

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro Tecnológico  
Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

**Incidência de Fitoplâncton Tóxico na Costa Catarinense:  
Impacto na Saúde Pública e no Meio Ambiente**

Cátia Regina Silva de Carvalho Pinto

Tese apresentada ao Curso de Pós- Graduação  
em Engenharia Ambiental da Universidade  
Federal de Santa Catarina para obtenção do  
grau de Doutor em Engenharia Ambiental.

**Orientador:** Prof. Dr. William Gerson Matias

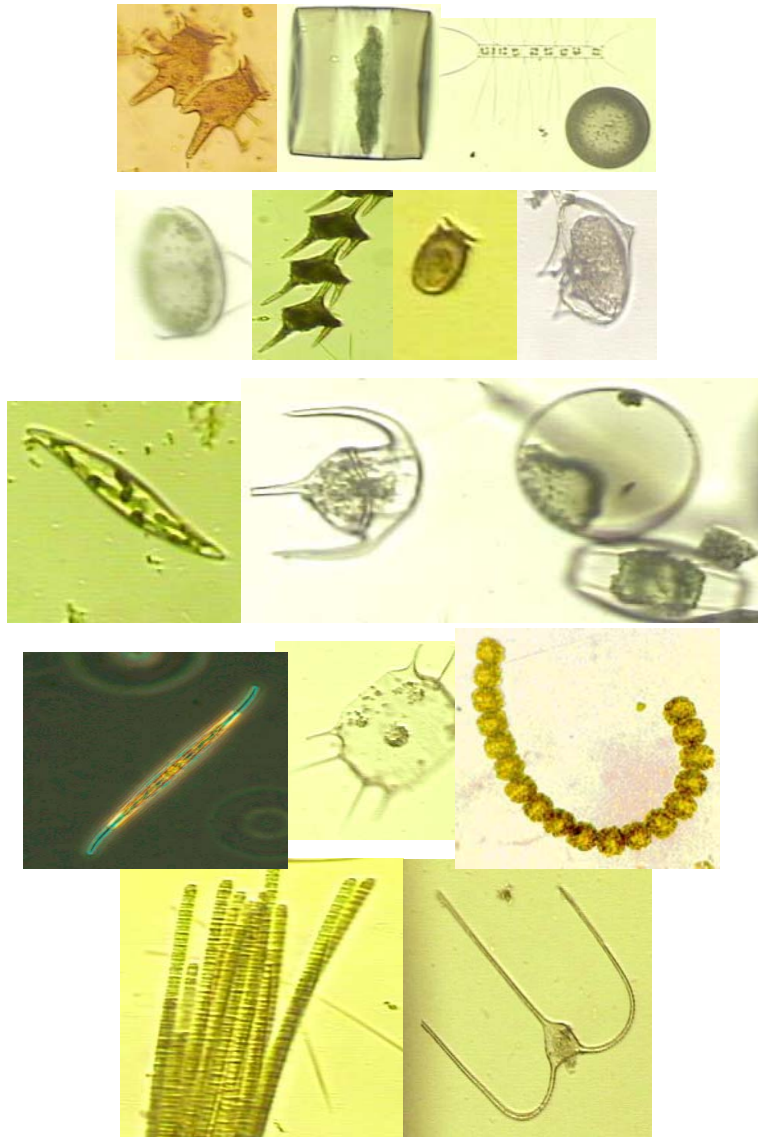
Fevereiro, 2005

**Ficha Catalográfica:**

Carvalho Pinto-Silva, C.R. Incidência de Fitoplâncton Tóxico na Costa Catarinense: Impacto na Saúde Pública e no Meio Ambiente.

Cátia Regina Silva de Carvalho Pinto – Florianópolis – SC, 2005, xv – 168p.  
Tese (Doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – 2005.

Título em Inglês: Occurrence of Toxic Phytoplankton in the Coast of Santa Catarina: Public Health and Environmental Impacts.



***"Elas são únicas,  
Com suas próprias características,  
Façamos como elas,  
Cultivemos nossas diferenças "***

Dedico este Trabalho:

A minha mãe, Benta por seu amor  
e confiança em mim.

Ao meu sogro, Alceu (in memoriam)  
por ter incentivado a viagem de seu  
filho para França mesmo quando  
mais precisava dele.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Carlos, meu amor, por ser um companheiro incansável e, principalmente, por sua atenção comigo e com meu trabalho. Obrigada por tudo;

Ao Professor Dr. William Gerson Matias, pela orientação, conselhos, ensinamentos, amizade e sobretudo por sua confiança em meu trabalho;

Ao Professor Dr. Edmond Ekué Creppy, por ter me aceitado em seu laboratório e por sua competência e rigor científico;

A Professora Dra Rejane H. R. da Costa por estar sempre presente;

Ao Dr. Serge Moukha por seus ensinamentos e pelos agradáveis dias de trabalho na França;

Ao IBAMA/ CEPSUL na pessoa de seu diretor Luis Fernando Rodrigues por ter permitido a realização deste estudo;

Ao Departamento de Oceanografia da Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI na pessoa do professor Dr. Luiz Proença por ter cedido a cepa do dinoflagelado utilizada neste trabalho;

A Coordenadoria da Pós-Graduação em Engenharia Ambiental pelos excelentes serviços prestados;

Ao Laboratório Integrado do Meio Ambiente - LIMA pelo apoio;

Aos tripulantes do Navio Oceanográfico Soloncy Moura (Seu Pedro, Mazinho, Montanha, Celso, Abel, Luís, Deoclésio e Ademar) tenham certeza que este trabalho só foi possível pela grandiosa ajuda de vocês;

Aos amigos de embarque (Fabrício, Nico, Fran, Anderson, Kaio, Marília e Carlos) por tornar uma tarefa tão difícil em algo agradável;

À minha amiga Fran, por sua incansável ajuda no decorrer deste trabalho;

Ao Nico por sua amizade e por estar sempre disposto a ajudar;

Ao pessoal do Laboratório Toxicologia Ambiental: Vanessa, Marília, Débora, Fran, Kalinca, Léo, Fabrício e Ana, obrigada pelo agradável convívio;

Aos novos e inesquecíveis amigos franceses Theophile, Beatrice, James, Abdrym, Ghada, Ababacar, Isabelle e Dominique. Sentirei muitas saudades de vocês;

Aos meus queridos amigos Dani, Jorge, Lú, e Ré obrigada por estarem sempre por perto;

A minha querida amiga Cla, por sua autenticidade e por confiar tanto em mim. Eu te adoro;

Aos meus irmãos e sobrinhos. Vocês têm um lugar especial no meu coração;

A minha sogra por seu carinho e incentivo;

Ao Maurício e Taisinha da pós, eu adoro vocês;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior - CAPES pela bolsa de doutorado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -CNPq pela bolsa de doutorado sanduíche;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

## RESUMO

O processo de ocupação desordenada de áreas e a exploração irracional dos recursos naturais resultaram em forte impacto sócio-ambiental, evidenciado pela degradação da qualidade ambiental dos ecossistemas marinhos. Um evento característico de ocorrer como consequência do desequilíbrio no ecossistema marinho, são as florações de microalgas produtoras de toxinas. As florações são comuns em locais de cultivo de moluscos e estes se tornam vetores de enfermidades que causam várias formas de intoxicações no homem, tornando-se um sério problema de saúde pública. Além disso, o excessivo crescimento de microalgas pode ocasionar uma absorção de nutrientes da água podendo causar a morte dos organismos aquáticos. Santa Catarina é responsável por 93% da produção de moluscos no contexto nacional. No entanto, pouco se sabe sobre microalgas produtoras de toxinas e seus efeitos tóxicos. Neste sentido, a verificação da ocorrência de microalgas tóxicas e de suas toxinas, bem como os testes de citotoxicidade e genotoxicidade propostos neste estudo, podem colaborar para compreendermos melhor o fenômeno das florações de microalgas e elucidar alguns mecanismos de ação tóxica, que levam estas toxinas a alterar a fisiologia celular causando diversas patologias, em especial o câncer. As análises da ocorrência de fitoplâncton tóxico revelaram que Santa Catarina requer um abrangente programa de monitoramento, uma vez que várias espécies de microalgas tóxicas estão presentes em 17 dos 21 pontos amostrados. Os resultados dos parâmetros físico-químicos e biológicos estão de acordo com a legislação brasileira (Conama 357/2005) exceto para os índices de coliformes fecais e totais. Foi observado que os mexilhões *Perna perna* alimentados com *Prorocentrum lima* sofrem aumento da frequência de micronúcleos e lesões nucleares em seus hemócitos. Os resultados dos testes de citotoxicidade e genotoxicidade mostraram que as toxinas ácido ocadáico e domóico diminuem a viabilidade celular, causam danos nas membranas, alterações nos lisossomos, diminuição da atividade metabólica das mitocôndrias e induzem apoptose em células de adenocarcinoma de intestino grosso humano (Caco-2).

## Abstract

The world's oceans teem with countless single-celled algae called phytoplankton. Among the thousands of living species are a few dozen that produce potent toxins or that cause harm in the other ways. Impacts from the bloom of this tiny organism are many and diverse, ranging from the death or illness of humans, whales or the marine animals to discoloration of the water and fouling of beaches with foam and dead fish. The phytoplankton requires certain major and minor nutrients for their nutrition. These can be supplied either naturally from marine process, or through human activities, such as pollution. One of the explanations given for the increased incidence of toxic algae bloom outbreaks worldwide is that these events are a reflection of increased pollution and nutrient loading in coastal waters. The main factor, which led us to start to deal with the phycotoxins issue, was the activity of mussel culturing. The aim of this work is to provide current information of the spatial and temporal distribution of potentially toxic phytoplankton species and evaluated the cytotoxicity and genotoxicity of domoic acid and okadaic acid on a human colorectal adenocarcinoma cell line (Caco-2). The results showed that all water quality parameters reported here are according to regulatory limit of Brazilian legislation (Conama 20/1986) except the values of total and fecal coliform. The results of toxic phytoplankton analysis showed that Santa Catarina requires a comprehensive monitoring programme, because most known toxic phytoplankton are present in its waters. However, our results did not show any clear relationship between nutrients concentration and cell densities of toxic phytoplankton. The results showed also that micronucleus as well as other nuclear buds occurs in mussels *Perna perna* fed *Prorocentrum lima*. The results demonstrate that okadaic and domoic acid decreases Caco-2 cells viability, damages membranes, lysosomes and mitochondria and induces apoptosis. This pathway, if elicited in consumers, may lead to diseases, loss of cells in certain organs, or eventually to carcinogenesis.



