

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

CLINICHE E SPERIMENTALI

XXXI CICLO

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

Coordinatore: Prof. Edoardo Spina

Dott. Marco Russo

**CARCINOMA DELLA TIROIDE, AMBIENTE
VULCANICO E METALLI PESANTI**

TESI DI DOTTORATO

Tutor:
Prof. Francesco Vermiglio

ANNO ACCADEMICO 2017/2018

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 2
SCOPO DELLA TESI	pag. 8
METODI	pag. 9
RISULTATI	pag. 15
DISCUSSIONE	pag. 19
BIBLIOGRAFIA	pag. 26
TABELLE E FIGURE	pag. 30

INTRODUZIONE

Il carcinoma differenziato della tiroide (CDT) trae origine dalle cellule dell'epitelio follicolare e costituisce più del 90% di tutti i tumori tiroidei. Il CDT è la più comune neoplasia endocrina e ha un'incidenza sempre crescente: negli Stati Uniti tra il 1974 ed il 2013 l'incidenza del CDT è aumentata annualmente in media del 3,6% (1). Negli ultimi decenni nessun altro tumore è aumentato tanto quanto il CDT che rappresenta oggi il quinto tumore più frequente nelle donne negli Stati Uniti (2).

Questo sorprendente cambiamento è stato osservato nella maggior parte dei paesi del mondo, con solo rare eccezioni come i paesi scandinavi ed il continente africano (3). L'aumento di incidenza, che è dovuto quasi esclusivamente all'aumento dell'istotipo papillifero, ha riguardato soprattutto i tumori di piccole dimensioni (ed in particolare i microcarcinomi, tumori di dimensioni ≤ 1 cm), il sesso femminile ed i soggetti di elevato status socio-economico (4,5).

Sicuramente il più frequente uso nella pratica clinica dell'ecografia e dell'esame citologico tramite agoaspirazione ha determinato un aumento dell'incidenza del CDT, portando all'identificazione di numerose lesioni nodulari asintomatiche della tiroide che, nonostante le loro caratteristiche istologiche, mostrano un comportamento indolente con un incremento dimensionale molto limitato nel tempo (6). Ciò ha determinato l'attuazione di misure di intervento sproporzionate con conseguenze e costi ingiustificati; a tale riguardo le società scientifiche che si occupano di CDT hanno fornito nuove linee guida per ridurre l'eccesso diagnostico e terapeutico dovuto ai microcarcinomi tiroidei (7). Tuttavia, tale cospicuo e diffuso incremento di incidenza descritto può essere solo parzialmente giustificato dal più frequente accesso alla diagnostica per immagini. Infatti l'"eccesso di diagnosi" non spiegherebbe alcuni

fenomeni, ad esempio: l'aumento d'incidenza riguardante solo l'istotipo papillifero, l'aumentata frequenza anche dei tumori di grandi dimensioni (8) e l'aumento delle diagnosi anche in età pediatrica, quando il riscontro incidentale e i microcarcinomi sono poco frequenti (9). Inoltre il tasso di mortalità del CDT, contrariamente a quanto accaduto per altri tumori dove è aumentata la quota di interventi diagnostici precoci (prostata e mammella), è rimasto stabile e, secondo alcune recenti osservazioni, addirittura in aumento: negli Stati Uniti tra il 1974 ed il 2013 l'aumento annuale medio è stato del 1,1% (1). Infine il tipo di mutazioni somatiche del CDT è cambiato nel tempo, essendo aumentati soprattutto i tumori che presentano mutazioni del gene BRAF (10). E' quindi verosimile che l'aumentata incidenza sia secondaria alla combinazione di un'aumentata capacità diagnostica e di altri fattori ambientali, come ad esempio le notevoli modifiche dello stile di vita e dell'ambiente che si sono verificati negli ultimi decenni (11): si pensi ad esempio all'aumento dell'esposizione alle radiazioni mediche, all'elevata prevalenza dell'obesità nella popolazione (12), all'incremento dell'apporto iodico dopo gli interventi di iodoprofilassi (13), alla diffusione di sostanze come xenobiotici, coloranti, conservanti e pesticidi che entrano nella catena alimentare, all'inquinamento ambientale dovuto a prodotti industriali od a interferenti endocrini con effetti noti sulla ghiandola tiroidea come i bifenili policlorati, il bisfenolo A, gli ftalati, i polibromodifenileteri, i perclorati e i nitrati (14). Un'azione simile a quella dei suddetti interferenti endocrini è stata riportata per alcuni metalli pesanti come ad esempio il cadmio, il mercurio ed il piombo (15). Negli ultimi anni, nel mondo industrializzato, l'esposizione umana a molti metalli pesanti è incrementata drammaticamente per l'aumento esponenziale del loro utilizzo in diverse applicazioni nel campo dell'industria, dell'agricoltura e della tecnologia (compresa quella medica) che hanno ampiamente fatto ricorso all'uso dei metalli e delle loro leghe (16).

L'aumentata incidenza del CDT riportata in numerose aree vulcaniche del pianeta, offre un modello potenzialmente utile per indagare la relazione intercorrente tra l'aumento di incidenza della patologia neoplastica tiroidea e la presenza di possibili carcinogeni tiroidei di derivazione ambientale.

La possibilità di un'associazione tra l'aumento dell'incidenza del CDT e l'attività vulcanica è stata ipotizzata per la prima volta nel 1981 (17), ed è stata corroborata dall'evidenza di elevate incidenze di CDT in regioni vulcaniche molto distanti tra loro ed abitate da popolazioni geneticamente molto diverse: Islanda (18,19), Hawaii (20,21), Vanuatu (22), Polinesia francese (23), Nuova Caledonia (24) (Tabella 1).

Sulla base di queste evidenze è stato condotto uno studio epidemiologico in Sicilia, mediante l'istituzione del Registro Regionale Siciliano per il Cancro della Tiroide (RRSCT) per valutare l'incidenza del CDT tra il 2002 e il 2004 nelle varie province siciliane (25). Questo studio ha evidenziato come il tasso d'incidenza standardizzato per la popolazione mondiale del CDT fosse notevolmente superiore (oltre il doppio) nella provincia di Catania, (geograficamente caratterizzata dalla presenza dell'Etna, il più grande vulcano attivo europeo), rispetto al resto della Sicilia. In particolare nella provincia etnea il tasso d'incidenza per il periodo suddetto è stato di 31,7/100.000 nelle femmine e 6,4/100.000 nei maschi contro 14,1/100.000 nelle femmine e 3,0/100.000 nei maschi residenti nel resto dell'isola (Figura 1). Questo studio ha fornito un'ulteriore evidenza a sostegno dell'ipotesi di un'associazione tra l'ambiente vulcanico ed il CDT, considerando inoltre che è stato possibile confrontare dati provenienti da due aree adiacenti che differiscono solo per l'ambiente vulcanico in quanto abitate da una popolazione omogenea dal punto di vista genetico, per distribuzione d'età e di sesso e con status socioeconomico e stile di vita simili.

Recentemente è stato osservato che anche l'incidenza di altri tumori, anche se in misura minore rispetto al CDT, è aumentata nell'area vulcanica etnea (linfoma di Hodgkin, leucemie linfatiche croniche, carcinomi mammari, prostatici e gastrici) (26). Questi risultati riflettono altre osservazioni riportate da studi condotti in aree vulcaniche come l'Islanda e le Azzorre (27, 28), rendendo plausibile l'ipotesi che la residenza in un ambiente vulcanico sia un fattore di rischio per lo sviluppo di patologie neoplastiche. Inoltre, altri dati della letteratura hanno evidenziato come soggetti abitanti in regioni dove è presente una costante attività vulcanica presentino più frequentemente alterazioni genomiche a carico del DNA (29).

Il vulcanismo etneo nella fase attuale (fase dello strato-vulcano, iniziata circa 60.000 anni fa) è caratterizzato da una continua attività sia di tipo effusivo, con numerose eruzioni e colate laviche lungo i fianchi del vulcano in tempi storici, sia di tipo esplosivo, con una quasi persistente attività di degassamento magmatico che determina la liberazione sia in atmosfera che nel bacino acquifero di una grande quantità di elementi chimici e metalli pesanti (Figura 2).

Le acque provenienti dal sistema acquifero durante il passaggio tra le porosità delle rocce basaltiche, reagendo con la CO₂ contenuta nei gas vulcanici, abbassano il proprio pH (per la formazione di acido carbonico H₂CO₃), fenomeno che favorisce il rilascio di vari elementi chimici dalle rocce basaltiche (30). Inoltre molti metalli pesanti si trovano ad una maggiore concentrazione nel suolo vulcanico (Fe, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn), così come diversi gas di origine vulcanica (CO₂, SO₂) si trovano ad alte concentrazioni nell'atmosfera circostante (31, 32). A conferma di ciò alcuni studi hanno evidenziato elevate concentrazioni (talvolta eccedenti il MAC, ovvero massima concentrazione permessa dalla legge) nelle acque etnee di diversi elementi come B, Fe, Mn e V (25).

La presenza di elevate concentrazioni di tali elementi e metalli pesanti nell'ambiente vulcanico rende l'atmosfera, l'acqua e il suolo dei potenziali veicoli di fattori determinanti biocontaminazione dei residenti di questa specifica area geografica. A tale riguardo, infatti, è stato evidenziato che i prodotti ortofrutticoli coltivati nell'area etnea presentano elevate concentrazioni di alcuni metalli pesanti (33). Inoltre, la presenza di biocontaminazione umana nella regione etnea è stata confermata da uno studio in cui sono state analizzate le concentrazioni di diversi elementi chimici nei capelli di scolari della provincia di Catania (34).

Tali evidenze suggeriscono un inquinamento non antropogenico dell'ambiente etneo, oltre che una biocontaminazione nei residenti nell'area vulcanica dell'Etna, dove l'incidenza del CDT è particolarmente elevata. Tale associazione tra inquinamento delle aree vulcaniche, biocontaminazione umana ed elevata incidenza di tumori tiroidei suggerisce una possibile relazione tra tali fenomeni, ma ulteriori analisi biologiche e molecolari sono necessarie per comprendere la capacità di tali fattori ambientali di indurre la carcinogenesi tiroidea. Uno dei possibili motivi di una specifica attività carcinogena tiroidea dei metalli pesanti è la capacità di concentrazione di tali elementi da parte del tessuto tiroideo ove potrebbero influenzare la funzione tiroidea, la proliferazione e la carcinogenesi agendo come interferenti endocrini. La complessità dei meccanismi coinvolti nell'omeostasi tiroidea implica che le sostanze chimiche ambientali possano agire con diversi meccanismi ed a differenti livelli. La maggior parte degli interferenti endocrini, infatti, agiscono determinando danno cellulare, interferenza con l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide od alterazioni del metabolismo periferico degli ormoni tiroidei (14) (Figura 3). Aumentando i livelli di TSH, le sostanze agenti come interferenti endocrini possono influenzare il potenziale di proliferazione delle cellule tiroidee ed indurre la suscettibilità alla trasformazione maligna (35).

