su roditori erano lo strumento più congruo per predire i rischi,
- tali esperimenti dovevano possedere un alto livello di sensibilità e specificità affinché i risultati potessero essere fruibili per la sanità pubblica;
- per raggiungere alti livelli di affidabilità i suddetti studi dovevano essere pianificati e condotti secondo procedure standardizzate e controllate, precorrendo i tempi di applicazione di quelle che all'inizio degli anni Ottanta furono denominate «buone pratiche di laboratorio» (*good laboratory practices*) e codificate con apposite normative prima negli Stati Uniti e quindi negli altri Paesi industrializzati.

La maggior parte degli agenti chimici e fisici studiati dal CRCCM/FER per valutare i potenziali effetti cancerogeni sono stati selezionati sulla base dei seguenti criteri:

- la quantità prodotta all'anno e quindi la potenziale popolazione esposta;
- la necessità di confermare sperimentalmente il possibile risultato equivoco di un rischio evidenziato da indagini epidemiologiche; un esempio paradigmatico recente è stato lo studio sperimentale sulla fluoroadenite (una fibra naturale pre-

## Il protocollo del Centro di ricerca sul cancro Cesare Maltoni

- Modello animale:** il modello animale utilizzato al CRCCM/FER è il ratto Sprague-Dawley, della colonia utilizzata in questo laboratorio da più di 30 anni, il cui tumorigramma di base è ben conosciuto e la cui suscettibilità al cancro è vicina a quella degli uomini. In alcuni casi, vengono utilizzati anche altre specie e ceppi (ratti Wistar, topi Swiss, criceti Golden).
- Gruppi sperimentali e loro dimensione:** il numero dei gruppi sperimentali è 2-3 o più, compreso il gruppo di controllo (in base alla rilevanza dell'agente per la sanità pubblica). I gruppi sono costituiti da un minimo di 50 animali per sesso e per gruppo fino a 500.
- Vie di esposizione:** le vie di somministrazioni riproducono l'esposizione umana. Le vie di somministrazione più frequentemente utilizzate sono: ingestione, iniezione, inalazione, e esposizioni esterne (per agenti fisici, come le radiazioni).
- Concentrazioni/dosi/intensità degli agenti testati:** sono testati almeno tre livelli di dose, compreso il massimo livello tollerabile (MTL), un livello confrontabile al livello espositivo umano e un livello intermedio. Se la MTL non è disponibile dalla letteratura scientifica, vengono condotti esperimenti di range-finding per determinarla.
- Inizio del trattamento:** il trattamento può iniziare durante la vita fetale (12° giorno), in età perinatale, o a 6-8 settimane di età. In alcuni casi particolari, l'inizio del trattamento può iniziare ad altre età.
- Durata del trattamento:** il trattamento dura tipicamente 104 settimane o per l'intero corso della vita. La durata può a volte essere differente.
- Durata della biofase:** la biofase dura fino alla morte spontanea, diversamente dai tipici esperimenti a lungo termine condotti in altri laboratori che terminano dopo 104 settimane dall'inizio del trattamento. Questa caratteristica distintiva del CRCCM permette ad un agente di esprimere completamente il suo potenziale cancerogeno.
- Conduzione dell'esperimento:** durante l'esperimento, vengono misurati il consumo giornaliero medio di acqua e cibo per gabbia e i pesi corporei individuali, una volta alla settimana per le prime 13 settimane, quindi ogni 2 settimane fino a 110 settimane di età. I pesi corporei continuano ad essere misurati fino alla fine dell'esperimento. Fino a 110 settimane di età gli animali vengono sottoposti settimanalmente a controllo clinico, quindi ogni 4 settimane fino alla fine dell'esperimento.
- Patologia:** ogni animale è sottoposto a una necropsia completa dopo la morte spontanea e ad una valutazione istopatologica di tutti gli organi. Durante la necropsia, vengono raccolti i seguenti organi e tessuti: tutti gli organi e tessuti con lesioni patologiche (con un margine di tessuto normale), cute, ghiandola mammaria (4 sedi), cervello (3 sezioni sagittali), ipofisi, ghiandola di Zymbal, ghiandole salivari, ghiandola di Harder, cranio (5 sezioni, con le cavità orali e nasali, i condotti uditivi interni ed esterni), lingua, tiroide e paratiroide, faringe e laringe, timo e linfonodi mediastinici, trachea, polmoni e bronchi principali, cuore, diaframma, fegato (2 lobi), milza, pancreas, reni, ghiandole surrenali, esofago, stomaco (pre e ghiandola), intestino (duodeno, digiuno-ileo, colon, sigma-retto), vescica, prostata, gonadi, grasso bruno interscapolare, linfonodi mesenterici e sottocutanei. Tutti gli organi sono conservati e fissati in etanolo al 70%, eccetto le ossa che sono fissate in formalina al 10% e quindi decalcificate con formaldeide al 10% e acido formico al 20% in soluzione acquosa. I campioni normalmente sono rifilati secondo le procedure operative standard del CRCCM/FER. I campioni rifilati sono processati e inclusi in blocchetti di paraffina; vengono eseguite sezioni di 3-5 µm per ogni campione.

