



**2º Congresso Ibérico de Cianotoxinas  
7 e 8 de Julho de 2011**



**Efeitos de microcistina-LR  
em células HepG2, Vero, MDCK e CaCo2**

Carina Menezes, Elsa Alverca, Elsa Dias, Filomena Sam-Bento, Paulo Pereira  
Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia, Departamento de Saúde Ambiental,  
Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge



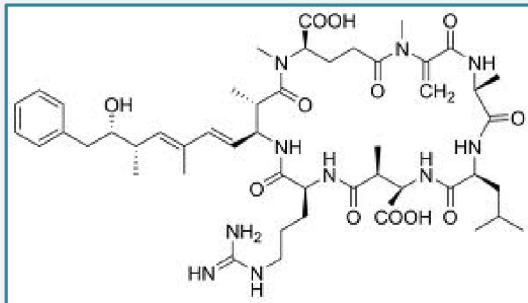
*Instituto*\_Nacional de Saúde

*Doutor Ricardo Jorge*



2µm

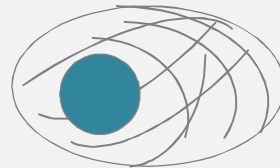
# Alvos intracelulares da MCLR



Hepatotoxina

Entrada através de transportadores de ácidos biliares (OATPs)

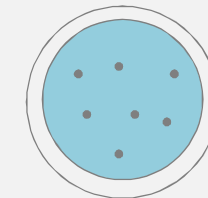
Actua através da inibição das fosfatases proteicas 1 e 2A



Destruturação  
de filamentos  
de actina e MT



Stress oxidativo  
Apoptose



Alterações  
estruturais

## Estudos com a linha celular renal Vero-E6:

Doses altas de MCLR → Apoptose  
Necrose

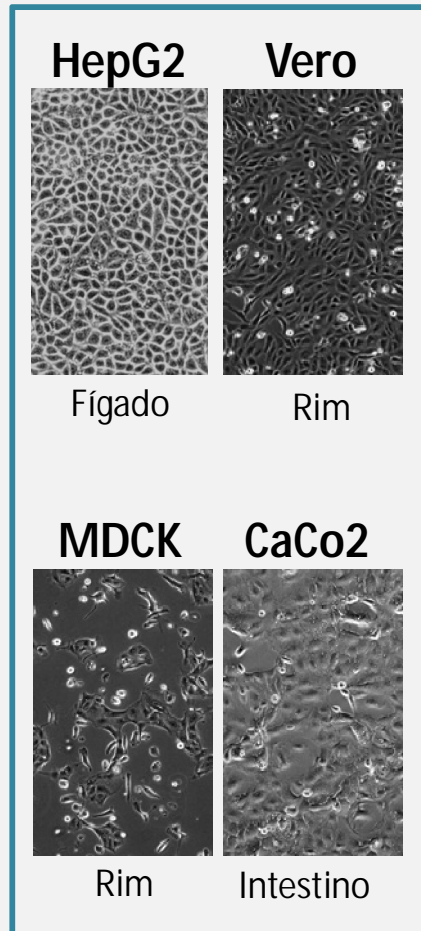
Doses baixas de MCLR → Autofagia  
RE e lisossomas