Inoltre, la combinazione di diverse sostanze chimiche può causare un'amplificazione degli effetti dannosi a causa della sinergia dell'interazione tra meccanismi cellulari multipli.

Più di 500 milioni di persone nel mondo risiedono in territori di origine vulcanica ed identificare possibili carcinogeni ambientali avrebbe notevole impatto socio-sanitario.

Inoltre, a causa dell'inquinamento derivante dalle attività umane, molti metalli sono notevolmente aumentati nell'ambiente industrializzato e potrebbero essere responsabili dell'incremento dell'incidenza del carcinoma della tiroide negli ultimi decenni.

SCOPO

Oggetto della presente tesi sono:

- studio epidemiologico di valutazione dell'incidenza e delle caratteristiche cliniche e istopatologiche del CDT in Sicilia,
- studio ambientale per l'identificazione di possibili inquinanti di origine vulcanica mediante l'analisi delle acque e dei licheni nell'area vulcanica etnea ed in un'area di controllo non vulcanica,
- studio di biomonitoraggio mediante l'analisi delle urine per analizzare il livello di contaminazione della popolazione residente nell'area vulcanica e nell'area di controllo,
- studio *in vivo* dell'azione carcinogena degli elementi chimici identificati dagli studi ambientale e di biomonitoraggio su modelli animali.

METODI

Studio epidemiologico

I dati epidemiologici sul CDT in Sicilia sono stati raccolti attraverso il RRSCT, istituito nel 2002, che registra tutti i casi di CDT incidenti in Sicilia. Tale registro si fonda su un doppio sistema di identificazione indipendente: una ricerca attiva per diagnosi istologica in tutti i centri di anatomie patologiche regionali e l'analisi sistemica delle schede di dimissioni ospedaliere fornite dalla banca dati dall'Osservatorio Epidemiologico Siciliano.

I dati ottenuti dal registro sono stati selettivamente analizzati e confrontati per valutare:

- incidenza e caratteristiche cliniche e patologiche del CDT nella popolazione residente nella provincia di Catania (area vulcanica) rispetto alla popolazione residente nelle province di Messina e di Palermo (area di controllo) negli anni 2002-2006.

- incidenza e caratteristiche cliniche e patologiche nella popolazione infantile e adolescenziale (0-19 anni) residente nell'area vulcanica (provincia di Catania) e nell'area di controllo (resto della Sicilia) nel periodo 2002-2009. Inoltre, in questo sottogruppo è stata eseguita una comparazione con i dati ottenuti nello stesso intervallo temporale dai 18 registri statunitensi che costituiscono il programma Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) (<http://seer.cancer.gov/>).

L'incidenza del CDT è indicata come tasso standardizzato per età per la popolazione mondiale (ASRw). I dati sulla popolazione siciliana (numero di abitanti, sesso ed età) sono stati ottenuti dall'Istituto Italiano di Statistica (ISTAT). I dati quantitativi sono stati confrontati usando il test t di Student mentre il test χ -quadrato è stato utilizzato per dati qualitativi. Il confronto dell'incidenza del CDT è stato effettuato mediante l'uso dell'analisi di regressione di Poisson.

Studio ambientale e di biocontaminazione

Il presente studio ha valutato comparativamente la concentrazione di 27 oligoelementi e metalli pesanti nell'acqua potabile, nei licheni (marcatori di inquinamento atmosferico) e nelle urine (valutazione della biocontaminazione) dei residenti dell'area vulcanica etnea ed in due aree non vulcaniche della Sicilia, (identificate con le provincie di Messina e Palermo), che hanno costituito l'area di controllo. Per area vulcanica è stata considerata l'area della provincia di Catania compresa entro un raggio di 35 km dalla cima dell'Etna (Figura 4). Le aree selezionate sono simili tra loro dal punto di vista geografico in quanto presentano sia aree metropolitane che aree rurali e montuose. Inoltre, nelle tre provincie studiate la popolazione ha status socio-economico e stile di vita simili.

L'acqua (140 campioni dall'area vulcanica e 138 dall'area di controllo) è stata raccolta dalla rete idrica pubblica e domestica dai soggetti che hanno partecipato allo studio di biocontaminazione fornendo i campioni di urina (come descritto in dettaglio successivamente) e collocata in provette sterili di polipropilene da 15 ml. I campioni sono stati conservati a -20° C fino alla misurazione e le concentrazioni dei vari elementi chimici sono state espresse in µg/L.

Il campionamento dei licheni (68 dall'area vulcanica e 41 dall'area di controllo) è stato effettuato prelevando la porzione periferica (in quanto sviluppatasi più recentemente) del tallo del lichene *Xanthoria parietina* raccolto dalla corteccia di *Quercus spp.* a circa 1 metro di altezza dal suolo (per evitare la contaminazione dal suolo stesso) ed in aree boschive lontane dai centri urbani per minimizzare l'influenza dei fattori antropici (Figura 5). I licheni, che sono degli organismi simbiotici derivanti dall'associazione di un'alga autotrofa ed un fungo, vengono utilizzati come degli ottimi indicatori

dell'inquinamento atmosferico, in quanto tendono ad assorbire ed accumulare gli ioni metallici ed altri elementi dispersi nell'aria fungendo da bioaccumulatori (36). Dopo la pulizia sotto osservazione microscopica, i campioni sono stati conservati a -20° fino alla misurazione degli elementi chimici. Per tale scopo, i campioni sono stati sottoposti a digestione con 4 ml di HNO₃ (65% m/v) e 0,1 ml di HF (40% m/v) e successivamente filtrati e diluiti con acqua deionizzata. I risultati della misurazione sono stati espressi in µg/g di lichene raccolto.

I campioni di urina sono stati raccolti da 278 volontari adulti sani che erano residenti nelle aree vulcaniche (n = 140) o di controllo (n = 138). I soggetti sono stati scelti casualmente attraverso una collaborazione con i medici di medicina generale. Gli individui delle due coorti erano appaiati per sesso, età e residenza urbana/rurale. Sono stati esclusi i soggetti che bevevano e/o utilizzavano per gli usi domestici acqua da fonti diverse dall'acqua di rubinetto o della rete idrica pubblica, ad esempio acqua imbottigliata o filtrata. Altri criteri di esclusione sono stati: fumo, assunzione di farmaci interferenti con funzione tiroidea e renale, malattie clinicamente rilevanti e malattie tiroidee pregresse o concomitanti. Le urine sono considerate un buon indicatore di biocontaminazione ed, in condizioni di esposizione cronica, la concentrazione urinaria dei vari elementi chimici riflette il grado di esposizione individuale alle determinate sostanze. L'urina del mattino è stata raccolta in due flaconcini da 15 ml in polipropilene, un campione è stato utilizzato per la misurazione della creatinina, eseguita lo stesso giorno della raccolta attraverso una metodica colorimetrica enzimatica, l'altro è stato conservato a -20° C fino alla misurazione degli elementi chimici. Prima delle l'analisi, le urine sono state filtrate e diluite con una soluzione all' 1% di HNO₃. I valori delle concentrazioni urinarie degli elementi sono state espresse in µg/g di creatinina.

Nei campioni di acqua, licheni ed urine è stata dunque effettuata, presso il Laboratorio di Tossicologia e Igiene Ambientale dell'IRCCS Maugeri di Pavia, l'esecuzione del dosaggio di 27 elementi chimici: Argento (Ag), alluminio (Al), arsenico (As), boro (B), bario (Ba), bismuto (Bi), bromo (Br), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), rame (Cu), mercurio (Hg), litio (Li), manganese (Mn), molibdeno (Mo), nichel (Ni), piombo (Pb), palladio (Pd), antimonio (Sb), selenio (Se), stagno (Sn), stronzio (Sr), tallio (Tl), uranio (U), vanadio (V), tungsteno (W) e zinco (Zn). Le misurazioni sono state eseguite utilizzando la spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente con cella di reazione dinamica (DRC-ICP-MS) (ELAN 6100 DRCII ICP-MS; PerkinElmer SCIEX Instruments, Concord, Ontario, Canada), una tecnologia estremamente sensibile ed ampiamente utilizzata in campo ambientale e tossicologico in quanto capace di determinare concentrazioni dell'ordine dei $\mu\text{g/l}$. I dati sulle concentrazioni degli elementi chimici sono stati espressi in termini di media geometrica (MG) ed intervallo di confidenza al 95% (IC). Il confronto tra le MG delle due aree valutate è stato eseguito mediante il test t di Student, mentre il coefficiente di correlazione di Pearson è stato calcolato per analizzare la relazione tra le MG nei campioni di acqua, licheni e urina.

Studio in vivo su modello animale

La quarta fase dello studio è stata condotta su 28 esemplari di ratto femmina Wistar mantenuti in condizione di carenza iodica e trattati con metimazolo. Tale modello animale determina una condizione di predisposizione alla tumorigenesi tiroidea, indotta dall'incremento del TSH con conseguente stimolo e proliferazione dei tireociti (37); inoltre sono stati scelti ratti di sesso femminile per la loro maggiore propensione allo sviluppo di tumori tiroidei (38).

I ratti sono stati randomizzati in due gruppi: 11 ratti nel gruppo A, 15 ratti nel gruppo B. Il Gruppo A ha ricevuto acqua da bere contenente lo 0,003% di metimazolo ed una dieta a basso contenuto di iodio (I). I ratti del gruppo B oltre al metimazolo ed alla dieta ipiodica ricevevano anche metalli pesanti (B, Cd e Mo) disciolti nell'acqua potabile alla concentrazione riportata nella Tabella 2. Due ratti non sono stati trattati né con metimazolo, né con dieta ipiodica, né con metalli pesanti, costituendo un gruppo di controllo. E' stato scelto di valutare l'effetto sinergico dell'esposizione cronica ai suddetti metalli a concentrazioni doppie a quelle riscontrate nelle urine dei residenti dell'area vulcanica (vedi risultati dello studio di biocontaminazione). La scelta di questi metalli era basata sul riscontro dei risultati del nostro studio sulla biocontaminazione (vedi successivamente) e sulla disponibilità di dati sperimentali che suggerivano la loro associazione con un'alterata funzione tiroidea (39-46).