Tabella 5. Protocollo standard degli esperimenti di cancerogenicità a lungo termine condotti al CRCCM/FER.

Table 5. Standard protocol of long term carcinogenic bioassays used at the Cesare Maltoni Cancer Research Center of the European Ramazzini Foundation.

sente nella roccia di lava dell'Etna) che ha confermato l'effetto mesoteliomatogeno della fibra rivelato da precedenti osservazioni epidemiologiche;<sup>25</sup>

■ la ripetizione di studi con inadeguato piano sperimentale e condotti nel passato su composti di ancora ampia diffusione/consumo, come il dolcificante artificiale aspartame.<sup>26,27</sup> Nella storia della cancerogenesi industriale gli studi sperimentali condotti dal professor Maltoni per studiare gli effetti cancerogeni del cloruro di vinile, un monomero chimico utilizzato per la produzione della plastica polivinilica, costituiscono una pietra miliare. I risultati di quegli studi, comunicati alla comunità scientifica nell'aprile 1973<sup>28</sup> e pubblicati sul Federal register (1974),<sup>29</sup> dimostrarono inequivocabilmente

una stretta correlazione causale tra l'esposizione al cloruro di vinile e l'insorgenza di angiosarcoma del fegato nei roditori. A ciò seguì, in un breve spazio di tempo, la pubblicazione di «case report» (fino ad allora mai comunicati, o forse volutamente tenuti riservati) riguardanti lavoratori dell'industria petrolchimica statunitense esposti a cloruro di vinile e deceduti per angiosarcoma del fegato.<sup>30</sup>

I risultati degli studi di Maltoni formarono le basi scientifiche determinanti per la definizione di nuovi livelli di esposizione negli ambienti di lavoro: da 250-500 ppm di concentrazione di cloruro di vinile nell'aria si passò a 1 ppm. La maggior parte degli studi di cancerogenicità a lungo termine condotti al CRCCM/FER sono programmati e condotti

seguendo un protocollo di base le cui caratteristiche sono riassunte nella **tabella 5**.

In alcuni casi gli esperimenti sono programmati e condotti seguendo un protocollo diverso rispetto a quello standard. Ciò accade quando si vogliono valutare i potenziali effetti di cosiddetti rischi cancerogeni diffusi. Questi sono rischi presumibilmente di bassa potenza ma ai quali può essere esposta la quasi totalità della popolazione del pianeta, e sono rappresentati da:

- agenti cancerogeni deboli a qualunque dose;
  - basse o bassissime dosi di agenti cancerogeni di qualunque tipo;
  - miscele di piccole dosi di agenti cancerogeni di ogni tipo.
- In definitiva, è noto che i rischi cancerogeni diffusi esistono, ma non si conosce la dimensione del loro impatto sanitario. La **tabella 6** riporta alcuni esempi di potenziali rischi cancerogeni diffusi e il possibile grado di percezione del pubblico. Gli effetti dei rischi cancerogeni diffusi sono difficilmente evidenziabili e quantificabili epidemiologicamente (dato il numero dei fattori confondenti) o con studi sperimentali ordinari. Sono necessari invece studi che, per le loro caratteristiche, possono essere definiti mega-esperimenti in quanto:
- devono essere condotti utilizzando un ampio numero di animali (almeno 300-1.000 per gruppo sperimentale);
  - l'esposizione deve avvenire in tutte le fasi dello sviluppo vitale (dalla vita fetale fino alla morte spontanea).

