

Pietro Apostoli, Roberto Bergonzi, Simona Catalani

Classificazione della 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-para-diossina come cancerogena: un percorso accidentato

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Applicata, Sezione di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale. Università degli Studi di Brescia

Con il presente lavoro riprendiamo la "Tribuna per il dibattito sugli aspetti teorico scientifici e tecnico applicativi in tema di cancerogenesi professionale". Dopo aver affrontato il tema della cancerogenicità degli elementi metallici ci siamo dedicati agli aggiornamenti della classificazione di sostanze cancerogene, alle metodologie di valutazione e relative criticità. Ci auguriamo che l'argomento possa creare l'occasione per aprire un dibattito e un confronto sul tema della cancerogenicità professionale, oltre a fornire nuovi spunti per approfondimenti futuri.

RIASSUNTO. La classificazione come cancerogena della 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-para-diossina (2,3,7,8-TCDD) e di alcuni altri congeneri ad essa assimilati è un tema dibattuto da lungo tempo e costellato da studi epidemiologici e sperimentali spesso contraddittori.

Nel prendere la decisione di includere la 2,3,7,8-TCDD nel Gruppo 1, la IARC nel 1997 diede molto peso alle evidenze di tipo meccanicistico e agli studi sugli animali da esperimento, giudicando meno influente il fatto che le evidenze nell'uomo fossero limitate. Questo negli anni ha generato non poche polemiche: da una parte c'è chi ha condiviso questa classificazione ipotizzando tal volta un aumentato rischio di mortalità per dosi di poco superiori a quelle della popolazione generale, dall'altra studiosi che, ri-analizzando o mescolando coorti e sottocorti precedentemente investigate, hanno messo in dubbio la sua reale cancerogenicità.

Nel 2010, nel processo di revisione delle sostanze cancerogene da parte della IARC, le evidenze sui meccanismi di cancerogenesi che avevano portato ad una prima classificazione sono state confermate ed unite a più chiare evidenze di tipo epidemiologico. È stato inoltre ribadito che tali evidenze riguardano "tutti i tumori combinati", cioè che l'aumento di rischio era significativo quando veniva considerato il numero complessivo delle diverse forme tumorali. Dall'altra parte sono rimasti, non senza una certa sorpresa, con evidenza limitata nell'uomo alcuni tumori specifici, come il sarcoma dei tessuti molli e il Linfoma non-Hodgkin, fino ad allora ritenuti addirittura tipici della 2,3,7,8-TCDD.

L'obiettivo di questa revisione è quello di presentare come il processo di valutazione si è evoluto e fornire strumenti per una sua utilizzazione più critica e consapevole.

Parole chiave: diossina, cancro, IARC.

ABSTRACT. CLASSIFICATION AS CARCINOGENIC FOR 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-PARA-DIOXIN: AN EVENTFUL JOURNEY. Carcinogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin (2,3,7,8-TCDD) and some other dioxin congeners is long time discussed by epidemiological and experimental studies, often with conflicting findings.

The inclusion of 2,3,7,8-TCDD in Group 1 by IARC in 1997 was based essentially on mechanistic evidence and experimental studies despite the limited evidence in humans.

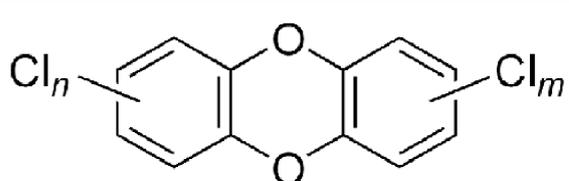
This procedure generated a lot of controversy. Some scientists agree with this classification and sometimes suggested increased cancer mortality risk with TCDD daily intake similar to those of the general population. Other authors re-analyzing data

Introduzione

Le diossine comprendono due grandi famiglie di composti aromatici clorurati: le policlorodibenzo-para-diossine (PCDD) ed i policlorodibenzofurani (PCDF), gruppi di molecole che presentano similitudini nella struttura chimica, nelle proprietà fisiche e nell'azione biologica.

La struttura generale delle PCDD è riportata nella figura 1; la sostituzione sugli anelli benzenici di uno o più atomi di idrogeno con un atomo di cloro, dà origine a 75 possibili differenti strutture, o congeneri. Analogamente, i policlorodibenzofurani, in cui l'anello contenente l'ossigeno è a 5 atomi e non sei, possono essere classificati in 135 diversi congeneri a seconda del grado di clorurazione (1, 2).

A causa della loro natura idrofobica e alla resistenza alla degradazione biochimica, questi composti persistono nell'ambiente e si bioaccumulano nei tessuti ricchi di grassi di animali e uomini. Le caratteristiche principali di questi composti sono già state trattate nella monografia



Numero di atomi di cloro (n+m)	Numero di isomeri
1	2
2	10
3	14
4	22
5	14
6	10
7	2
8	1
Totale	75

Figura 1. Formula di struttura delle policlorodibenzo-para-diossine e numero degli isomeri clorurati

mainly from caselist previously investigated did not confirm the 2,3,7,8-TCDD carcinogenicity.

In the review process of carcinogenic substances by IARC in 2010, the evidence for 2,3,7,8-TCDD carcinogenicity in humans upgraded from limited to sufficient, due to confirmed and integrated epidemiological evidences. It is also confirmed that these findings relate to all cancers combined, while for some "classic" cancers related to TCDD (as soft tissue sarcoma and non-Hodgkin lymphoma) the evidence remains limited. In this paper a literature review accompanied by comments is reported with the aim to provide information about the evaluation process and tools for its more critical and scrupulous interpretation.

Key words: dioxin, cancer, IARC.

pubblicata recentemente su questa rivista (3) ed alle quali si rimanda per gli aspetti generali. In questa sede si vuole approfondire la questione della loro cancerogenicità, proseguendo il percorso già iniziato con i policlorobifenili (4).

Per le PCDD, i congeneri cui sono stati attribuiti maggiori proprietà tossiche sono quelli contenenti da 4 a 8 atomi di cloro, in particolare quando la sostituzione coinvolge le posizioni 2,3,7,8. Gli atomi di cloro nelle quattro posizioni laterali, infatti, conferiscono ad essi la massima affinità con il recettore arilico (Aryl hydrocarbon receptor, AhR), dando luogo al maggior numero di azioni tossiche correlate.

L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) nel 1997 ha dedicato a PCDD e PCDF una prima monografia nella quale, passati in rassegna tutti gli studi epidemiologici e sperimentali disponibili, ha assegnato al Gruppo 1 (cancerogenicità certa) ad un solo congenere delle PCDD: la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-para-diossina (2,3,7,8-TCDD) (5). Negli studi epidemiologici, l'evidenza più significativa riguardava l'incremento di rischio per "all cancer combined", indicando con questi termini un aumento dei decessi imputabili al complesso delle patologie tumorali: in questo articolo tali termini saranno tradotti come "tutti i tumori combinati". Molti sforzi scientifici sono stati spesi nel dimostrare l'associazione di alcune specifiche forme tumorali con l'esposizione a 2,3,7,8-TCDD, in particolare i sarcomi dei tessuti molli e i linfomi non-Hodgkin. Tuttavia, già nel 1997, il Gruppo di Lavoro IARC giudicò che l'eccesso di rischio per sarcomi dei tessuti molli osservato in alcune coorti, tra cui anche una italiana, non fosse sufficientemente provato, per la dipendenza dei risultati dal basso numero di casi, per la fondata possibilità di errori nella classificazione di tale forma tumorale, per la mancanza di una chiara relazione con l'esposizione a 2,3,7,8-TCDD e perché tale incremento era invece assente in alcune delle principali coorti occupazionali prese in esame. Per quanto riguarda i linfomi non-Hodgkin, un incremento di rischio fu osservato nelle quattro coorti occupazionali più significative e negli studi riguardanti la popolazione di Seveso (6-10). L'assenza di una completa concordanza tra i risultati dei diversi studi e la non significatività statistica della maggior parte di tali incrementi di rischio, portarono la IARC a suggerire di usare cautela nell'interpretare i dati come evidenza di causalità.

Nella revisione IARC del 2010, di cui è attualmente consultabile solo l'*evaluation* e un estratto pubblicato su Lancet Oncology (11, 12), è stata confermata la cancerogenicità certa della 2,3,7,8-TCDD per tutti i tumori combinati, estendendola al 2,3,4,7,8-pentaclorodibenzofurano (2,3,4,7,8-PeCDF), ed al 3,3',4,4',5-pentaclorobifenile (PCB 126), poiché ritenuti in grado di agire con il medesimo meccanismo di azione della 2,3,7,8-TCDD; per quanto riguarda tumore ai polmoni, sarcoma dei tessuti molli e linfoma non-Hodgkin l'evidenza nell'uomo rimane limitata.

Di seguito riportiamo le principali tappe del processo di valutazione della cancerogenicità di queste sostanze, evidenziandone le maggiori criticità.

Meccanismi di azione

I meccanismi di azione coinvolti nella cancerogenesi della 2,3,7,8-TCDD si possono ricondurre principalmente a danno ossidativo, soppressione del controllo immunitario, proliferazione cellulare e promozione tumorale.

I segnali di trasduzione indotti da PCDD (principalmente 2,3,7,8-TCDD) sono mediati dal recettore arilico (AhR).

Questa proteina è un fattore di regolazione ubiquitario che lega 2,3,7,8-TCDD e i suoi congeneri aromatici planari in modo saturabile e con alta affinità (13-16).

La monografia IARC del 1997 (5) riportava sia le evidenze sperimentali e plausibilità delle principali vie di azione della cancerogenicità della 2,3,7,8-TCDD, sia le ipotesi dei meccanismi di promozione del tumore. Queste ultime includono le alterazioni dell'espressione di geni coinvolti nella differenziazione e crescita cellulare, i danni al DNA mediati dal citocromo P-450 e l'espansione di cellule preneoplastiche attraverso l'inibizione dell'apoptosi, la modulazione positiva intra ed extra cellulare di stimoli della crescita.

Nella valutazione finale era riportato che la 2,3,7,8-TCDD è un cancerogeno multi-sito negli animali da esperimento per il coinvolgimento di AhR; si sottolineava, inoltre, che questo recettore è altamente conservato dal punto di vista dell'evoluzione con una funzionalità simile sia negli uomini che negli animali da esperimento.

Tuttavia, una delle maggiori criticità sollevate negli anni in merito all'interazione TCDD-AhR era proprio la trasposizione degli effetti osservati negli animali all'uomo.

La maggiore differenza fra uomini e animali è in relazione all'emivita biologica; la 2,3,7,8-TCDD ha una emivita di 5.8-11.3 anni nell'uomo (17), mentre nei roditori è in genere di soli 10-30 giorni (5). La 2,3,7,8-TCDD si accumula nei tessuti umani con un tasso più elevato rispetto agli animali da esperimento in seguito a esposizione cronica a basse dosi. Questo aumentato accumulo suggerisce che negli uomini la risposta TCDD-indotta, in seguito a esposizione prolungata, avvenga a dosi giornaliere più basse rispetto alla dose richiesta per suscitare la stessa risposta in animali da esperimento.

Un esempio delle possibili differenze interspecie è la sensibilità 100 volte maggiore verso gli effetti letali acuti

della 2,3,7,8-TCDD fra cavie e criceti; analogamente, i ratti Long Evans e Han Wistar sono simili nella sensibilità dell'induzione del CYP1A1, ma differiscono di 100 volte nella sensibilità della promozione tumorale dell'epatocarcinoma (18).

Nei roditori si osserva l'insorgenza di tumore primario nel fegato in seguito di esposizione a 2,3,7,8-TCDD ad alte dosi, evento raramente osservato in popolazioni umane.

Nel 2003 Cole nella sua review "critica" (19) sulla cancerogenicità della TCDD, sottolineava che la maggior parte delle prove riportate nella monografia IARC del 1997 in merito al coinvolgimento di AhR si riferiva a forme di tossicità diverse dai tumori (cloracne, effetti epatici, gastrointestinali, neurologici, immunologici, polmonari, tiroidei, renali e diabete). La monografia stessa riconosceva che non è noto se esista un collegamento diretto tra una serie di alterazioni biochimiche che seguono il legame con il recettore ed ogni specifico effetto tossico.

Un ulteriore punto discusso da Cole era che secondo la IARC altre sostanze chimiche (dibenzo-para-diossine, polliclorodibenzofurani e polliclorobifenili) agiscono in un modo simile alla 2,3,7,8-TCDD, anche se con potenze differenti, per quanto riguarda il meccanismo di cancerogenicità; tuttavia, solo la 2,3,7,8-TCDD era stata dichiarata cancerogeno per gli esseri umani, mentre gli altri composti erano stati classificati come non cancerogeni per l'uomo (gruppo 3).

L'autore osservava anche che i tumori più segnalati negli esperimenti su animali erano quelli a carico del fegato e della cavità orale, che non trovano particolare corrispondenza con i tipi di tumore osservati nell'uomo.

La revisione IARC del 2010 (11, 12) riformula parte delle osservazioni sopra citate affermando che l'interazione della 2,3,7,8-TCDD con il recettore arilico è il meccanismo responsabile della cancerogenesi di tale sostanza e, sottolineando come tale proprietà sia mantenuta fra le diverse specie compreso l'uomo, inserisce sostanze come 2,3,4,7,8-PeCDF e PCB 126 nel Gruppo 1 proprio a causa della loro elevata affinità con AhR.