Dopo 1, 5 e 10 mesi dal trattamento, sono stati raccolti dei campioni di urina delle 24 ore e conservati a -20 °C per le misurazioni di I e metalli. Cinque ratti del gruppo A e 5 ratti del gruppo B sono stati sacrificati dopo 5 mesi dal trattamento, mentre i restanti 6 ratti del gruppo A e 10 ratti del gruppo B sono stati sacrificati dopo 10 mesi per ottenere campionamenti tissutali tiroidei da inviare all'analisi istopatologica ed alla misurazione intratiroidea dei metalli. I campioni di tessuto paraffinati per l'analisi istologica sono stati tagliati in sezioni spesse 3 µm e colorati con ematossilina-eosina. La valutazione dei parametri morfologici tiroidei si è basata sull'analisi delle caratteristiche architettoniche e cellulari effettuata separatamente da due patologi in cieco. I parametri istologici tiroidei valutati sono stati: dimensione dei follicoli, morfologia cellulare, disomogeneità e presenza di cellule ossifile, nuclei chiari, congestione vascolare e strutture papillari.

I campioni di urina sono stati filtrati e diluiti con una soluzione all' 1% di HNO_3 , mentre i campioni di tessuto sono stati sottoposti a digestione con HNO_3 (65% m/v) e 0,5 mL di H_2O_2 (30% m/v), e successivamente filtrati e diluiti con acqua deionizzata. Le misurazioni degli elementi chimici sono state eseguite mediante DRC-ICP-MS. I valori degli elementi misurati sono stati normalizzati sia per peso di tessuto che per DNA. L'analisi statistica è stata effettuata mediante test t di Student.

RISULTATI

Studio epidemiologico

Dall'analisi dei dati epidemiologici ottenuti dal RRSCT è emerso che nel periodo 2002-2006 sono stati diagnosticati 1228 casi di CDT nell'area vulcanica (provincia di Catania) e 1147 nell'area di controllo (province di Messina e Palermo), con un'incidenza circa doppia nella zona vulcanica rispetto all'area di controllo (18.5/100.000 vs 9.6/100.000) (Tabella 3). Tale incremento coinvolgeva unicamente l'istotipo papillifero: il rapporto papillifero/follicolare è stato di 23,5 nell'area vulcanica e di 7,5 nell'area di controllo. I CDT dei residenti dell'area vulcanica erano più frequentemente multifocali (33,4% vs 29,4%, $p < 0,01$) e con maggiore estensione extratiroidea (17,6% vs 13,5%, $p < 0,01$), mentre non vi erano differenze significative per quanto concerne il coinvolgimento linfonodale, il rapporto F/M, l'età alla diagnosi e la dimensione del tumore ed il rapporto micro/macrocarcinomi.

Dall'analisi dei dati relativi ai CDT in età pediatrica in Sicilia è emerso che i casi incidenti negli anni compresi tra il 2002 e il 2009 sono stati 54 per un tasso di incidenza di 0,8 per le femmine e 0,2 per i maschi (Tabella 4). La maggior parte dei casi (79,6%) è stata diagnosticata nei soggetti più grandi (fascia d'età compresa tra 15 e 19 anni), l'istotipo più frequente è stato il papillifero (94,4%) e il rapporto F/M (3,5:1) aumentava con l'età. Non sono state riscontrate differenze significative di incidenza tra i carcinomi differenziati tiroidei in età pediatrica diagnosticati in Sicilia e negli Stati Uniti, mentre è stata evidenziata un'importante differenza tra le due zone della Sicilia: l'incidenza di carcinoma differenziato della tiroide è significativamente maggiore nell'area vulcanica (ASRw=1,4 nelle femmine, ASRw=0,5 nei maschi) rispetto al resto della Sicilia

(ASRw=0,6 nelle femmine, ASRw= 0,1 nei maschi) ($p=0,009$ per le femmine e $p=0,03$ per i maschi) (Tabella 4).

Studio ambientale e di biomonitoraggio

Le MG delle concentrazioni dei metalli esaminati nei campioni di acqua, licheni e urine sono elencate nella Tabella 5. In particolare, la concentrazione media di 5 elementi (Ba, Co, Ni, Tl e Zn) era significativamente più alta nell'acque provenienti dall'area di controllo rispetto all'area vulcanica mentre per 4 elementi (Cu, Pb, Sn e Sr), non vi era alcuna differenza tra i campioni provenienti dalle due aree. La concentrazione media di 14 elementi (As, B, Br, Cd, Hg, Li, Mn, Mo, Pd, Sb, Se, U, V e W) era significativamente più alta nei campioni di acqua della zona vulcanica e per B, Cd, Hg, Mn, Mo, Pd, Se, U, V e W era da tre a cinquanta volte superiore rispetto all'area di controllo (Tabella 6).

La concentrazione media di 14 elementi (As, B, Ba, Co, Cu, Mo, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, Tl, V e Zn) era significativamente più alta nei campioni di licheni raccolti nell'area vulcanica rispetto all'area di controllo con differenze meno marcate che per i campioni di acqua. Le concentrazioni di Br, Cd, Hg, Li, Mn, Ni, Pd, U e W non erano diverse tra i campioni di licheni raccolti nelle due aree.

La concentrazione di 5 elementi (As, Ba, Ni, Pb e Sb) non era significativamente differente nei campioni di urine dei residenti delle due aree. Diciotto elementi (B, Br, Cd, Co, Cu, Hg, Li, Mn, Mo, Pd, Se, Sn, Sr, Tl, U, V, W, Zn) erano a concentrazioni significativamente più elevate nelle urine dei residenti dell'area vulcanica rispetto all'area di controllo e per 13 di essi (B, Cd, Cu, Hg, Li, Mn, Mo, Pd, Se, Tl, U, V e W) le concentrazioni nelle urine dei residenti dell'area vulcanica erano più di una volta e mezza superiori rispetto ai campioni provenienti dall'area di controllo.

Le concentrazioni di B, Mo, Se e V erano significativamente aumentate nell'area vulcanica in tutti e tre i tipi di campioni esaminati (acqua, licheni e urine). Ag, Al, Bi e Cr sono risultati inferiori al limite di rilevazione in più del 40% dei campioni di acqua, urina e licheni, pertanto, l'analisi è stata considerata inadeguata per stabilire se vi fossero differenze nella concentrazione di questi elementi tra le due aree studiate.

Le medie delle concentrazioni urinarie degli elementi studiati correlavano significativamente con le medie delle concentrazioni dei campioni di acqua sia dell'area vulcanica ($r=0,76$; $p<0,001$) che nell'area di controllo ($r=0,66$; $p<0,001$), mentre non vi era correlazione tra i valori urinari e quelli ottenuti dai campioni di licheni ($r=0,27$ per l'area vulcanica e $r=0,40$ per l'area di controllo; $p>0,05$).

Studio in vivo

Non è stata rilevata alcuna differenza significativa nel peso corporeo nei ratti trattati con B, Cd e Mo (gruppo B) rispetto al gruppo di controllo A, suggerendo che questi metalli, alle dosi utilizzate, non danno segni di evidente tossicità in questi animali.

Per valutare l'assunzione dei metalli mediante l'acqua dagli animali studiati, sono stati misurati i metalli nelle urine dopo 1, 5 e 10 mesi dal trattamento. I livelli di tutti e tre gli elementi erano significativamente aumentati nei campioni urinari degli animali trattati rispetto ai campioni dei ratti del gruppo A, confermando che i metalli erano stati ingeriti ed assorbiti. In particolare le concentrazioni urinarie di Cd e Mo erano a concentrazioni simili a quelle presenti nell'acqua somministrata (0,4 µg/L e 100 µg/L, rispettivamente), mentre la concentrazione urinaria del B era leggermente inferiore, probabilmente a causa di una diversa percentuale di escrezione di questo metallo nel ratto (Figura 6a). L'analisi della ioduria ha evidenziato che le concentrazioni di I nelle urine sono

progressivamente e similmente diminuite nei due gruppi come conseguenza della dieta a basso contenuto di I (Figura 6b).

Per studiare l'effetto dei metalli sulla tiroide, gli animali sono stati sacrificati a 5 e 10 mesi dal trattamento e la loro ghiandola tiroidea è stata analizzata istologicamente. Le tiroidi dei ratti dei due gruppi A e B sono state confrontate con quelli dei due ratti sani non trattati. Come conseguenza dell'ipotiroidismo indotto dalla dieta povera di iodio e dal metimazolo, le tiroidi dei ratti dei gruppi A e B erano marcatamente ingrandite, con pattern follicolare irregolare ed incremento della vascolarizzazione rispetto a quelle dei due ratti non trattati, le quali erano invece caratterizzate da strutture follicolari omogenee caratterizzate da cellule piatte ed assenza di congestione vascolare.

Dopo 5 mesi, in 2 ratti su 5 del gruppo B, è stata osservata anche iperplasia nodulare, anomalie nucleari come la presenza di nuclei chiari, che quando associata a strutture papillari ben definite, è un marcatore diagnostico di trasformazione cellulare.

Dopo 10 mesi, l'architettura tissutale della tiroide è stata ulteriormente compromessa con completa disorganizzazione della struttura follicolare, aumento marcato della vascolarizzazione ed aumento del numero di cellule iperplastiche ed ossifiliche in entrambi i gruppi (aspetto correlato all'ipotiroidismo e che caratterizza sia le lesioni tiroidee benigne che maligne). Nelle tiroidi dei ratti del gruppo B era aumentata la presenza di strutture papillari in associazione alla comparsa di anomalie nucleari (Tabella 7).

Il contenuto di I intratiroideo normalizzato per DNA è risultato essere significativamente inferiore nei ratti trattati con metalli (gruppo B) rispetto al gruppo di controllo (gruppo A) ($p = 0,01$), suggerendo che la captazione ed il metabolismo intratiroideo dello I fosse influenzato negativamente dalla presenza dei metalli. L'analisi della concentrazione dei metalli nei campioni tissutali di ratto ha rivelato inoltre che i

livelli di B e Mo non differivano tra le tiroidi dei ratti del gruppo A e B e che le concentrazioni di Cd erano indosabili nelle tiroidi di entrambi i gruppi, indicando che le alterazioni istopatologiche osservate nella tiroide non erano secondarie ad una maggiore concentrazione di metalli all'interno della ghiandola tiroidea (Tabella 8).