## LISTA DAS FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Floração de microalga da espécie <i>Noctiluca scintillans</i>	18
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do ácido ocadáico	24
<b>Figura 3.</b> Estrutura química do ácido domóico.	25
<b>Figura 4.</b> Mapa mostrando o litoral catarinense.	34
<b>Figura 5.</b> Navio de Pesquisa Oceanográfico Soloncy Moura-Cepsul/Ibama.	36
<b>Figura 6.</b> Garrafa de Nansen utilizada para as coletas de água	37
<b>Figura 7.</b> Coleta de fitoplâncton	40
<b>Figura 8.</b> Esquema representativo da Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência	53
<b>Figura 9.</b> Espécies de microalgas tóxicas encontradas na Costa Catarinense.	83

## **TABELA**

**TABELA 1.** Posição geográfica dos pontos de coleta.

35

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

OA - Ácido Ocadáico

DA – Ácido Domóico

DSP - Síndrome Diarréica do Molusco

ASP – Síndrome Amnésica do Molusco

PSP - Síndrome Paralisante do Molusco

SOD – Superóxido desmutase

MN – Micronúcleos

NL – Lesões Nucleares

LCMM - Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos

mA - MiliAmpere

MU –Unidade de camundongo

PM – Peso molecular

CO<sub>2</sub> - Gás carbônico

DMEM – Meio de cultura Dulbecco's

UV – Ultravioleta

PBS – Tampão fosfato

SSC – Citrato de sódio salino

HCL – Ácido clorídrico

KCL – Cloreto de potássio

## SUMÁRIO

<i>RESUMO</i>	VII
<i>ABSTRACT</i>	VIII
<i>LISTA DAS FIGURAS</i>	IX
<i>LISTA DAS TABELAS</i>	X
<i>LISTA DAS ABREVIATURAS</i>	XI
<b>1. Introdução</b>	1
<b>2. Objetivos</b>	5
<b>2. 1. Objetivo Geral</b>	5
<b>2. 2. Objetivos Específicos</b>	5
<b>3. Fundamentação Teórica</b>	6
3. 1. Plataforma Continental do Sul do Brasil	6
3. 2. Fitoplâncton	8
3.2.1 Características Gerais	8
3.2.2. Diversidade Fitoplanctônica	10
3.2.3. Fitoplâncton e Nutrientes	11
3.3. Fitoplâncton Tóxico	14
3.3.1. Florações de Microalgas	14
3.3.2. Florações de Microalgas e Efeitos Tóxicos	16
3.3.3 Fitoplâncton Tóxico e Estratégia Adaptativa	19
3.3.4. Toxinas Marinhas e Maricultura	21
3.3.5. Florações Tóxicas e Impacto na Saúde Pública	23
3.3.5.1. Síndrome Paralisante do Molusco (PSP)	26
3.3.5.2. Síndrome Diarréica do Molusco (DSP)	27
3.3.5.3. Síndrome Amnésica do Molusco (ASP)	28
3.3.6. Toxicidade, Citotoxicidade, Genotoxicidade e Toxinas Marinhas	29
<b>4. Materiais e Métodos</b>	31
4.1. Materiais Biológicos	31
4.1.1. Mexilhão <i>Perna perna</i>	31
4.1.2. Dinoflagelado <i>Prorocentrum lima</i>	31
4.1.3 Camundongo <i>Mus musculus</i>	32
4.1.4. Cultura de Células Caco-2	32
4.2. Metodologia Parte 1: Verificação da Ocorrência de Fitoplâncton	32

Tóxico e Avaliação dos Parâmetros de Qualidade da Água na Costa Catarinense	
4.2.1 Descrição da Área de Estudo	32
4.2.2. Locais de Coleta	33
4.2.3. Dados Meteorológicos	34
4.2.4. Coleta da Água	37
4.2.5. Parâmetros Físico-Químicos	37
4.2.5.1. Nutrientes Inorgânicos Dissolvidos	37
4.2.5.1.1. Amônia	38
4.2.5.1.2. Nitrato	38
4.2.5.1.3. Nitrito	38
4.2.5.1.4. Fosfato	38
4.2.5.1.5. Silicato	39
4.2.6. Parâmetros Biológicos	40
4.2.6.1. Coliformes Totais e Fecais	40
4.2.6.2. Clorofila a (cla a)	40
4.2.7. Amostragem de Fitoplâncton	40
4.2.8. Amostragem de Mexilhões	41
4.2.9. Extração das Toxinas dos Hepatopâncreas dos Mexilhões	41
4.2.10. Bioensaio com Camundongos	41
4.3. Metodologia Parte 2: Alimentação dos mexilhões <i>Perna perna</i> com Dinoflagelado <i>Prorocentrum lima</i>	42
4.3.1. Coleta de <i>Perna perna</i>	42
4.3.2. Cultivo de <i>Prorocentrum lima</i>	43
4.3.3. Preparação das Soluções de <i>Prorocentrum lima</i>	44
4.3.4. Exposição dos Mexilhões	44
4.3.4. 1. Preparações Citológicas	45
4.3.4.2. Análise Citogenética	45
4.4. Metodologia Parte 3: Determinação da Citotoxicidade e Genotoxicidade de Toxinas Marinhas através de técnicas Bioquímicas e Moleculares	46
4.4.1. Cultura Celular	46
4.4.1. Repicagem e Contagem Celular	47

4.4.2. Toxinas	47
4.4.3. Testes de Citotoxicidade	48
4.4.3.1. Teste do MTT	48
4.4.3.2. Teste do Vermelho Neutro (Neutral Red)	49
4.4.3.3. Teste do Azul de Tripán (Blue Trypan)	50
4.4.4. Testes de Genotoxicidade	50
4.4.4.1. Extração do DNA Total	50
4.4.4.2. Separação dos Fragmentos de DNA por Eletroforese	51
4.4.4.3. Teste do Cometa	51
4.4.4.4. Teste do Micronúcleo	52
4.4.4.5. Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)	53
4.4.4.6. Coloração com Acridine Orange e Brometo de Etídio	55
4.4.4.7. Técnica da reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR)	55
4.4.4.7.1. Extração e Purificação do RNA Total	56
4.4.4.7.2. RT-PCR	56
4.5. Análise dos Dados	57
<b>5. Resultados e Discussão</b>	58
5.1. Artigo 1 :Water Quality and Occurrence of Toxic Phytoplankton in the Coast of Santa Catarina, Brazil.	58
5.1.1. Discussão Artigo 1	78
5.2. Artigo 2: Micronucleus test in mussels <i>Perna perna</i> fed with the toxic dinoflagellate <i>Prorocentrum lima</i> .	84
5.2.1. Discussão artigo 2	94
5.3. Artigo 3: Evaluation of the Cytotoxicity and Genotoxicity of Domoic Acid in Caco-2 cells.	97
5.3.1. Discussão Artigo 3	112
5.4. Artigo 4: Mechanistic approach to the apoptosis induced by Okadaic Acid in Caco-2 cells using <i>bax</i> , <i>bcl2</i> expression ,cytotoxicity and genotoxicity assays	114
5.4.1. Discussão artigo 4	129
5.5. Artigo 5: Genotoxicity of Okadaic and Domoic Acid Evaluated by Micronucleus Assay and FISH Technique	132

5.5.1. Discussão artigo 5	144
<b>6. Considerações Finais</b>	146
<b>7. Conclusões</b>	150
<b>8. Perspectivas</b>	152
<b>9. Referências Bibliográficas</b>	153

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACAQ. Associação Catarinense de Aqüicultura. Disponível em <[www.acaq.org.br](http://www.acaq.org.br)>. Acesso em 12/11/2003.
- Allan, G. Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short-term oxygen stress on subsequent growth of juvenile *P. monodon*. **Aquaculture**, v. 94, p. 27-34, 1991.
- Aminot, A & Chaussepied, M. **Manuel de analyses chimiques en milieu marin**. Brest: CNEXO, 86 p., 1983.
- Anderson, D. M.; Andersen, P.; Bricelj, V.,M; Cullen, J. .J. and Rensel, J.E. **Monitoring and Management Strategies for Harmful algal Blooms in Coastal Waters**. IOC-UNESCO, 59. Paris, 268 p. , 2001.
- Aonuma, S.; Ushijima, T.; Shima and H., Nagau, M. Mutation induction by okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, in CHL cells but not in *S. typhimurium*. **Mutation Research**, v. 250, p. 375-381, 1991.
- APHA, WEF, AWWA. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 14 ed. Washington, p. 10-1-10-54, 1992.
- Azevedo, S.M.F. Toxinas de cianobactérias: causas e conseqüências para a saúde pública. **Medicina on line**, p. 1-3, 1998.
- Bayne, B. **Marine Mussel: Their Ecology and Physiology**. Cambridge. University Press Cambridge. International Biology Program, v.10, 126p., 1976.



- Beçak, W. & Paulete, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Eds. Livro de Técnicas Científicas, S.A., Rio de Janeiro, RJ. 305p, 1976.
- Belin, C.; Berthome, J.P. and Lassus, P. Dinoflagellés toxiques et phénomènes deaux colorées sur les côtes françaises: évolution et tendances entre 1975 et 1988. **Equinoxe**, v. 25, p. 30-38, 1989.
- Berthome, J.; James, M.; Curtis, T. and Nozawa, L. The biosynthesis of marine natural products. **Chemical**, v. 33, p. 1699-1733, 1985.
- Bevilacqua, V. **Cultivo sustentável de molusco traz benefícios: Produção aliada à preservação tem recursos do Banco Mundial e cria perspectivas ao produtor**. Diário Catarinense, Florianópolis, p. 40, 14 dezembro de 2001.
- Bhattacharya, D. & Medlin, L. Algal phylogeny and the origin of land plants. **Plantae Physiology**, v. 116, p. 9 -15, 1998.
- Bolch, T.; Kautsky, L. and Green, N. **Técnicas utilizadas para estudios de polución en macroalgas marinas**. In: Manual de Métodos Ficológicos. Eds. Alveal, K., Ferrario, M.E , Oliveira, E.C. and Sar, F. Universidad de Concepción, Concepción, Chile, p. 779-793, 1999.
- Botana, L.M.; Rodrigues-Vieytes, M.; Alfonso, A. and Louzao, C.M. **Phycotoxins: Paralytic Shellfish Poisoning and Diarrhetic Shellfish Poisoning. Handbook of Food Analysis**. Edit by Nollet, L.M., vol.2, 1996.
- Bourne, N.; Hodgson, C.A. and Whyte, C.A. **Manual of scallop culture in British Columbia. Canadian technical report of fisheries and aquatic sciences**, Nanaimo 1694, 215p., 1989.