Efeitos comuns a  
outras linhas celulares





# Objectivos



## 1. Determinação dos limiares de citotoxicidade e da relação dose-resposta para cada linha celular

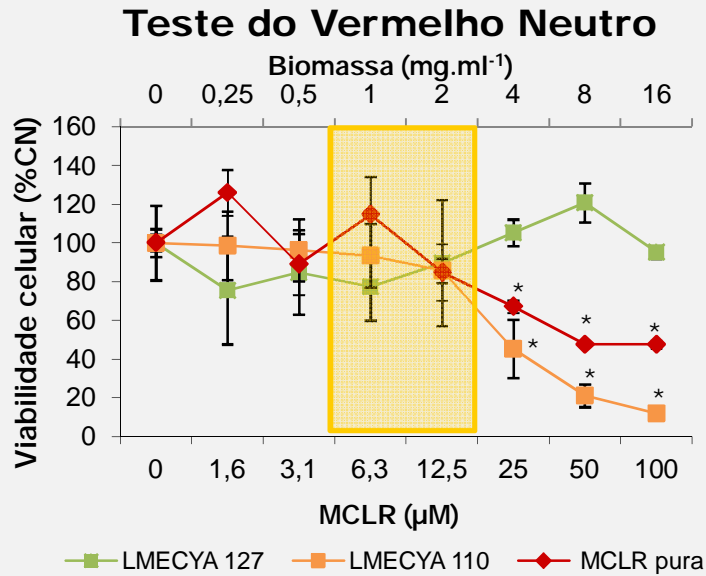
- Teste de viabilidade do Vermelho Neutro
- Exposição: MCLR pura, MCLR do extracto LMECYA 110 e extracto não-toxigénico LMECYA 127, 24h, 1-100  $\mu$ M MCLR

## 2. Identificar os alvos intracelulares da MCLR

- Microscopia Electrónica de Transmissão
- Microscopia de Fluorescência e confocal