DISCUSSIONE

L'incidenza del CDT è in aumento in tutto il mondo e le cause di questo fenomeno sono tuttora dibattute nella comunità scientifica, divisa tra i sostenitori della tesi di un aumento apparente, secondario alla diffusione delle tecniche di diagnostica per immagini, e tra coloro che sono convinti di un reale incremento di incidenza come suggerirebbe il cambiamento del profilo molecolare del CDT e l'aumento della mortalità (47). L'ambiente vulcanico, dove viene riscontrata un'elevata incidenza di CDT, offre un modello interessante che potrebbe aiutare a comprendere la relazione tra l'aumento dell'incidenza del CDT ed i fattori ambientali. La causa dell'incremento dell'incidenza del CDT nell'area vulcanica dell'Etna in Sicilia (25) ed in altre aree vulcaniche non è conosciuta, ma l'inquinamento ambientale in queste aree, legato all'emissione di metalli pesanti di origine vulcanica, è una caratteristica risaputa (48, 49); anche per quanto riguarda l'Etna è noto che essa contribuisce al 2% delle emissioni globali di metalli pesanti nell'ambiente circostante, che possono aumentare fino al 16% durante le eruzioni (50).

Il nostro studio epidemiologico ha confermato la maggiore incidenza del CDT nell'area vulcanica della Sicilia, dovuta esclusivamente all'aumento dell'istotipo papillifero. Inoltre, in quest'area, i CDT erano caratterizzati più frequentemente dalla presenza alla

diagnosi di alcune caratteristiche di aggressività biologica quali la multifocalità e l'estensione extratiroidea. L'analisi del sottogruppo di CDT diagnosticati in età pediatrica ha evidenziato inoltre, l'aumentata incidenza anche nei bambini e negli adolescenti residenti nell'area vulcanica rispetto al resto della Sicilia. In questa popolazione, l'aumento apparente dovuto ad un eccesso diagnostico è piuttosto improbabile perché i bambini sono raramente sottoposti a screening per patologie tiroidee rispetto agli adulti (51) e la maggior parte dei soggetti affetti viene diagnosticata mediante la palpazione a causa dei segni locali (tumefazione o massa palpabile nel collo), come evidenziato anche da un recente studio riguardante una serie di 124 pazienti pediatrici affetti da CDT diagnosticati e seguiti presso i centri di Endocrinologia di Messina e Catania (52). Questi dati supportano la possibilità che l'influenza negativa dell'ambiente vulcanico osservato nella popolazione adulta agisca già in giovane età, probabilmente a causa dell'esposizione cronica ai presunti agenti cancerogeni a partire dalla vita fetale. La differenziazione della tiroide del feto è particolarmente sensibile ai fattori mutageni e questo può contribuire alla comparsa precoce del CDT nei bambini e negli adolescenti residenti nell'area vulcanica.

Inoltre, nel nostro studio sono state valutate le concentrazioni di diversi elementi chimici nell'ambiente vulcanico etneo ed in due aree non vulcaniche adiacenti. Nelle stesse aree è stata esaminata la biocontaminazione umana analizzando le concentrazioni degli stessi elementi nelle urine dei residenti. Nel complesso, lo studio ambientale ha indicato la presenza di un inquinamento da parte di plurimi elementi chimici nell'area vulcanica etnea, che coinvolge sia l'acqua che l'atmosfera a diversi livelli. Molti metalli pesanti sono aumentati nei licheni raccolti nell'area vulcanica, suggerendo che la loro concentrazione è aumentata nell'atmosfera. Le differenze tra le due aree sono molto più

marcate per le concentrazioni degli elementi chimici nei campioni di acqua, in cui elementi quali Cd, Mo, Pd, Se, V e W sono aumentati più di dieci volte nelle acque dell'area vulcanica rispetto ai campioni prelevati nell'area di controllo (Tabella 6). Questo inquinamento ambientale si riflette nella maggiore concentrazione di molti di questi elementi nelle urine dei residenti dell'area vulcanica: infatti, i valori medi urinari erano più del doppio per Cd, Hg, Mn, Pd, Tl, U, V e W (Tabella 6). Questa documentata biocontaminazione da esposizione cronica nei residenti dell'area vulcanica etnea è confermata dall'aumentata concentrazione di molti di questi elementi anche nei capelli degli scolari che vivono in queste zone (34). La biocontaminazione umana nell'area vulcanica può avvenire sia attraverso l'acqua che l'atmosfera. Tuttavia la differenza delle concentrazioni di oligoelementi tra l'area vulcanica e quella di controllo è più marcata per l'acqua che per l'atmosfera e la correlazione tra i valori di concentrazione degli elementi nelle urine è significativa per l'acqua ma non per i licheni. Questi dati suggeriscono che l'ingestione piuttosto che l'inalazione possa essere la principale via di biocontaminazione. Tale processo è condizionato da numerosi processi metabolici endogeni che portano all'accumulo ed all'eliminazione attraverso l'escrezione renale ed epatica determinando l'alta variabilità della biocontaminazione individuale. Lo studio della concentrazione dei diversi elementi, inoltre, non tiene conto della speciazione chimica, ossia dei diversi stati di ossidazione del singolo elemento che possono determinare effetti biologici totalmente diversi (fenomeno ben noto per l'As e il Cr). Questi fattori endogeni, oltre al livello di biocontaminazione esogeno, determineranno l'esposizione individuale e le diverse conseguenze biologiche.

Va tuttavia ricordato che l'associazione tra l'aumento di incidenza del CDT e la biocontaminazione dei residenti non implica necessariamente una relazione di causa-effetto. Molti degli elementi che sono aumentati nell'area vulcanica sono sostanze

chimiche biologicamente attive, importanti per diverse funzioni enzimatiche (Se, Zn), altri hanno effetti tossici noti inducendo stress ossidativo, inibendo la riparazione del DNA, alterando la trasduzione del segnale cellulare (53), ed, in ultima istanza, potendo favorire la trasformazione maligna cellulare (54). Le concentrazioni misurate nel nostro studio, tuttavia, non raggiungono mai la soglia nota che determina tossicità. Gli effetti tossici e cancerogeni potrebbero comunque dipendere, non dalla concentrazione di un singolo metallo, ma piuttosto dall'effetto sinergico di una miscela di sostanze chimiche la cui interazione può indurre tossicità anche a basse concentrazioni di esposizione. Inoltre va considerato che molti di questi elementi presentano curve dose-risposta di tipo bifasico (il cosiddetto effetto ormesi) per cui le conseguenze biologiche sfavorevoli possono essere presenti a concentrazioni molto basse (55, 56), mentre a concentrazioni maggiori può non esservi una risposta biologica. Anche l'interazione geni-ambiente ha un ruolo preponderante nella carcinogenesi dato che gli xenobiotici possono essere metabolizzati in modo diverso attraverso i sistemi di detossificazione spiegando una diversa suscettibilità individuale agli agenti cancerogeni. Va inoltre considerata l'importanza dell'esposizione ambientale comprendente il periodo prenatale e le possibili alterazioni di tipo epigenetico che influenzeranno la risposta agli agenti cancerogeni, compresa l'iniziazione e la promozione della trasformazione maligna (57).

Per valutare l'effetto in vivo dei metalli pesanti sulla tiroide è stato condotto uno studio su ratti femmina ipotiroidei (trattati con metimazolo e dieta a basso contenuto di I) a cui venivano somministrati bassi livelli di B, Cd e Mo. Tali elementi hanno determinato un aumento delle anomalie istologiche a carico della tiroide rispetto ai ratti non trattati ed in particolare è stato riscontrato un incremento delle strutture papillari associate alle anomalie nucleari (che possono essere considerate marcatori di trasformazione

neoplastica maligna). Tali caratteristiche sono state osservate solo in un ratto del gruppo A (trattati con dieta ipiodica e metimazolo) ed in tutti i ratti del gruppo B (trattati con B, Cd e Mo) a 10 mesi, un periodo di tempo significativamente minore rispetto a quello descritto dagli studi condotti sui ratti trattati con dieta a basso contenuto di I (58, 59). Questi dati suggeriscono che anche una bassa concentrazione di B, Cd e Mo nella dieta può accelerare e/o promuovere il processo di trasformazione cellulare. Il Cd, la cui tossicità è ben stabilita (60), essendo classificato carcinogeno del gruppo I dall' Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (61), determina diversi effetti noti a carico della ghiandola tiroidea, ed in particolare è stato dimostrato che i livelli Cd sono associati all'aumento del TSH, alla riduzione degli ormoni tiroidei ed alla presenza di anomalie preneoplastiche (43,45); inoltre, uno studio condotto su soggetti sottoposti a tiroidectomia per CDT ha evidenziato che i livelli tissutali di Cd erano più elevati nelle tiroidi delle donne affette da CDT di stadio più avanzato (46). Per quanto riguarda gli altri due elementi i dati sono meno numerosi, tuttavia è stato riportato che il B riduce la concentrazione degli ormoni tiroidei nei suini (39) ed è più elevato nei capelli di bambini con gozzo (40), mentre il Mo interagisce con il recettore della T3 nel fegato di ratto (41) ed è stato riscontrato che i livelli urinari di Mo sono significativamente correlati con la ioduria di bambini che vivono in aree iodocarenti (42).

Una novità importante dello studio *in vivo*, è che l'esposizione ai metalli è stata cronica ed a concentrazioni non tossiche. Il meccanismo molecolare della promozione della carcinogenesi tiroidea delle basse dosi di B, Cd e Mo, non è chiaro, ma dai dati ricavati dalle concentrazioni tissutali tiroidee sembra emergere che questi metalli compromettono l'assorbimento e la ritenzione intratiroidea dello I da parte della tiroide, mentre non vi è un accumulo intratiroideo di tali sostanze.