- Boyd, C. **Water Quality in waterwater fishponds**. Agricultural Experimental Station. Auburn University. Opelika, Alabama, USA, 359 p., 1996.
- Branco, S. **Limnologia Sanitária, estudo de la polución de águas continentales**. Secretaria General da Organizaciion de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico e Tecnológico. *Série de Biología Monografía*, n.28. Washington, D.C.,120 p., 1984.
- Brandini, F. P.; Lopes, R. M.; Gutseit, K. S.; *et al.* **Planctonologia na plataforma continental do Brasil: diagnose e revisão bibliográfica**. REVIZEE, 188 p., 1997.
- Brusick, D. **Principles of genetic toxicology**. 2 ed. New York: Plenum Press, 236 p., 1988.
- Carmody, E.P.; James, K.J. and Kelly, S.S. Dinophysistoxin-2: The predominant diarrhoetic shellfish toxin in Ireland. **Toxicon**, v. 34, p.351-359, 1996.
- Carmouze, J. P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. São Paulo: Edgard Blucher/ FAPESP, 82p.,1997.
- Carrano, A.V.; Nataranjan, S. Considerations for populations monitoring using cytogenetic techniques. **Mut. Res.** V. 204, p. 379-406, 2002.
- Carreto, J. I.; Akselman, R.; Benavides, H. R.; Montoya, N. G.; Negri, R. M. El **Proyecto “maré roja” del instituto nacional de investigacion y desarrollo pesquero (INIPED)**. In: Eds. Sar, E. A.;

- Ferrario, O, M. E.; Reguera, B. Floraciones Algales em el Cono Sur Americano, Instituto Espanõl de Oceanografia, p. 269-288, 1991.
- Carvalho Pinto -Silva, C.R.; Ferreira, J.F.; Costa, R.H.R.; Belli Filho, P.; Creppy, E.E. and Matias, W.G. Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. **Toxicon**, v. 41, p. 93-97, 2003.
- CNUMAD. **Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento**. *Agenda 21*. Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações, Série Ação Parlamentar, nº 56,. 471p. 1995
- Cembella, D.R. A new shellfish poisoning from the bivalve. **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 4027-4030, 1996.
- Chapin , F.S.; Walter,B.H.; Hobbs, R.J.; Hooper, D.U.; Lawton, J.H.; and Tilman, Biotic control over the functioning of ecosystems. **Science**, v., 277, p. 500-504, 1997.
- Charlson, R.D.; James, K.J.; Kelly, S.S. and Tindall, D.R. Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in the Virgin Island. **Aquatic Toxicology**, v. 38, p.171-176, 1987.
- Chen, D.Z.X.; Boland, M.P.; Smillie, M.A.; Andersen, R.J. and Holmes, C.F.B. Identification of protein phosphatase inhibitors of the microcystin class in the marine environment. **Toxicon**, v. 31, p. 1407-1414, 1993.
- Creppy, E.E., Traoré, A., Baudrimont, I., Cascante, M., and Carratu, M.R. Recent advances in the study of epigenetic effects induced by the phycotoxin okadaic acid. **Toxicology**. V. 181, p. 433-439, 2002.

Ciotti, A., M. **Fitoplâncton da Plataforma Continental do Sul do Brasil: clorofila, feopigmentos e análise preliminar primária.**

Tese de mestrado, UFRGS, 1990.

Colt, J. Gás supersaturation. Impact on the design on and operation of aquatic systems. **Aquacultural Engineering**, v.5, p. 49-85, 1996.

Corrêa, I.C.S. Sedimentos superficiais da plataforma e talude do sul do Brasil. **Proceedings of the International Conference on Marine Resources of the Pacific. Vinã del Mar**, p. 155-163, 1983.

CTTmar - **Centro de Tecnologias da Terra e do Mar**. Disponível em :  
<[www.cttmar.univali.br/praias/informacoes/implementacaop](http://www.cttmar.univali.br/praias/informacoes/implementacaop)>.

Acesso em 22/11/2003.

Dales, B. & Yentsh, M. Seafood toxins. **Oceanus**, v.21, p. 41-52, 1978.

Daranas, A. H.; Norte M.; Fernandez, J. J. Toxic Marine Microalgae. **Toxicon**, v. 39, p. 1101-1132. 2001.

Depledge, M.H. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. **Mutation Research**, v.399, p. 109-122, 1998.

Diegues, A.C.S: **Povos e mares: leituras em sócio - Antropologia marítima**. Ed. Nupaub -USP, São Paulo, 206 p., 1995.

Dizer, H., Fischer, B., Harabawy, A.S.A., Hennion, M.C., and Hansen, P. D. Toxicity of domoic acid in the marine mussel *Mytilus edulis*. **Aquat Toxicol**. V. 12, p. 149-56, 2001.

Dodge, J.D. Revision of the Taxonomy within the genus *Prorocentrum*. **Botanical Journal Limnology**, v. 71, p. 102-105, 1982.

- Duve, C. The birth of complex cells. **Scientific American**, v, 274, p. 50-57, 1996.
- Epagri/UFSC. **Manual de cultivo de mexilhão *Perna perna***. Florianópolis, 139 p., 2004.
- Esteves, F. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência – FINEP, 575 p., 1988.
- Fast, A. & Boyd, C. **Water circulation, aeration and other management practices**. In: Marine Shrimp Culture: Principles and Practices. Arlo Fast & James Lester (Eds). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 457-495, 1992.
- Fenech M, Chang WP, Kirsh-Volders M, Holland N, Bonassi S and Zeiger E HUMN project: detailed description on the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mut. Res.**, v. 534, p.65-75, 2003.
- Ferreira, J. & Magalhães, A. **Desenvolvimento do cultivo de mexilhões em Santa Catarina (Sul do Brasil)**. In: VI Congresso Latinoamericano de Ciências del Mar. Mar Del Plata, Chile, p. 80, 1995.
- Fessard, V.; Grosse, Y.; Pfl-Leszkowicz, A. and Puisex-Dao, S. Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts , HESV keratinocytes. **Mutation Research**, v. 361, p. 133 -141, 1996.
- Fiala, M. **Phytoplankton:biomasse, production, numeration et culture**. Jacques, G., ed. UNESCO, 1979.

- Fillmann, G. **Caracterização química das massas de água da plataforma continental do sul do Brasil.** Tese de Mestrado, Universidade de Rio Grande, Brasil, 1990.
- Fleming, L. E.; Bean, J. A. and Baden, D.G. **Epidemiology and public health. Manual on Harmful Marine Microalgae.** IOC: Manual and Guides, UNESCO, p. 475-486, 1995.
- Freitas, J.C. **Toxinas de algas fitoplanctônicas. Manual de Métodos Ficológicos,** p. 311-327, 1995.
- Fujiki, H.; Sueoka, E.; Komori, A. and Suganuma, M. Tumor promotion and TNF- $\alpha$  gene expression by the okadaic acid class tumor promoters. **Environmental Carcinogenesis. & Ecotoxicologic Research,** v. 15:1, p. 1-40, 1997.
- Gad, S.C. & Weil, C.S. **Statistics for toxicologists.** In: Principles and methods of toxicology, student edn. Raven Press, New York. pp 273-320, 1982.
- Gago-Martinez, A.; Vazquez-Rodrigues, J.A.; Thibaut, P. and Quilliam, M. Simultaneous occurrence of Diarrhetic and Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Spanish Mussels in 1993. **Natural Toxins,** v.4, p.72-79, 1996.
- Hallegraeff, G. M. **Harmful Algae blooms: a global overview.** Manual on Harmful Marine Microalgae, IOC/Unesco, v, 33, p,1-23, 1995.
- Halstead, B.W. **Intoxications marine animals of the world.** Ed. Princeton: Darwin, 136 p., 1988.
- Hégarat, L., Nessler, F., Mourot, A., Marzin, D., and Fessard, V. Lack of DNA damage induction by okadaic acid, a marine toxin, in the

- CHO-Hprt and the in vitro UDS assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental mutagenesis**, v. 564, p.139-147, 2004.
- Hernandez-Becerril, D.U. **Fitoplancton marino en Mexico. Journal Latinoamerican of Microbiology**, v.29, p. 171-174, 1987.
- Hubold, G. Hydrography and plankton off southern Brazil and Rio of Prata. **Atlântica**, v. 4, p. 1-21, 1980.
- IBAMA. **Instituto brasileiro do Meio Ambiente, Anuário Estatístico**, 1998.
- IOC - Intergovernmental Oceanographic Commission. **Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)** . HAB Publication Series, Vol.1, UNESCO, 1995.
- Iverson, F.; Truelove, J.; Tryphonas, L. and Nera, E. The toxicology of domoic acid administered systemically to rodents and primates. **Journal Organic Chemical**, v. 63, p. 2475-2480, 1990.
- Kasting, J. F. Earth's early atmosphere. **Science**, v. 259, p. 920-926, 1993.
- Keller, M,D. & Guillard, R.R.L. Media for the Culture of oceanic ultraphytoplankton. **J. Phycol.**,v. 23, p. 633-638, 1985.
- Kumagai, M.; Yanagi, T.; Murata, M.; Yasumoto, Y.; Kat, M;Lassus, P. and Rodriguez-Vasquez, L. Okadaic acid as the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning in Europe. **Agric. Biol. Chem.**, v. 50, p. 2853-2857, 1986.
- Kuhnen, S.; Bueno, A.M.S.; Ferreira, J.F. and Agostini, J.M.S. **Padronização do teste do micronúcleo em hemócitos do**

- mexilhão *Perna perna*** . Resumos do 43º Congresso Nacional de Genética, Goiânia, Brasil, p. 118, 1997.
- Kurelec, B. The genotoxic disease syndrome. **Marine Environmental Research**, v. 35, p. 341-348, 1993.
- Laing, I. Cultivation of marine unicellular algae. Lab. Leaflet. MaMAFF Direct. **Fish. Res., Lowestoft**, v. 67, 31p., 1991.
- Lassus, P. Intoxications par les coquillages: une nette recrudescence. **Le Généraliste**, v.548, p. 22-33, 1989.
- Lassus, P.; Herbland, A. and Lebaut, M.C .Toxic blooms and toxic effects along the French Coast. **World Aquaculture**, v. 22, p. 49-54, 1991.
- Lima, I.D. **Distribuição e abundância de anchoita (*Engraulis anchoita*) em relação aos processos oceanográficos na plataforma continental do sul do Brasil**. Dissertação de Mestrado, Univ. Rio Grande, Brasil, 1992.
- Longhurst, A.; Sathyendranath, S.; Platt, T. and Caverhill, C. An estimate of global primary production in the ocean from satellite radiometer data. **Journal Plankton Research**, v.17:6, p. 1245 - 1271, 1995.
- López-Barea, J. & Pueyo, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. **Mutation Research**, v. 399, p. 3-15, 1998.
- Margaleff, R. **Ecologia**. Ediciones Omega S.A., Barcelona. 951 p, 1983.