Se si rileva un rischio cancerogeno, i mega-esperimenti sono in grado di definire il tipo e l'entità della risposta tumorale. Se invece non si dovesse evidenziare un effetto cancerogeno, ciò non escluderebbe un rischio che teoricamente può non essere stato rilevato nelle condizioni sperimentali applicate. In ogni caso, i risultati servono a stabilire una soglia di salvaguardia che è proporzionale alla correttezza metodologica seguita e alla potenza globale dell'esperimento.

In oltre 35 anni di attività, nei laboratori del CRCCM/FER sono stati studiati 207 agenti, utilizzando oltre 160.000 roditori (soprattutto ratti e topi). Complessivamente sono stati condotti oltre 400 esperimenti. A tutt'oggi sono stati pubblicati i risultati degli studi su 112 agenti. La **tabella 7** riporta l'elenco degli agenti di cui è stata dimostrata una chiara evidenza di cancerogenicità.<sup>25-27,31-33</sup>

Tipo	Percezione pubblica
campi elettromagnetici a frequenza estremamente bassa (corrente elettrica)	+++
campi elettromagnetici a radiofrequenza (telefonia mobile)	++++
particelle (PM10, PM2,5, PM1)	++++
organismi geneticamente modificati	++
uranio impoverito	+

Tabella 6. Potenziali rischi cancerogeni diffusi: alcuni esempi.

Table 6. Potential diffuse carcinogenic risks: some examples.

### La caratteristica distintiva degli studi di cancerogenicità condotti al CRCCM

Un carattere distintivo dell'approccio metodologico seguito al CRCCM/FER rispetto ad altri centri di ricerca è la scelta di protrarre l'esperimento fino alla morte naturale di tutti gli animali in studio. Troncare arbitrariamente la durata di una sperimentazione dopo appena i due terzi dell'arco naturale di vita degli animali, infatti, può abbassare il livello di sensibilità dello studio e, quindi, non rivelare un possibile effetto cancerogeno dell'agente studiato. I vantaggi di tale approccio sono stati sottolineati recentemente da altri autori.<sup>34,35</sup>

Gli esempi seguenti confermano la maggiore sensibilità degli studi in cui gli animali vengono osservati fino alla loro morte spontanea.

#### Alcol etilico

Vari studi epidemiologici hanno dimostrato una correlazione positiva tra l'assunzione di bevande alcoliche e l'aumento di rischio di cancro di cavità orale, faringe, laringe, esofago e fegato. Molti studi sperimentali condotti su ratti e topi esposti a varie concentrazioni di alcol etilico somministrato nell'acqua da bere non hanno però dimostrato lo stesso effetto. In un esperimento condotto nei laboratori CRCCM/FER l'alcol etilico è stato somministrato per ingestione attraverso l'acqua a una concentrazione del 10% (0 nel gruppo di controllo), fornita *ad libitum* a ratti Sprague-Dawley maschi e femmine; sia i genitori sia la prole sono stati compresi nell'esperimento. Il trattamento dei genitori è iniziato a 39 settimane di età, 7 giorni prima dell'accoppiamento. Il trattamento della prole è iniziato durante la vita fetale. Il trattamento per tutti i ratti è durato fino a morte spontanea.

A differenza degli studi precedenti, condotti per periodi più brevi della vita naturale degli animali, nelle condizioni sperimentali del CRCCM è stato dimostrato che l'alcol etilico è cancerogeno per vari organi e tessuti, in particolare induce tumori maligni del cavo orale, della lingua e delle labbra, dell'esofago, le stesse sedi che sono state dimostrate essere gli organi bersaglio degli studi epidemiologici.<sup>36</sup>

#### Formaldeide

Durante gli anni Novanta la produzione mondiale di formaldeide era di oltre 12 milioni di tonnellate l'anno. Il maggiore impiego di questa sostanza è nella produzione di resine utilizzate negli adesivi e negli impregnanti impiegati nella costruzione di tavole di truciolato, mobili e altri prodotti di legno. La formaldeide inoltre è impiegata come conservante e disinfettante in molti prodotti cosmetici, per il trattamento dei capelli, deodoranti, lozioni, collutori e prodotti per le unghie.