In conclusione, gli studi epidemiologico, ambientale, di biomonitoraggio ed *in vivo* hanno evidenziato:

- 1) l'aumentata incidenza e la presentazione più aggressiva alla diagnosi dell'istotipo papillifero nell'area vulcanica etnea rispetto all'area di controllo (Province di Messina e Palermo); tale incremento di incidenza del CDT era presente anche nella sottopopolazione pediatrica,
- 2) l'aumento nell'ambiente vulcanico (acqua e atmosfera) di diversi elementi chimici e metalli pesanti,
- 3) la biocontaminazione dei residenti dell'area vulcanica etnea documentata dall'aumento della concentrazione urinaria, in particolare di B, Br, Cd, Hg, Li, Mn, Mo, Pd, Se, U, V, W,
- 4) la precoce comparsa dei segni tipici di trasformazione maligna nelle cellule tiroidee in ratti ipotiroidei esposti cronicamente a B, Cd e Mo.

Nell'ultimo decennio le attività antropogeniche hanno contribuito in modo significativo ad aumentare la contaminazione ambientale con diversi metalli pesanti, e nel mondo industrializzato, un'alta percentuale della popolazione è esposta a questo rischio. L'osservazioni emerse da questi studi (l'aumento di incidenza del CDT nell'area vulcanica, la biocontaminazione dei residenti di queste aree e la precoce trasformazione tiroidea in senso neoplastico nel modello murino studiato) offrono delle evidenze solo parziali sul ruolo che i metalli pesanti possono avere a riguardo della carcinogenesi tiroidea. L'azione biologica dei metalli pesanti e l'interferenza di altri fattori che possono aumentarne gli effetti biologici dovranno essere studiati *in vitro* sulle cellule tiroidee umane allo scopo di identificare le sostanze chimiche che hanno una relazione

causa-effetto con la trasformazione maligna delle cellule tiroidee. Questi studi possono avere un impatto importante migliorando la nostra comprensione della biologia tiroidea, definendo meglio i livelli tossici degli inquinanti ambientali e fornendo le basi per misure di prevenzione o intervento.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Lim H, Devesa SS, Sosa JA, Check D, Kitahara CM. Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974-2013. *JAMA* 2017; 317:1338-1348.
- 2) American Cancer Society, Cancer Fact & Figures 2017, Atlanta: American Cancer Society; 2017.
- 3) Kilfoy BA, Zheng T, Holford TR, Han X, Ward MH, Sjodin A, Zhang Y, Bai Y, Zhu C, Guo GL, Rothman N, Zhang Y. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002. *Cancer Causes Control* 2009; 20:525-531.
- 4) Vaccarella S, Franceschi S, Bray F, Wild CP, Plummer M, Dal Maso L. Worldwide Thyroid-Cancer Epidemic? The Increasing Impact of Overdiagnosis. *N Engl J Med*. 2016; 375:614-617.
- 5) Morris LG, Sikora AG, Tosteson TD, Davies L. The increasing incidence of thyroid cancer: the influence of access to care. *Thyroid* 2013; 23:885-891.
- 6) Ito Y, Miyauchi A, Inoue H, Fukushima M, Kihara M, Higashiyama T, Tomoda C, Takamura Y, Kobayashi K, Miya A. An observational trial for papillary thyroid microcarcinoma in Japanese patients. *World J Surg* 2010; 34:28-35.
- 7) Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2015; 26:1-133.
- 8) Simard EP, Ward EM, Siegel R, Jemal A. Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008. *CA Cancer J Clin* 2012; 62:118-128.
- 9) Vergamini LB, Frazier AL, Abrantes FL, Ribeiro KB, Rodriguez-Galindo C. Increase in the incidence of differentiated thyroid carcinoma in children, adolescents, and young adults: a population-based study. *J Pediatr* 2014; 164:1481-1485.
- 10) Romei C, Fugazzola L, Puxeddu E, Frasca F, Viola D, Muzza M, Moretti S, Nicolosi ML, Giani C, Cirello V, Avenia N, Rossi S, Vitti P, Pinchera A, Elisei R. Modifications in the papillary thyroid cancer gene profile over the last 15 years. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:E1758-1765.
- 11) Marcello MA, Malandrino P, Almeida JF, Martins MB, Cunha LL, Bufalo NE, Pellegriti G, Ward LS. The influence of the environment on the development of thyroid tumors: a new appraisal. *Endocr Relat Cancer* 2014; 21:T235-54.
- 12) Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* 2015; 33:673-89.
- 13) Moleti M, Sturniolo G, Trimarchi F, Vermiglio F. The changing phenotype of iodine deficiency disorders: a review of thirty-five years of research in north-eastern Sicily. *Ann Ist Super Sanita* 2016; 52:550-557.
- 14) Duntas LH. Chemical contamination and the thyroid. *Endocrine* 2015; 48:53-64.
- 15) Rana SV. Perspectives in endocrine toxicity of heavy metals--a review. *Biol Trace Elem Res* 2014; 160:1-14.
- 16) Vigneri R, Malandrino P, Gianì F, Russo M, Vigneri P. Heavy metals in the volcanic environment and thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 457:73-80.

- 17) Kung TM, Ng, WL, Gibson JB. Volcanoes and carcinoma of the thyroid: a possible association. *Arch Environ Health* 1981; 36:265-267.
- 18) Arnbjornsson E, Arnbjornsson A, Olafsson A. Thyroid cancer incidence in relation to volcanic activity. *Arch Environ Health* 1986; 41:36-40.
- 19) Hrafnkelsson J, Tulinius H, Jonasson JG, Olafsdottir G, Sigvaldason H. Papillary thyroid carcinoma in Iceland. A study of the occurrence in families and the coexistence of other primary tumours. *Acta Oncol* 1989; 28:785-788.
- 20) Goodman MT, Yoshizawa CN, Kolonel LN. Descriptive epidemiology of thyroid cancer in Hawaii. *Cancer* 1988; 61:1272-1281.
- 21) Kolonel LN, Hankin JH, Wilkens LR, Fukunaga FH, Hinds MW. An epidemiologic study of thyroid cancer in Hawaii. *Cancer Causes Control* 1990; 1:223-234.
- 22) Paksoy N, Montaville B, McCarthy SW. Cancer occurrence in Vanuatu in the South Pacific, 1980-86. *Asia Pac J Public Health* 1989; 3:231-236.
- 23) Curado M, Edwards B, Shin H, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P. Cancer Incidence in Five Continents Vol. IX. IARC Scientific Publication No. 160. Lyon: IARC, 2007.
- 24) Truong T, Rougier Y, Dubourdieu D, Guihenneuc-Jouyau C, Orsi L, Hémon D, Guénel P. Time trends and geographic variations for thyroid cancer in New Caledonia, a very high incidence area (1985-1999). *Eur J Cancer Prev* 2007; 16:62-70.
- 25) Pellegriti G, De Vathaire F, Scollo C, Attard M, Giordano C, Arena S, Dardanoni G, Frasca F, Malandrino P, Vermiglio F, Previtiera DM, D'Azzò G, Trimarchi F, Vigneri R. Papillary thyroid cancer incidence in the volcanic area of Sicily. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:1575-1583.
- 26) Russo M, Malandrino P, Addario WP, Dardanoni G, Vigneri P, Pellegriti G, Squatrito S, Vigneri R. Several Site-specific Cancers are Increased in the Volcanic Area in Sicily. *Anticancer Res* 2015; 35:3995-4001.
- 27) Amaral A, Rodrigues V, Oliveira J, Pinto C, Carneiro V, Sanbento R, Cunha R, Rodrigues A. Chronic exposure to volcanic environments and cancer incidence in the Azores, Portugal. *Sci Total Environ* 2006; 367:123-128.
- 28) Kristbjornsdottir A, Rafnsson V. Cancer incidence among population utilizing geothermal hot water: a census-based cohort study. *Int J Cancer* 2013; 133:2944-2952.
- 29) Rodrigues AS, Arruda MS, Garcia PV. Evidence of DNA damage in humans inhabiting a volcanically active environment: a useful tool for biomonitoring. *Environ Int* 2012; 49:51-56.
- 30) Aiuppa A, Dongarrà G, Valenza M, Federico C, Pecoraino G: Degassing of Trace Volatile Metals During the 2001 Eruption of Etna. In: Robock A, Oppenheimer C (eds). *Volcanism and the Earth's Atmosphere*, pp 41-54. American Geophysical Union Washington, D. C., 2003.
- 31) Andronico D, Spinetti C, Cristaldi A, Buongiorno MF. Observations of Mt. Etna volcanic ash plumes in 2006: an integrated approach from ground-based and polar satellite NOAA-AVHRR monitoring system. *J Volcanol Geotherm Res* 2009; 180:135-147.
- 32) Favalli M, Mazzarini F, Pareschi MT, Boschi E. Role of local wind circulation in plume monitoring at Mt. Etna volcano (Sicily) insight from a mesoscale numerical model. *Geophys Res Lett* 2004; 31:L09105.
- 33) Ferrante M, Fiore M, Ledda C, Ciucciù F, Alonzo E, Fallico R, Platania F, Di Mauro R, Calenti L, Sciacca S. Monitoraggio di metalli pesanti ed oligoelementi in aria, ortofrutta e terreno nella provincia di Catania. *Ig. Sanità Pubbl* 2013; 69:47-54.