- Martins, A.S. Distribution, abundance and interactions of the fish *Trichiurus lepturus* in the southern Brazil subtropical convergence ecosystem. **Fisheries Research**, v. 30, p. 217-227, 1997.
- Matias, W. G. & Creppy, E. E. Evidence for enterohepatic circulation of okadaic acid in mice. **Journal Toxicology Substancy Mechanisms**, v. 15, p. 405-414, 1996.
- Matias, W.G. & Creppy, E.E. Biological marker of ADN damage induced by okadaic acid in Vero cells. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 13, p, 83- 88, 1998.
- Matias, W. G.; Traore, A.; Bonini, M. and Creppy E.E. Oxygen reative radicals production in cell culture by okadaic acid and their implication in protein synthesis inhibition. **Human & Experimental Toxicology**, v.18: 5, p.345–350, 1999.
- Matthews, S. G. & Pitcher, G. C. **Worst recorded marine mortality on the South African coast.** In Yasumoto, T.. Oshima, Y.; Fukuyo, Y. (Eds.). Harmful and toxic algal blooms. Sendai:UNESCO, p. 89-92, 1996
- Mellgren, G.; Vintermyr, O.K.; Boe, R and Doskeland, S.O. Hepatocyte DNA republication is abolished by inhibitors selecting protein phosphatase 2A rather than phosphatase 1. **Cell Research**, v, 205, p, 293-301, 1993.
- Messner, D.J., Ao, P., Jagdale, A.B., Boynton, A.L. Abbreviated cell cycle progression induced by the serine/threonine protein phosphatase inhibitor okadaic acid at concentrations that promote neoplastic transformation. **Carcinogenesis**, v. .22 (8), p.1163-72, 2001.

- Moestrup **O. Economic aspects: blooms, nuisance species, and toxins.** In: Green, J. C. & Leadbeater, B. S. (Eds.). *The Haptophyte Algae*. Oxford: Clarendon Press, v. 51, p. 265-285, 1997.
- Moslen, M.T. & Legator, M.S. Advantages of a combined testing protocol (CCTP) with multiple endpoints: the reverse tier approach. **Mutation Research**, v. 205, p. 91-97, 1988.
- Morales, J.C. **Acuicultura marina animal.** Ed. Mundi-prensa, Madrid, 671p., 1991.
- Nusch, E.A Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. **Archivesl Hydrobiology**, v, 14, p.14-36, 1980
- Odebrecht, C.; Garcia, V.M. and Abreu, P.C. **Raphidophycean in southern Brazil.** IOC/Unesco Harmful Algae News. v, 4, p.12-13, 1995.
- Odebrecht, C.; Rorig, L.; Garcia, V.M. and Abreu, P.C. **Shellfish mortality and a red tide event in southern Brasil.** Harmuful marine algal blooms. Lavoisier Publishing: Paris, p. 213-218, 1995b.
- Odum, E.P. **Ecologia.** Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de janeiro, 434 p., 1986.
- Park, D.L. Detection of Ciguatera and Diarrheic Shellfish Toxins in Finfish and Shellfish with Ciguatera kit. **Journal of AOAC International**, v.78:2, p. 533-537, 1995.
- Poli, R., Poli, A.T., Andreatta, E. e Beltrame, E. **Aqüicultura: Experiências Brasileiras,** Ed. UFSC, 455 p., 2003

- Pourriot, R. **Écologie du plancton des eaux continentales**. Editora Masson, Rio de Janeiro, 198 p., 1982.
- Proença, L. A.; Schmitt, F.; Costa, T. and Rorig, L. Just a diarrhea? Evidence of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina, Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 50:6, p. 458 -462, 1998.
- Proença, L. A.; Lagos, N.; Rörig, L.; Silva, M. and Guimarães, S. Occurrence of paralytic shellfish toxins - PST in southe Brazilian waters. **Ciência e Cultura**, v. 51:1, p. 16-21, 1999.
- Proença, L.A.; Tamanaha, M.S. and Schmitt, F. **Floração de *Mesodinium rubrum*, um ciliado autotrófico não tóxico, no litoral de Santa Catarina**, In: IX Reunião Brasileira de Ficologia. Santa Cruz – Aracruz/ES. Algas, Biodiversidade e Exploração Racional, p. 246, 2002.
- Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F. and Marques, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Editora Ulbra, 356p., 2003.
- Rieber, M.S. & Rieber, M. Accessibility to DNA in carcinoma chromatin is promoted by nanomolar okadaic acid: effect on AT-rich DNA binding proteins. **Cancer Research**, v, 52, p. 6397-6399, 1992.
- Rios, E.C. **Seashell of Brasil**. Rio Grande, Editora da Furg, 2 edição, 492 p., 1994.
- Rogers, C.G., and Boyes, B.G. Evaluation of the genotoxicity of domoic acid in a hepatocyte-mediated assay with V79 Chinese hamster lung cells. **Mutation Research**, v. 226, p. 191-195, 1989.

- Rossini, G.P., Sgarbi, N., and Malaguti, C. The toxic responses induced by okadaic acid involve processing of multiple caspase isoforms. **Toxicon** , v. 39, p. 763–770, 2001.
- Sampayo, L. A. Freshwater tolerance of marine and estuarine larvae of *Odontesthes argentinenses* (Pisces: Atherinidae). **Archival Biology Technology**, v,35:1, p. 85-90, 1992.
- Santos, L. Santa Catarina esta de olho no saneamento. **Revista Ambiental**. Ano 4, n. 10, 2004.
- Schantz, E.J.; Ghzarossian, V.E.; Scoes, H.K.; Prezzanite, I.O. and Clardy, J. The structure of saxitoxin. **Journal American Chemical Society**, v. 97, p. 1238-1239, 1975.
- Seelinger, U.; Odebrecht, C. and Castello, J.P. **Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil**. Ed. Ecoscientia, 341p., 1998.
- Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R. and Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v, 175, p.184-191, 1988.
- Smayda T. J. What is a bloom? A commentary. **Limnology and Oceanography**, v. 42, p. 1132-1136, 1990.
- Sournia, A.; Chretiennot, D. and Ricard, M. Marine phytoplankton: how species in the world ocean?. **Journal Plankton Research**, V. 13, p. 1093-1099, 1991.

- Spector, D.L.; Goldman, R.D. and Leinwand, L.A. Fluorescence in situ hybridization to DNA. In: Subcellular Localization of Genes and their Products. **Cells A Laboratory Manual**, v. 3, p. 1-45, 1998.
- Steidinger, K. A. **Some taxonomic and Biologic Aspects of Toxic Dinoflagellates. Algal toxins in seafood and drinking water.** New York: Academic Press, p. 1-139, 1993.
- Steinert, S.A.; Steib-montee, R.; Leather, J.M. and Chadwick, D.B. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. **Mutation Research**, v. 399, p. 65-85, 1998.
- Suárez- Ilha, K. Marine biotoxins. **Journal Association Analysis Chemical**, v. 31, p. 160 - 198, 1999.
- Sueoka, E. ; Sueoka, N.; Suganuma, M. and Fujiki, H. Carcinogenesis os okadaic acid class tumor promoters derived from marine natural. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**, v. 123, p. 413 - 419, 1997.
- Suganuma, M.; Fujiki, H.; Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Hirota, M. and Sugimara, T. Okadaic acid: An additional non-phorbol-12-tetratecadenanoate-13-acetate-type tumor promoter. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 58, p. 1768-1771, 1988
- Svensson S. & Forlin, L. Intracellular effects of okadaic acid in the blue mussel *Mytilus edulis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, **Marine Environmental Research**, v. 46, p. 449-452, 1998.
- Tachibana,K.; Scheuer, P.J.; TsukitanI,Y.; Kikuchi, H.; Engen, D.V.; and chimitz, F.J. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two

marine sponges of the genus *halichondria*. **Journal American Chemical Society**, v. 103, p. 2469-2471, 1981.

Todd, E.C.D. **Amnesic shellfish poisoning – A new seafood toxin syndrome**. In: Toxic marine phytoplankton. Proceedings of the Fourth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Lund, Sweden. (Eds. Granéli, E.; Sundstrom, B.; Edler, L. and Anderson, D.M., Elsevier, New York, Amsterdam, London, p. 504-508, 1990.

Tohda, H.; Nagao, M.; Sugimura, T. and Oikawa, A. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, induces sister-chromatid exchanges depending on the presence of bromodeoxyuridine. **Mutation Research**, v. 289, p. 275-280, 1993.

Traore, S., Baudrimont, I., Ambaliou, A., Dano, S.D., and Creppy, E.E. DNA breaks and cell cycle arrest induced by okadaic acid in Caco2 cells, a human colonic epithelial cell line, **Arch. Toxicol.** V.75, p. 110-117, 2001.

Unesco. Organização das Nações Unidas para Educação, a Ciência e a Cultura. Disponível em “[www.unesco.org/ioc](http://www.unesco.org/ioc) .” Acesso em 14/05/2003.

Vieytes, M.R.; Fontal, O.I. and Botana, L.M. A fluorescent microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. *Analytical Biochemistry*, v.248, p. 258-264, 1997.

Vitousek, P.M.; Mooney, H.A.; Lubchenco, J. and Melillo, J.M. Human domination of earth's ecosystems. **Science**, v. 277, p. 494-499, 1997.