Test condotti *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato la genotossicità della formaldeide. Studi di cancerogenicità a lungo termine su ratti Fisher 344 e topi B6C3F1 esposti a vapori di formaldeide per 24 mesi hanno dimostrato un aumento del-

## 151 agenti con «chiara» evidenza di cancerogenicità

**monomeri plastici**

cloruro di vinile  
cloruro di vinilidene  
acrilonitrile  
acetato di vinile  
ossido di stirene

**polimeri plastici**

ivoclar  
acronite  
lucitone  
teflon

**solventi clorurati**

tricloroetilene

**aldeidi**

formaldeide

**pesticidi**

mancozeb

**composti inorganici**

solfuro di cadmio (cadmio giallo)  
cromato di piombo (cromo giallo)  
cromato di piombo basico (cromo arancio)  
cromato solfato e molibdato di piombo (molibdeno arancio)  
allume di cromo  
solfato basico di cromo (neochromium)  
cromato di piombo rivestito di silice  
dischi di vitallio  
dischi di vitallio (forati)  
cromato di zinco basico (zinco giallo)

**radiazioni ionizzanti**

radiazioni gamma

**composti usati nell'industria conciaria**

chromitan b  
baychrom  
quebraco  
tupasol

**farmaci**

adriamicina  
epirubicina  
idarubicina

**additivi alimentari**

aspartame<sup>26, 27</sup>

**benzene: additivi ossigenati e idrocarburi aromatici**

alcol metilico  
alcol etilico  
metil tert-butil etere (mtbe)  
amil-metil etere terziario (tame)  
di-isopropil etere (dipe)  
benzene  
toluene<sup>32</sup>

**materiali naturali e artificiali**

crocidolite  
crisotilo (3 campioni)  
amosite  
antofillite  
cemento-amianto  
amianti modificati (6 campioni)  
lana di vetro<sup>33</sup>  
lana di roccia  
fibre ceramiche  
talco (industriale)  
erionite  
fibre di carbonio (dischi)  
fluoroedenite<sup>25</sup>

Modificata da: Sofritti M et al., 2002.

Tabella 7. Progetto di esperimenti a lungo termine condotti dal CRCCM/ FER: risultati.

Table 7. Project of long term carcinogenicity bioassays performed at CMCR/ERF: results.

l'incidenza di carcinomi squamocellulari delle cavità nasali.<sup>37</sup> Complessivamente, gli studi epidemiologici hanno indicato una relazione causale tra il cancro del naso-faringe e l'esposizione a formaldeide.

In uno studio di cancerogenicità a lungo termine condotto presso i laboratori del CRCCM/ FER la formaldeide è stata somministrata per ingestione nell'acqua da bere a ratti maschi e femmine Sprague-Dawley di 8 settimane d'età per 111 settimane. Tutti gli animali sono stati osservati fino a morte spontanea. Nelle condizioni sperimentali testate si è dimostrato che la formaldeide è un agente cancerogeno multipotente che induce tumori maligni della mammella, del tratto gastrointestinale, linfomi e leucemie.<sup>38</sup>

In una recente rivalutazione, la IARC (International agency

for research on cancer) ha classificato la formaldeide come agente cancerogeno per l'uomo causalmente correlato al cancro del naso-faringe. Inoltre, è stata dimostrata una forte (anche se non considerata sufficiente) evidenza dell'associazione tra esposizione a formaldeide e leucemie nell'uomo.<sup>39</sup>

**Mancozeb**

Il Mancozeb, un ditio-carbamato dietilenico, è stato per decenni uno dei fungicidi più comunemente usati e commercializzati. In Italia, e in particolare in Emilia-Romagna, è uno dei fungicidi più utilizzati in agricoltura. Nonostante sia prodotto e commercializzato da più di 60 anni, i precedenti studi di cancerogenicità su questo fungicida avevano prodotto risultati inadeguati per il limitato numero di animali impie-

gati per sesso e per gruppo e per la scarsa durata degli esperimenti. A causa di queste inadeguatezze e del grande numero di persone esposte (i lavoratori coinvolti nella sua produzione e utilizzo, i cittadini residenti nelle aree agricole dove le coltivazioni vengono irrorate, i consumatori di prodotti contaminati), alla fine degli anni Ottanta presso il CRCCM/FER è stato condotto un esperimento di cancerogenicità a lungo termine per valutare i rischi cancerogeni del Mancozeb.