- 34) Varrica D, Tamburo E, Dongarrà G, Sposito F. Trace elements in scalp hair of children chronically exposed to volcanic activity (Mt. Etna, Italy). *Sci Total Environ* 2014; 470-471:117-126.
- 35) Boelaert K. The association between serum TSH concentration and thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16:1065-1072.
- 36) Augusto S, Máguas C, Branquinho C. Guidelines for biomonitoring persistent organic pollutants (POPs), using lichens and aquatic mosses - a review. *Environ Pollut* 2013; 180:330-338.
- 37) Axelrad AA, Leblond CP. Induction of thyroid tumors in rats by a low iodine diet. *Cancer* 1955; 8:339-367.
- 38) Derwahl M, Nicula D. Estrogen and its role in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2014; 21:T273-283
- 39) Armstrong TA, Spears JW, Lloyd KE. Inflammatory response, growth, and thyroid hormone concentrations are affected by long-term boron supplementation in gilts. *J Anim Sci* 2001; 79:1549-1556.
- 40) Kudabayeva KI, Koshmaganbetova GK, Mickuviene N, Skalnaya MG, Tinkov AA, Skalny AV. Hair Trace Elements are Associated with Increased Thyroid Volume in Schoolchildren with Goiter. *Biol Trace Elem Res* 2016; 174:261-266.
- 41) Faure R, Dussault JH. Interaction of sodium molybdate with the thyroid hormone receptor. *Biochem Cell Biol* 1990; 68:630-634.
- 42) Celik T, Savas N, Kurtoglu S, Sangun O, Aydin Z, Mustafa D, Ozturk OH, Misirlioglu S, Oktem M. Iodine, copper, zinc, selenium and molybdenum levels in children aged between 6 and 12 years in the rural area with iodine deficiency and in the city center without iodine deficiency in Hatay. *Turk Pediatri Ars* 2014; 49:111-116
- 43) Jancic SA, Stosic BZ. Cadmium effects on the thyroid gland. *Vitam Horm* 2014; 94:391-425
- 44) Tiran B, Karpf E, Tiran A. Age dependency of selenium and cadmium content in human liver, kidney, and thyroid. *Arch Environ Health* 1995; 50:242-246.
- 45) Yorita Christensen KL. Metals in blood and urine, and thyroid function among adults in the United States 2007-2008. *Int J Hyg Environ Health* 2013; 216:624-632.
- 46) Chung HK, Nam JS, Ahn CW, Lee YS, Kim KR. Some Elements in Thyroid Tissue are Associated with More Advanced Stage of Thyroid Cancer in Korean Women. *Biol Trace Elem Res* 2016; 171:54-62.
- 47) Vigneri R, Malandrino P, Vigneri P. The changing epidemiology of thyroid cancer: why is incidence increasing? *Curr Opin Oncol* 2015; 27:1-7.
- 48) Deheyn DD, Gendreau P, Baldwin RJ, Latz M. Evidence for enhanced bioavailability of trace elements in the marine ecosystem of Deception Island, a volcano in Antarctica. *Mar Environ Res* 2005; 60:1-33.
- 49) Fiorentino CE, Paoloni JD, Sequeira ME, Arosteguy P. The presence of vanadium in groundwater of southeastern extreme the pampean region Argentina. Relationship with other chemical elements. *J Contam Hydrol* 2007; 93: 122-129.
- 50) Gauthier PJ, Le Cloarec MF. Variability of alkali and heavy metal fluxes released by Mt. Etna volcano, Sicily, between 1991 and 1995. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 1998; 81: 311-326.
- 51) Cho YY, Jang HW, Joung JY, Park SM, Jeong DJ, Kim SW, Chung JH. Trends in Thyroid Cancer Incidence in Korean Children (1999-2012) Based on Palpation and Nonpalpation Detection Methods. *Eur Thyroid*. 2015; J4:252-259.

- 52) Russo M, Malandrino P, Moleti M, Vermiglio F, D'Angelo A, La Rosa G, Sapuppo G, Calaciura F, Regalbuto C, Belfiore A, Vigneri R, Pellegriti G. Differentiated thyroid cancer in children: Heterogeneity of predictive risk factors. *Pediatr Blood Cancer* 2018; 16:e27226.
- 53) Valko M, Morris H, Cronin, MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; 12:1161-1208.
- 54) Martín SA, Emilio R, Mahara, V. Role of oxidative stress in transformation induced by metal mixture. *Oxid Med Cell Longev* 2011; 935160.
- 55) Calabrese EJ. Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine. *EMBO Rep* 2004; 5:S37-40.
- 56) Cook R, Calabrese, EJ. The importance of hormesis to public health. *Environ Health Perspect* 2006; 114:1631-1635.
- 57) Rappaport SM, Smith MT. Epidemiology. Environment and disease risks. *Science* 2010; 330:460-461.
- 58) Ohshima M, Ward JM. Dietary iodine deficiency as a tumor promoter and carcinogen in male F344/NCr rats. *Cancer Res* 1986; 46:877-883.
- 59) Ward JM, Ohshima M. The role of iodine in carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1986; 206:529-542.
- 60) Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003; 192:95-117.
- 61) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol 100C. Cadmium and Cadmium Compounds. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2012.

TABELLE E FIGURE

Tabella 1. Tassi di incidenza del CDT nelle aree vulcaniche. Va considerato che negli ultimi decenni i tassi medi d'incidenza nel resto del mondo sono stati $4\text{-}5/10^5$ nel 1980-1990 e $10\text{-}12/10^5$.

Autori	Anni analizzati	Area geografica	Tasso di incidenza	
			Maschi	Femmine
Hrafinkelsson et al. (1989)	1955–1984	Iceland	$3,4/10^5$	$9,5/10^5$
Goodman et al. (1988)	1960–1984	Hawaii	$3,1/10^5$	$8,1/10^5$
Paksoy et al. (1989)	1980–1986	Vanuatu	$3,6/10^5$	$9,0/10^5$
Truong et al. (2007)	1985–1999	New Caledonia	$10,4/10^5$	$71,4/10^5$
Curado et al. (2007)	1998–2002	French Polynesia	$5,4/10^5$	$37,4/10^5$
Pellegriti et al. (2009)	2002–2004	Etna (Sicily)	$6,4/10^5$	$31,7/10^5$



Figura 1. Tassi di incidenza standardizzati per la popolazione mondiale del CDT nelle province della Sicilia nel periodo 2002-2004. Tratto da Pellegriti et al. *Journal of the National Cancer Institute*, 2009.

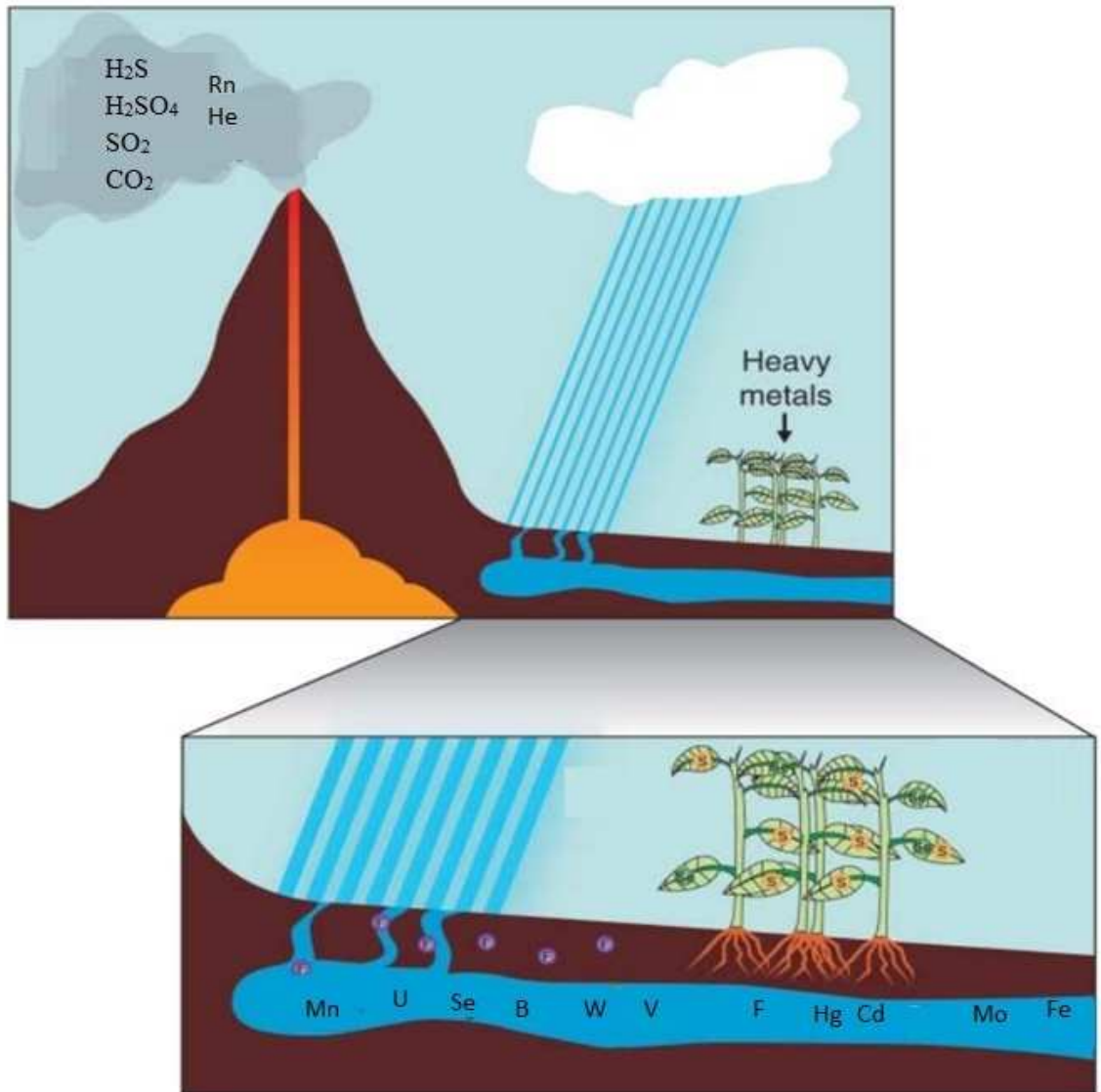


Figura 2. Inquinamento non antropogenico delle aree vulcaniche. Numerosi elementi chimici e metalli pesanti sono presenti in grandi quantità negli acquiferi, nel suolo e nell'atmosfera contaminando queste aree ed entrando nella catena alimentare. Modificato da Marcello et al., *Endocrine Related Cancer*, 2014.