Dal momento che il recettore arilico è espresso in molti tessuti (20) con differenze tessuto specifiche in termini di livelli dell'espressione e profilo dei geni target, c'è una sostanziale complessità e difficoltà nell'associare le trascrizioni TCDD-mediate di specifici geni target e responsi tossici tessuto-specifici, incluso il tumore. È importante sottolineare che il coinvolgimento dei geni target individuali non è correlata con una cancerogenicità sito-specifica. Ad esempio, mentre la TCDD non ha effetti come promotore tumorale nei ratti ovariectomizzati e non stimola la proliferazione cellulare epatica in questi animali, è ancora in grado di indurre CYP1A2 nella stessa maniera dei ratti integri (21). Allo stesso modo, l'induzione del CYP1A1 da parte di TCDD è molto simile in ratti maschi e femmine, anche se i maschi sono quasi completamente resistenti alla cancerogenicità della TCDD (22).

Gli studi meccanicistici successivi hanno approfondito il ruolo dell'interazione verso il recettore arilico individuando nuovi repressori AhR e proteine che interagiscono con il recettore, ad esempio l'XAP2 (23-26). Sono stati

inoltre caratterizzati meccanismi molecolari che coinvolgono AhR e possibili associazioni con lo sviluppo del tumore, come variazioni di proteine citosoliche trasduttrici, mobilitazione del calcio, proteine onco-soppressori, fattori di crescita, oncogeni e proteine del ciclo cellulare (27, 28).

Nella revisione 2010 è riportato che fra i meccanismi recettore-mediati responsabili della cancerogenesi, quello più rappresentato è la promozione dei tumori attraverso la modificazione della replicazione cellulare e dell'apoptosi e, in seconda misura, l'aumento di stress ossidativo responsabile di danni al DNA.

La promozione dei tumori attraverso l'inibizione dell'apoptosi conferisce alla 2,3,7,8-TCDD anche un ruolo di co-cancerogeno, ossia di favorire la proliferazione di cellule tumorali iniziate da cancerogeni certi.

Chopra *et al.* (29) hanno esaminato gli effetti della 2,3,7,8-TCDD sui meccanismi di apoptosi indotti da raggi UV, ocratossina A e cicloeximide su epatociti di ratto. Sia i raggi UV che l'ocratossina provocano un'attivazione delle caspasi ed effetti apoptotici nucleari. La 2,3,7,8-TCDD inibisce l'induzione dell'apoptosi causata dai raggi UV e questi effetti sembrano essere dipendenti dall'attivazione dei recettori Ah, come è stato dimostrato con l'impiego di un antagonista AhR. Gli autori suggeriscono pertanto che l'inibizione dell'apoptosi da parte della 2,3,7,8-TCDD dipenda o dall'induzione di proteine anti apoptotiche dipendenti dal recettore Ah o dall'inibizione di proteine pro-apoptotiche indotte dai raggi UV.

L'induzione di stress ossidativo è un fattore determinante nella cancerogenesi della 2,3,7,8-TCDD. Studi su ratti e topi dopo singoli trattamenti ad alte dosi hanno evidenziato un aumento della produzione di anioni superossido, perossidazione lipidica e rottura del DNA a singolo filamento (30, 31). Studi in vitro mostrano che la promozione della trasformazione di fibroblasti di topo in seguito ad esposizione a concentrazioni non citotossiche di 2,3,7,8-TCDD è inibita dalla somministrazione di antiossidanti come vitamina C ed A (32). Recentemente, è stato proposto un ulteriore meccanismo d'azione a supporto dell'azione cancerogena della 2,3,7,8-TCDD: la proliferazione di cellule tumorali attraverso l'azione diretta sulla trascrizione mitocondriale. I segnali di stress mitocondriale indotti dalla 2,3,7,8-TCDD possono essere propagati in parte attraverso AhR, ma anche attraverso meccanismi indipendenti da tale recettore, come l'induzione di proteine chinasi C e segnali extracellulari regolati da chinasi (33, 34).

Una delle modalità per cui la 2,3,7,8-TCDD può promuovere lo sviluppo del cancro è stata descritta da Biswas *et al.* nel 2008 (35). I dati ottenuti dopo esposizione di miociti hanno confermato un'inibizione della trascrizione mitocondriale ed un'alterazione del potenziale transmembrana mitocondriale e dell'omeostasi del Ca⁺⁺. Le cellule trattate con 2,3,7,8-TCDD mostravano una resistenza all'apoptosi con un fenotipo altamente invasivo. Questo suggerisce che la 2,3,7,8-TCDD potrebbe promuovere una progressione dei tumori agendo sulle funzioni mitocondriali attivando segnali di stress.

Jenkins *et al.* (36) hanno ipotizzato che il periodo di esposizione a interferenti endocrini come la 2,3,7,8-TCDD possa influire sulla suscettibilità del tumore al

seno: l'esposizione prenatale alla molecola potrebbe alterare la differenziazione delle ghiandole mammarie aumentando la suscettibilità. Nello studio è stata dimostrata una down regolazione della superossidodismutasi 1 (SOD1), calo che può contribuire alla formazione di un ambiente non idoneo per affrontare una esposizione a radicali liberi. Secondo gli autori, l'esposizione prenatale a 2,3,7,8-TCDD può predisporre al tumore al seno nella prole adulta alterando il proteoma delle cellule mammarie.

Evidenze di laboratorio su cavie hanno dimostrato, ad esempio, come l'esposizione in determinate "finestre espositive" (15° giorno dal concepimento) a 2,3,7,8-TCDD abbia comportato un numero nettamente più elevato di tumori mammari rispetto a quelli osservati in un gruppo esposto a cancerogeno certo (dimetildibenzoantracene) al 50° giorno dalla nascita.

Questi lavori, come numerosi altri (37, 38) aprono pertanto scenari assolutamente nuovi rispetto a neoplasie in netto aumento come i tumori mammari e mettono in discussione la visione stessa della cancerogenesi. Questa potrebbe non essere più vista come il risultato di una mutazione somatica, con l'acquisizione di vantaggi del clone neoplastico attraverso passaggi successivi, ma come il risultato di un'alterata programmazione tissutale che avverrebbe nel corso della vita fetale o comunque nel corso di determinate "finestre espositive" (39).

Studi epidemiologici

La 2,3,7,8-TCDD è da tempo ritenuta la più tossica fra i congeneri esaminati, seguita da diossine a più alto grado di clorurazione.

Come stabilito dalla IARC, un agente può essere, eccezionalmente, incluso nel Gruppo 1 anche quando il grado di evidenza di cancerogenicità negli uomini non è sufficiente, ma è dimostrata una sufficiente evidenza di cancerogenicità negli animali da esperimento ed una forte evidenza negli uomini che l'agente agisca mediante un meccanismo di cancerogenesi simile.

Il gruppo di lavoro IARC, nell'esprimere il parere in merito alla TCDD, ha tenuto in considerazione le seguenti osservazioni:

- (i) La 2,3,7,8-TCDD è un cancerogeno multiorgano negli animali da esperimento che agisce, come ben dimostrato, attraverso un meccanismo che coinvolge il recettore arilico;
- (ii) questo recettore, dal punto di vista evolutivo, si è altamente conservato ed ha lo stesso funzionamento nell'uomo come negli animali da esperimento;
- (iii) la concentrazione tissutale nelle popolazioni umane esposte ad alte concentrazioni nelle quali è stato osservato un aumento del rischio di tumore è simile a quella misurata in ratti esposti a dosi risultate cancerogene.

In seguito alla classificazione da parte della IARC, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha riconsiderato la valutazione del rischio e abbassato notevolmente i livelli giornalieri tollerabili (40, 41). L'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente degli Stati Uniti (42), che aveva

classificato nel 1985 la diossina come un cancerogeno umano probabile (probable human carcinogen), nella relazione di rivalutazione del rischio pubblicata nel 2003 afferma che la diossina è meglio caratterizzata da una classificazione come cancerogeno certo per l'uomo (carcinogenic to humans).

Gli studi più importanti presi in considerazione per la valutazione della cancerogenicità della 2,3,7,8-TCDD sono essenzialmente quattro coorti (Stati Uniti, Olanda e due in Germania) di soggetti impiegati nella produzione di erbicidi (le diossine erano sottoprodotti indesiderati del processo di sintesi industriale di 2,4,5-triclorofenolo, precursore dell'erbicida acido 2,4,5-triclorofenossiacetico) ed una coorte di soggetti residenti nel territorio di Seveso contaminato in seguito all'incidente all'impianto chimico ICMESA nel 1976 (6-10; 43-50).

All'interno di queste coorti, spesso sono state analizzate sottocoorti caratterizzate da esposizioni maggiori e/o periodo di latenza più lungo.

Lo studio NIOSH pubblicato da Fingerhut *et al.* (44, 51) comprendeva 5172 lavoratori di 12 impianti chimici statunitensi, e riportava uno standardized mortality ratio (SMR) per tutti i tumori combinati pari a 1.15 (95% CI 1.02-1.30), mentre nella sottocoorte di lavoratori con più di un anno di esposizione a 2,3,7,8-TCDD e almeno 20 anni di latenza (n = 1520), la mortalità per tutti i tumori combinati era significativamente più elevata (SMR 1.5; CI 1.2-1.8).

Gli studi riguardanti l'incidente avvenuto nel 1953 nello stabilimento BASF in Germania hanno evidenziato che nella sottocoorte dei lavoratori più esposti, la mortalità per tutti i tumori combinati era significativamente più alta quando venivano presi in considerazione tempi di latenza uguali o superiori a 20 anni, sia che l'esposizione fosse valutata mediante diagnosi di cloracne e altre lesioni della pelle (SMR 2.0, 90% CI 1.2-3.2) (45), sia attraverso una stima di dose interna (SMR 2.0, 95% CI 1.1-3.4) (49), mentre tale evidenza non appariva quando veniva presa in considerazione la coorte nel suo insieme. Si osserva, in particolare, un aumentato rischio per tumori all'apparato respiratorio (SMR 2.2 nel gruppo con dose cumulativa di 2,3,7,8-TCDD più alta). Ott e Zober (49) rimarcano che le piccole dimensioni della coorte (circa 250 lavoratori) e la mancata attenuazione di fattori confondenti sono responsabili della fluttuazione degli incrementi di rischio misurati.

Anche un'altra importante coorte occupazionale tedesca (n = 1583; 1184 uomini), concernente l'impianto di Amburgo della Boehringer-Ingelheim, è stata ampiamente studiata (50, 52). Becher *et al.*, 1996 (53) analizzando una sottocoorte, indicano un SMR per tutti i tumori combinati di 1.3 (CI 1.0-1.5), mentre Flesch-Janys *et al.* (54), utilizzando come riferimento un gruppo di lavoratori di una società di fornitura di gas, ha evidenziato un eccesso di mortalità per tumore, con un trend positivo (p<0.01) all'aumentare dell'esposizione; in particolare, nei soggetti con concentrazioni di diossine/furani (in ng TEQ/Kg di lipidi ematici) superiori al 90° percentile, il rischio relativo era pari a 2.7 (CI 1.7-4.4), come correttamente riportato in una successiva pubblicazione (55).

Passando agli studi condotti negli impianti chimici olandesi di erbicidi, nella coorte di lavoratori di uno di essi ($n = 1167$), in cui nel 1963 si era verificato un incidente con conseguente rilascio di PCDD, Hooiveld *et al.* (56) avevano osservato che la mortalità per tutti i tumori combinati era superiore all'atteso (SMR 1.5, CI 1.1-1.9), con evidenza anche per siti specifici, in particolare vescica (SMR 3.7, CI 1.0-9.5) e rene (SMR 4.1, CI 1.1-10.4).

Il Gruppo di Lavoro IARC ha preso in considerazione anche gli studi di mortalità e di incidenza di neoplasie nella popolazione di Seveso, nonostante avesse osservato che: (i) le dimensioni del gruppo di popolazione più esposta fossero modeste ($n = 804$), (ii) che una latenza di 15 anni (10 per lo studio di incidenza) potesse essere troppo breve per il manifestarsi di eventi cancerogenici, (iii) che la determinazione dei livelli ematici di 2,3,7,8-TCDD era stata condotta solo in un piccolo numero di soggetti (9).

In tali studi l'area era stata suddivisa in 3 zone, in relazione ai livelli di contaminazione da 2,3,7,8-TCDD del suolo (zona A, 15.5-580.4 ppt; zona B, 1.7-4.3 ppt; zona R, 0.9-1.4 ppt). La mortalità per tutti i tumori combinati nelle aree contaminate non presentava incrementi rispetto all'atteso; eccessi di mortalità erano invece stati osservati per tumori specifici: negli uomini, cancro rettale nella zona B (RR 2.9, CI 1.4-6.2), cancro all'esofago nella zona R (RR 1.6, CI 1.1-2.4), e leucemia nella zona B (RR 3.1, CI 1.4-6.7); nelle donne era evidente un eccesso di mortalità per mieloma multiplo (RR 6.6, CI 2.3-18.5) e linfoma di Hodgkin (RR 6.5, CI 1.5-30.0) nella zona B. Analogamente agli studi di mortalità, per quanto riguarda l'incidenza di neoplasie, nella zona A non era stato osservato alcun eccesso rispetto all'atteso, mentre un incremento di neoplasie del sistema ematopoietico era presente nella zona B.

Le coorti sono state oggetto di vari studi epidemiologici e successivi follow-up da parte di diversi autori, sia singolarmente che raggruppandole.