Il mangime addizionato con il fungicida è stato somministrato *ad libitum* a ratti Sprague-Dawley maschi e femmine di 8 settimane di età per 104 settimane. Tutti gli animali sono stati osservati fino a morte spontanea. In queste condizioni sperimentali il Mancozeb ha dimostrato di essere un agente cancerogeno multipotente in grado di indurre un aumento dell'incidenza dei tumori maligni di testa e collo e della tiroide nei maschi e nelle femmine, e di linfomi e leucemie nei maschi.<sup>40</sup>

#### Studi in corso al CRCCM/FER

Dal 2002 al CRCCM/FER è in corso un vasto programma di mega-esperimenti per valutare i potenziali effetti cancerogeni:

- delle radiazioni non-ionizzanti: campi magnetici della corrente elettrica alternata-50 Hz e campi elettromagnetici a radiofrequenza della telefonia mobile, in specifico quelli generati dalle antenne delle stazioni radio-base;
- di alcuni dolcificanti artificiali, in primo luogo l'aspartame (su ratti e topi) per acquisire ulteriori dati da utilizzare per la quantificazione del rischio, in secondo luogo il sucralosio, che sta sostituendo l'aspartame in molti prodotti.

Il mega-esperimento sui campi magnetici della corrente elettrica è stato programmato su 7.133 ratti esposti a vari livelli di intensità di campo, a partire dalla vita fetale fino a morte spontanea, e in diverse situazioni espositive. Attualmente la biofase dello studio è terminata ed è iniziata la processazione del materiale sperimentale e l'elaborazione dei dati. I primi risultati saranno disponibili entro la fine del 2009.

Il mega-esperimento sui campi elettromagnetici a radiofrequenza della telefonia mobile è stato programmato su 2.448 ratti, anch'essi esposti a vari livelli di intensità di campo, dalla vita fetale fino alla morte spontanea. La biofase dell'esperimento è iniziata alla fine del 2005 ed è durata fin oltre la metà del 2008. Almeno altri due anni saranno necessari per la valutazione dei dati e la pubblicazione dei risultati.

Questi studi sui possibili effetti cancerogeni dei campi elettromagnetici non-ionizzanti sono importanti per la sanità pubblica, in quanto possono fornire informazioni utili ai fini di creare una base scientifica più adeguata per le normative in questo settore.

#### Conclusioni

Il cancro rappresenta oggi, e ancora di più lo sarà in futuro se non verranno intrapresi adeguati provvedimenti, uno dei maggiori problemi di sanità pubblica da affrontare con urgenza

nei Paesi industrializzati, ma presto anche in quelli in via di sviluppo. Ciò è dovuto alla dimensione epidemiologica della malattia, alle sue pesanti conseguenze sociali, e soprattutto ai fattori e ai rischi ambientali determinati dai modelli di sviluppo degli ultimi decenni.

Così come nel secolo passato la sconfitta delle grandi epidemie è stata possibile, prima ancora dell'introduzione delle vaccinazioni e delle terapie antibiotiche, grazie alle grandi bonifiche ambientali e all'introduzione di adeguate norme igieniche che hanno abbattuto la carica di microrganismi ambientali, altrettanto oggi non si può prescindere dal fatto che il perseguimento di un'efficace strategia di controllo dei tumori si deve basare anche e soprattutto sulla prevenzione, in particolare sull'identificazione degli agenti e delle situazioni di rischio cancerogeno. Gli esperimenti a lungo termine di cancerogenicità sono fondamentali per l'identificazione di potenziali agenti cancerogeni, sia per quanto riguarda la valutazione di quelli già da tempo in commercio sia per quelli che devono essere ancora commercializzati.

Alla luce di ciò, l'intenzione di porre forti restrizioni o addirittura di vietare l'uso di uno strumento di ricerca così importante per la sanità pubblica, come emerge dalle direttive che la Commissione e il Parlamento europeo (sollecitati dalla pressione di associazioni animaliste) stanno per emanare, rappresenta un atto legislativo inopportuno o meglio, per non usare un eufemismo, irresponsabile. Soprattutto se si considera che i requisiti maggiormente monitorati per valutare la qualità degli esperimenti di tossicità a lungo termine, in particolare di cancerogenicità, sono le condizioni ambientali dello stabulario (temperatura, umidità, luminosità), una dieta bilanciata, il controllo giornaliero dello stato di salute. Condizioni queste di base per garantire una durata e qualità di vita ottimale agli animali in esperimento.