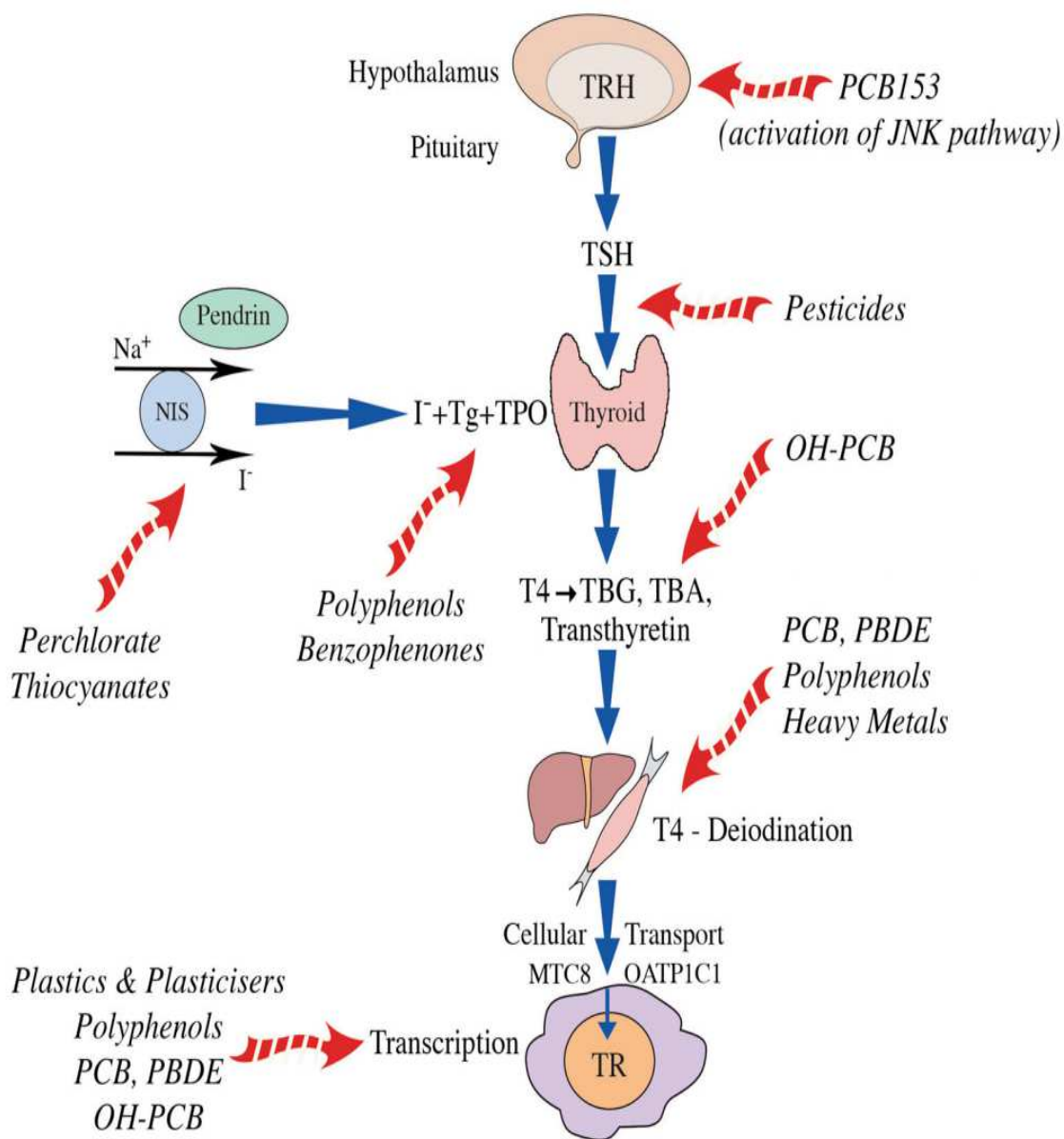


Figura 3. Interferenti endocrini e tiroide. PCB: policlorobifenili. OH-PCB: policlorobifenili idrossilati. PBDE: polibromodifenilietteri. NIS: Sodium/iodide symporter. TBG: Thyroxine binding globulin. TBA: Thyroxine binding albumin. MTC8: Monocarboxylate transporter. TR: Thyroid receptor. Tratto da Duntas, *Endocrine*, 2015.

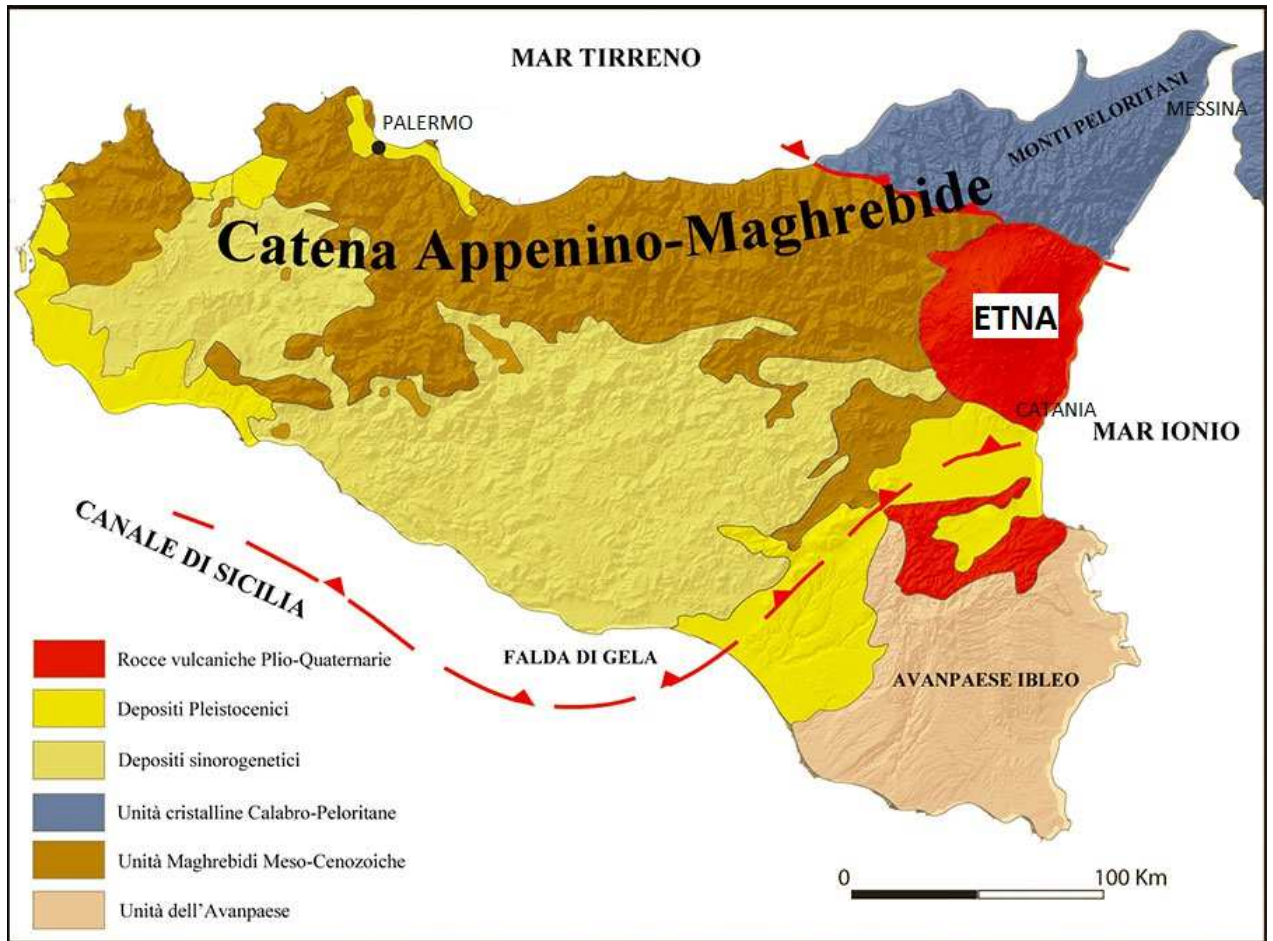


Figura 4. Carta geologica della Sicilia. Si noti l'area vulcanica della provincia di Catania in rosso. Le aree di controllo (province di Palermo e di Messina) sono caratterizzate da diversa composizione geologica.



Figura 5. Lichene *Xanthoria parietina* su tronco di un albero.

Tabella 2. Elementi e composti aggiunti nell'acqua bevuta dai ratti del gruppo B.

Elemento (PM)	[C] dell'elemento	Composto (PM)	[C] del composto	LD50 nel ratto
B (10,81)	1600 µg/L (148 µM)	Acido Borico (61,83)	9,14 mg/L	270-675 mg
Cd (112,41)	0,4 µg/L (3,6 nM)	Cloruro di Cadmio (183,32)	0,66µg/L	8,8-22 mg
Mo (95,96)	100 µg/L (1,04µM)	Eptamolibdato d'ammonio (1235,86)	1,286mg/L	33-83 mg

PM: peso molecolare. [C]: concentrazione. LD50: dose letale 50 (dose di una sostanza in grado di uccidere il 50% di una popolazione campione).

Tabella 3. Studio epidemiologico (2002-2006) sull'incidenza dei CDT nell'area vulcanica (provincia di Catania) e non vulcanica (province di Messina and Palermo) in Sicilia.

Area	Sesso	CDT			Papillifero			Follicolare		
		n.	ASRw	(95%IC)	n	ASRw	(95%IC)	n	ASRw	(95%IC)
Vulcanica	F	1019	29,8	(25,6-34)	960	27,9	(23,9-31,9)	42	1,1	(0,4-1,8)
	M	209	6,4	(4,4-8,4)	193	6	(4,1-7,9)	7	0,2	(0-0,4)
Non Vulcanica	F	936	15,4	(13,1-17,7)	807	13,4	(11,3-15,5)	97	1,5	(0,9-2,1)
	M	211	3,5	(2,4-4,6)	168	2,9	(1,9-3,9)	33	0,5	(0,1-0,9)

ASRw: tasso di incidenza standardizzato per la popolazione mondiale.

Tabella 4. Tassi di incidenza del CDT in età pediatrica (età alla diagnosi 0-19 anni) nel periodo 2002-2009.

Area geografica	Sesso	ASRw (IC 95%)
USA	F	1,0 (0,9-1,0)
	M	0,2 (0,2-0,2)
Sicilia	F	0,8 (0,6-1,1)
	M	0,2 (0,1-0,4)
Area vulcanica	F	1,4 (0,8-2,4)*
	M	0,5 (0,2-1,1)**
Area non vulcanica	F	0,6 (0,4-0,9)
	M	0,1 (0,1-0,3)

*p 0,009 vs area non vulcanica

**p 0,03 vs area non vulcanica

ASRw: tasso di incidenza standardizzato per la popolazione mondiale.

Tabella 5. Concentrazioni degli elementi chimici analizzati nei campioni di acqua, licheni e urine dei residenti nell'area vulcanica e di controllo. I valori sono espressi come MG (IC95%).

