

R. Zefferino¹, G. Elia², M.T. Petrozzi³, A. Leone⁴, P. Corsi⁵, L. Ambrosi¹

Effetto promoter del mercurio cloruro e del metil-mercurio su cheratinociti umani in coltura

¹ Cattedra di Medicina del Lavoro - Facoltà di Medicina e Chirurgia - Università di Foggia

² Fondazione "Salvatore Maugeri" IRCCS - Centro di Igiene Ambientale - Bari

³ DMIMP - Sez. Medicina del Lavoro - Università di Bari

⁴ IRBA - CNR - Lecce

⁵ Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana - Università di Bari

RIASSUNTO. L'esposizione lavorativa al Mercurio si verifica nell'industria estrattiva dell'oro, nella produzione di lampade fluorescenti, di cloro-soda e di strumenti di precisione. Esiste anche un rischio extralavorativo legato all'utilizzo di mercurio negli amalgami dentari e al consumo alimentare di pesce di grossa taglia. Il nostro studio ha inteso valutare un eventuale effetto cancerogeno epigenetico del Mercurio. A tal fine sono state allestite differenti colture cellulari di cheratinociti che sono state esposte, una a dosi crescenti di $HgCl_2$ per 30 min., un'altra per 24 h, ed infine un'altra ancora a dosi crescenti di CH_3HgCl per 24 h. Mediante il metodo del rosso neutro sono state evidenziate per entrambe le sostanze le concentrazioni che non svolgevano alcun effetto citotossico. Per indagare la comunicazione intercellulare mediata dalle gap junctions (GJIC) è stato utilizzato il metodo del dye transfer. In particolare, dopo aver aggiunto la sostanza alla concentrazione non citotossica abbiamo microiniettato le cellule con un tracciante fluorescente (Lucifer Yellow CH) utilizzando un micromanipolatore ed un microiniettore (Eppendorf). Il nostro studio ha evidenziato che $HgCl_2$ dopo trenta minuti di incubazione alla concentrazione di 10 μM non determina alcuna riduzione della comunicazione intercellulare. La concentrazione, invece di 10 nM dopo 24 h di incubazione dà luogo ad un evidente riduzione del numero di cellule fluorescenti e ciò è espressione di una ridotta comunicazione intercellulare. Per ciò che concerne CH_3HgCl è stato visto che la concentrazione non citotossica di 250 nM dopo 24 h, determina un'evidente inibizione della comunicazione intercellulare. Numerose sostanze sono state testate al fine di evidenziare un effetto epigenetico; per il mercurio i dati sono controversi. Nel nostro sistema sperimentale noi abbiamo visto che i) entrambe le forme di mercurio studiate inibiscono la comunicazione intercellulare; ii) il cloruro di mercurio inibisce la comunicazione intercellulare a concentrazioni nettamente più basse di quelle del metil-mercurio. Sarà pertanto utile valutare se l'effetto di inibizione della GJIC, da noi riscontrato, è reversibile e soprattutto se tale reversibilità si verifica dopo la semplice rimozione del tossico o se necessita dell'azione di un attivatore delle gap junctions come l'acido retinoico. Ulteriori studi sono in corso sul profilo di espressione genica della connexina 43 onde evidenziare se l'effetto svolto al mercurio sulla comunicazione intercellulare si correla ad alterazioni dei meccanismi trascrizionali o traduzionali.

Parole chiave: gap junctions, comunicazione intercellulare, cancerogenesi, colture cellulari.

ABSTRACT. www.gimle.fsm.it

Mercury has received considerable media focus because it is present in dental amalgams and seafood. There is potential exposure in gas meters, thermometers and fluorescent lamps workers. To evaluate its possible epigenetic carcinogen effect,