- Voltera, L.; Gucci, P.M.B. and Bruno, M. Problem of phenomenon of DSP (diarrhetic shellfish poisoning). **Ambiente Risorse Salute**, v. 5, p. 12-17, 1990.
- Yasumoto, T.; Oshima, Y. and Yamaguchi, M. Occurrence of new type of shellfish poisoning in the Tokohu District. Bull. **Journal Society Scientific Fisherie**, v. 44, p. 1249-1255, 1980.
- Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Sugawara, W.; and Yamaguchi, M. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. **Journal Society Scientific Fisherie**, v. 46, p. 1405-1411, 1984.
- Yasumoto, T., Murata, T. and Oshima, Y. Diarrhetic shellfish toxins. **Tetrahedron**, v. 41, p. 1019-1025, 1989.
- Yuan, X.M., Li, W., Dalen, H., Lotem, J., Kama, R., Sachs, L., Brunk, U.T. Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v 99, p. 6286-6291, 2002
- Wright, J.L.C.; Boyd, R.K. and Freitas, A.S.W. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern PEI. **Cancer Journal Chemical**, v. 67, p. 481-485, 1989.
- Zenebon, O. & Pregnotatto, N. P. **Memórias técnico-científicas da divisão de bromatologia e química. In: Antunes, J. L. F.** Instituto Adolfo Lutz: 100 Anos de Saúde Pública. Secretaria de Estado da Saúde/SP. Instituto Adolfo Lutz, p. 173 - 198, 1992.
- Zejschwitz, C.V.; Vorwerk, H.; Tergau, F. and Steinfeld, H.J. Apoptosis induction by inhibitors of Ser/Thr phosphatases 1 and 2 A is associated with transglutaminase activation in two different

human epithelial tumour lines. **FEBS Lett**, v. 413, p. 147-151, 1997.

Zingone, A. & Enevoldsen, H. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. **Ocean & Coastal Management**. v. 43, p. 725-748, 2000.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Materiais Biológicos**

#### **4.1.1. Mexilhão *Perna perna***

Foram utilizados mexilhões adultos da espécie *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) (MOLLUSCA:BIVALVIA), com 6 e 7 cm de comprimento.

#### **4.1.2. Dinoflagelado *Prorocentrum lima***

A cepa PL2V de *P. lima* (Ehrenberg) Dodge, 1975, foi cedida pelo professor Dr. Luiz Antônio Proença, da Universidade do Vale do Itajaí-UNIVALI. Esta cepa é proveniente do Instituto Espanhol de Oceanografia de Vigo - Espanha.

#### **4.1.3 Camundongo *Mus musculus***

Foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* (linhagem Swiss), com 27 dias de idade e pesando 20 gramas, procedentes do Biotério Central da UFSC.

#### **4.1.4. Cultura de Células Caco-2**

As células Caco-2 (linhagem de células de câncer de intestino grosso humano) foram obtidas do Dr. Jing Yu, Tufts School of Medicine (Medford, Mass-USA).

## **4.2. Metodologia Parte 1: Verificação da Ocorrência de Fitoplâncton Tóxico e Avaliação dos Parâmetros de Qualidade da Água na Costa Catarinense**

Nesta primeira parte do trabalho foi realizado um monitoramento na costa Catarinense, durante 12 meses, para verificação da ocorrência de espécies tóxicas de fitoplâncton e análise dos parâmetros físico-químicos e biológicos da água.

### **4.2.1. Descrição da Área de Estudo**

A área de estudo deste trabalho abrangeu desde a Baía da Babitonga até o município de Laguna. Da Baía da Babitonga, até a Ponta de Itapocorói, no município de Penha, o trecho do litoral caracteriza-se por uma ampla faixa de sedimentos quaternários, de origem marinha. Da Ponta de Itapocorói, no município de Penha, até a Ponta dos Ganchos no município de Governador Celso Ramos, destaca-se a presença de esporões, partes terminais das Serras Cristalinas, que avançam em direção ao oceano e que se apresentam em forma de costões, onde é intenso o trabalho erosivo e se traduz pela fragmentação e pelo aparecimento de blocos rochosos, caracterizando a paisagem litorânea, de modo especial na Ponta da Penha, das Laranjeiras, de Porto Belo e dos Ganchos. Entre os esporões podem surgir profundas reentrâncias, como por exemplo, a enseada de Porto Belo e de Zimbros. No interior das enseadas, encontram-se sedimentações marinhas, representadas por numerosas praias (Lima, 1992).

Da Ponta dos Ganchos no município de Gov. Celso Ramos até a Ponta do Casqueiro, no município de Paulo Lopes, o litoral apresenta características semelhantes às do extremo norte do Estado. Pode-se também observar a presença de esporões cristalinos e a formação de baías profundas, como a Baía Norte e Baía Sul, situadas entre a Ilha de Santa Catarina e o continente, onde no interior destas encontram-se mangues. Da Ponta do Casqueiro, no município de Paulo Lopes até o Cabo de Santa Marta, no município de Laguna, o litoral caracteriza-se por apresentar forte processo de sedimentação marinha (Côrrea, 1983).

Um dos pontos de coleta se deu na Reserva Biológica da Ilha do Arvoredo, situada 11 km ao norte de Florianópolis. A Reserva Biológica é formada pelas Ilhas Galês, Calhau de São Pedro, Ilha Deserta e a Ilha do Arvoredo que dá nome e delimita o Sul da Reserva. A Ilha do Arvoredo é a maior de todas das Reservas, com 270 hectares cobertos de Mata Atlântica (Ibama, 1998).

#### **4.2.2. Locais de Coleta**

Os pontos de coletas estão localizados na plataforma continental do Estado de Santa Catarina, totalizando 21 pontos amostrais, sendo 10 locais de baías, onde são cultivados mexilhões e ostras e 11 locais de mar aberto (Figura 4).

As coletas, realizadas com o auxílio do Navio de Apoio Oceanográfico Soloncy Moura/Cepsul/IBAMA (Figura 5), foram mensais, entre agosto de 2002 e agosto de 2003. Os locais de amostragem foram posicionados com um receptor GPS e os pontos escolhidos estão apresentados na Tabela 1.



**Figura 4.** Mapa mostrando o litoral catarinense. ● Indica os pontos amostrados.

**Tabela 1.** Posição geográfica dos pontos de coleta.

<b>Pontos de Coleta</b>	<b>Latitude (S)</b>	<b>Longitude (W)</b>
Laguna	28 29 275	048 44 223
Imbituba	28 13 611	048 39 243
Garopaba	28 01 033	048 36 830
Ilha dos Corais	27 56 460	048 32 864
Caiacangaçú	27 46 433	048 34 986
Barra Caiacanga	27 50 135	048 34 447
Ilha 3 Irmãs	27 49 886	048 31 227
Ilha do Campeche	27 41 445	048 28 387
Ilha do Arvoredo	27 16 569	048 22 578
Ilha de Ratonas Grande	27 28 146	048 33 986
Armação Piedade	27 23 145	048 32 858
Arga (Ponto entre Arvoredo e Ganchos)	27 20 519	048 30 283
Ganchos	27 18 102	048 33 481
Zimbros	27 49 886	048 31 227
Porto Belo	27 08 219	048 32 206
Laranjeiras	26 59 508	048 35 485
Penha	26 46 587	048 36 362
Baía da Babitonga	26 16 111	048 48 606
Ilha dos Remédios	26 27 146	048 34 959
São Francisco	26 11 843	048 23 243
Barra do Rio Itajaí	26 54 531	048 36 895

### 4.2.3. Dados Meteorológicos

Os dados de temperatura do ar, velocidade e direção predominante dos ventos foram obtidos através de um anemômetro instalado na própria embarcação.

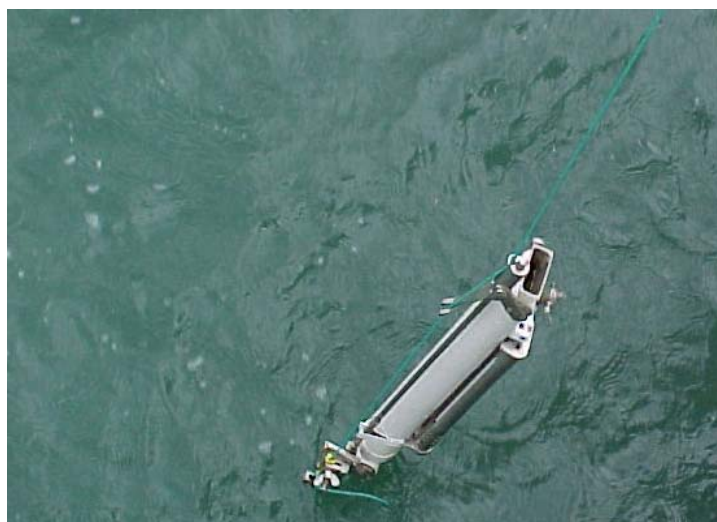


**Figura 5.** Navio de Pesquisa Oceanográfico Soloncy Moura-Cepsul/Ibama.

### 4.2.4. Coleta da Água

Para as coletas da água de sub-superfície até o fundo (5 m) foi utilizada uma garrafa de alumínio (Garrafa de Nansen) que é constituída de um cilindro com fechamento total das duas extremidades. Esta garrafa desceu aberta até a profundidade a ser amostrada e um dispositivo especial (mensageiro) foi

lançado ao longo do cabo, fechando a garrafa e aprisionando a água a ser amostrada (Figura 6).



**Figura 6.** Garrafa de Nansen utilizada para as coletas de água.

#### **4.2.5. Parâmetros Físico-Químicos**

Os parâmetros físico-químicos: oxigênio dissolvido ( $O_2$ ), temperatura e salinidade foram medidos “*in situ*”. O  $O_2$  foi medido com um oxímetro digital marca YSI modelo 55. Temperatura e salinidade foram medidas com um multianalisador marca Orion modelo 115. Além desta medição, a temperatura da água foi obtida com dois termômetros de inversão acoplados na própria garrafa de Nansen. A profundidade de penetração de luz na coluna d’água foi medida com disco de Secchi.

#### **4.2.5. 1. Nutrientes Inorgânicos Dissolvidos**

Para as análises dos nutrientes dissolvidos foram utilizadas, para cada nutriente, sub-alíquotas, retiradas das amostras, que foram filtradas em filtro de fibra de vidro Whatman 0,45µm de poro, em sistema a vácuo. Essas sub-alíquotas foram congeladas até o momento de cada análise. Do ponto de vista analítico, a filtração das amostras foi necessária, pois a alíquota filtrada estará, praticamente, livre de material em suspensão que perturba as análises espectrofotométricas. Para cada nutriente analisado foi preparada uma bateria de padrões crescente (curva padrão), a partir de uma solução estoque de alta concentração. As concentrações de nutrientes foram verificadas através de espectrofotometria na faixa de luz visível.

##### **4.2.5.1. 1. Amônia**

A amônia foi analisada seguindo o método colorimétrico de Nessler (APHA, 1992). 5 ml da amostra foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 0,5 ml de tartarato de potássio 50% e 1 ml de uma solução contendo iodeto de mercúrio, iodeto de potássio e hidróxido de sódio. Após 10 minutos a leitura foi realizada a 640 nm.