## 3. Comparar os efeitos da MCLR em cada linha celular

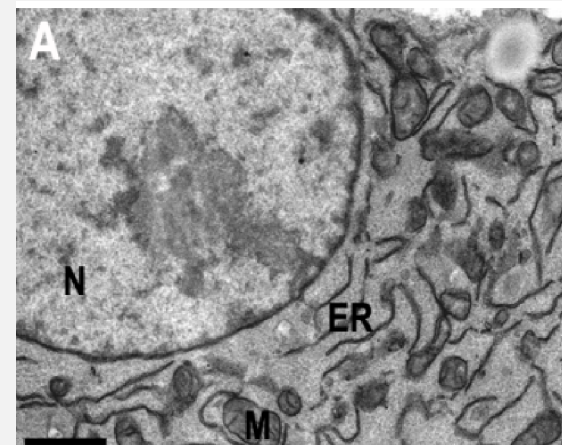
# Células HepG2



**Limiares de citotoxicidade:**

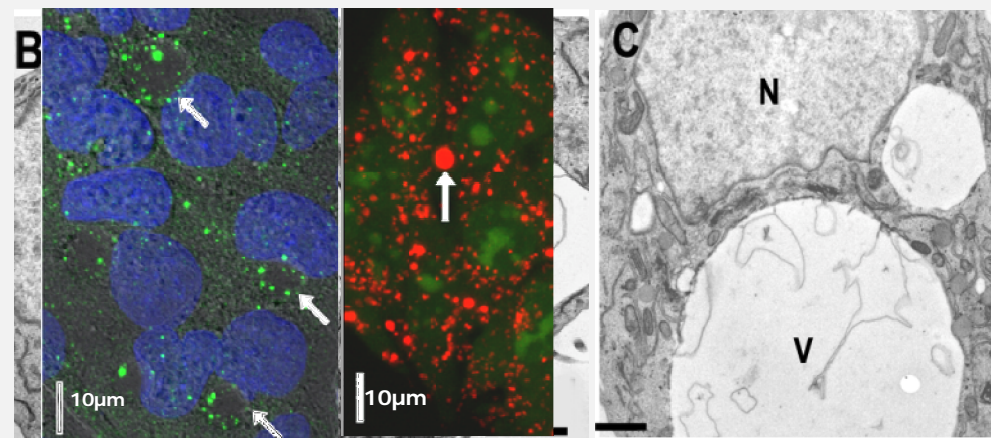
MCLR Pura – 50 µM  