cultures of human keratinocytes were treated with increasing doses of $HgCl_2$ for 30 min, 24 h and of CH_3HgCl for 24 h, respectively. The red neutral method was used to evaluate the doses of $HgCl_2$ and CH_3HgCl which had no cytotoxic effect. Then, the dye transfer method was used to investigate the gap junctions-mediated intercellular communication (GJIC). Cells were microinjected with Lucifer Yellow CH by using the Eppendorf Apparatus and the Leica inverted microscope. After 30 min incubation at the concentration of 10 μM , $HgCl_2$ did not exert inhibition of GJIC. Conversely, after 24 h at the concentration of 10 nM, $HgCl_2$ inhibited GJIC. Incubation with CH_3HgCl at the concentration of 250 nM for 24 h reduced the number of fluorescent cells, thus denoting a inhibition of GJIC. Taken together our data demonstrated that: i) $HgCl_2$ and CH_3HgCl exerted an inhibitory effect upon GJIC; ii) $HgCl_2$ resulted to inhibit GJIC at concentrations 25 folds lower than CH_3HgCl . Further studies will be addressed to whether the reversal of GJIC inhibition could be obtained by withdrawal of toxic substance, or by the addition of a GJIC activator like the retinoic acid. Finally to shed light on the possible effect of mercury derivatives at the transcriptional or translational levels, the expression profile of the connexin 43 gene after $HgCl_2$ and CH_3HgCl exposure of cultured human keratinocytes will be investigated.

Key words: gap junctions, intercellular communication, carcinogenesis, cell culture.

Introduzione

Il mercurio si ritrova nella crosta terrestre soprattutto nelle rocce i cui componenti sono ricchi di gruppi sulfidrilici; già da qualche secolo il mercurio viene estratto dal cinabro per essere utilizzato per le applicazioni più disparate. Le principali applicazioni del mercurio riguardano gli impianti per la produzione del cloro, la produzione di componenti elettrici e di strumentazioni di precisione per la misura della temperatura e della pressione, l'industria estrattiva dell'oro, la produzione di lampade fluorescenti e la produzione ed impiego di amalgami per otturazioni dentarie.

L'esposizione professionale, stimata in circa 70.000 lavoratori in tutti gli USA (Campbell et al 1992), avviene prevalentemente per via inalatoria sia per il mercurio metallico che per i suoi composti inorganici ed organici.

Esiste anche un rischio per la popolazione generale, definito rischio ambientale, che deriva dallo smaltimento di lampade fluorescenti, termometri e altri strumenti di precisione, dalle amalgami dentali nonché dal consumo alimentare di pesce di grossa taglia.

Circa una possibile azione genotossica del mercurio inorganico i dati di letteratura sono controversi. Bahia Md et Al. (1) hanno escluso un effetto genotossico nel loro modello sperimentale costituito da linee cellulari di linfoblasti (TK6), Rao MV et Al. (2) invece riportano l'effetto genotossico del mercurio dimostrando finanche il ruolo protettivo della vitamina C in un sistema costituito da colture di leucociti.

Il presente studio è stato condotto allo scopo di evidenziare l'azione del mercurio cloruro e mono-metil-mercurio cloruro sulla comunicazione intercellulare mediata dalle gap junctions. Tale effetto è un indice specifico che permette di definire una sostanza come cancerogeno epigenetico.

È stato evidenziato da parte di Loch-Carusio R. et Al. (3) un effetto inibente del mercurio sulla comunicazione intercellulare attraverso un modello sperimentale di colture resistenti e non alla 6-Tioguanina. Schirmacher K et Al (4) dimostrarono che il mercurio era capace di ridurre l'accoppiamento elettrico attraverso un incremento del calcio intracellulare, tale condizione determinava un'inibizione della comunicazione intercellulare mediata dalle gap junctions.

Materiali e metodi

I cheratinociti umani sono stati forniti dall'Istituto Zooprofilattico di Brescia. Il medium che è stato utilizzato è l'Epilife ed è stato fornito da Sigma, ad esso è stato aggiunto il Keratinocyte Medium Supplement e la Penicillina/Streptomina.

La piastrazione è stata effettuata con una densità cellulare di 70.000 cellule per pozzetto (chamber slide 8/well Falcon). Al terzo giorno le cellule sono arrivate a confluenza. Si è quindi provveduto ad aggiungere i composti del mercurio alle opportune concentrazioni. Per il mercurio cloruro si è iniziato a valutare la vitalità cellulare esponendo le cellule per un periodo di trenta minuti a dosi crescenti. In particolare sono state utilizzate dosi tali da determinare le seguenti concentrazioni di mercurio 0.1, 1, 10, 100 e 1000 micromolari. Con il metodo del Rosso Neutro descritto da Borenfreund et Al. (5) sono state individuate le concentrazioni non citotossiche.