##### **4.2.5.1.2. Nitrato**

O nitrato foi analisado seguindo o método colorimétrico da Brucina (APHA, 1992). Em um tubo de ensaio contendo 0,03g de brucina a 2% foram colocados 1,5 ml da amostra. A mistura foi agitada, vagarosamente, e após



este período foram adicionados 5 ml de ácido sulfúrico P.A. A leitura foi realizada a 543 nm.

#### **4.2.5.1.3. Nitrito**

O nitrito foi analisado seguindo o método colorimétrico da sulfanilamida (APHA, 1992). Na amostra (5 ml) foram adicionados 0,5 ml de uma solução de ácido acético com ácido sulfanílico e 1 ml de uma solução de ácido acético com alfa-naftalamina. Após 10 minutos a leitura foi realizada a 550 nm.

#### **4.2.5.1.4. Fosfato**

O método utilizado para análise de fosfato foi o colorimétrico do molibdovanadofosfato (APHA, 1992). Foram adicionados 0,5 ml de molibdato de amônia e 0,02 ml de metavanadato de amônia em 5 ml da amostra. Após 15 minutos a leitura foi realizada em 750 nm.

#### **4.2.5.1.5. Silicato**

A quantidade de sílica presente nas amostras foi analisada seguindo o método do molibdosilicato (APHA, 1992). 5 ml da amostra foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 0,02 ml de molibdato de amônia. Após 5 minutos foram adicionados 0,4 ml de ácido clorídrico e 0,1 ml de metasilicato de sódio. A leitura foi realizada a 725 nm.

#### **4.2.6. Parâmetros Biológicos**

##### **4.2.6.1. Coliformes Totais e Fecais**

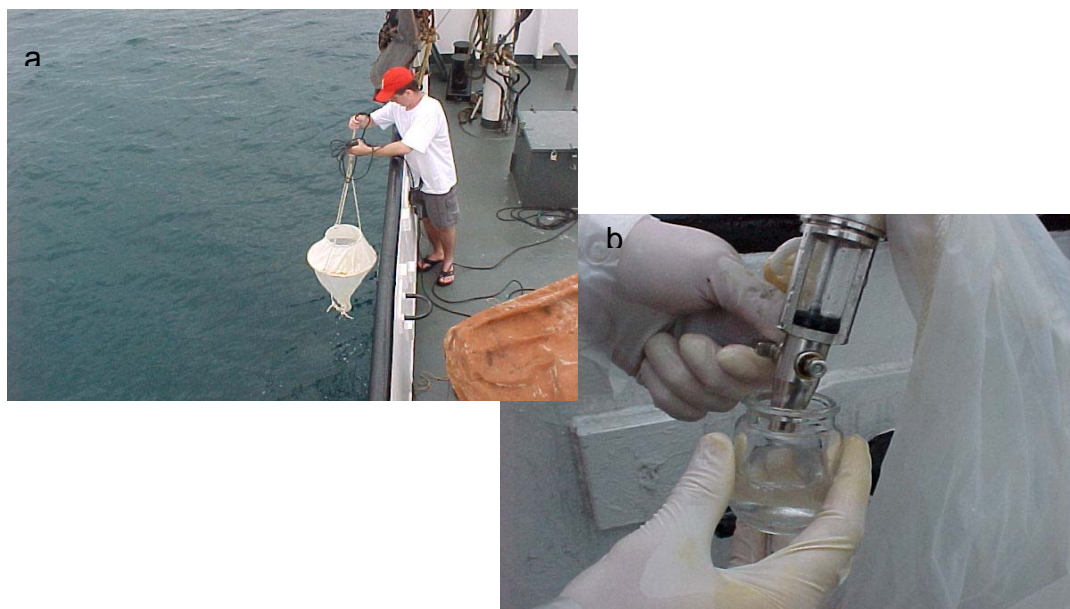
As amostras coletadas foram inoculadas, imediatamente, em meio de cultura e incubadas durante 18 horas a 35°C. O método utilizado para análise de coliformes totais e fecais foi o do Colilert.<sup>®</sup> Neste método os dois nutrientes indicadores, ONPG e MUG são as principais fontes de carbono e são metabolizados pelas enzimas  $\beta$ -D-Galactosidase e  $\beta$ -D-Glucuronidase identificando as bactérias coliformes totais e fecais, respectivamente. Os coliformes totais metabolizam o ONPG, e com isso a amostra incolor passa a amarela, enquanto que os coliformes fecais utilizam o MUG para gerar fluorescência quando a amostra é exposta à luz UV.

##### **4.2.6.2. Clorofila a (cla-a)**

A biomassa fitoplanctônica (teor de clorofila-a) foi estimada através de espectrofotometria utilizando o método descrito por Nusch (1980). As amostras da coluna d'água (250 ml) foram filtradas em filtro de fibra de vidro Whatman GF/F (0,45  $\mu$ m de poro) em sistema a vácuo. Os filtros foram colocados em tubos de ensaio contendo 10 ml de etanol 90%. O material foi colocado em banho maria, a uma temperatura de 75°C, por 5 minutos. Após ser resfriado, em água corrente, o material permaneceu, por 24 horas, sob refrigeração. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 665 nm, em cubeta de quartzo de 1 cm<sup>3</sup> de passo óptico.

#### 4.2.7. Amostragem de Fitoplâncton

As amostras para estudo do fitoplâncton foram obtidas com uma rede cilíndrica, com 25 $\mu$ m de abertura de malha. Os arrastos foram realizados horizontal e verticalmente à superfície, durante 5 minutos, com o barco em marcha constante e lenta (cerca de 1 nó). Após as coletas, as amostras foram acondicionadas em frascos de polietileno, devidamente etiquetadas e contendo formol neutro a 4% (Figura 7). A identificação das espécies foi realizada em microscópio invertido acoplado a um microcomputador com programa de análise de imagem (Image Pro Plus®) em lâminas de Sedgwick- Rafter.



**Figura 7.** Coleta de fitoplâncton: a) rede utilizada para coleta das amostras, b) amostra sendo acondicionada em formol 4%.

#### **4.2.8. Amostragem de Mexilhões**

Em cada local foram coletados 20 mexilhões (locais de cultivos e costões). Os mexilhões foram limpos externamente com auxílio de uma escova e abertos por meio de secção dos músculos adutores e suas glândulas digestivas (hepatopâncreas) foram cuidadosamente retiradas com auxílio de uma tesoura cirúrgica e bisturi. Os hepatopâncreas foram congelados para posterior análises.

#### **4.2.9. Extração das Toxinas dos Hepatopâncreas dos Mexilhões**

O procedimento de extração da toxina utilizado foi similar ao descrito por Yasumoto et al. (1980). Só foram analisados os mexilhões que foram coletados nos locais onde foi verificada a ocorrência de fitoplâncton tóxico. Foi utilizado 1g de hepatopâncreas de cada mexilhão, dos diferentes locais. Esse material foi transferido, separadamente, para recipientes contendo 4 ml de metanol. Após homogeneização, o material foi filtrado em papel filtro e cada extrato filtrado foi centrifugado (centrifuga marca ALC - modelo PK 120) por 10 minutos a 800g. Este procedimento foi repetido por 2 vezes. Foram adicionados 2,5 ml de diclorometano em cada sobrenadante que permaneceram evaporando, em banho-maria, a 60°C por 1h. Cerca de 1,5 ml de cada extrato restante foram dissolvidos em 4 ml de Tween 60 a 1%.

#### **4.2.10. Bioensaio com Camundongos**

A metodologia mais utilizada para quantificar a toxina em moluscos é o bioensaio com camundongos (Yasumoto *et al.*, 1984). Esta metodologia foi desenvolvida pelo Ministério Japonês de Saúde e Bem Estar e é realizada através da estimativa do tempo de sobrevivência dos camundongos após a inoculação intraperitoneal do extrato dos hepatopâncreas dos mexilhões. O resultado obtido é expresso em “mouse unit” (MU), que significa a quantidade de toxina capaz de matar um camundongo dentro de 24 horas. A toxicidade da amostra (MU/g de tecido) é determinada como a menor dose que mata dois ou mais camundongos, de cada três, em um período de 24 horas.

Para cada extrato analisado foram utilizados 3 camundongos machos pesando entre 25 a 30 gramas. Um (01) ml de cada extrato foi injetado, intraperitonealmente, em cada camundongo. Os animais foram mantidos em gaiolas a uma temperatura de 25°C com comida e água a disposição.

#### **4.3. Metodologia Parte 2: Alimentação dos mexilhões *Perna perna* com Dinoflagelado *Prorocentrum lima***

Após ser verificado que o dinoflagelado *P. lima* foi a espécie tóxica mais abundante nos pontos amostrados foi realizado estudo laboratorial para verificação do potencial genotóxico desse organismo em mexilhões *Perna perna*.

#### **4.3.1. Coleta de *Perna perna***

Os mexilhões utilizados nesta parte do estudo foram coletados na estação de cultivo experimental da Ilha de Ratores Grande, situada na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina (27°28'30"S/48°33'40" W), pertencente ao Laboratório de Cultivos de Moluscos Marinhos (LCMM)/UFSC. Nesta estação de cultivo, os mexilhões, sob a forma de sementes (organismos jovens com cerca de 2 cm de comprimento), são colocados em cordas que ficam amarradas a galões plásticos que servem como bóias, chamado de cultivo tipo espinhel. Após cerca de oito meses atingem o tamanho de, aproximadamente, 8 cm e são utilizados comercialmente.

Após a coleta os animais foram transferidos para um aquário de vidro, com dimensões de 75 cm x 50 cm x 50 cm. Neste aquário foram colocados 40 litros de água do mar filtrada e esterilizada por radiações ultravioletas, procedentes do LCMM. Os mexilhões foram mantidos neste aquário por um período de cinco dias para adaptação e tentativa de evitar a desova. O bloqueio da desova é importante para evitar o estresse dos animais que inclusive pode levá-los a morte.

Durante todo o período de adaptação os animais foram alimentados com algas diatomáceas *Chaetoceros* sp. cedidas pelo LCCM. Essas algas também foram utilizadas no experimento para alimentação do grupo controle laboratorial.

#### **4.3.2. Cultivo de *Prorocentrum lima***

Em um frasco fermentador foi adicionado 1 L de meio de cultura tipo K (Keller & Guillard, 1985), juntamente com 1 L de água do mar filtrada e esterilizada. Posteriormente, esta solução foi autoclavada, por quinze (15) minutos, a uma temperatura de 120°C. Em seguida, foram adicionadas, neste frasco as células de *P. lima*. O cultivo foi mantido sob temperatura controlada de 23±2°C e fraca aeração, porém constante. A iluminação foi mantida com luz fria, num total de 3000 Lux. Semanalmente, 500 ml de meio K e água do mar foram adicionados no cultivo, a fim de garantir o suprimento necessário para o crescimento dos organismos.