Kogevinas *et al.* (57) hanno ampliato con ulteriori sistematiche uno studio coordinato dalla IARC (condotto da Saracci *et al.*, nel 1991, 58) fino ad ottenere un totale di 36 coorti (alcune delle quali già incluse negli studi sopra citati), provenienti da 12 Paesi e comprendenti oltre 21000 addetti alla produzione o allo spargimento di erbicidi contaminati o meno da 2,3,7,8-TCDD e da altri congeneri a più alto grado di clorurazione, con un follow-up complessivo esteso dal 1939 al 1992. In 15 coorti di 8 Paesi, l'eccesso riscontrato di mortalità per tumore era superiore al 10%; nel sottogruppo di 13831 lavoratori esposti a erbicidi contaminati da diossine, gli autori hanno osservato un piccolo eccesso, statisticamente significativo, di mortalità per tutti i tumori combinati (SMR 1.12, CI 1.04-1.21), con l'evidenza di un trend positivo all'aumentare del tempo trascorso dalla prima esposizione, ma indipendente dalla durata dell'esposizione stessa. Dallo studio era emerso anche un eccesso di mortalità per tumori specifici, in particolare per neoplasie del rene (SMR 1.60, CI 1.05-2.35), per linfoma non-Hodgkin (SMR 1.39, CI 0.89-2.06), e per il sarcoma dei tessuti molli (SMR 2.03, CI 0.75-4.43), al quale sono attribuiti 6 decessi, avvenuti tutti almeno 10 anni dopo la prima esposizione; per quanto riguarda le

neoplasie respiratorie dopo l'esclusione del tumore al polmone, l'eccesso è superiore all'atteso, ma gli autori non hanno escluso un effetto confondente dovuto ad esposizione ad asbesto (57).

Dopo aver preso in esame queste coorti, il Gruppo di Lavoro IARC ha individuato e focalizzato l'attenzione sulle sottocoorti caratterizzate da esposizione più elevata e da un adeguato periodo di latenza, allo scopo di evidenziare meglio, se presente, un'associazione causale.

Un aumento del rischio per tutti i tumori combinati è stato osservato in varie sottocoorti industriali ad elevata esposizione. Combinando i risultati di quattro di queste sottocoorti, tale rischio è stato calcolato dal Gruppo di Lavoro IARC pari a 1.4 (CI 1.2-1.6, $p < 0.001$).

L'evidenza di una relazione dose-risposta osservata in particolare in due studi (49, 55) tendeva a rafforzare l'ipotesi di una relazione causale tra esposizione a 2,3,7,8-TCDD e mortalità per tumore, anche se tale relazione non appare negli studi di coorte più grandi.

Per quanto riguarda l'aumento di rischio per tumori in siti specifici, il Gruppo di Lavoro aveva ritenuto che gli studi valutati indicassero un'evidenza, giudicata comunque molto meno significativa, di un incremento di rischio di mortalità per linfomi non-Hodgkin, consigliando però cautela nell'interpretare i dati come una relazione causale e per il tumore polmonare (dalla elaborazione dei dati delle quattro sottocoorti industriali: SMR 1.4, CI 1.1-1.7, $p < 0.01$), per il quale non era comunque esclusa l'esposizione occupazionale ad altri composti cancerogeni e l'abitudine al fumo; relativamente a sarcoma dei tessuti molli, neoplasie dell'apparato gastrointestinale e mielomi multipli, non vi era completa concordanza nei risultati.

Nelle sue conclusioni, pertanto, il Gruppo di Lavoro sottolineava che l'evidenza più significativa di cancerogenicità della 2,3,7,8-TCDD è per tutti i tumori combinati, piuttosto che per un sito specifico; l'esistenza di pochi altri esempi di agenti in grado di sviluppare tumori in tutti i siti (fra tutti il fumo di sigaretta e le radiazioni ionizzanti, che comunque presentano siti specifici predominanti), consigliavano comunque di trattare i dati epidemiologici disponibili con le dovute cautele.

La decisione dell'Agenzia Internazionale fu apertamente contestata (19) o per lo meno i risultati ottenuti da alcuni Autori sollevavano dubbi in merito alla bontà della classificazione IARC della 2,3,7,8-TCDD (59). L'argomento dava comunque origine a pubblicazioni critiche (60). Come il parere espresso dal comitato della Accademia Nazionale delle Scienze nel 2006 (61) in seguito alla rivalutazione del rischio dell'EPA nel 2003 (62) "...pur ritenendo che la questione riguardi più la semantica che la scienza, e che le implicazioni sulla salute pubblica sarebbero identiche, l'EPA dovrebbe chiarire se le evidenze sperimentali siano sufficienti ad inquadrare la 2,3,7,8-TCDD come cancerogeno certo e non come cancerogeno probabile". La risposta è contenuta in un corposo documento consultabile sul web (63), che però EPA sottolinea non costituire la politica dell'Ente.

Altri autori sono stati meno diplomatici. Cole (19) ha sostenuto che le evidenze epidemiologiche di cancerogenicità nell'uomo fossero da considerarsi inadeguate an-

ziché limitate, ed ha sollevato dubbi su ogni argomento che ha motivato la scelta del Gruppo di Lavoro IARC: sottostima di possibili fattori confondenti ed errori metodologici negli studi di coorte, mancanza di una conferma conclusiva che l'interazione con il recettore arilico sia sufficiente per la cancerogenicità, inconsistenza nella definizione di cancerogeno multi-sito negli animali, oltre ai risultati negativi apparsi in alcuni studi successivi al 1997.

Collins *et al.*, (59) hanno esaminato 1615 lavoratori esposti a diossine in un impianto di produzione di triclorofenolo (facenti parte della coorte NIOSH). I decessi per tutti i tumori combinati erano pari all'atteso, quelli per tumore al polmone erano inferiori (SMR 0.7). Un incremento di rischio è stato osservato per linfomi non-Hodgkin (SMR 1.3, CI 0.6-2.5), leucemia (SMR 1.9, CI 1.0-3.2) e sarcoma dei tessuti molli (SMR 4.1, CI 1.1-10.5), ma solo per questi ultimi gli autori identificano un trend associato all'esposizione. Peraltro, la registrazione di questa causa di morte appare particolarmente delicata, sia per il ridotto numero di osservazioni nelle coorti, sia per la possibilità di errori di diagnosi e di incertezza nella codifica sui certificati di morte.

In un concomitante lavoro riguardante addetti di un impianto di produzione di pentaclorofenolo, esposti soprattutto a diossine ad alto grado di clorurazione, ma con bassa contaminazione da 2,3,7,8-TCDD, Collins *et al.* (64) osservarono che i decessi per tumori combinati e per tumore al polmone erano simili al numero atteso, mentre i 7 decessi per linfoma non-Hodgkin presuppongono un incremento di rischio (SMR 2.8, CI 1.1-5.7).

Molti degli studi pubblicati successivamente al 1997, di fatto, riprendono lavori pubblicati in precedenza, introducendo differenti modelli di stima dell'esposizione e/o prolungando il follow-up.

Steenland *et al.* (65) estesero il follow-up della coorte NIOSH investigata da Fingerhut *et al.* (51), di ulteriori 6 anni: il rapporto standardizzato di mortalità per tutti i tumori combinati era 1.13 (CI 1.02-1.25), 1.60 limitando lo studio al gruppo di soggetti più esposti. Gli Autori dimostrarono un trend statisticamente significativo di incremento di rischio all'aumentare dell'esposizione, confermato in una pubblicazione successiva (66), nella quale si riportava un aumentato rischio di mortalità per tutti i tumori combinati di 1.62 nel gruppo dei più esposti rispetto al gruppo dei meno esposti (in tal caso si trattava di un confronto interno alla stessa coorte). Tumore alla laringe e mieloma multiplo presentavano un eccesso di mortalità significativo (SMR 2.2 e 2.1, rispettivamente), seppur basati su un piccolo numero di casi. Un incremento di rischio per tumore alla vescica era stato attribuito dagli stessi autori ad esposizione a 4-amminobifenile in uno degli impianti (10 decessi sui 16 dell'intera coorte).

Cheng *et al.* (67) hanno rianalizzato la coorte statunitense di 3538 lavoratori maschi professionalmente esposti a 2,3,7,8-TCDD precedentemente valutata da Steenland *et al.* (64,65): lo studio, in grado di isolare gli effetti confondenti di fumo di sigaretta e di esposizione ad altri cancerogeni, era basato su una stima dei livelli sierici di diossina mediante modelli di eliminazione dipendenti da concentrazione ed età. Nella coorte si osservava un 17% di in-

cremento di rischio di mortalità per tumore rispetto alla popolazione generale (CI 1.03-1.32), confermando i dati presentati da Steenland. Tuttavia, gli autori sottolineavano che l'incremento era particolarmente significativo solo in uno degli 8 impianti chimici considerati, caratterizzato da un forte eccesso di decessi per tumori associati al fumo e da un eccesso di patologie non maligne associate al fumo. Un'associazione statisticamente significativa tra 2,3,7,8-TCDD e mortalità per tutti i tumori apparentemente non influenzata dall'abitudine al fumo, era invece presente quando veniva utilizzato il confronto interno alla coorte, con applicazione di una latenza di 15 anni ed esclusione del 5% dei soggetti più esposti.

I risultati di due studi metanalitici condotti sulle coorti tedesche e sulla coorte NIOSH (68, 69) tendevano a confermare l'esistenza di una relazione tra incremento di rischio di mortalità per tutti i tumori combinati ed esposizione crescente a 2,3,7,8-TCDD. Tuttavia, Starr (60) contestò le modalità di estrapolazione della relazione dose-risposta e affermò che, sebbene i dati epidemiologici utilizzati nella metanalisi dell'EPA (69) fossero consistenti con un incremento del 32% di mortalità per tumore, tale aumento non poteva essere attribuito all'esposizione a 2,3,7,8-TCDD ma ad altri fattori di rischio.

McBride *et al.*, (70) avevano esaminato un gruppo di 1599 lavoratori, dei quali 1134 esposti a 2,3,7,8-TCDD, in parte già oggetto di studi (57,58): l'incremento di rischio di mortalità per tutti i tumori combinati era leggermente superiore all'atteso (SMR 1.1, CI 0.9-1.4), ma l'assenza di un'associazione statisticamente significativa con i livelli espositivi fa ritenere agli autori che non si possa parlare di evidenza di aumentato rischio. Anche per linfoma non-Hodgkin, mieloma multiplo e sarcoma dei tessuti molli, il rischio standardizzato era superiore all'atteso, ma il piccolo numero di decessi osservati rendeva le stime del rischio particolarmente imprecise.

Nel 2004 Steenland *et al.* (71), in una revisione critica della letteratura, avevano sottolineato che una serie di studi, in parte già citati, condotti successivamente al 1997 e riguardanti la relazione esposizione-risposta (incremento del rischio di mortalità all'aumentare dell'esposizione), supportando l'esistenza di un rapporto causale, davano forza alla classificazione IARC (53, 65, 68, 72). Secondo gli autori, il giudizio di cancerogenicità veniva inoltre rafforzato sia da progressi nella comprensione del meccanismo di azione delle diossine regolato dal recettore arilico, sia da nuovi studi di coorte (o meglio follow-up successivi di studi già valutati), alcuni riguardanti il personale delle forze armate statunitensi esposte a 2,3,7,8-TCDD durante la guerra nel Vietnam in seguito allo spargimento del defogliante Agent Orange (73), altri aventi come oggetto la popolazione di Seveso. Vediamo più nel dettaglio gli sviluppi di queste due coorti.

La popolazione militare coinvolta nello spargimento aereo dell'erbicida "Agent orange" nel Vietnam nel periodo 1962-1971 (militari dell'Unità dell'Air Force impegnati nell'operazione denominata Ranch Hand) è stata al centro di diversi studi, peraltro non concordi nei risultati; questa popolazione non è stata esposta a livelli di 2,3,7,8-TCDD paragonabili a quelli delle coorti industriali, ma le

concentrazioni osservate erano comunque superiori al background della popolazione generale. L'Agent Orange era una miscela al 50% di acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) e acido 2,4,5-triclorofenossiacetico (2,4,5-T), utilizzata in enormi quantità (oltre 40 milioni di litri) durante il conflitto dalle forze statunitensi come defoliante. Il 2,4,5-T conteneva 2,3,7,8-TCDD come contaminante in concentrazioni comprese tra 50 ppb e 50 ppm.

Nel 2004, Akhtar *et al.* (73) determinarono nei veterani Ranch Hand (n = 1196) un rapporto standardizzato di incidenza (SIR) di tutti i tumori combinati pari a 1.08 (CI 0.9-1.3) e un SMR di 0.68. Osservarono però un incremento significativo di incidenza di melanomi della pelle (SIR 2.33, CI 1.4-3.65) e di tumore alla prostata rispetto alla popolazione generale. Quest'ultimo non è però attribuibile alla 2,3,7,8-TCDD, ma alla maggiore sorveglianza sanitaria cui erano sottoposti i militari (che spiegherebbe l'eccesso osservato anche nei veterani non esposti a diossina), oppure alla concomitante esposizione a 2,4-D, associata al tumore alla prostata in altri studi. In una pubblicazione successiva sulla medesima coorte, Pavuk *et al.* (74), hanno escluso un eccesso di rischio di tumore alla prostata in associazione all'esposizione a 2,3,7,8-TCDD.

Ketchum *et al.* (75) utilizzarono come riferimento un gruppo di veterani del conflitto nel sud-est asiatico non impiegati nello spargimento degli erbicidi. Dopo suddivisione del personale dell'operazione Ranch Hand in 3 categorie di esposizione secondo i valori di diossine nel siero, gli autori non trovarono sufficiente evidenza di un eccesso di rischio di mortalità per tumori combinati per esposizione a 2,3,7,8-TCDD, oltre a non osservare una relazione esposizione-risposta.

Anche Michalek *et al.* (76) non avevano osservato incrementi significativi di rischio per tumori combinati; tuttavia, lo stesso Autore, nel 2008 (77) ha riconosciuto che il periodo di servizio, i giorni impiegati nello spargimento del defogliante e gli anni di servizio nel sud-est asiatico erano importanti confondenti e che dopo opportuno aggiustamento, l'associazione tra 2,3,7,8-TCDD e rischio di incidenza di cancro risultava rafforzata (RR 1.4, CI 1.1-1.7, p = 0.005 significatività del trend del rischio relativo in relazione alle 3 classi di esposizione; RR 2.2 nel gruppo con concentrazioni sieriche di 2,3,7,8-TCDD più alte).