Individuato l'intervallo di dosi non citotossiche si è proceduto ad esporre le colture a concentrazioni di mercurio comprese in quel range per trenta minuti.

Quindi si è proceduto ad iniettare le cellule con il Lucifer Yellow (5 mg/ml) e con il destrano tetrametilrodamina (0.5 mg/ml) forniti da Molecular Probes Inc. Eugene U.S.A. utilizzando un Micromanipolator 5171 ed un Transinjector 5246 (Eppendorf. Germania). 10 minuti dopo è stato osservato al microscopio a fluorescenza il numero di cellule iniettate con il Lucifer Yellow che sono state quindi fissate in formaldeide al 2% in PBS (6).

Il destrano tetrametilrodamina, di peso molecolare 10.000 daltons, non passa attraverso le gap junctions e quindi permette di differenziare la cellula microiniettata dalle circostanti. Utilizzando il solo Lucifer Yellow non si potrebbe distinguere, osservando un insieme di cellule, quella microniettata da quella in cui il colorante è passato per diffusione attraverso i canali delle gap junctions. Utilizzando la osservazione in fluorescenza si è proceduto al conteggio delle cellule colorate con il Lucifer Yellow.

Le stesse metodiche sono state utilizzate per osservare l'effetto citotossico e l'effetto sulla comunicazione intercellulare mediato dalle gap junctions di mercurio cloruro e mono-metil-mercurio dopo 24 ore di esposizione.

Il confronto statistico tra le medie sia dei valori di assorbimento del Rosso Neutro (test di vitalità) che del numero di cellule fluorescenti (test di diffusione del colorante) è stato effettuato mediante il Test-t di Student.

Risultati

La valutazione dell'effetto del mercurio cloruro sui cheratinociti dopo un'esposizione di mezz'ora (fig. 1) ha permesso di evidenziare un effetto citotossico a concentrazioni superiori a 10 μ M.

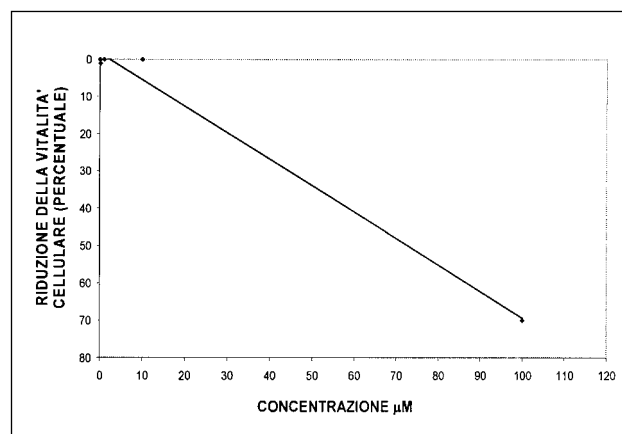


Figura 1. Effetto di $HgCl_2$ sulla vitalità cellulare (30 minuti)

In considerazione del fatto che un eventuale effetto sulla comunicazione intercellulare mediato dalle gap junctions si può verificare se la cellula è danneggiata abbiamo utilizzato concentrazioni fino a 10 μ M., cioè a dosi non citotossiche.

In queste condizioni non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa, dopo iniezione di colorante Lucifer Yellow, tra il numero di cellule fluorescenti presenti nei campioni trattati rispetto a quello dei campioni di controllo.

Una maggiore durata dell'esposizione a mercurio cloruro, per 24 ore, ha permesso di evidenziare che fino a concentrazioni 10 nanomolari non si riduce la vitalità cellulare, mentre a concentrazioni 100 nanomolari si verifica una riduzione statisticamente significativa della vitalità cellulare ($p < 0.01$, fig. 2).