LMECYA 110 - 25 µM

CN



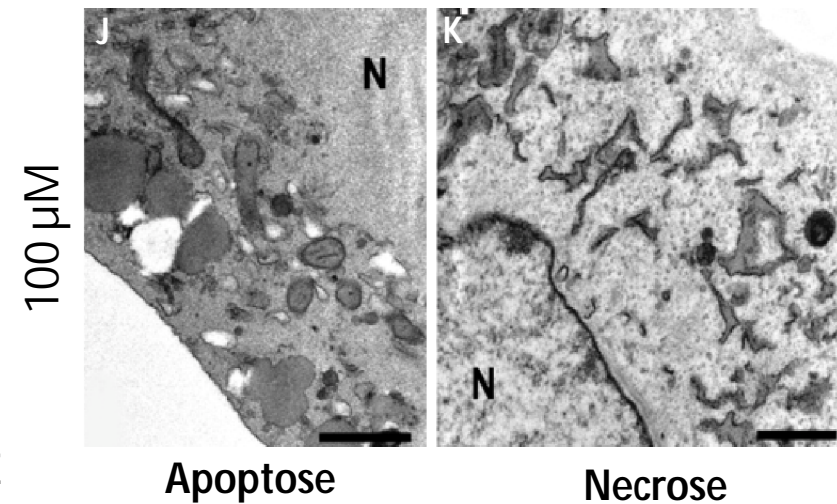
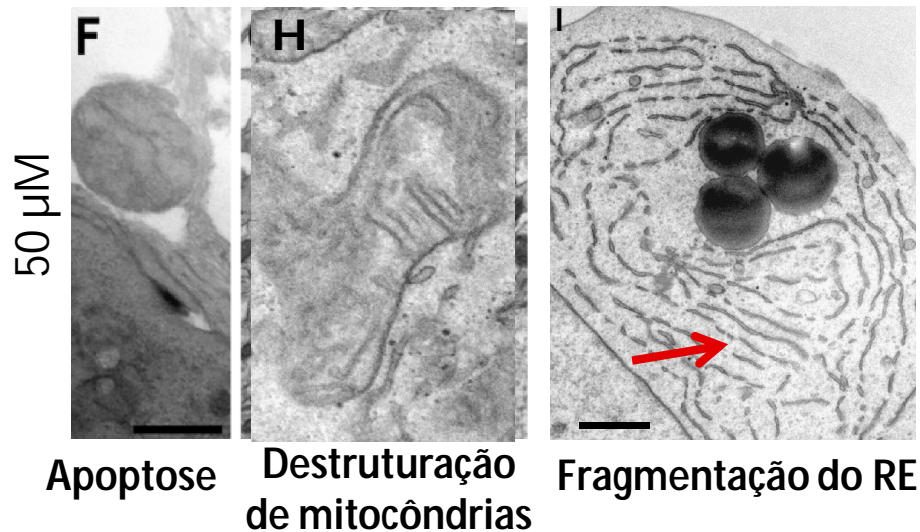
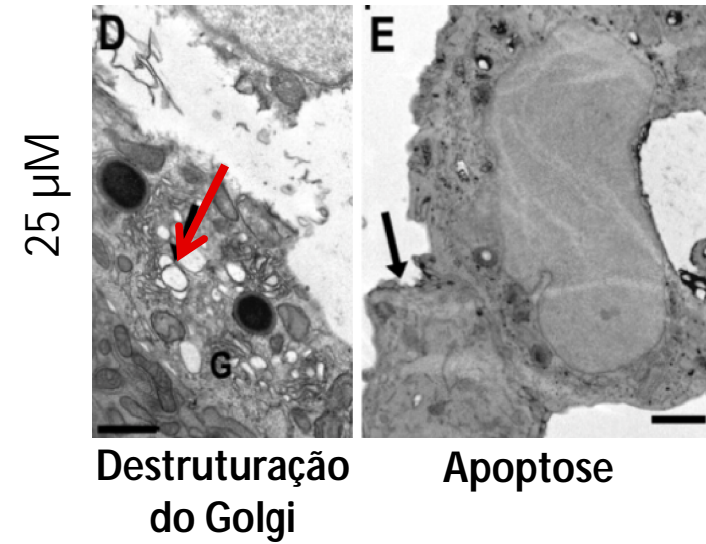
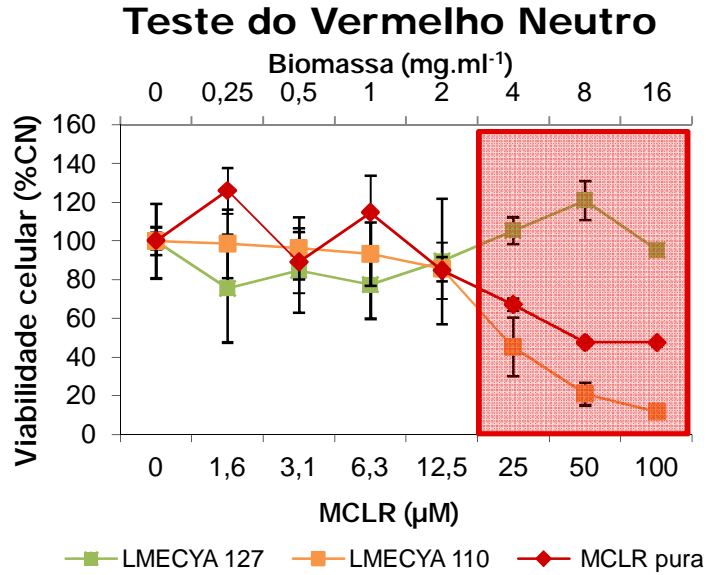
6 µM