A concentração de *P. lima* foi monitorada através da contagem dos organismos em Câmara de Neubauer (1/10mm - 0,0025mm<sup>2</sup>) utilizando microscopia óptica a uma resolução de 10 x 100.

#### **4.3.3. Preparação das Soluções de *Prorocentrum lima***

Foi preparada uma solução-mãe com 1.900.000 cel/L de *P. lima*, através de diluições e contagem em câmara de Neubauer. A partir desta solução foram preparadas soluções com concentrações de 200 células de *P. lima*/L, 1000 células *P. lima* /L e 10.000 células *P. lima* /L. Essas concentrações foram diluídas com água do mar filtrada e esterilizadas com UV e estocadas em balões volumétricos. Esses balões foram totalmente recobertos por papel alumínio para evitar que os dinoflagelados continuassem crescendo, uma vez que a

presença de luz é essencial para este processo. Essas soluções serviram de alimentação para os mexilhões, conforme experimento descrito a seguir.

#### **4.3.4. Exposição dos Mexilhões**

Este experimento foi realizado em aquários de vidro com capacidade para 3 L, contendo 1 L de água do mar filtrada e esterilizada por UV. Esses aquários foram mantidos com aeração constante por todo período dos testes. Foram utilizados 5 grupos de 12 mexilhões, sendo um grupo considerado controle da natureza, outro grupo como controle laboratorial, e os outros três grupos experimentais.

O primeiro grupo foi utilizado como controle da natureza, ou seja, os animais foram coletados e, imediatamente, seus hemócitos foram retirados e as lâminas preparadas no local da coleta. O segundo grupo, considerado controle laboratorial, foi alimentado com algas não tóxicas *Chaetoceros* sp. No terceiro grupo, os mexilhões foram alimentados com uma solução de 200 células de *P. lima*/L. Nas mesmas condições experimentais, outro grupo recebeu uma solução de 1000 células de *P. lima*/L. Finalmente, o quinto grupo recebeu uma solução com 10.000 células de *P. lima*/L. A alimentação com *P. lima* somente foi oferecida nas primeiras horas do experimento. Após 24 e 48 horas, foram retirados os hemócitos dos mexilhões como descrito a seguir.



#### **4.3.4.1. Preparações Citológicas**

Para obtenção de hemócitos, individualizados, com citoplasma intacto e adequados à análise de micronúcleos e lesões nucleares foi utilizada a técnica de Kuhnen *et al.* (1997).

Para obtenção da hemolinfa, as valvas dos mexilhões foram abertas com a introdução de uma faca na região do bisso (ventral) e assim mantidas com o auxílio de uma pinça. Foi retirado 1 ml de hemolinfa do músculo adutor posterior, e mantida em 1 ml de uma solução de metanol e ácido acético (50:50 v/v) por 7 minutos. Para cada animal, foram realizados 4 esfregaços em lâmina de microscopia e fixados em metanol (PA) por 10 minutos. A coloração dos esfregaços foi realizada pelo método Feulgen-Fast-Green (Beçak & Paulete, 1976).

#### **4.3.4.2. Análise Citogenética**

A análise citogenética foi realizada em microscópio óptico (Olympus BX40 acoplado a um microcomputador Maxtech - Pentium 100 com um programa para análise de imagem - Image Pro Plus) a uma resolução de 10 x 100. O critério adotado para identificar os micronúcleos (MN) foi o mesmo utilizado por Carrano *et al.* (2002) que define o MN como inclusões citoplasmáticas esféricas, apresentando contorno definido, com diâmetro de 1/10 a 1/3 em relação ao núcleo, com coloração e estrutura similar ao mesmo.

O critério para análise das lesões nucleares (LN) seguiu recomendações de Fenech *et al.* (2003) que considera as lesões nucleares como corpos

nucleoplásmicos aderidos ao núcleo e corpos nucleoplásmicos em forma de ponte. Para cada grupo 1000 hemócitos foram contados e registrados quanto ao aparecimento de micronúcleos ou lesões nucleares

#### **4.4. Metodologia Parte 3: Determinação da Citotoxicidade e Genotoxicidade de Toxinas Marinhas através de Técnicas Bioquímicas e Moleculares.**

Esta parte do trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Toxicologie e Hygiène Appliquée, Faculté de Pharmacie, Université Bordeaux 2 - França, sob a orientação do Professor Dr. Edmond Ekué Creppy.

A qualificação do fitoplâncton realizada na primeira parte deste estudo mostrou que a grande maioria das microalgas tóxicas, encontrada no litoral de Santa Catarina, pode produzir três tipos de toxinas: ácido ocadáico, ácido domóico e saxitoxina. Por este motivo, foi verificada a citotoxicidade e genotoxicidade destas toxinas em cultura de célula humana.

A saxitoxina não foi incluída neste estudo, pois sua possível utilização como arma química impediu sua importação dos Estados Unidos.

##### **4.4.1. Cultura Celular**

As células Caco-2 (linhagem de células de adenocarcinoma<sup>7</sup> de intestino grosso humano) foram obtidas do Dr. Jing Yu, Tufts School of Medicine (Medford, Mass-USA). A cultura celular foi mantida em atmosfera úmida com

95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. As células foram crescendo em meio Dubelco's (DMEM) (Sigma-França) suplementado com 4% de L-glutamina (8mM), 1% de antibióticos (100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina) e 10% de soro bovino fetal.

#### **4.4.1. Repicagem e Contagem Celular**

A repicagem da cultura celular foi realizada a cada 48 horas. O tapete celular foi lavado com PBS e uma mistura de tripsina (0,5mg/ml) e EDTA (0,2mg/ml) (Sigma, França). As células foram recuperadas por centrifugação 600g, durante 5 minutos. Após a eliminação do sobrenadante, as células foram colocadas em suspensão por homogeneização do meio de cultura. Uma alíquota de 100µl da suspensão celular foi misturada a 900µl do meio de cultura DMEM e a 20µl do corante azul de tripan (0,4%). Duas gotas dessa mistura foram colocadas em lâmina de Neubauer para contagem em microscópio invertido. Esta contagem permite determinar as diluições que deverão ser efetuadas para a inoculação de novas culturas celulares.

---

7. Tumor maligno originado em tecido epitelial de tipo glandular, e em que as células tumorais se dispõem de modo a reproduzir, grosseiramente, o aspecto de glândulas das mucosas normais.

#### **4.4.2. Toxinas**

O ácido ocadáico (PM 805) (Sigma, França) foi solubilizado em etanol PA e o ácido domóico (PM 311,3) (Sigma, França) foi solubilizado em água MilliQ.

#### **4.4.3. Testes de Citotoxicidade**

##### **4.4.3.1. Teste do MTT**

O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT (3-4,5-dimethylthiazol 2,5-diphenyltetrazolium bromide) pelas células sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado Formazan. A succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, é capaz de transformar o MTT que é de cor amarela em cristais de formazan, que são de cor escura. Esta capacidade somente as células viáveis possuem indicando atividade mitocondrial e conseqüente viabilidade celular (Denizot & Lang, 1986).

As células Caco-2 ( $1 \times 10^5$  cels/ml) foram colocadas em microplacas de 96 poços, contendo 200 $\mu$ l de DMEM/poço e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período de crescimento celular, as células foram tratadas com as concentrações de 15, 30, 60 e 100ng/ml de ácido ocadáico e com as concentrações de 30, 60, 100, 200 e 300ng/ml de ácido domóico, com sete réplicas por concentração. Para os grupos controles, foram utilizados seus respectivos solventes. As células foram mantidas em incubação por 72 horas e após este período, as células foram lavadas com 100 $\mu$ l de PBS. Uma solução (200 $\mu$ l) de 0,5mg/ml de 3 MTT foi adicionada em todas as concentrações e,

novamente, as células foram incubadas a 37°C por 3 horas, tempo necessário para a redução do MTT. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância correspondente a cada amostra foi medida no leitor de placas (Microplate Autoreader – MR 4000, Dynatech – France) a 570 nm. A absorbância considerada foi proporcional ao número de células viáveis.

#### **4.4.3.2. Teste do Vermelho Neutro (Neutral Red)**

Este teste determina a integridade da membrana lisossômica. Os compartimentos lisossômicos apreendem e acumulam substâncias tóxicas que podem afetar a integridade funcional das células. O corante vermelho neutro penetra na membrana celular das células viáveis, difundindo-se e concentrando-se nos lisossomos. Este ensaio permite a distinção entre células viáveis e células mortas, baseado na capacidade que os lisossomos apresentam em absorver o corante. O tempo de retenção do corante dentro dos lisossomos das células intoxicadas é, significativamente, mais reduzido quando comparado com células controles (Gad & Weil, 1982).

As células Caco-2 ( $1 \times 10^5$  cels/ml) foram colocadas em microplacas de 96 poços, contendo 200µl de DMEM/poço, incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, as células foram tratadas com as concentrações de 15, 30, 60 e 100ng/ml de ácido ocadáico e com as concentrações de 30, 60, 100, 200 e 300ng/ml de ácido domóico, com sete réplicas por concentração. Para os grupos controles, foram utilizados seus respectivos solventes. Após incubação por 72 horas, os meios foram descartados e as células foram lavadas com 150µl

de PBS. 150µl do corante vermelho neutro foram adicionados, em cada concentração, e as células foram, novamente, incubadas por 4 horas. As células foram lavadas em PBS e uma solução de ácido acético/etanol 50% (1:99 v/v) foi adicionada em cada concentração e mantida sob agitação por 15 minutos. A leitura dos resultados foi realizada em 540nm com leitor de microplacas autoreader.

#### **4.4.3.3. Teste do Azul de Tripán (Blue Trypan)**

A viabilidade das células foi medida pelo teste de exclusão do azul de tripan. As células Caco-2 ( $1 \times 10^5$  cels/ml) foram inoculadas em microplacas de 6 poços, contendo 2ml de DMEM/poço e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, as células foram tratadas com concentrações de 15, 30, 60 e 100ng/ml de ácido ocadáico e com as concentrações de 30, 60, 100, 200 e 300ng/ml de ácido domóico, com duas réplicas por concentração. Para os grupos controles foram utilizados seus respectivos solventes. Após a intoxicação, as células foram incubadas por 24 horas a 37°C. Ao término deste período, uma pequena alíquota de 20µl da suspensão celular foi misturada com 180µl do corante azul de tripan (0.4%). As células viáveis que excluíram este corante foram contadas na câmara de Neubauer (0,100mm) em microscópio invertido (Olympus BX40) (Loveland *et al.*, 1992).