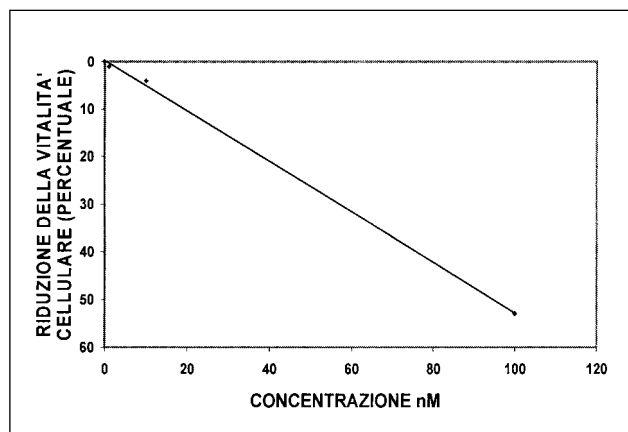


Figura 2. Effetto di $HgCl_2$ sulla vitalità cellulare (24 h)

Lo studio dell'effetto delle concentrazioni fino a 10 nanomolari ha permesso invece di evidenziare che la concentrazione 10 nanomolare riduce in maniera significativa il numero di cellule tracciate con il Lucifer Yellow ($p < 0.05$, fig. 3).

Riguardo all'effetto del mono-metil-mercurio cloruro si è evidenziato che concentrazioni fino a 500 nanomolari per 24 ore non modificano in maniera significativa la vitalità cellulare (fig. 4).

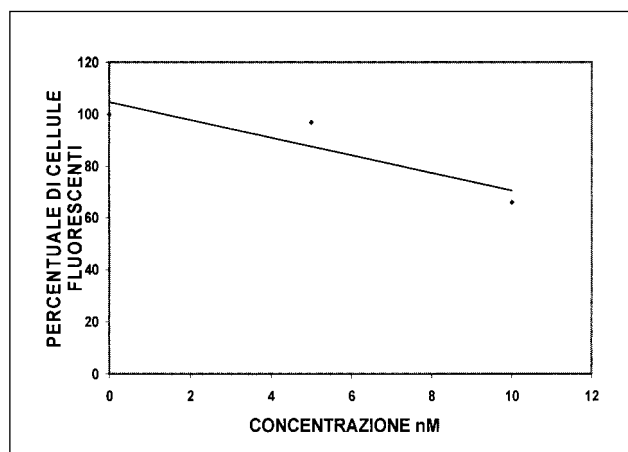


Figura 3. Effetto di $HgCl_2$ sulla comunicazione intercellulare (24 h)

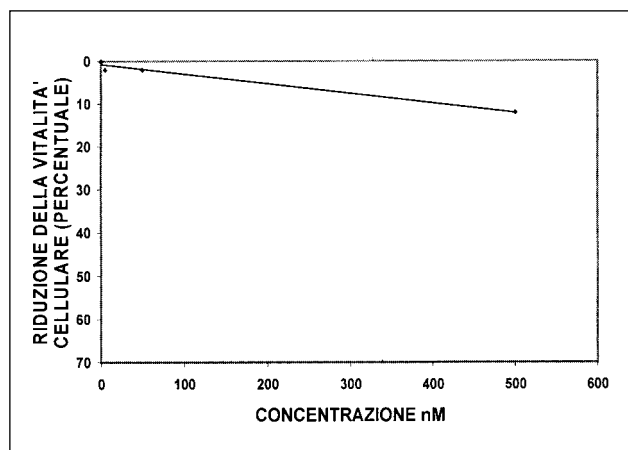


Figura 4. Effetto di CH_3HgCl sulla vitalità cellulare (24 h)

Per quanto concerne invece l'effetto sulla comunicazione cellulare si è osservata una significativa riduzione delle cellule fluorescenti, espressione della permeabilità delle gap junctions, alla concentrazione 250 nanomolare (fig. 5). Questa differenza è apparsa statisticamente significativa ($p < 0.01$).