12 µM

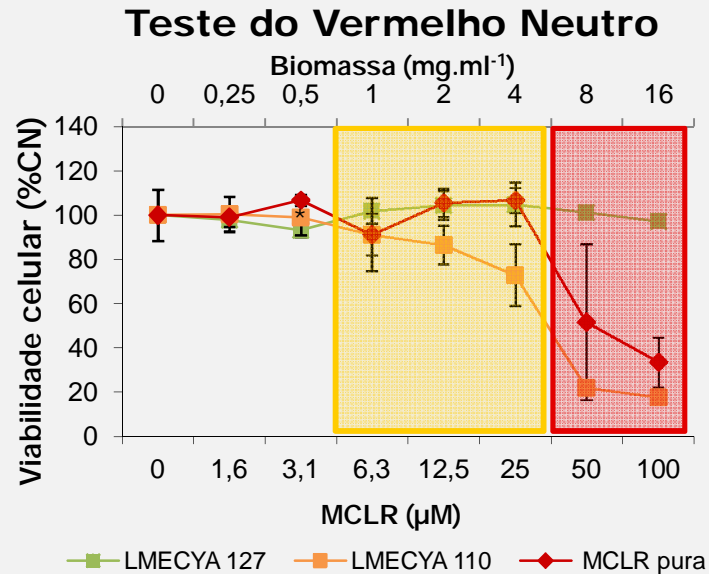


Vacuolização do citoplasma

# Células HepG2



# Células Vero



## Limiares de citotoxicidade:

LMECYA 110 - 50 µM

MCLR Pura - 50 µM

## Efeitos em organelos:

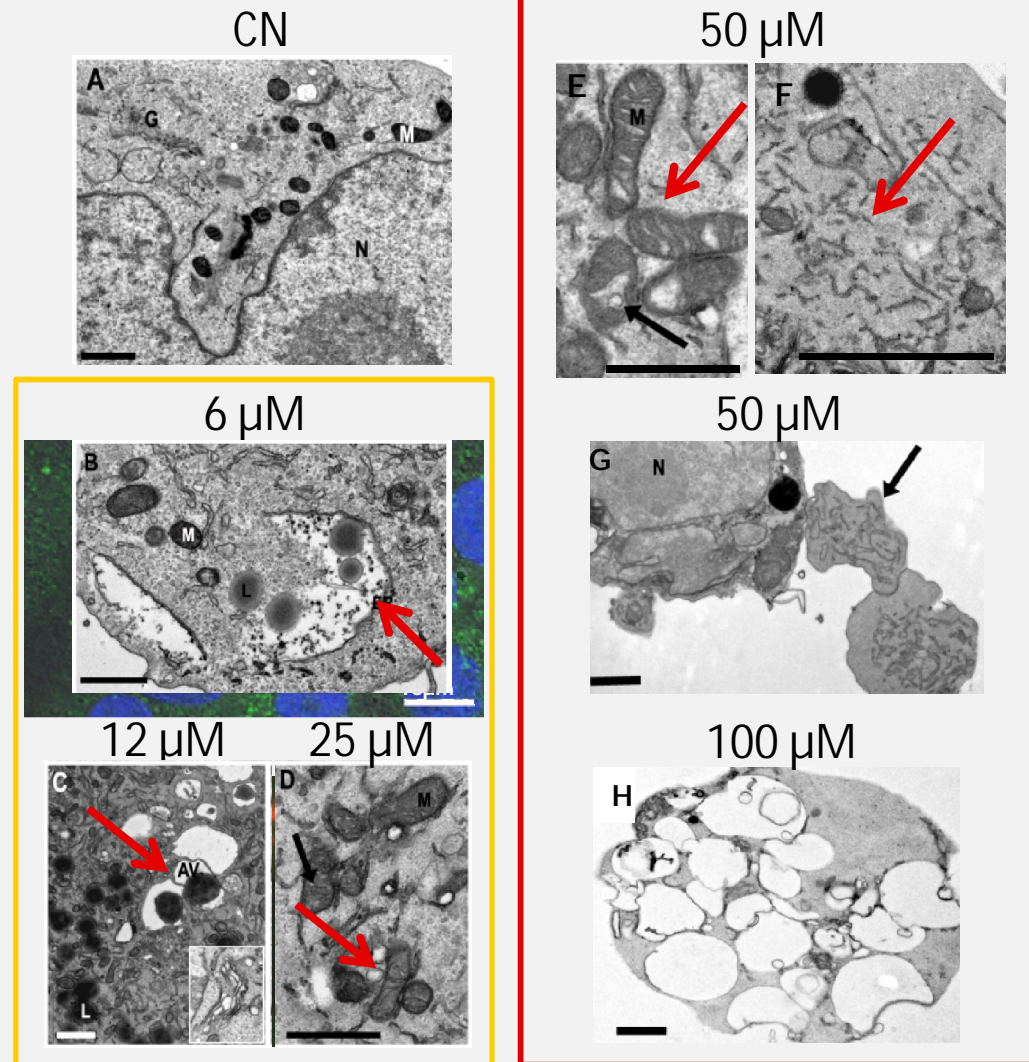
6 µM - Vacuolização do RE

12 µM - Vacuolização do citoplasma

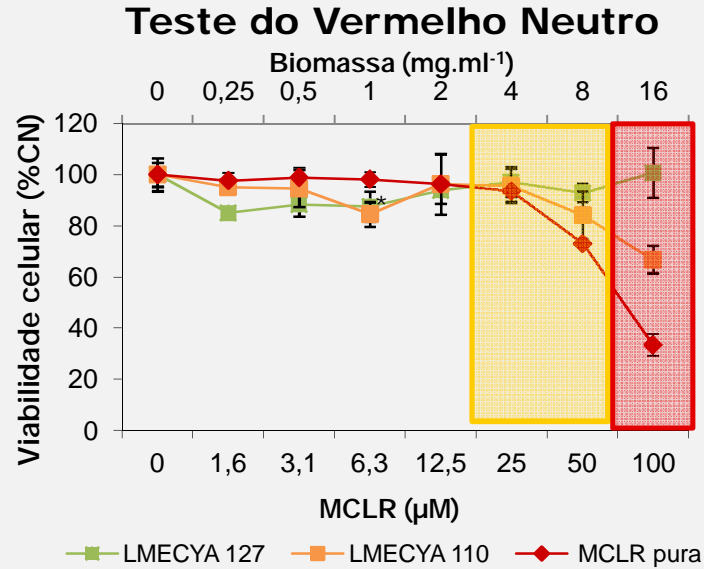
25, 50 µM - Alterações nas mitocôndrias

50 µM - Fragmentação do RE

50, 100 µM - Apoptose



# Células MDCK



## Limiares de citotoxicidade:

LMECYA 110 - 100 µM