Elemento chimico	[C] elemento Acqua (µg/L)		[C] elemento Licheni (µg/g)		[C] elemento Urine (µg/g creatinine)	
	Area di controllo	Area vulcanica	Area di controllo	Area vulcanica	Area di controllo	Area vulcanica
As	0,3 (0,3-0,4)*	1,3 (1,2-1,5)	0,12 (0,07-0,22)*	0,30 (0,22-0,42)	12,4 (10,0-16,0)	16,3 (13,0-21,0)
B	39,7 (33,0-47,7)*	179,6 (153,9-209,7)	0,95 (0,67-1,35)*	3,2 (2,3-4,5)	520 (457-591)*	853 (759-958)
Ba	10,0 (7,9-12,7)*	3,0 (2,5-3,7)	4,3 (3,3-5,5)*	7,7 (6,3-9,4)	0,6 (0,5-0,8)	0,7 (0,6-0,9)
Br	80,0 (70-91,3)*	131,9 (117,3-148,3)	8,2 (6,5-10,3)	5,9 (4,5-7,9)	1333 (1137-1564)*	1863 (1683 - 2061)
Cd	0,001 (0,001-0,002)*	0,02 (0,01-0,02)	0,04 (0,02-0,06)	0,04 (0,03-0,06)	0,10 (0,09-0,12)*	0,21 (0,18 - 0,24)
Co	0,04 (0,03-0,05)*	0,03 (0,03-0,04)	0,10 (0,07-0,14)*	0,18 (0,14-0,24)	0,19 (0,17-0,22)*	0,27 (0,24-0,31)
Cu	0,9 (0,6-1,4)	1,0 (0,7-1,3)	2,1 (1,7-2,6)*	4,3 (3,5-5,4)	3,5 (3,1- 3,9)*	5,5 (5,1 - 6,0)
Hg	0,0008 (0,0007-0,001)*	0,004 (0,003-0,005)	0,011 (0,008-0,015)	0,009 (0,008-0,011)	0,08 (0,06-0,1)*	0,21 (0,15-0,28)
Li	3,7 (2,9-4,8)*	5,7 (4,8-6,9)	0,28 (0,19-0,40)	0,40 (0,30-0,50)	7,8 (6,7-9,1)*	14,1 (12,4-16,0)
Mn	0,03 (0,01-0,06)*	0,1 (0,1-0,2)	9,7 (7,5-12,5)	13,2 (10,6-16,5)	0,3 (0,3-0,5)*	0,9 (0,8-1,1)
Mo	0,5 (0,4-0,7)*	7,8 (6,3-9,6)	0,02 (0,01-0,03)*	0,07 (0,05-0,11)	31,2 (26,6-36,7)*	59,6 (51,3-69,3)
Ni	0,4 (0,3-0,6)*	0,06 (0,03-0,1)	0,87 (0,69-1,08)	0,88 (0,74-1,05)	0,53 (0,36-0,75)	0,54 (0,38-0,76)
Pb	0,001 (0,001-0,002)	0,002 (0,001-0,002)	1,1 (0,9-1,4)*	2,1 (1,8-2,4)	0,06 (0,04-0,08)	0,07 (0,05-0,10)
Pd	0,0003 (0,0002-0,0004)*	0,003 (0,002-0,005)	0,01 (0,01-0,02)	0,02 (0,01-0,02)	0,01 (0,01-0,01)*	0,09 (0,06-0,13)

Sb	0,03 (0,03-0,04)*	0,05 (0,05-0,06)	0,03 (0,02-0,04)*	0,04 (0,03-0,05)	0,02 (0,02-0,03)	0,02 (0,02-0,03)
Se	0,006 (0,003-0,01)*	0,07 (0,04-0,1)	0,02 (0,01-0,03)*	0,06 (0,04-0,08)	13,4 (12,3-14,6)*	21,5 (20,2-22,9)
Sn	0,002 (0,001-0,003)	0,001 (0,0009-0,002)	0,03 (0,02-0,04)*	0,09 (0,06-0,12)	0,11 (0,09-0,14)*	0,19 (0,16-0,23)
Sr	100,5 (80,1-124,9)	117,5 (101,1-136,7)	3,9 (3,1-5,0)*	7,3 (5,9-9,2)	74 (60-93)*	110 (92-132)
Tl	0,001 (0,0007-0,002)*	0,0003 (0,0002-0,0004)	0,03 (0,02-0,03)*	0,06 (0,05-0,07)	0,09 (0,07 - 0,10)*	0,18 (0,16 - 0,20)
U	0,3 (0,2-0,4)*	1,1 (0,8-1,4)	0,03 (0,03-0,04)	0,03 (0,03-0,04)	0,006 (0,005-0,007)*	0,012 (0,011-0,014)
V	0,5 (0,3-0,7)*	19,9 (16,2-24,4)	1,1 (0,8-1,6)*	1,9 (1,5-2,5)	0,02 (0,01-0,02)*	0,16 (0,13-0,20)
W	0,004 (0,002-0,01)*	0,2 (0,2-0,3)	0,01 (0,01-0,02)	0,01 (0,01-0,03)	0,05 (0,05-0,07)*	0,12 (0,10-0,15)
Zn	5,0 (3,4-7,2)*	3,1 (2,3-4)	5,3 (4,3-6,6)*	9,3 (7,3-11,7)	148 (130-169)*	217 (195-240)

*p<0,05

Tabella 6. Rapporto tra la concentrazione di alcuni elementi chimici nell'area vulcanica rispetto all'area di controllo nei campioni di acqua e di urine dei residenti.

Elemento	Acqua	Urine
B	4,5	1,6
Br	1,6	1,4
Cd	20,0	2,1
Hg	5,0	2,6
Li	1,5	1,8
Mn	3,3	3,0
Mo	15,6	1,9
Pd	10,0	9,0
Se	11,7	1,6
U	3,7	2,0
V	39,8	8,0
W	50,0	2,4

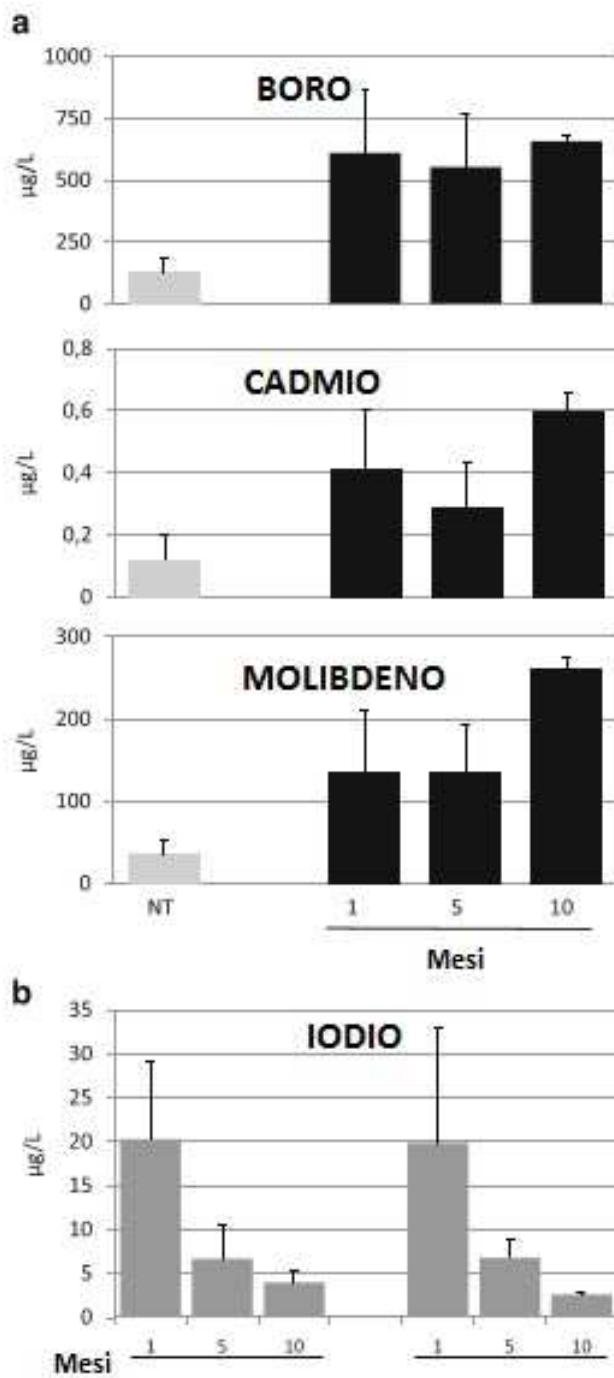


Figura 6. a) Concentrazioni medie urinarie di B, Cd, Mo nei ratti del gruppo A (in grigio chiaro, NT) e del gruppo B dopo 1,5 e 10 mesi dal trattamento (in nero)
 b) Ioduria nei ratti del gruppo A e del gruppo B dopo 1,5 e 10 mesi dal trattamento.

Tabella 7. Caratteristiche istologiche tiroidee dei ratti dei due gruppi studiati.

Caratteristiche istologiche		Gruppi	
		A	B
5 Mesi			
Follicoli			
Disomogeneità		0%	40% (2/5)
Presenza di nuclei chiari		0%	40% (2/5)
Strutture papillari		0%	0%
Congestione vascolare		100% (5/5)	100% (5/5)
10 Mesi			
Follicoli			
Disomogeneità	(lieve)	17% (1/6)	0%
	(moderata)	83% (5/6)	50% (5/10)
	(grave)	0%	50% (5/10)
Presenza di nuclei chiari	(lieve)	17% (1/6)	30% (3/10)
	(moderata)	83% (5/6)	30% (3/10)
	(grave)	0%	40% (4/10)
Strutture papillari	(lieve)	17% (1/6)	10% (1/10)
	(moderata)	0%	50% (5/10)
	(grave)	0%	40% (4/10)
Congestione vascolare (lieve)		0%	0%
(moderata)		83% (5/6)	50% (5/10)
(grave)		17% (1/6)	50% (5/10)

Lieve= presente in meno del 10% dell'area esaminata.

Moderata= presente nel 10-30% dell'area esaminata.

Grave= presente in più del 30% dell'area esaminata.

Tabella 8. Concentrazione tissutale degli elementi studiati nei campioni tiroidei di ratto.

Gruppi	I		B		Mo		Cd
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/DNA}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/DNA}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/DNA}$	$\mu\text{g/g}$
A (M \pm DS)	1,1 \pm 0,74	2,98 \pm 0,47	0,33 \pm 0,37	0,93 \pm 0,87	0,04 \pm 0,01	0,14 \pm 0,09	<0,01
B (M \pm DS)	0,57 \pm 0,65	1,37 \pm 0,76	0,30 \pm 0,85	0,92 \pm 0,83	0,04 \pm 0,01	0,09 \pm 0,03	<0,01
P	0,13	0,01	0,85	0,99	0,74	0,22	