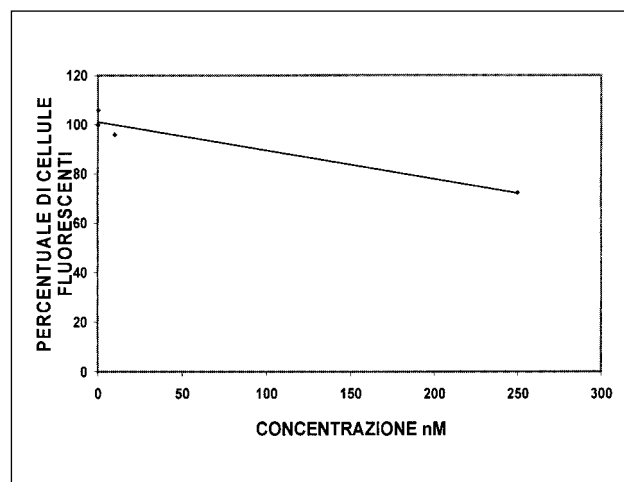


Figura 5. Effetto di CH_3HgCl sulla comunicazione intercellulare (24 h)

Discussione e conclusioni

Numerose sostanze di uso industriale sono state testate onde indagarne un effetto epigenetico e tra queste vi sono fitofarmaci, metalli e idrocarburi aromatici policiclici. Tra i metalli, il mercurio è stato valutato attraverso coculture di cellule resistenti e non alla 6 Tioguanina ed è risultato che esso inibisce la comunicazione intercellulare (3), un'altra prova è stata fornita attraverso il dimostrato collegamento tra un aumentato incremento di calcio intracellulare indotto dal mercurio e la inibizione della comunicazione intercellulare (4). L'interesse verso questo metallo da parte nostra deriva dal fatto che esiste anche un'esposizione extraprofessionale meno controllata rispetto a quella professionale e che interessa quindi soggetti più sensibili quali bambini e donne in gravidanza.

Il nostro studio ha permesso di evidenziare che entrambe le forme (mercurio cloruro inorganico e mono-metil-mercurio cloruro), possono svolgere un'azione di inibizione della comunicazione intercellulare mediata dalle gap junctions.

Questo effetto del mono-metil-mercurio, tuttavia si verifica a concentrazioni 25 volte superiori rispetto al cloruro di mercurio; il mono-metil-mercurio risulta anche meno citotossico (fig. 5).

Questo risultato richiede ulteriori approfondimenti in ordine ai meccanismi di azione sulle strutture cellulari potendosi ipotizzare allo stato attuale sia l'effetto endocellulare dei vari composti del mercurio che quello a livello di proteine di membrana.

Le osservazioni fornite dallo studio delle gap junctions che, seppure a concentrazioni differenti, sono ridotte rispetto al controllo, potrebbero essere interpretate come un possibile effetto promoter dei composti del mercurio presi in esame.

È evidente che una siffatta ipotesi va ulteriormente approfondita con altri parametri di valutazione quali la concentrazione delle connessine e la loro espressione genica onde evidenziare se l'effetto svolto dal mercurio sulla comunicazione intercellulare si correla ad alterazioni dei meccanismi trascrizionali o traslazionali.

Sarà infine utile valutare l'eventuale reversibilità dell'effetto e soprattutto se tale reversibilità compare dopo la rimozione del tossico o se è specifica in quanto compare soltanto dopo l'aggiunta di un attivatore delle gap junctions come l'acido retinoico.

Bibliografia

- 1) Bahia Md et Al. Genotoxic effects of mercury on in vitro cultures of human cells. *An Acad Bras Cienc* 1999; 71 (3Pt 1): 437-43.
- 2) Rao MV et Al. Role of ascorbic acid on mercuric chloride-induced genotoxicity in human blood cultures. *Toxicol In Vitro* 2001 Dec.; 15 (6): 649-654.
- 3) Loch-Carusio R et Al. Inhibition of metabolic coupling by metals. *J Toxicol Environm Health* 1991 Jan; 32 (1): 33-48.
- 4) Schirmacher K et Al. Effects of lead, mercury, and methyl mercury on gap junctions and $[Ca^{2+}]_i$ in bone cells. *Calcif Tissue Int* 1998 Aug; 63 (2): 134-139.
- 5) Borenfreund et Al. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption *Toxicology Letters* 1985. (24): 119-124.
- 6) Mikalsen SO. Effects of heavy metal ions on intercellular communication in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 1990; (11): 1621-1626.

Richiesta estratti: Dott. Roberto Zefferino - *Cattedra di Medicina del Lavoro, Facoltà di Medicina e Chirurgia OO.RR. - Viale Luigi Pinto - 71100 Foggia, Italy - E-Mail rozzeffer@tin.it*