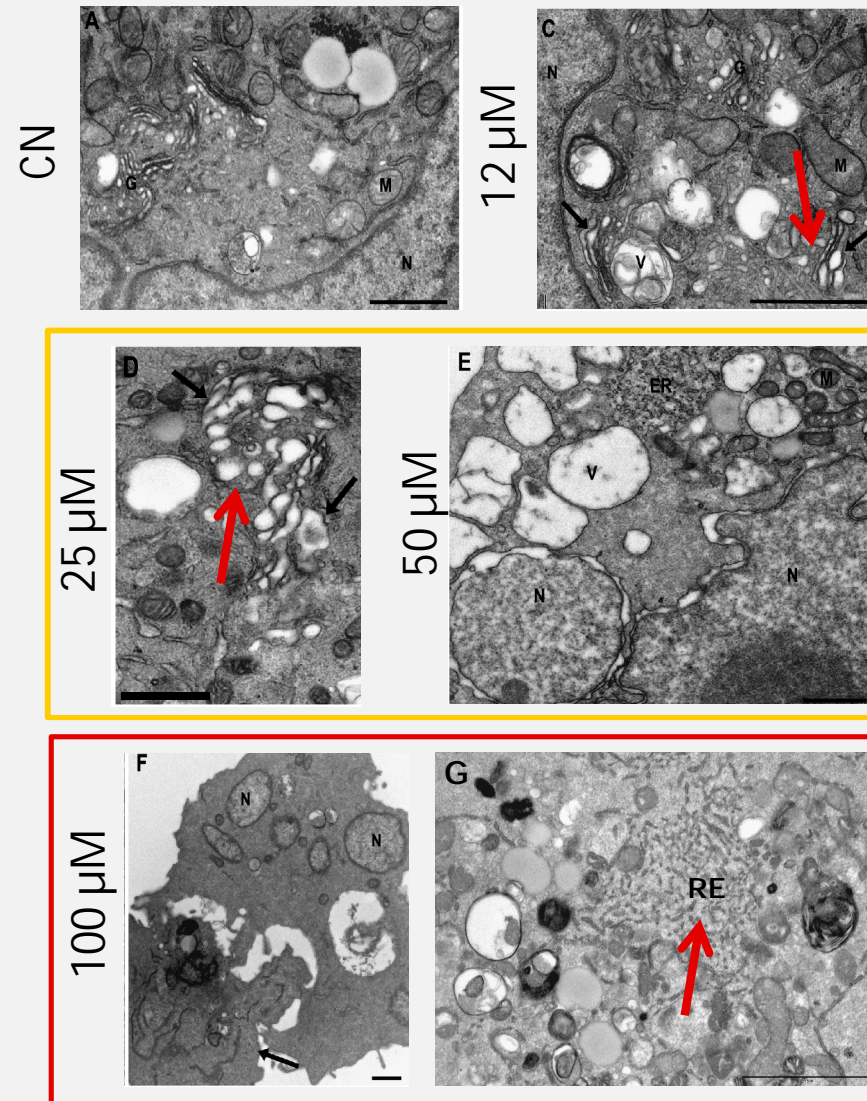
MCLR Pura - 100 µM

## Efeitos em organelos:

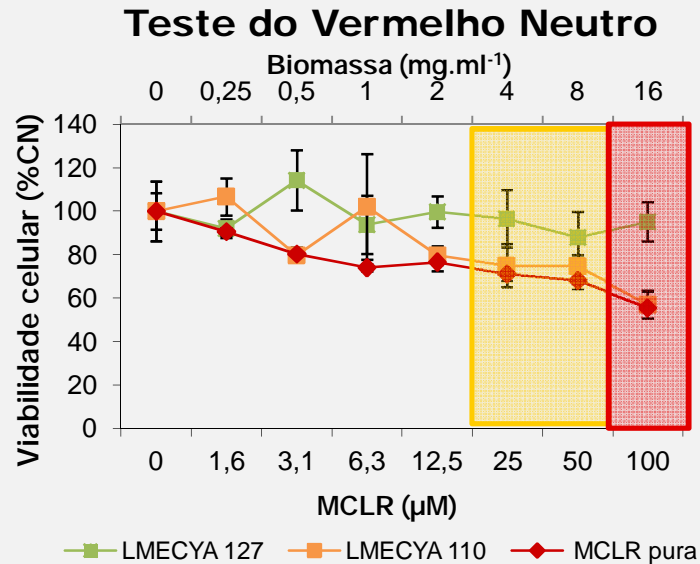
12, 25 µM - Vacuolização do Golgi

50 µM - Vacuolização de mitocôndrias

100 µM - Apoptose e fragmentação do RE



# Células Caco-2



## Limiares de citotoxicidade:

LMECYA 110 - 100 µM

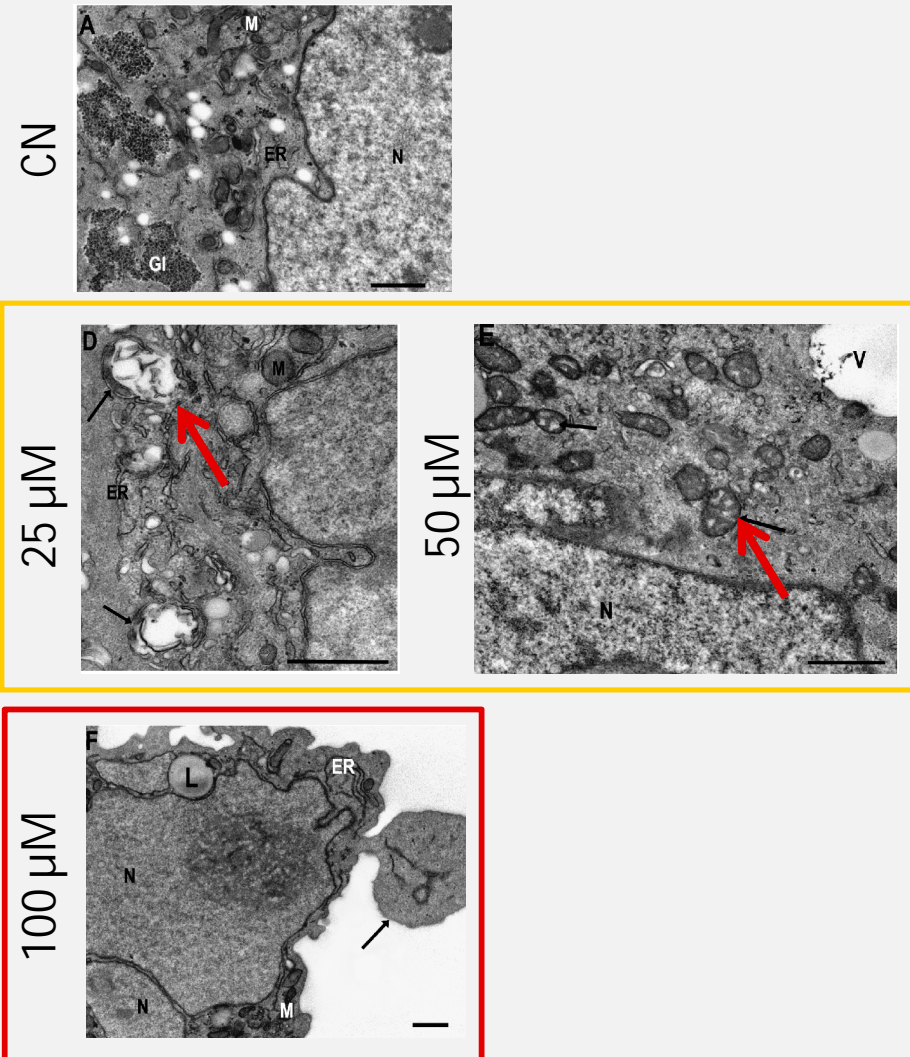
MCLR Pura - 100 µM

## Efeitos em organelos:

25 µM) Vacuolização do Golgi

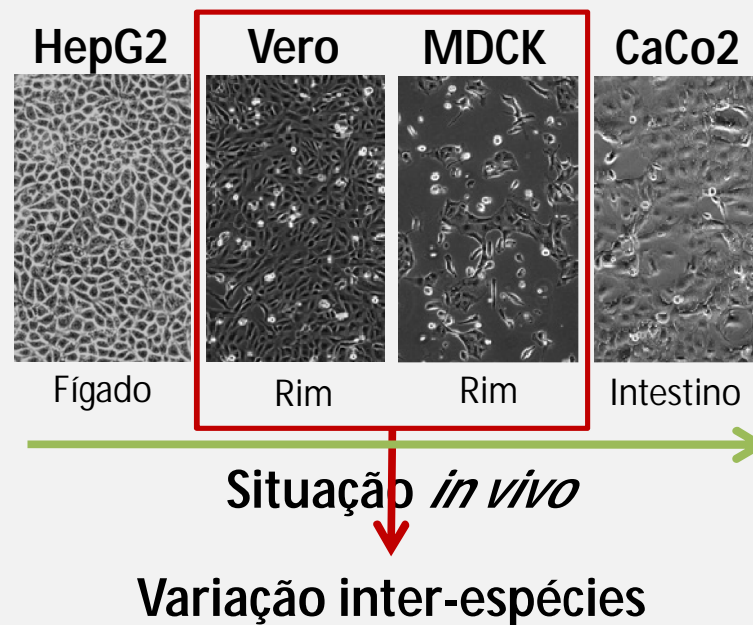
50 µM) Destrução das mitocôndrias

100 µM) Apoptose