La popolazione di Seveso è senza dubbio preziosa per la valutazione degli effetti della 2,3,7,8-TCDD in quanto, a differenza delle coorti di lavoratori esposti, comprende una popolazione eterogenea per sesso, età e abitudini di vita. Inoltre, gli abitanti della città furono esposti a 2,3,7,8-TCDD pura e non ad una miscela di congeneri.

Il follow-up sulla mortalità per tumore nei 20 anni successivi all'incidente mostrava scostamenti significativi rispetto alle previsioni nelle aree più contaminate (A+B) per quanto riguarda tumore al retto (RR 1.8; 95% CI, 1.0-3.3. dopo stratificazione, confermato negli uomini con residenza nella zona B) e tumori al sistema linfatico ed emopoietico (RR 1.7; 95% CI, 1.2-2.5). Per questi ultimi, dopo stratificazione, l'incremento risultava significativo sia per uomini che per le donne, seppur riguardando forme diverse anche in relazione alla latenza, con particolare rilevanza nel gruppo di residenti della zona B.

Gli uomini residenti nelle zone A+B avevano un aumentato rischio di mortalità per tutti i tumori combinati (RR 1.1; 95% CI, 1.0-1.3; RR pari a 1.3 considerando una latenza di almeno 15 anni) e per tumore ai polmoni (RR 1.3; 95% CI, 1.0-1.7); per quest'ultimo, il maggior contributo all'incremento era attribuibile alla residenza nella zona A (78). L'articolo venne pubblicato accompagnato da un editoriale (79) in cui venivano sollevati due dubbi: i gruppi di popolazione di Seveso più esposti presentavano concentrazioni medie di 2,3,7,8-TCDD circa 10 volte inferiori rispetto alle coorti occupazionali, pertanto un incremento di rischio non sarebbe atteso; la mortalità per tumore osservata nella popolazione maschile poteva plausibilmente essere influenzata dall'abitudine al fumo, di cui non erano disponibili informazioni. Bertazzi *et al.* risposero alle critiche sollevate sostenendo validità e oggettività del proprio studio (80).

Nel follow-up di morbilità a 20 anni, la frequenza di alcuni tumori sito-specifici, in particolare le neoplasie linfatiche ed emopoietiche in entrambi i sessi, il cancro rettale negli uomini e del tratto biliare nelle donne, risultava significativamente superiore all'atteso. Nella zona A compariva anche un aumentato rischio di insorgenza di cancro mammario nella popolazione femminile dopo almeno 15 anni di latenza (81). In concomitanza, uno studio condotto su donne residenti nelle aree A e B di età inferiore a 40 anni al momento dell'incidente, ha evidenziato, mediante dosaggio di 2,3,7,8-TCDD ematica in 981 soggetti, che la comparsa di cancro mammario era correlata ai livelli di diossina, sebbene il piccolo numero di casi (n=15) faccia ritenere importante un ulteriore follow-up per un'eventuale conferma dei risultati (82).

Nel follow-up riguardante la mortalità a 25 anni dall'incidente, i dati sembravano invece delineare più chiaramente un trend positivo e statisticamente significativo di aumento del rischio relativo in funzione dell'entità dell'esposizione; tale andamento veniva confermato per mieloma multiplo e linfoma non-Hodgkin. Un rischio relativo di mortalità per tutti i tumori combinati pari a 1.65 (CI 1.04-2.62) era osservato nella zona A dopo almeno 20 anni dall'incidente, quasi interamente attribuibile ai decessi della popolazione maschile. Tuttavia, gli aumenti di mortalità per alcuni tumori specifici, quali il cancro al retto ed il tumore ai polmoni negli uomini perdevano la significatività statistica dimostrata nei follow-up precedenti (83).

A favore della cancerogenicità della 2,3,7,8-TCDD, alcuni studi epidemiologici hanno riportato relazioni positive esposizione-risposta, osservazioni indubbiamente molto importanti quando si voglia dimostrare l'esistenza di una relazione di causalità. Citiamo i principali risultati.

Flesch-Janis *et al.* (84) hanno ottenuto un trend positivo statisticamente significativo (p<0.01) degli RR quando la coorte di Amburgo veniva suddivisa per livelli ematici di PCDD/PCDF TEQ e confrontata con una coorte di lavoratori non esposti a diossine (1.15, 1.12, 1.25, 1.07, 1.23, 1.92). Nelle 4 classi di esposizione costruite da Ott e Zober (49) con le stime di dose cumulativa della coorte BASF, era visibile un trend positivo degli SMR per i decessi per tutti i tipi di tumore (0.8, 1.2, 1.4, 2.0) all'aumentare dei livelli di 2,3,7,8-TCDD. Hooiveld *et al.* (72)

calcolarono un RR (mortalità per tutti i tipi di tumore) di 4.7 per il gruppo di lavoratori più esposti, usando come riferimento interno il gruppo di lavoratori non esposti.

Steenland *et al.* (66) hanno diviso la coorte in settili secondo i livelli cumulativi di 2,3,7,8-TCDD nel siero, hanno applicato una latenza di 15 anni, e attribuendo un RR di mortalità per tutti i tipi di tumore pari a 1.00 al settile più basso, hanno evidenziato un trend positivo (1.00, 1.26, 1.02, 1.43, 1.46, 1.82, 1.62, $p = 0.003$). Sulla stessa coorte, anche Cheng *et al.* (67) hanno osservato un'associazione positiva tra 2,3,7,8-TCDD e mortalità per cancro ($p < 0.05$), dopo aggiustamento per un periodo di latenza di 15 anni.

Nel follow-up a 25 anni della coorte di Seveso citato poco sopra, il rischio relativo di mortalità per tumori del sistema linfatico ed emopoietico presentava un trend con le aree ($A = 2.23$, $B = 1.59$, $R = 0.99$, $p = 0.04$) (83).

Infine, un aumento del rischio di mortalità, basato sull'osservazione di soli 4 casi di sarcoma dei tessuti molli, all'aumentare dell'esposizione a 2,3,7,8-TCDD è stato presentato da Collins *et al.* (64).

È opportuno chiedersi se le evidenze di cancerogenicità affermate per esposizioni ad alti livelli di 2,3,7,8-TCDD, abbiano rilevanza anche nelle esposizioni a basse dosi, ovvero ai livelli della popolazione generale. In effetti, come già detto, in seguito alla classificazione IARC del 1997, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha ridotto notevolmente i livelli giornalieri tollerabili rispetto ai precedenti limiti (40, 41).

Nel sommario della monografia 69 (5), la IARC affermò che non era possibile valutare il rischio per la salute nella popolazione generale, mediamente esposta a concentrazioni di 2,3,7,8-TCDD di 2 o 3 ordini di grandezza inferiori a quelli osservati sia nelle coorti occupazionali, sia in studi di cancerogenicità su animali da laboratorio. Tuttavia, vari autori si sono cimentati, partendo dall'analisi dei dati ottenuti in studi di coorte per esposizione occupazionale ad alte dosi, nella stima dell'incremento di rischio di mortalità nella popolazione generale in seguito a esposizione a dosi vicine ai valori di background. Steenland *et al.* (71) hanno ritenuto questa estrapolazione accettabile, in quanto in alcune coorti di soggetti esposti ad alte dosi era presente un discreto numero di soggetti esposti a basse dosi; nel loro studio indicavano che livelli di esposizione a 2,3,7,8-TCDD paragonabili a quelli della popolazione generale possono essere cancerogeni, rendendo quindi opportuno fissare con maggior cautela i livelli consentiti di esposizione a lungo termine.

La stessa autrice (66,85) dall'analisi della coorte NIOSH aveva stimato, in presenza di un'esposizione a 2,3,7,8-TCDD pari al doppio dei livelli di background (quest'ultimo valutabile in circa 0.5 pg/Kg peso corporeo/giorno), un eccesso di rischio di 0.05-0.9% (considerando un rischio di mortalità per tumore nella popolazione americana a 75 anni del 12.4%). L'intervallo è molto ampio perché fortemente dipendente dal modello matematico adottato: gli autori consideravano più accettabile il modello che prediceva un incremento di 0.05% dei decessi per tumore. Cheng *et al.* (67) partendo dall'analisi della stessa coorte, avevano ottenuto una stima di eccesso di

mortalità (a 75 anni, ipotizzando una concentrazione sierica costante di 5 ppt di 2,3,7,8-TCDD) inferiore rispetto ai dati presentati da Steenland (0.01-0.006%).

Nel 1998 Becher *et al.* (86) studiando la coorte di Amburgo, avevano ottenuto un incremento di rischio dello 0.2% per un'esposizione giornaliera a 2,3,7,8-TCDD di 1 pg/Kg peso corporeo.

Nel 2000, la U.S. EPA (69) aveva condotto uno studio metanalitico che includeva le coorti NIOSH e le coorti tedesche. Ne ricavò un incremento dello 1% di rischio di mortalità per tumore in presenza di un carico corporeo di 47 ng TEQ/Kg ($ED_{0.1}$). Per confronto, sempre secondo l'EPA nella popolazione generale il carico corporeo è mediamente pari a 5 ng TEQ/Kg. Nel 2003, Crump *et al.* (68) elaborarono sulle stesse coorti (con ulteriore follow-up) una metanalisi che fornì come risultato un $ED_{0.1}$ di 91 ng TEQ/Kg, secondo i loro calcoli equivalente ad un intake giornaliero di 45 pg TEQ/Kg peso corporeo. Entrambi gli studi sono stati fortemente criticati dal punto di vista procedurale e nei conseguenti risultati da Starr (60, 87), mentre Popp *et al.*, (88) ritenevano che la stima del rischio ottenuta dall'EPA si basasse su presupposti errati, perché estrapolata da un modello lineare dose-risposta.

Modalità di valutazione dell'esposizione o identificazione dei soggetti esposti

Dall'analisi della letteratura scientifica si deduce che uno dei punti di maggior criticità degli studi epidemiologici è la valutazione dell'esposizione. Nella maggior parte degli studi, erano assenti misure analitiche individuali o, più spesso, erano disponibili prelievi di sangue di una piccola percentuale dei soggetti, spesso non rappresentativa, della coorte. Quando presenti, i prelievi biologici sono avvenuti, eccetto gli studi riguardanti la coorte di Seveso, vari decenni dopo l'esposizione.

Gli autori hanno affrontato e cercato di superare il problema attraverso diverse vie, sia per identificare i soggetti esposti, sia per determinare a quanto ammontassero le concentrazioni di 2,3,7,8-TCDD nel periodo di effettiva esposizione. Gli studi presentano quindi differenze nel valore di emivita della 2,3,7,8-TCDD adottato, nei modelli di eliminazione applicati, nella completezza delle informazioni riguardanti la storia lavorativa per l'identificazione dell'esposizione, nella percentuale di misure individuali di monitoraggio biologico disponibili, nei criteri di conferma della bontà delle stime di esposizione.

Fingerhut *et al.* (44) per identificare, all'interno della coorte NIOSH, i lavoratori esposti hanno utilizzato la durata dell'impiego nei reparti caratterizzati da contaminazione da 2,3,7,8-TCDD (individuati in base a condizioni operative, mansione, misure ambientali di diossina, intermedi di reazione, prodotti di sintesi). Per confermare la validità di questa modalità di misura dell'esposizione, nel 1988 hanno analizzato il siero di 253 lavoratori di due dei 12 impianti e constatato che i valori sierici correlavano bene con gli anni di lavoro ($r = 0.72$, $p < 0.0001$). Oltre ad avere a disposizione misure individuali per il 5% della coorte, uno dei limiti consiste nell'assunzione da parte

degli autori che l'esposizione fosse equivalente in tutti gli impianti.

Lo studio della coorte NIOSH, ridotto da 12 ad 8 impianti, è proseguito con il lavoro di Steenland *et al.* (65), che hanno calcolato per ogni lavoratore un punteggio che rappresentava l'esposizione cumulativa a 2,3,7,8-TCDD, secondo le conoscenze in merito a: contaminazione dei materiali, turni di lavoro, probabilità di contatto con la diossina, giorni di lavoro. Per confermare questo metodo di valutazione dell'esposizione cumulativa, sono stati confrontati i punteggi dei lavoratori con o senza cloracne, patologia considerata sintomo di esposizione ad alte dosi. Le mediane dei punteggi nei due gruppi, che apparivano molto diverse (11546 vs 77), sembrano sostenere l'approccio di Steenland, anche se la diagnosi di cloracne non è affidabile completamente come indicatore di esposizione a causa di fluttuazioni dovute a suscettibilità, come si osserva anche in Zober *et al.* (45).

Nel 2001, Steenland *et al.* (66) hanno quantificato, nel 1988, la 2,3,7,8-TCDD nel siero di 170 lavoratori di uno degli 8 impianti chimici della coorte; quindi, mediante un modello matematico che considerava tempo di dimezzamento della diossina, cinetica di accumulo ed escrezione e storia lavorativa, hanno calcolato i livelli sierici di 2,3,7,8-TCDD al momento dell'ultima esposizione. La correlazione di questi valori con i punteggi di esposizione calcolati nel lavoro precedente (ρ di Spearman 0.65) è stata utilizzata per calcolare le concentrazioni sieriche di tutta la coorte. L'approccio introdotto dagli autori e le analisi di monitoraggio biologico costituiscono un notevole passo in avanti rispetto al lavoro del 1999 (65), ma non hanno eliminato possibili errori di classificazione, ed inoltre i 170 lavoratori potrebbero non essere rappresentativi dell'intera coorte.

Collins *et al.* (60) hanno analizzato, nel 2004, 280 campioni di siero (17% della coorte del sito del Midland) e, integrando il modello cinetico di eliminazione con i dettagli della storia lavorativa del lavoratore, hanno determinato la dose media di 2,3,7,8-TCDD associata allo svolgimento di ciascuna delle mansioni considerate a rischio (ad esempio da misure di igiene industriale o da casi di cloracne). Per ogni lavoratore della coorte, conoscendo le dosi medie associate alla mansione, è stato tracciato un profilo di concentrazione lungo ogni momento della vita del lavoratore a partire dalla prima esposizione. La dose cumulativa è rappresentata dall'area sotto questa curva.