Sia i Paesi industrializzati sia quelli in via di sviluppo stanno attraversando un periodo di transizione che sarà più o meno lungo e durante il quale verranno scoperte nuove fonti energetiche, nuove tecnologie, nuovi farmaci e nuovi approcci terapeutici, verranno introdotti l'uso industriale delle nanoparticelle e delle nanotecnologie, ci saranno nuovi prodotti alimentari, nuovi stili di vita: non si può procedere senza tenere conto degli errori del passato.

Oggi, e ancor di più in futuro, sono disponibili strumenti scientifici più adeguati per valutare la sicurezza e i rischi delle nuove frontiere che vengono proposte. Questi strumenti debbono essere usati, e soprattutto si deve imparare a prendere atto dei dati che essi forniscono e agire conseguentemente.

Quali le prospettive? Diceva John Bailar a proposito del cancro: «Decenni di sforzi (e pubblicità) dedicati al miglioramento delle terapie mediche non hanno avuto una ricaduta clinicamente rilevante. D'altro canto, non sembra che ci siano all'orizzonte nuove importanti terapie in attesa di essere scoperte. Immaginate dove avremmo potuto essere oggi se avessimo destinato almeno una parte di quegli sforzi in pro-

getti di ricerca sulla prevenzione o agli screening. Non è mai troppo tardi per effettuare i necessari mutamenti per riorientare le nostre priorità di ricerca».<sup>41</sup>