## Conclusões

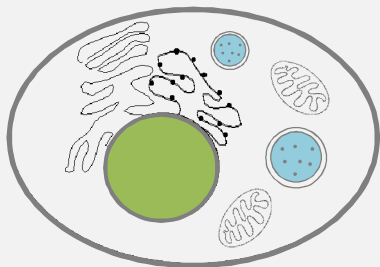
- 1) Efeito da MCLR: a MCLR semi-purificada e pura produzem um efeito citotóxico dependente da concentração
- 2) Sensibilidade:



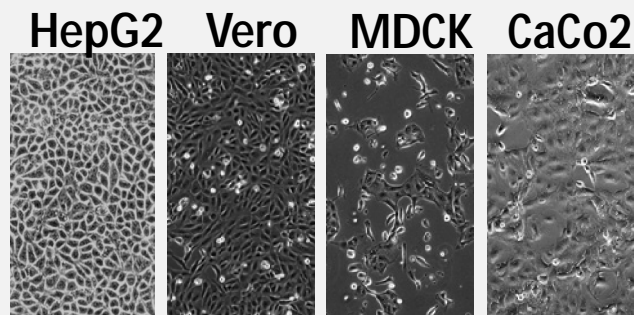
## Conclusões

- 1) Efeito da MCLR: a MCLR semi-purificada e pura produzem um efeito citotóxico dependente da concentração
- 2) Sensibilidade: Células HepG2 > Vero > MDCK > CaCo-2
- 3) Apoptose: Mecanismo comum a todas as linhas celulares

- 4) Organelos: Lisossomas – alvos precoces da MCLR em células HepG2 e Vero  
Retículo Endoplasmático – organelo alvo em HepG2 e Vero  
Complexo de Golgi – organelo alvo em MDCK e CaCo-2  
Mitocôndrias – afectadas a concentrações altas de MCLR



- 5) Autofagia: despoletada a concentrações sub-citotóxicas – mecanismo sobrevivência de células HepG2 e Vero?



# Agradecimentos

**Ana Amorim  
Elsa Alverca  
Elsa Dias  
Filomena Sam-Bento  
Paulo Pereira  
Sérgio Paulino  
Albertina Amaral  
Catarina Churro  
Maria João Silva  
Paulo Matos  
Sónia Moniz**



**HABCOL-PROJECTO N°  
PDCT/MAR/60086/2004**