Quello condotto da Cheng *et al.* (67) appare essere lo studio sulla coorte NIOSH strutturato meglio. Come Steenland *et al.* (66) sono partiti dai valori ematici di 170 lavoratori, ma nel calcolo dei livelli sierici di TCDD al momento dell'ultima esposizione, hanno tenuto conto che la cinetica di eliminazione è dipendente da età e concentrazione. Gli autori hanno confermato la validità del modello grazie a 39 soggetti di cui possedevano misure seriali di 2,3,7,8-TCDD nel siero (36 della coorte di Seveso). Rispetto ai modelli di cinetica di eliminazione con emivita costante (nei quali si misura la concentrazione di TCDD, poi si applica un'equazione che tenga conto dell'emivita della diossina e degli anni di retrodatazione, cioè dal momento dell'analisi all'anno dell'ultima esposizione, con

opportuna correzione per il valore di background) il modello farmacocinetico età- e concentrazione-dipendente è più attendibile.

Dal punto di vista della metodologia di valutazione dell'esposizione, quello di Zober *et al.* (45) riguardante la coorte BASF è lo studio strutturato peggio. Già la numerosità della coorte era molto bassa (247 persone), ma il reclutamento risultò alquanto insolito: i soggetti furono suddivisi in 3 sottocoorti: 69 esposti all'incidente del 1953 secondo una lista preparata dall'Azienda nel 1954; una seconda sottocoorte, costruita nel 1983, di 84 lavoratori potenzialmente esposti a 2,3,7,8-TCDD comprendente principalmente vigili del fuoco e lavoratori dell'impianto (ma anche artigiani, meccanici, imbianchini, addetti alle operazioni di demolizione dell'autoclave o riparazioni tra il 1954 e il 1969); una terza sottocoorte, assemblata nel 1987, di 94 lavoratori potenzialmente esposti sulla base dei ricordi di colleghi ancora vivi, ed in parte da persone che dopo l'incidente erano impegnate in ispezioni dell'impianto. Nel 1986 è stata determinata la concentrazione di 2,3,7,8-TCDD in 28 persone (11%) per validare la suddivisione nei 3 differenti livelli di esposizione rappresentati dalle 3 sottocoorti (mediane rispettivamente di 24.5 ppt, 9.5 ppt e 8.4 ppt). Come ulteriore conferma, la stratificazione secondo i sintomi di cloracne mostrava alcune differenze nelle concentrazioni mediane (15 ppt vs 5.8 ppt); tuttavia nel gruppo senza cloracne alcuni soggetti presentavano valori elevati, per cui, come già espresso, non può essere ritenuto un indicatore completamente affidabile.

È possibile individuare, nelle modalità di reclutamento, due errori particolarmente evidenti: l'inclusione di vigili del fuoco nella sottocoorte 2 trattandosi di categoria notoriamente esposta anche ad altri cancerogeni e la costruzione della sottocoorte 3 basata su ricordi di chi è vivo; l'errore in tal caso è dimostrato anche da un SMR molto basso (0.48) per tutti i tumori combinati rispetto alla popolazione generale.

Nell'articolo presentato nel 1996 (49), sono stati superati alcuni errori precedenti. Gli autori erano in possesso di un questionario contenente molte informazioni (fumo, altre esposizioni, BMI...). Sono stati usati due diversi indici di esposizione: i sintomi di cloracne e la stima della dose cumulativa di 2,3,7,8-TCDD, ottenuta attraverso una lunga serie di passaggi. Gli Autori erano, infatti, partiti dalle analisi ematiche di prelievi eseguiti nel 1989 in 138 persone (54%) e successivamente avevano applicato come valore di emivita della 2,3,7,8-TCDD quello stimato da misure ripetute di 29 soggetti. L'emivita era stata prima modulata in funzione della percentuale di grasso corporeo dei soggetti (calcolato da BMI). Dalla concentrazione nel siero, gli autori hanno calcolato il carico corporeo totale moltiplicando per i lipidi nel corpo; poi, con modello di regressione non lineare, hanno determinato il contributo che la durata dell'esposizione e le diverse condizioni di lavoro fornivano alla dose di 2,3,7,8-TCDD al momento dell'esposizione. A questo punto, avevano applicato il modello di stima a tutta la coorte e diviso per il peso della persona, in modo da avere il valore in $\mu\text{g}/\text{Kg}$. La stima della dose cumulativa veniva confermata dal confronto dei valori medi di 3 gruppi, ottenuti suddividendo la coorte

per la gravità dei sintomi di cloracne (soggetti senza cloracne 38.4 ppt, forma moderata 420.8 ppt, forma severa di cloracne 1008 ppt). Le piccole dimensioni della coorte e, di conseguenza, il basso potere statistico, rimangono un limite importante.

Negli studi sulla coorte di Amburgo, Manz *et al.*, (50) avevano usato informazioni sui processi di produzione (concentrazione di 2,3,7,8-TCDD nei reattivi e nei prodotti, contaminazione del suolo delle varie aree dell'impianto), ottenute da misurazioni eseguite prevalentemente nel 1984. In tal modo, i lavoratori erano stati divisi in 3 gruppi di esposizione (bassa, media ed alta). Nel 1985 erano stati quindi analizzati 48 campioni (3%) di tessuto adiposo: 37 soggetti, appartenenti al gruppo ad alta esposizione presentavano una mediana di 137 ng/Kg, mentre gli altri 11 (gruppo medio e basso) avevano 60 ng/Kg (valore di background 7-20 ng/Kg). Altre modalità di stratificazione adottate hanno riguardato la durata dell'impiego nell'impianto e la data di inizio del rapporto di lavoro (prima o dopo l'incidente all'autoclave).

La coorte di Amburgo era stata successivamente studiata da Flesch-Janis *et al.* (54), i quali avevano applicato un modello farmacocinetico del primo ordine per calcolare la 2,3,7,8-TCDD alla fine dell'esposizione, partendo dai risultati di 190 analisi di siero o tessuto adiposo (emivita stimata da campionamenti seriali in 48 lavoratori). Nel 1998, Flesch-Janis *et al.* (89) implementavano il numero di analisi con ulteriori 275 campioni di siero e l'esposizione cumulativa veniva stimata con l'approccio dell'area sotto la curva, che abbiamo già visto applicato da Collins *et al.* (59) e di cui è disponibile un chiaro esempio grafico in McBride *et al.* (69). Tale stima era stata anche utilizzata da Becher *et al.* (86).

Bertazzi *et al.* (78) avevano classificato l'esposizione della coorte di Seveso in base alla residenza in tre aree geografiche al momento dell'incidente, considerate ad alto medio e basso livello di esposizione in seguito a misure di concentrazione di 2,3,7,8-TCDD nel suolo. Una serie di campioni di plasma raccolti subito dopo l'incidente in persone residenti nelle aree A (37% sul totale dei residenti), B (1%) ed R (0.1%) erano stati utilizzati per confermare la validità della suddivisione. L'elevata variabilità nella concentrazione del suolo all'interno di ciascuna area ed il numero comunque limitato di misure individuali non consentono di escludere possibili errori di classificazione. Tale limite è presente anche negli studi successivi (83, 90). Mediante questionario era stata invece confermata la concordanza tra residenza e presenza in una determinata area nel momento dell'incidente.

Non è escluso che l'evidenza, comparsa nei primi lavori (9,78), di un incremento di rischio localizzato maggiormente nei residenti della zona a media contaminazione (B) anziché dell'area più contaminata (A), possa essere giustificata dalla scarsa numerosità del gruppo di residenti della zona A, pertanto più "restio" dal punto di vista statistico a fornire evidenze, anche qualora presenti.

Un punto di forza di questa coorte è invece la disponibilità di misure di 2,3,7,8-TCDD in prelievi avvenuti poco dopo l'esposizione, evitando perciò l'introduzione di errori attraverso modelli cinetici di eliminazione.

Lo studio di Warner *et al.* (82) è un lavoro molto interessante e ben strutturato: è l'unico per ora sulla coorte di Seveso che ha messo in relazione il rischio di cancro con misure individuali di 2,3,7,8-TCDD. Per il 92% della sottocoorte, i campioni di siero sono stati raccolti nel 1976 (n = 899); il rimanente 8% sono prelievi più recenti, le cui concentrazioni erano state pertanto inserite in un modello di eliminazione, con emivita di 9 anni (91), per calcolare i livelli ematici al momento dell'esposizione.

Gli studi condotti da Akhtar *et al.* (73) sulla coorte militare denominata Ranch Hand erano caratterizzati dalla disponibilità di un elevato numero di analisi biologiche (1009, 84% nella coorte; 1429, 80% nel gruppo di controllo) in campioni di siero prelevati in gran parte nel 1987. I prelievi più recenti erano stati retrodatati al 1987 mediante modello di eliminazione con emivita di 7.6 anni. Erano state quindi costruite categorie di esposizione a seconda della concentrazione di 2,3,7,8-TCDD nel sangue, ma erano presentate anche stratificazioni della coorte in base agli anni di guerra in cui era stato usato l'Agent Orange ed agli anni di servizio in Vietnam e nel sud est asiatico. Michalek and Pavuk (77) avevano mantenuto le modalità di costruzione delle categorie di esposizione di Akhtar *et al.* (73), introducendo però alcuni dettagli, pertinenti, nella stratificazione della coorte.

Nel lavoro del 1998, Hooiveld *et al.* (72) avevano raccolto, mediante questionario, i dettagli della storia occupazionale della coorte olandese (in quali reparti lavoravano, se presenti all'incidente del 1963, ecc.) per classificare i lavoratori come esposti (n = 549) o meno (n = 482).

Da misure nel siero di PCDD con prelievi eseguiti nel 1993 in 47 persone (4%, delle quali 14 direttamente esposte all'incidente all'autoclave), gli autori avevano calcolato la concentrazione di 2,3,7,8-TCDD al momento della massima esposizione (modello con emivita fissa) per tutta la coorte. Le medie geometriche dei risultati analitici sembrano poter discriminare tra esposti all'incidente e non presenti all'incidente, tra impegnati nei reparti di produzione e addetti ad altri reparti. Ciò nonostante, la valutazione dell'esposizione basata su un campione non rappresentativo, o semplicemente sulla storia lavorativa della coorte, costituisce un limite importante dello studio. Inoltre, il numero di decessi per tumori era modesto (20 decessi per neoplasie maligne nei 140 presenti all'incidente) soprattutto per valutazioni di aumentato rischio di tumori in siti specifici.

Molti degli studi epidemiologici hanno evidenziato associazioni più forti tra esposizione a 2,3,7,8-TCDD e cancro quando venivano presi in considerazione periodi di latenza sufficientemente lunghi, in genere 15 o 20 anni (44, 49, 50, 65, 72). Anche i risultati degli studi riguardanti la coorte di Seveso erano strettamente condizionati dall'utilizzo della latenza per la costruzione di categorie, anche se tale operazione riduce ulteriormente il numero di casi nella valutazione di specifiche neoplasie (78, 90). L'importanza dell'intervallo di latenza osservato dai diversi autori nella significatività dell'incremento di rischio concorda con l'evidenza che il manifestarsi di molte neoplasie avvenga vari anni dopo l'esposizione, anche se la condizione ottimale sarebbe l'utilizzo dei dati di incidenza

(disponibili per la coorte di Seveso, la coorte BASF e la coorte militare) piuttosto che di mortalità. La valutazione del rischio attraverso l'incidenza consente, infatti, di minimizzare la variabilità dovuta alla sopravvivenza alla patologia maligna.

È possibile che alcuni soggetti avessero avuto esposizioni recenti, senza però che queste comportassero un aumentato rischio. Pertanto, l'utilizzo di un opportuno periodo di latenza nella stratificazione della coorte consentiva, pertanto, agli autori di ovviare alla conseguente riduzione del SMR nel gruppo dei più esposti; in tal modo, veniva dato peso statistico solo ai soggetti caratterizzati da livelli elevati di diossine per molti anni, considerazione che concorda con un inquadramento della 2,3,7,8-TCDD come promotore tumorale.

Con la premessa che gli studi di McBride *et al.* (70, 92) presentano delle lacune, tra cui la perdita del follow-up per il 20% dei soggetti della coorte in seguito ad emigrazione, l'utilizzo della latenza non aveva evidenziato alcun aumento di rischio per tumore. Altri autori non hanno utilizzato la latenza per costruire sottocoorti di lavoratori (59, 64, 73). Flesch-Janis *et al.* (54, 89), pur non avendola applicata come criterio di categorizzazione, constatavano un aumento di rischio di mortalità.

Per quanto riguarda, invece, lo studio di Warner *et al.*, (82), sarà interessante valutare i prossimi follow-up, affinché si riduca la differenza tra l'età in cui mediamente si diagnostica il tumore al seno (circa 60 anni) e l'età media della sottocoorte femminile investigata.

Cheng *et al.* (67) avevano osservato che l'associazione positiva tra 2,3,7,8-TCDD e mortalità per tutti i tumori combinati era significativa solo applicando una latenza di 10-15 anni ed escludendo il 5% degli individui più esposti. Questa esclusione consentiva di ovviare ad errori di classificazione, a causa di esposizioni recenti o di breve durata (ad esempio, nel caso di interventi di sanificazione per episodi di spillamento dalle apparecchiature).