Conflitti di interesse: nessuno

## Bibliografia

- American cancer society. Cancer statistics 2008. Disponibile su: <http://www.cancer.org>
- Associazione Italiana Registri Tumori, AIRT Working Group. I tumori in Italia. Rapporto AIRTUM 2006: incidenza, mortalità e stime. *Epidemiol Prev* 2006; 30(1) Suppl 2.
- Registri tumori di mortalità nominativa di Bologna e Provincia, stampati in proprio dal Centro di ricerche epidemiologiche della FER, 1982-2004.
- American cancer society. New Report aims to improve care for long-term cancer survivors. New York 2006/02/14. Disponibile su: <http://www.cancer.org>
- Ries LAG, Meibert D, Krapcho M et al. SEER cancer statistics review, 1975-2005. National Cancer Institute, Bethesda MD, 2008. Disponibile su: [http://seer.cancer.gov/cst/1975\\_2005/accessible\\_contents.html](http://seer.cancer.gov/cst/1975_2005/accessible_contents.html)
- Schmähl D. Possibilities and limitations in cancer prevention. *Acta Oncol* 1988; 9: 79-89.
- Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med* 1971; 284(15): 878-81.
- Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66(6): 1191-308.
- Landrigan PJ, Markowitz S. Current magnitude of occupational disease in the United States. Estimates from New York State. *Ann NY Acad Sci* 1989; 572: 27-45; discussion 55-60.
- Leigh JP, Markowitz SB, Fahs M et al. Occupational injury and illness in the United States. Estimates of costs, morbidity, and mortality. *Arch Intern Med* 1997; 157(14): 1557-68.
- Belpomme D, Irigaray P, Hardell L et al. The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environ Res* 2007; 105(3): 414-29.
- Sasco AJ. Cancer and globalization. *Biomed Pharmacother* 2008; 62(2): 110-21.
- Ward EM, Schulte PA, Bayard S et al. Priorities for development of research methods in occupational cancer. *Environ Health Perspect* 2003; 111(1): 1-12.
- Smith AH, Shearn VI, Wood R. Asbestos and kidney cancer: the evidence supports a causal association. *Am J Ind Med* 1989; 16: 159-66.
- Enterline PE, Henderson V. Asbestos and kidney cancer. *Am J Ind Med* 1990; 17: 645.
- Seidman H, Selikoff IJ. Decline in death rates among asbestos insulation workers 1967-1986 associated with diminution of work exposure to asbestos. *Ann NY Acad Sci* 1990; 609: 300-17.
- Lemen RA. Asbestos-related disease risks still exist. *Eur J Oncol* 2005; 10(1): 9-30.
- US National academy of sciences. Toxicity testing. Strategies to determine needs and priorities. Washington DC, National Academy Press 1984.
- Tomatis L. The predictive value of rodent carcinogenicity tests in the evaluation of human risks. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1979; 19: 511-30.
- Yamagiwa K, Ishikawa K. Experimentelle Studien über die Pathogenese der Epithelialgeschwülste. *Mitteilungen Med Facultat Kaiserl Univ Tokyo* 1915; 15: 295-344.
- Maronpot RR, Flake G, Huff J. Relevance of animal carcinogenesis findings to human cancer predictions and prevention. *Toxicol Pathol* 2004; 32 suppl 1: 40-48.
- Huff J. Long-term chemical carcinogenesis bioassays predict human cancer hazards. Issues, controversies, and uncertainties. *Ann NY Acad Sci* 1999; 895: 56-79.
- Soffritti M, Belpoggi F, Knowles K. Rischi ambientali e cancro: il ruolo della prevenzione primaria. *L'Ecologist italiano: la salute dell'uomo e della natura* 2006. Libreria Editrice Fiorentina, pp. 130-46.
- Direttiva 79/831/CEE del Consiglio, 18 settembre 1979. Disponibile su: <http://eur-lex.europa.eu/>
- Soffritti M, Minardi F, Bua L et al. First experimental evidence of peritoneal and pleural mesotheliomas induced by fluoroedenite fibres present in Etnean volcanic material from Biancavilla (Sicily, Italy). *Eur J Oncol* 2004; 9: 169-75.
- Soffritti M, Belpoggi F, Degli Esposti D et al. First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 379-85.
- Soffritti M, Belpoggi F, Tibaldi E et al. Life-span exposure to low doses of aspartame beginning during prenatal life increases cancer effects in rats. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 1293-97.
- Maltoni C. Occupational carcinogenesis. Report to the Second international Symposium on cancer detection and prevention (Bologna, April 9-12, 1973). *Adv Tum Prev Detect Charat* 1974; 2: 19-26.
- Federal register. 1974; 39 (67; April 5): 12343.
- Creech JL, Johnson MN. Angiosarcoma of liver in the manufacture of polyvinyl chloride. *J Occup Med* 1974; 16(3): 150-51.
- 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 NY Acad Sci* 2002; 982: 26-45.
- Soffritti M, Belpoggi F, Padovani M et al. Life-time carcinogenicity bioassays of toluene given by stomach tube to Sprague-Dawley rats. *Eur J Oncol* 2004; 9: 91-102.
- Maltoni C, Minardi F, Soffritti M, Lefemine G. Long-term carcinogenicity bioassays on industrial chemicals and man-made mineral fibres, at the Bentivoglio (BT) laboratories of the Bologna Institute of oncology: premises, programs and results. *Toxicol Ind Health* 1991; 7: 63-94.
- Huff J, Jacobson ME, Davis D. The limits of two-year bioassay exposure regimens for identifying chemical carcinogens. *Environ Health Perspect* 2008; 116(11): 1439-42.
- Caldwell JC, Jinot J, DeVoney D, Gift JS. Evaluation of evidence for infection as a mode of action for induction of rat lymphoma. *Environ Mol Mutagen* 2008; 49(2): 155-64.
- Soffritti M, Belpoggi F, Cevolani D et al. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of methyl alcohol and ethyl alcohol in rats. *Ann NY Acad Sci* 2002; 982: 46-69.
- Kerns WD, Pavkov KL, Donofrio DJ et al. Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Res* 1983; 43(9): 4382-92.
- Soffritti M, Belpoggi F, Lambertini L et al. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of formaldehyde and acetaldehyde in rats. *Ann NY Acad Sci* 2002; 982: 87-105.
- IARC Working group. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxy-2-propanol. Lyon, France, WHO Press 2006; Volume 88.
- Belpoggi F, Soffritti M, Bua L et al. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity on ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats. *Ann NY Acad Sci* 2002; 982: 123-36.
- Bailar JC. The fight against cancer: the need to reorient the approach. *Eur J Oncol* 2003; 8: 75-76.