Anche il confronto interno tra classi di esposti della stessa coorte od il confronto con altre coorti di lavoratori è stato spesso utilizzato, in aggiunta al confronto con la popolazione generale. L'approccio consente di evitare confondimenti dovuti all'effetto "healthy worker": l'impiego di una persona in un'attività lavorativa prevede uno stato di buona salute e quindi una coorte occupazionale potrebbe non essere sovrapponibile, perché più sana, alla popolazione generale, producendo pertanto SMR troppo bassi; è da notare che, generalmente, almeno per quanto riguarda la mortalità per cancro, tale effetto risulta minimo. Starr (87), attraverso analisi puntuale della tabella 2 di Steenland *et al.* (65), aveva dimostrato però che l'uso del confronto interno associato alla latenza rafforzava artificialmente un trend positivo.

Non tutti gli autori disponevano di informazioni necessarie ad escludere possibili fattori confondenti. Pertanto, erano stati adottati alcuni sistemi di controllo per poterne escludere l'influenza sui risultati ottenuti, nonostante l'assenza dei dati.

Fingerhut *et al.* (44), non avendo conoscenze in merito all'abitudine al fumo nella coorte, nel 1988 avevano recuperato tale informazione da circa 200 ex lavoratori e con

questi dati avevano apportato correzioni (+5%) al numero di decessi attesi per tumori legati al fumo. Gli autori sostenevano che l'incremento di mortalità associato a 2,3,7,8-TCDD permanesse, ma è evidente che con questa correzione tale incremento resta significativo solo nella sottocoorte più esposta, non nell'intera coorte. In ogni caso, gli autori ritenevano la variabile non influente per due motivi: i) non appariva alcun eccesso di mortalità per patologie non maligne associate al fumo; ii) dividendo la coorte in 2 gruppi (meno di 1 anno di esposizione e più di 1 anno di esposizione), l'eccesso di rischio per tumori generalmente associati al fumo era significativo solo nel gruppo con più anni di esposizione a 2,3,7,8-TCDD, mentre avrebbe dovuto essere presente in entrambi, se l'incremento fosse stato attribuibile al fumo. Analogamente, Steenland *et al.* (65), documentavano una correlazione positiva e significativa tra SMR ed esposizione a 2,3,7,8-TCDD anche dopo esclusione di tutti i decessi per tumori associati al fumo.

Tuttavia, a sollevare il dubbio che la mortalità nella coorte NIOSH fosse soggetta ad una forte influenza da parte dell'abitudine al fumo, è lo studio di Cheng *et al.* (67). Gli autori, nel calcolo degli SMR rispetto alla popolazione generale, avevano escluso, uno per volta, gli 8 impianti per valutare l'effetto di alcune variabili confondenti. L'eccesso di tutti i tumori combinati appariva significativo solo per 1 impianto, così come l'eccesso di tumore ai polmoni appariva significativo solo per lo stesso impianto, nel quale c'era anche un eccesso significativo di tumori associati al fumo e di patologie non maligne associate al fumo. L'aumentato rischio per tumori associati al fumo che si evidenziava in un altro impianto era attribuibile principalmente a 7 casi di tumore alla vescica (rispetto ai 0.4 attesi) dovuti ad esposizione a 4-amminobifenile. Inoltre, l'SMR per tumori associati al fumo nell'intera coorte era leggermente superiore (1.22, CI 1.01-1.45) a quello osservato per i tumori non associati al fumo (1.12, CI 0.94-1.33).

Per quanto riguarda la coorte BASF, Zober *et al.* (45) non possedevano informazioni sul fumo, ma non trovando alcun eccesso di malattie respiratorie non maligne avevano supposto che non costituisse un confondimento. Nel lavoro del 1996 (49), Ott and Zober avevano recuperato informazioni sull'abitudine al fumo per l'86% della coorte. Di interessante si osserva che solo nei fumatori era presente un aumento di mortalità per tutti i tipi di tumore ed un trend positivo negli SMR all'aumentare dell'esposizione cumulativa di 2,3,7,8-TCDD.

Anche per l'altra coorte tedesca non erano disponibili informazioni dettagliate. Ciò nonostante, Manz *et al.* (50) escludevano ogni possibile interferenza del fumo, dopo verifica che in un campione non rappresentativo della coorte (361 lavoratori), il 73% erano fumatori, in linea con la percentuale riscontrata nella coorte usata come riferimento (76%). Flesch-Janis *et al.* (54) non avevano trovato, all'interno della coorte, una correlazione tra concentrazione di 2,3,7,8-TCDD ed abitudine al fumo.

Sulla coorte di Seveso mancavano informazioni riguardanti l'abitudine al fumo (78). L'assenza, tra le tre aree, di differenze socio-demografiche e di differenze

nella frequenza di malattie croniche respiratorie aveva comunque fatto ritenere agli autori che il fumo non potesse aver influenzato significativamente i risultati; inoltre, l'eccesso di mortalità per tumore diventava significativo dopo opportuno periodo di latenza dall'incidente e ciò non avrebbe dovuto verificarsi se l'incremento di decessi per neoplasie fosse imputabile al fumo. Infine, non era stato osservato alcun eccesso di altri tumori associati al fumo (laringe, esofago, pancreas e vescica).

Akhtar *et al.* (73), in possesso di informazioni dettagliate in merito all'abitudine al fumo, potevano escludere un suo effetto confondente sulla coorte militare.

L'eventualità di un'esposizione multipla è una variabile molto importante, soprattutto in ambito professionale, dove in molte situazioni sono presenti altre sostanze cancerogene. Per quanto riguarda le coorti investigate, le informazioni in merito a possibili co-esposizioni non sempre erano esaurienti o comunque sufficienti per escludere la loro influenza sull'incremento di mortalità. Vediamo nello specifico.

Nella coorte NIOSH alcuni lavoratori erano esposti anche a 4-amminobifenile, come già osservato da Fingerhut *et al.* (44). Steenland *et al.* (65) hanno escluso i decessi per tumore alla vescica dai tumori associati al fumo, ed osservando che la significatività del trend positivo del rischio relativo permaneva (nel confronto interno), hanno concluso che l'esposizione a 4-amminobifenile non influenzava la relazione dose-risposta tra 2,3,7,8-TCDD e mortalità per i tumori combinati.

Cheng *et al.* (67) avevano evidenziato che l'esposizione a 4-amminobifenile era circoscritta ad uno solo degli impianti inclusi nella corte NIOSH, in cui erano avvenuti 7 decessi per tumore alla vescica (rispetto ai 0.4 attesi).

Ott and Zober (49) avevano informazioni sull'esposizione della coorte BASF ad asbesto (1 mesotelioma) ed a beta-naftilammina; quest'ultima non risultava influente sugli incrementi di mortalità per tumore, ma aveva effetti sull'incidenza di tumori del tratto urinario (SIR 6.9, CII.9-17.7).

Il lavoro di Manz *et al.* (50) mancava di informazioni adeguate in merito ad esposizione dei lavoratori della coorte di Amburgo ad asbesto, benzene e dimetilsolfato. Inoltre, la coorte era esposta a lindano ed a β -HCH, che erano prodotti insieme a triclorofenolo e acido 2,4,5-triclorofenossiacetico. Successivamente, Flesch-Janis *et al.* (54) avevano verificato che l'esposizione a dimetilsolfato non era un fattore confondente e che l'esposizione a lindano ed a β -HCH era alta nei reparti dove la 2,3,7,8-TCDD era bassa; pertanto, ne avevano escluso l'influenza sui risultati. Successivamente, Becher *et al.* (86) avevano preso in considerazione anche l'esposizione della coorte ad altri composti dioxin-like ed avevano confermato le conclusioni di Flesch-Janis *et al.* (54) riguardo al lindano.

Diversamente, Hooiveld *et al.* (72) pur eseguendo analisi di PCDD, avevano svolto lo studio solo con la 2,3,7,8-TCDD, non potendo quindi escludere possibili confondenti.

Infine, Gli studi sulla coorte militare sono fortemente limitati dall'impossibilità di escludere l'influenza dell'esposizione ad acido 2,4-diclorofenossiacetico sull'au-

mento di incidenza di tumori nei partecipanti all'operazione Ranch Hand (73, 76).

2,3,7,8-TCDD e sarcomi dei tessuti molli: un esempio di studi epidemiologici contrastanti

L'associazione tra 2,3,7,8-TCDD ed incidenza di una rara forma tumorale come il sarcoma dei tessuti molli (STM) è uno dei temi più a lungo dibattuto e con evidenze tuttora non concordi.

Una delle prime associazioni fra esposizione a composti diossino-simili e aumento dell'incidenza di STM riguardava popolazioni esposte a erbicidi diossino-contaminati (93-96).

La frequenza dei sarcomi dei tessuti molli risultava elevata ma non significativa nella maggior parte degli studi più recenti (9, 44, 57, 97-99). L'associazione fra esposizione a diossine e STM suggerita in questi ed in altri studi epidemiologici, è stata dibattuta per una varietà di ragioni. Gli argomenti criticati sono stati il ridotto numero di casi, le modalità di reclutamento della popolazione oggetto degli studi, i possibili errori di classificazione della forma tumorale per insufficiente accuratezza dei certificati di morte, la mancanza di indicatori di esposizione o la potenziale pluri-esposizione, l'esistenza di fattori confondenti.

La revisione IARC del 2010 (11, 12) sottolinea che l'evidenza di cancerogenicità della 2,3,7,8-TCDD è sufficiente per tutti i tipi di tumori mentre rimane limitata per l'associazione causale con STM e linfomi non-Hodgkin.

Per evidenziare la sensibilità degli studi epidemiologici riguardanti il sarcoma dei tessuti molli, riportiamo un caso di una realtà italiana di cui sono disponibili evoluzioni ed approfondimenti con relative rettifiche.

Lo studio si basa su 3 osservazioni epidemiologiche svolte nella popolazione residente nella Zona industriale del comune di Mantova alla fine degli anni '90 (100-103) rivolte ad evidenziare l'associazione tra 2,3,7,8-TCDD e sarcomi (viscerali e non-viscerali).

Lo studio caso-controllo (basato su 37 casi e 171 controlli) riportava un *Odds Ratio* (OR) pari a 31.4 (95% CI, 5.6-176.1) per i casi di STM nei soggetti che tra il 1960 ed il 1990 avevano la *residenza principale* in un'area compresa entro un raggio di 2 chilometri di distanza dall'inceneritore di un'azienda chimica. L'aumentata incidenza osservata si basava su 5 casi di sarcoma ed un controllo (soggetto sano) residenti in tale area.

Lo studio presentava alcuni limiti metodologici, in primis la bassa numerosità. Comunque, su richiesta della Regione Lombardia, fu istituita una *Commissione nazionale per lo studio della situazione igienico-ambientale in relazione al polo chimico di Mantova*, condividendo la necessità di ulteriori approfondimenti, tra cui il monitoraggio biologico delle diossine in un campione di popolazione. La misura dell'esposizione è stata condotta con la collaborazione di alcuni autorevoli istituti scientifici (tra cui l'Istituto Superiore di Sanità) dosando congeneri diossino-simili e non in 30 soggetti definiti esposti, cioè un gruppo sovrapponibile per sesso, età e storia abitativa

(zona industriale) ai casi di sarcoma su cui si basava lo studio caso-controllo ed in 30 soggetti residenti nel centro storico.

Il rapporto sui risultati diffuso dal Ministero della Salute (104) riporta che "...sia le analisi grezze sia quelle corrette per covariate hanno evidenziato concentrazioni di singoli composti e di classi di composti (diossine, furani, PCB) non sistematicamente né significativamente differenti fra esposti e non esposti. Alcuni singoli composti hanno dimostrato occasionalmente differenze prossime alla significatività da considerare con cautela visto l'alto numero di confronti statistici effettuati".

Successivamente, un team di esperti si è confrontato ed ha condotto ulteriori analisi ed osservazioni, presentate al Convegno "Diossina e rischi per la salute: tra presente passato e futuro" del 2006 (105, 106).

Tale rapporto asserisce che i dati hanno mostrato differenze percentuali in eccesso nei residenti della zona industriale rispetto ai residenti nel centro storico per quanto riguarda TEQ-PCDF, TEQ-PCB diossino-simili, total-TEQ, TEQ-PCDD e PCB totali, mentre la concentrazione di 2,3,7,8-TCDD è risultata più elevata fra gli abitanti del centro storico. I livelli misurati non sono collegabili ad un incremento della frequenza dei sarcomi quale quello osservato, soprattutto se si confrontano i livelli di esposizione osservati a Mantova con quelli di altre popolazioni maggiormente esposte ma nelle quali l'incremento dei sarcomi non è stato così marcato.

Esiste quindi una discrepanza sussistente tra un rischio di sarcoma particolarmente elevato (OR=31.4) e la non altrettanto elevata esposizione a sostanze diossino-simili.

I limiti dello studio caso-controllo sono stati ricondotti al lungo intervallo temporale che lo separa dal periodo storico rilevante in termini eziologici ed alle modeste dimensioni numeriche che lo caratterizzano. Il Consensus Report concludeva asserendo che "...la conoscenza dei dati ed i limiti evidenziati portano a ritenere più plausibile una con-causalità di altri inquinanti di origine industriale...", giudicando l'associazione con la 2,3,7,8-TCDD non fondata su argomenti solidi (107).

La caratterizzazione dell'esposizione dei composti organo-alogenati persistenti dovrebbe, infatti, essere realizzata integrando il dato di biomonitoraggio con adeguate informazioni raccolte su base individuale (alimentazione, attività lavorativa, storia residenziale etc.), con dati provenienti da un accurato monitoraggio ambientale e con affidabili informazioni relative alle sorgenti di emissione corredate da dati storici sulla produzione/emissione degli impianti di interesse. Si tratta di condizioni che difficilmente possono realizzarsi sempre compiutamente.

Discussione

L'analisi della principale letteratura e delle discussioni intorno all'argomento della cancerogenicità della 2,3,7,8-TCDD voleva fornire al lettore gli strumenti per poter affrontare una valutazione più critica dell'argomento.

Come si evince dagli studi, pochi dubbi rimangono in merito al meccanismo di azione implicato nella cancero-

genesi della 2,3,7,8-TCDD: negli anni si sono rafforzate le evidenze della sua azione come promotore dei tumori, attraverso la modificazione della replicazione cellulare e dell'apoptosi e l'aumento di stress ossidativo responsabile di danni al DNA.

Per il resto si conferma l'assenza di un sito specifico di azione: la 2,3,7,8-TCDD si mostra come un cancerogeno multi-organo, anche se non è chiaro se questo sia attribuibile al meccanismo di azione od all'impossibilità di stabilire un sito predominante dagli studi disponibili.

Diversa è invece l'evoluzione degli studi epidemiologici, che risentono di tante variabili dovute al disegno dello studio, alla valutazione dell'esposizione, alla stratificazione per periodi di latenza, all'applicazione di modelli cinetici di eliminazione ed a co-esposizioni. L'avvicinarsi negli anni di dibattiti e revisioni delle coorti già studiate è sicuramente indice di un delicato sistema di valutazione della cancerogenicità della 2,3,7,8-TCDD nell'uomo.

Gli studi che hanno analizzato l'associazione fra esposizione a 2,3,7,8-TCDD e insorgenza di sarcoma dei tessuti molli, linfoma non-Hodgkin e tumore al polmone sono quelli che più di altri portano ad oggi dati dubbi o perché basati su piccoli numeri, o per errori di classificazione della neoplasia o ancora per insufficiente controllo di alcune covariate. Per questi motivi l'evidenza di cancerogenicità della 2,3,7,8-TCDD per tali patologie tumorali rimane limitata e non inquadrata come certa.

L'incremento di rischio di mortalità per tutti i tipi di tumore estrapolato dalla IARC nel 1997 dalle quattro sotto-coorti selezionate era moderato (SMR 1.4, CI 1.1-1.7), se confrontato con quelli osservati per siti specifici di cancerogeni certi. D'altra parte, in una coorte occupazionale esposta a un cancerogeno certo con sito predominante, difficilmente si osserva un aumento di rischio di mortalità per tutti i tumori di dimensioni analoghe.

Gli studi successivi al 1997 presentavano stime di rischio paragonabili in magnitudine: SMR 1.6 nel sottogruppo degli individui più esposti (65), SMR 1.17 (67), RR 1.3 negli uomini delle aree A e B (78), RR 1.65 nei residenti della zona A considerando almeno 20 anni di latenza (83), SMR 1.5 (72), con l'eccezione di Michalek e Pavuk che ricavano un RR di 2.2 nel gruppo più esposto (77).

Incrementi più consistenti sono stati osservati in siti specifici, in particolare STM (4.1 rif. 59) LNH (2.8 rif. 64), mieloma multiplo (2.1 rif. 66) tumori al sistema linfatico ed emopoietico (2.2 rif. 83), tumore al retto negli uomini (2.4 rif. 78), melanomi (2.3 rif. 73), anche se per molti di essi, sono già state trattate le criticità.

Non vi è dubbio che incrementi di rischio consistenti consentano di escludere con maggior forza la possibilità che i risultati siano dovuti a confondenti o al caso, anche se, ovviamente, un piccolo aumento di rischio non esclude a priori l'esistenza di una relazione di causalità.

L'evidenza di tale relazione, come abbiamo avuto modo di discutere nelle pagine precedenti, è stata supportata dal lavoro di alcuni autori attraverso la presentazione di trend positivi del rischio di mortalità all'aumentare dell'esposizione a 2,3,7,8-TCDD, anche se ricordiamo che la valutazione stessa dell'esposizione è una delle criticità delle coorti investigate.

Un argomento importante connesso alla classificazione della 2,3,7,8-TCDD quale cancerogeno certo, è la valutazione del rischio nella popolazione generale. Le stime estrapolate dalle relazioni dose-risposta contenute in alcuni studi indicano che valori di intake giornaliero di poche volte superiori ai valori di background potrebbero essere potenzialmente cancerogeni, con tutte le implicazioni che questo può avere in caso di ulteriori ritocchi dei valori massimi consentiti (controllo degli alimenti ed emissioni industriali). È evidente che le incertezze sollevate da alcuni autori su tali elaborazioni non possano essere sottovalutate.

Per concludere riportiamo, a riprova dell'incertezza e disomogeneità dell'argomentazione i limiti di esposizione professionale.

In Italia non esistono valori limite di esposizione professionale stabiliti per diossine negli ambienti di lavoro. Anche l'ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) non riporta un TLV per la 2,3,7,8-TCDD. L'Agenzia americana NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) raccomanda che l'esposizione occupazionale agli agenti cancerogeni, tra i quali è annoverata la 2,3,7,8-TCDD, sia contenuta ai più bassi livelli possibili.

In Germania, il limite di esposizione occupazionale ufficiale (MAK, Maximale Arbeitsplatzkonzentration, equivalente del TLV) per la 2,3,7,8-TCDD è pari a 10^{-8} mg/m³ (108); inoltre, la molecola è inserita nella categoria di cancerogenesi 4, ossia sostanze con potenziale cancerogeno per il quale la genotossicità gioca nessuna o minima parte. Non è atteso alcun contributo a rischio di cancro nell'uomo purché il MAK venga rispettato.

Bibliografia

- 1) EFSA European Food Safety Authority: Scientific Colloquium 1- Dioxins, 2004.
- 2) Needham LL, Patterson DG, Jr Houk VN. Levels of TCDD in selected human populations and their relevance to human risk assessment. Cold Spring Harbor Press 1991; 229-247.
- 3) Turci R, Minoia C, Leoni E, Sturchio E, Boccia P, Meconi C, Zannellato M, Signorini S, Mantovani A, La Rocca C, Bianchi F, Imbriani M. PCDD: policlorodibenzo-p-diossine. G Ital Med Lav Erg 2009; 31: 325-370.
- 4) Apostoli P, Bergonzi R, Catalani S. Polychloro biphenils (PCBS) and cancer. G Ital Med Lav Ergon 2009; 31: 419-27.
- 5) IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man 1997; Vol. 69, p. 33.
- 6) Bertazzi PA, di Domenico A. Chemical, environmental, and health aspects of the Seveso, Italy, accident. In: Schechter, A., ed., Dioxin and Health, New York, Plenum Press, 1994 pp. 587-632.
- 7) Bertazzi PA, Zocchetti C, Pesatori AC, Guercilena S, Sanarco M, Radice L. Ten-year mortality study of the population involved in the Seveso incident in 1976. Am J Epidemiol 1989; 129: 1187-1199.
- 8) Bertazzi PA, Zocchetti C, Pesatori AC, Guercilena S, Consonni D, Tironi A, Landi MT. Mortality of a young population after accidental exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Int J Epidemiol 1992; 21: 118-123.
- 9) Bertazzi PA, Pesatori AC, Consonni D, Tironi A, Landi MT, Zocchetti C. Cancer incidence in a population accidentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-paradioxin. Epidemiology, 1993; 4: 398-406.
- 10) Bertazzi PA, Pesatori AC, Landi MT. Cancer mortality, 1976-1991, in the population exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Organohalogen compounds 1996; 30: 294-296.
- 11) <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/vol100F-evaluations.pdf>
- 12) Baan R, Grosse Y, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglianò V; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group A review of human carcinogens-Part F: chemical agents and related occupations. Lancet Oncol 2009; 10: 1143-1144.
- 13) Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1982; 22: 517-554.
- 14) Bradfield CA, Kende AS, Poland A. Kinetic and equilibrium studies of Ah receptor-ligand binding: use of C25II-2-iodo-7,8-dibromodibenzo-p-dioxin. Mol Pharmacol 1988; 34: 229.
- 15) Safe SH. Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzop-dioxins and dibenzofuans. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1986; 26: 371-399.
- 16) Gillner M, Bergman J, Cambileau C, Alexandersson M, Fernström B, Gustafsson JÅ. Interactions of indolo(3,2-b)carbazoles and related polycyclic aromatic hydrocarbons with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver. Mol Pharmacol 1993; 44: 336-345.
- 17) Olson JR, McGarrigle BP, Gigliotti PJ, Kumar S, McReynolds JH. Hepatic uptake and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran. Fundam Appl Toxicol 1994; 22: 631-40.
- 18) Viluksela M, Bager Y, Tuomisto JT, Scheu G, Unkila M, Pohjanvirta R, Flodstrom S, Kosma VM, Maki-Paakkanen J, Vartiainen T, Klimm C, Schramm KW, Warngard L, Tuomisto J. Liver tumor-promoting activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in TCDD-sensitive and TCDD-resistant rat strains. Cancer Res 2000; 60: 6911-6920.
- 19) Cole P, Trichopoulos D, Pastides H, Starr T, Mandel JS. Dioxin and cancer: a critical review. Regul Toxicol Pharmacol 2003; 38: 378-88.
- 20) Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI, Bradfield CA. Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. Mol Pharmacol 1993; 44: 911-917.
- 21) Lucier GW. Humans are a sensitive species to some of the biochemical effects of structural analogs of dioxin. Environ Toxicol Chem 1991; 10: 727-735.
- 22) Wyde ME, Cambre T, Lebetkin M, Eldridge SR, Walker NJ. Promotion of altered hepatic foci by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 17β-estradiol in male Sprague-Dawley rats. Toxicol Sci 2002; 68: 295-303.
- 23) Carlson D, Perdew G. A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. J Biochem Mol Toxicol 2002; 16: 317-325.
- 24) Kumar M, Perdew G. Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. Gene Expr 1999; 8: 273-286.
- 25) Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. Genes Dev 1999; 13: 20-25.
- 26) Petrusis J, Perdew G. The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. Chem Biol Interact 2002; 141: 25-40.
- 27) Enan E, El-Sabeawy F, Scott M, Overstreet J, Lasley B. Alterations in the growth factor signal transduction pathways and modulators of the cell cycle in endocervical cells from macaques exposed to TCDD. Toxicol Appl Pharmacol 1998; 151: 283-293.
- 28) Matsumura F. On the significance of the role of cellular stress response reactions in the toxic actions of dioxin. Biochem Pharmacol 2003; 66: 527-540.
- 29) Chopra M, Gähns M, Haben M, Michels C, Schrenk D. Inhibition of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin depends on protein biosynthesis. II Biol Toxicol 2010; 26: 391-401.
- 30) Stohs SJ, Shara MA, Alsharif NZ, Wahba ZZ, al-Bayati ZA. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in female rats. Toxicol Appl Pharmacol 1990; 106: 126-135.
- 31) Alsharif NZ, Lawson T, Stohs SJ. Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin is mediated by the aryl hydrocarbon (Ah) receptor complex. Toxicology 1994; 92: 39-51.

- 32) Wölfle D, Marquardt H. Antioxidants inhibit the enhancement of malignant cell transformation induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1273-1278.
- 33) Mead MN. Cancer and TCDD: the mitochondrial connection. *Environ Health Perspect* 2008; 116: A112.
- 34) Aly HA, Domènech O. Cytotoxicity and mitochondrial dysfunction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 2009; 191: 79-87.
- 35) Biswas G, Srinivasan S, Anandatheerthavarada HK, Avadhani NG. Dioxin-mediated tumor progression through activation of mitochondria-to-nucleus stress signaling. *PNAS* 2008; 105: 186-191.
- 36) Jenkins S. Prenatal TCDD exposure predisposes for mammary cancer in rats. *Reprod Toxicol* 2007; 23: 391-396.
- 37) Brody JG, Rudel RA. Environmental Pollutants and breast cancer. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 1007-1019.
- 38) Soto AM. Does breast cancer start in the womb? *Basic&Clinical Pharmacology&Toxicology* 2008; 102: 125-133.
- 39) Sonnenschein C. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. *Seminars in Cancer biology* 2008; 18: 372-377.
- 40) WHO. Assessment of the Health Risk of Dioxins: Re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI). Geneva: World Health Organization. 1998 Available: <http://www.who.int/pcs/docs/dioxin-exec-sum/exe-sum-final.doc>
- 41) WHO. PCDDs, PCDFs, and Coplanar PCBs, Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. WHO Food Additive Series. Geneva: World Health Organization 2001.
- 42) U.S. EPA. Exposure and Human Health Reassessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and Related Compounds. Part II. Health Assessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and Related Compounds. Draft. U.S. Environmental Protection Agency 2000. Available: <http://www.epa.gov/ncea/pdfs/dioxin/part2/dritoc.pdf>
- 43) Collins J, Strauss ME, Levinskas GJ, Conner PR. The mortality experience of workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in a trichlorophenol process accident. *Epidemiology* 1993; 4: 7-13.
- 44) Fingerhut MA, Halperin WE, Marlow DA, Piacitelli LA, Honchar PA, Sweeney MH, Greife AL, Dill PA, Steenland K, Suruda AJ. Cancer mortality in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *New Engl J Med* 1991; 324: 212-218.
- 45) Zober A, Messerer P, Huber P. Thirty-four-year mortality follow-up of BASF employees exposed to 2,3,7,8-TCDD after the 1953 accident. *Int Arch Occup Environ Health* 1990; 62: 139-157.
- 46) Zober MA, Ott MG, Pöpke O, Senft K, Germann C. Morbidity study of extruder personnel with potential exposure to brominated dioxins and furans. 1. Results of blood monitoring and immunological tests. *Br J Ind Med* 1992; 49: 532-544.
- 47) Zober A, Ott MG, Fleig I, Heidemann A. Cytogenetic studies in lymphocytes of workers exposed to 2,3,7,8-TCDD. *Int Arch Occup Environ Health* 1993; 65: 157-161.
- 48) Zober A, Ott MG, Messerer P. Morbidity follow up study of BASF employees exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) after a 1953 chemical reactor incident. *Occup Environ Med* 1994; 51: 479-486.
- 49) Ott MG, Zober A. Cause specific mortality and cancer incidence among employees exposed to 2,3,7,8-TCDD after a 1953 reactor accident. *Occup Environ Med* 1996; 53: 606-612.
- 50) Manz A, Berger J, Dwyer JH, Flesch-Janys D, Nagel S, Waltsgott H. Cancer mortality among workers in chemical plant contaminated with dioxin. *Lancet* 1991; 338: 959-964.
- 51) Fingerhut MA, Halperin WE, Marlow DA, Piacitelli LA, Honchar PA, Sweeney MH, Greife AL, Dill PA, Steenland K, Suruda AJ. Mortality Among US Workers Employed in the Production of Chemicals Contaminated with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (NTIS PB 91-125971), Cincinnati, OH, United States Department of Health and Human Services, National Institute for Occupational Safety and Health 1991.
- 52) Nagel S, Berger J, Flesch-Janys D, Manz A, Ollroge I. Mortality and cancer mortality in a cohort of female workers of a herbicide producing plant exposed to polychlorinated dibenzo-p-dioxins and furans. *Inform Biomet Epidemiol Med Biol* 1994; 25: 32-38.
- 53) Becher H, Flesch-Janys D, Kauppinen T, Kogevinas M, Steindorf K, Manz A, Wahendorf J. Cancer mortality in German male workers exposed to phenoxy herbicides and dioxins. *Cancer Causes Control* 1996; 7: 312-321.
- 54) Flesch-Janys D, Berger J, Gurn P, Manz A, Nagel S, Waltsgott H, Dwyer JH. Exposure to polychlorinated dioxins and furans (PCDD/F) and mortality in a cohort of workers from a herbicide-producing plant in Hamburg, Federal Republic of Germany. *Am J Epidemiol* 1995; 142: 1165-1175.
- 55) Flesch-Janys D, Becher H, Gurn P, Jung D, Konietzko J, Manz A, Papke O. Elimination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in occupationally exposed persons. *J Toxicol Environ Health* 1996; 47: 363-378.
- 56) Hooiveld M, Heederik D, Bueno de Mesquita B. Preliminary results of the second follow-up of a Dutch cohort of workers occupationally exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols and contaminants. *Organohalogen compounds* 1996; 30: 185-189.
- 57) Kogevinas M, Becher H, Benn T, Bertazzi PA, Boffetta P, Bueno de Mesquita HB, Coggon D, Colin D, Flesch-Janys D, Fingerhut M, Green L, Kauppinen T, Littorin M, Lyng E, Mathews JD, Neuberger M, Pearce N, Saracci R. Cancer mortality in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols and dioxins: An expanded and updated international cohort study. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 1061-1075.
- 58) Saracci R, Kogevinas M, Bertazzi PA, Bueno de Mesquita HB, Coggon D, Green LM, Kauppinen T, L'Abbé KA, Littorin M, Lyng E, Mathews JD, Neuberger M, Osman J, Pearce N, Winkelmann R. Cancer mortality in workers exposed to chlorophenoxy herbicides and chlorophenols. *Lancet* 1991; 338: 1027-1032.
- 59) Collins JJ, Bodner K, Aylward LL, Wilken M, Bodnar CM. Mortality rates among trichlorophenol workers with exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Am J Epidemiol* 2009; 170: 501-550.
- 60) Starr TB. Significant shortcomings of the U.S. Environmental Protection Agency's latest draft risk characterization for dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 2001; 64: 7-13.
- 61) NAS (2006). Health risks from dioxin and related compounds: Evaluation of the EPA reassessment. National Academy of Science. Washington, DC. http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=11688.
- 62) U.S. EPA (2003). Exposure and human health reassessment of 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p dioxin (TCDD) and related compounds [NAS review draft]. U.S. Environmental Protection Agency, National Center for Environmental Assessment. Washington, DC. <http://www.epa.gov/nceawww1/pdfs/dioxin/nas-review/>.
- 63) U.S. EPA (2010). EPA's Reanalysis of Key Issues Related to Dioxin Toxicity and Response to NAS Comments. U.S. Environmental Protection Agency, National Center for Environmental Assessment. Washington, DC. http://oaspub.epa.gov/eims/eimscmm.getfile?p_download_id=496700
- 64) Collins JJ, Bodner K, Aylward LL, Wilken M, Swaen G, Budinsky R, Rowlands C, Bodnar CM. Mortality rates among workers exposed to dioxins in the manufacture of pentachlorophenol. *J Occup Environ Med* 2009; 51: 1212-1219.
- 65) Steenland K, Piacitelli L, Deddens J, Fingerhut M, Chang LI. Cancer, heart disease and diabetes in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 779-786.
- 66) Steenland K, Deddens J, Piacitelli L. Risk assessment for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) based on an epidemiologic study. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 451-458.
- 67) Cheng H, Aylward L, Beall C, Starr TB, Brunet RC, Carrier G, Dellzell E. TCDD exposure-response analysis and risk assessment. *Risk Analysis* 2006; 26: 1059-1071.
- 68) Crump KS, Canady R, Kogevinas M. Meta-analysis of dioxin cancer dose response for three occupational cohorts. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 681-687.
- 69) U.S. EPA (2000). Benchmark dose technical guidance document [external review draft]. Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC. EPA/630/R-00/001. <http://www.epa.gov/raf/publications/benchmark-dose-doc-draft.htm>
- 70) McBride Collins JJ, Humphry NL, Herbison P, Bodner KM, Aylward LL, Burns CJ, Wilken M. Mortality in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin at a trichlorophenol plant in New Zealand. *JOEM* 2009; 51: 1049-1105.
- 71) Steenland K, Bertazzi PA, Baccarelli A, Kogevinas M. Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as

- a human carcinogen. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1265-1268.
- 72) Hooiveld M, Heederik DJ, Kogevinas M, Boffetta P, Needham LL, Patterson DG Jr, Bueno-de-Mesquita HB. Second follow-up of a Dutch cohort occupationally exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and contaminants. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 891-901.
- 73) Akhtar F, Garabrant D, Ketchum N, Michalek J. Cancer in US Air Force veterans of the Vietnam war. *J Occup Environ Med* 2004; 46: 123-136.
- 74) Pavuk M, Michalek JE, Ketchum NS. Prostate cancer in US air Force veterans of the Vietnam war. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2006; 16: 184-190.
- 75) Ketchum NS, Michalek JE, Burton JE. Serum dioxin and cancer in veterans of operation Ranch Hand. *Am J Epidem* 1999; 149: 630-639.
- 76) Michalek JE, Ketchum NS, Akhtar FZ. Postservice mortality of US Air Force veterans occupationally exposed to herbicides in Vietnam: 15-year follow-up. *Am J Epidemiol* 1998; 148: 786-792.
- 77) Michalek JE, Pavuk M. Diabetes and cancer in veterans of Operation Ranch Hand after adjustment for calendar period, days of spraying, and time spent in Southeast Asia. *J Occup Environ Med* 2008; 50: 330-340.
- 78) Bertazzi PA, Consonni D, Bachetti S, Rubagotti M, Baccarelli A, Zocchetti C, Pesatori AC. Health effects of dioxin exposure: a 20-year mortality study. *Am J Epidemiol* 2001; 153: 1031-1044.
- 79) Smith A, Lopipero P. Invited commentary: how do the Seveso findings affect conclusions concerning TCDD as a human carcinogen? *Am J Epidemiol* 2001; 153: 1045-7.
- 80) Bertazzi PA, Consonni D, Bachetti S, Rubagotti M, Baccarelli A, Zocchetti C, Pesatori AC. Respond to Smith and Lopipero. *Am J Epidemiol* 2001; 153: 11.
- 81) Pesatori AC, Consonni D, Rubagotti M, Grillo P, Bertazzi PA. Cancer incidence in the population exposed to dioxin after the "Seveso accident": twenty years of follow-up. *Environ Health* 2009; 8: 39-50.
- 82) Warner M. Serum dioxin concentrations and breast cancer risk in the Seveso Women's Health Study. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 625-628.
- 83) Consonni D, Pesatori AC, Zocchetti C, Sindaco R, D'Oro LC, Rubagotti M, Bertazzi PA. Mortality in a Population Exposed to Dioxin after the Seveso, Italy, Accident in 1976: 25 Years of Follow-Up. *Am J Epidemiol* 2008; 167: 847-858.
- 84) Flesch-Janys D, Berger J, Gum P, Manz A, Nagel S, Waltsgott H, Dwyer JB. Erratum. *Am J Epidemiol* 1996; 144: 716.
- 85) Steenland K, Deddens J. Dioxin: Exposure-Response Analyses and Risk Assessment. *Industrial Health* 2003; 41: 175-180.
- 86) Becher H, Steindorf K, Flesch-Janys D. Quantitative cancer risk assessment for dioxins using an Occupational cohort. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 663-670.
- 87) Starr TB. Significant Issues Raised by Meta-analyses of Cancer Mortality and Dioxin Exposure. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 1443-1447.
- 88) Popp JA, Crouch E, McConnell EE. A Weight-of-evidence analysis of the cancer dose-response characteristics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD). *Toxicol Sci* 2006; 89: 361-369.
- 89) Flesch-Janys D, Steindorf K, Gurn P, Becher H. Estimation of the cumulated exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins/furans and standardized mortality ratio analysis of cancer mortality by dose in an occupationally exposed cohort. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 655-662.
- 90) Pesatori AC, Consonni D, Bachetti S, Zocchetti C, Bonzini M, Baccarelli A, Bertazzi PA. Short- and long-term morbidity and mortality in the population exposed to dioxin after the "Seveso accident". *Ind Health* 2003; 41: 127-138.
- 91) Needham LL, Gerthoux PM, Patterson Jr DG, Brambilla P, Prikle JL, Tramacere PL, Turner WE, Beretta C, Sampson EJ, Mocarelli p. Half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in serum of Seveso adults: interim report. 1994; 21: 81-85.
- 92) McBride DI, Collins JJ, Humphry NF, Herbison P, Bodner KM, Aylward LL, Burns CJ, Wilken M. Mortality in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin at a trichlorophenol plant in New Zealand. *J Occup Med* 2009; 51: 1049-1056.
- 93) Hardell L, Sandström A. Case-control study: soft-tissue sarcomas and exposure to phenoxyacetic acids or chlorophenols. *Br J Cancer* 1979; 39: 711-717.
- 94) Hardell L, Erisson M. The association between soft-tissue sarcoma and exposure to phenoxyacetic acids. A new case-referent study. *Cancer* 1988; 62: 652-656.
- 95) Eriksson P. Effects of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in the brain of the neonatal mouse. *Toxicology* 1988; 69: 43-48.
- 96) Eriksson M, Hardell L, Adami HO. Exposure to dioxins as a risk factor for soft tissue sarcoma: a population-based case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 486-490.
- 97) Bertazzi PA, Pesatori AC, Bernucci I, Landi MT, Consonni D. Dioxin exposure and human leukemias and lymphomas. Lessons from the Seveso accident and studies on industrial workers. *Leukemia* 1999; 13: S72-4.
- 98) Bertazzi PA, Zocchetti C, Guercilena S, Consonni D, Tironi A, Landi MT, Pesatori AC. Dioxin exposure and cancer risk: a 15-year mortality study after the "Seveso accident". *Epidemiology* 1997; 8: 646-652.
- 99) Hertzman C, Teschke K, Ostry A, Hershler R, Dimich-Ward H, Kelly S, Spinelli JJ, Gallagher RP, McBride M, Marion SA. Mortality and cancer incidence among sawmill workers exposed to chlorophenolate wood preservatives. *Am J Public Health* 1997; 87: 71-79.
- 100) Costani G. Segnalazione di un'incidenza anomala di sarcomi dei tessuti molli. *Epidemiol Prev* 1998; 22: 1.
- 101) Costani G, Rabitti P, Mambrini A, Bai E, Berrino F. Soft tissue sarcomas in the general population living near a chemical plant in northern Italy. *Tumori* 2000; 86: 375-377.
- 102) Comba P, Ascoli V, Belli S, Benedetti M, Gatti L, Ricci P, Tieghi A. Risk of soft tissue sarcomas and residence in the neighbourhood of an incinerator of industrial wastes. *Occup Environ Med* 2003; 60: 1-4.
- 103) Comba P, Fazzo L, Berrino F. Soft tissue sarcomas in Mantua: epidemiological evidence and perspectives for environmental remediation. *Epidemiol Prev* 2004; 28: 266-271.
- 104) http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_publicazioni_535_allegato.pdf
- 105) Consonni D, Caramaschi F, Mazzoli P, Sartori S, Sindaco R, Bertazzi PA. Concentrazioni plasmatiche di diossine, furani e PCB in un campione di residenti in prossimità del polo chimico di Mantova. *Atti del 30° Congresso AIE (Terrasini (PA), 4-6 ottobre 2006): 100.*
- 106) Sindaco R, Consonni D, Sartori S, Bertazzi PA. Valori ematici di diossine nella popolazione adulta generale di 23 paesi. *Atti del 32° Congresso AIE, Milano, 15-17 ottobre 2008; p. 229.*
- 107) Bertazzi PA, Comba P, Consonni D, Crosignani P, Ricci P, Tomatis L, Viviano G. Sarcomi ed esposizione a sostanze diossino-simili in Mantova. A cura di ASL provincia di Mantova 2007. http://www.focus.it/fileflash/inquinamento/italia_speciale/mantova_AS_L.pd
- 108) Commission for the Investigation of Health hazards of Chemical Compounds in the Work Area, DFG (2008) (ed) List of MAK and BAT values 2008, report no. 42. Wiley-VCH, Weinheim.

Richiesta estratti: *Apostoli Pietro - Dipartimento di Medicina Sperimentale e Applicata, Sezione di Igiene Industriale, Università di Brescia, Piazzale Spedali Civili 1, 25123 Brescia, Italy, Tel. +39 030 399 5666, Fax +39 030 399 6046, E-mail: apostoli@med.unibs.it*