#### **4.4.4. Testes de Genotoxicidade**

##### **4.4.4.1. Extração do DNA Total**

Para isolar o DNA das células Caco-2, tratadas com 15, 30, 60 e 100ng/ml de ácido ocadáico e ácido domóico, por 24 horas, foi utilizado Kit de purificação de DNA genômico (Promega, França). As células intoxicadas foram transferidas para tubo de microcentrifugas (Eppendorf), lavadas em PBS e centrifugadas a 13000 g. Foram adicionadas uma solução de lise (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCL pH 8,0 e 0,5% de Duodecil Sulfato de sódio-SDS) e uma solução de Rnase. As células foram incubadas a 37°C por 30 minutos e logo após, o material foi centrifugado a 13000 g por 15 minutos. Com auxílio de uma pipeta, o sobrenadante foi transferido para outros frascos de microcentríifuga, tomando o cuidado para não transferir nada do precipitado. O DNA foi precipitado com 200µl de isopropanol gelado. Os tubos foram novamente centrifugados a 13000 g, por 20 minutos, em microcentrífuga refrigerada (5°C). Após a centrifugação todo o sobrenadante foi retirado e nesta fase, o DNA já era visível como um precipitado escuro no fundo do frasco. Foram adicionados 200µl de etanol 70% e centrifugados a 13000 g por 5 minutos. Após retirado o sobrenadante, os tubos ficaram abertos por cerca de 30 minutos, para a total evaporação do álcool. Após este período, o DNA foi dissolvido em 100µl de Tampão TE (100 mM Tris-HCL ph 8,0 e 10 mM EDTA pH 8,0). O DNA total foi quantificado em espectrofotômetro (Unican 8625 - UV/Vis) usando a taxa de absorbância de 260/280 nm.

#### **4.4.4.2. Separação dos Fragmentos de DNA por Eletroforese**

Para eletroforese foram utilizados os DNA das células tratadas com as diferentes concentrações dos ácidos ocadáico e domóico, como citado anteriormente. A avaliação qualitativa da fragmentação do DNA foi realizada por eletroforese em 1% de gel de agarose e visualizada pela coloração com brometo de etídio. A eletroforese foi realizada em uma cuba de eletroforese horizontal (H4 - Life Technologies - Gibco BRL). A placa de acrílico contendo o gel foi colocada na cuba e coberta com 1000 ml de tampão TBE (1M Tris-HCL pH 8,0, 0,1 mM EDTA e 0,1 M ácido bórico). Depois da aplicação das amostras, a cuba foi conectada a uma fonte (250 EX – Life Technologies - Gibco BRL), e ajustada para 60 volts por 40 minutos. O material foi revelado em um transiluminador de luz UV (TFX 35M - Vilber Lourmat) e fotografado com filme polaroide (Sigma, França).

#### **4.4.4.3. Teste do Cometa**

O teste do cometa (pH>13) foi realizado conforme descrito por Singh *et al.* (1988). As células Caco-2 foram incubadas em multiplacas com 6 compartimentos em 3 ml de DMEM. Depois de tratadas com as diferentes concentrações (15, 30, 60 e 100ng/ml) dos ácidos ocadáico e domóico e mantidas em incubação a 37°C, 5% CO por 24 horas, as células foram lavadas, rapidamente, em PBS e tripsina e centrifugadas a 2000 g por 2 minutos. O sedimento (pellet) foi ressuspensionado em PBS e, no final, uma densidade celular de  $1 \times 10^5$  cels/ml foi utilizada para o teste do cometa. Uma suspensão de



células (100µl) foi misturada a 120 µl de agarose LMP (Low Melting point 0.75%) em PBS. 150µl dessa mistura foram colocados sobre as lâminas microscópicas, que já continham 1.5% de agarose NMP (Normal Melting point). As lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise por 1 hora. Após serem retiradas desta solução, as lâminas foram lavadas em PBS e colocadas na cuba de eletroforese. A eletroforese foi processada de acordo com protocolo padrão, usando um tempo de denaturação alcalina de 40 minutos e eletroforese de 1.6 V/cm e 300mA. As lâminas foram codificadas e coradas com brometo de etídio. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência (Helmut Hund GmbH, HS500, Wetzlar, Germany) conectado a uma câmera e um sistema de vídeo (Cohu, CCD, Japan). Para cada célula, o tamanho do cometa (definido como o diâmetro do núcleo somado ao tamanho do DNA migrado) foi quantificado com auxílio de um software (Komet 5.5 – Leading DNA damage analysis software).

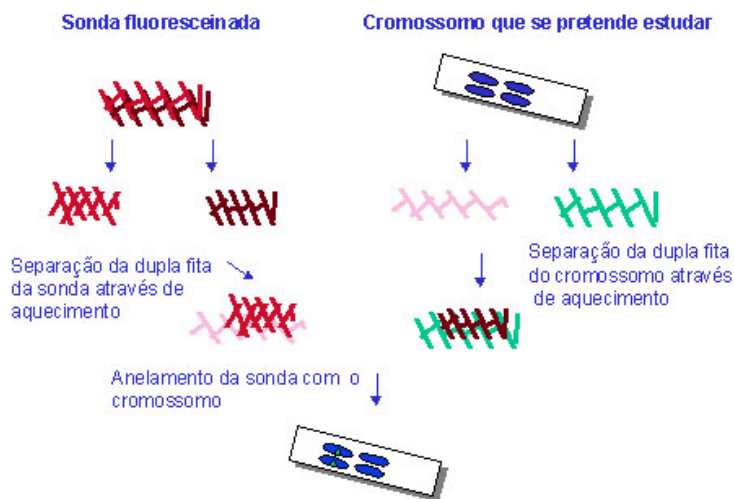
#### **4.4.4.4. Teste do Micronúcleo**

As células Caco-2 ( $1 \times 10^5$  cels/ml) foram inoculadas em frascos de cultura celular de 30 ml, contendo 5 ml de DMEM e incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. Depois de tratadas com as concentrações de 15, 30, 60 e 100ng/ml dos ácidos oadáico e domóico, por 24 horas, as células foram centrifugadas (800 g/5min). Os sobrenadantes foram descartados e 5ml de uma solução hipotônica de cloreto de potássio (KCL 0,075M) foram adicionados, vagorosamente, pela parede do tubo. Novamente, as células foram

centrifugadas (800g/5min) e fixadas com metanol/ácido acético (3:1) por 20 minutos. O procedimento de fixação foi repetido por duas vezes. Para a observação microscópica, as lâminas foram confeccionadas com duas gotas da suspensão celular e coradas com acridine orange (Sigma, França). Esta análise foi realizada em microscópio de fluorescência (Helmut Hund GmbH, HS500, Wetzlar, Germany) conectado a uma câmera e um sistema de vídeo (Cohu, CCD, Japan). Para determinar a frequência de células micronucleadas foram analisadas 1000 células por concentração.

#### 4.4.4.5. Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

A hibridização *in situ* é uma metodologia utilizada para a visualização de seqüências definidas de ácidos nucleicos (DNA/RNA), em preparações celulares, através da hibridização de seqüências complementares (Sonda). O princípio básico é a ligação (anelamento) específica entre as duas seqüências (Figura 8) (Spector *et al.*, 1998).



**Figura 8.** Esquema representativo da Hibridização *in situ* por fluorescência.

O FISH foi realizado utilizando-se uma sonda centromérica para todos os cromossomos (Concentrated Human Pan-Centromeric Chromosome Probe - Star FISH - Cambio -UK). As lâminas utilizadas no FISH foram as mesmas preparadas para o micronúcleo, as quais foram mantidas congeladas por uma semana, antes de serem hibridizadas. As lâminas contendo as preparações foram lavadas em PBS gelado e tratadas com pepsina 10% (Sigma) por 5 minutos e, em seguida, com 10mM de HCl por 10 min a 37°C. O material foi fixado em 3% de formaldeído (Sigma, France) em PBS. As lâminas foram desidratadas em uma bateria de álcool crescente (80, 90, 95%). A desnaturação do DNA foi realizada em formamida 70% (Sigma) em citrato de sódio salino (SSC) a 70° C por 2 min e, novamente, foram desidratadas na mesma bateria de álcool.

Uma mistura da hibridização contendo a sonda (2.5µg/ml) e DNA de esperma de salmão (500µg/ml) (Salmon testes DNA, Sigma) foi desnaturada a 80°C por 5 min e, imediatamente após, colocada no gelo por 4 min. Para cada lâmina foi utilizada uma alíquota de 12,5µl da mistura e logo após, a hibridização foi realizada por 16 h a 37°C em câmara úmida. Depois da incubação, as lâminas foram lavadas em SSC e Tween 20 por 10 minutos. Novamente, as lâminas foram incubadas com um agente bloqueador (5% leite em pó em SSC) a 37°C por 10 min. Após esta incubação, as lâminas foram lavadas em SSC e cobertas com uma diluição de 1:250 de um anticorpo antibiotina (Sigma) e incubadas a 37°C por 30 min. Depois de lavadas,

novamente em Tween 20, as lâminas foram incubadas com um anticorpo (conjugated antimouse antibody – sigma) por 30 min a 37°C.

Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida e foram seguidas de lavagem em Tween-20. Depois de última lavagem as lâminas foram coradas com iodeto de propídio (5µg/ml, Sigma). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência (Helmut Hund GmbH, HS500, Wetzlar, Germany) conectado a uma câmara e um sistema de vídeo (Cohu, CCD, Japan). Para cada concentração foram analisados 100 micronúcleos contendo um ou mais sinais centroméricos.

#### **4.4.4.6. Coloração com Acridine Orange e Brometo de Etídio**

As células Caco-2 foram cultivadas em placas de 6 compartimentos com uma densidade celular de  $2 \times 10^5$  cells/ml por 24h. Após este período, as células foram incubadas com as concentrações de 15, 30, 60 e 100ng/ml de ácido ocadáico e domóico. As células foram centrifugadas (1000g) e 2 gotas da suspensão celular foram colocadas sobre a lâmina e, rapidamente, coradas com 1µl de uma mistura de acridine orange (100µg/ml) e brometo de etídio (100µg/ml) (Sigma, França). As células foram analisadas em microscópio fluorescente (Helmut Hund GmbH, HS500, Wetzlar, Germany) conectado a uma câmara e a um sistema de vídeo (Cohu, CCD, Japan). Para cada concentração 100 células foram contadas, e a porcentagem de células mortas (apoptose) foi determinada.

#### **4.4.4.7. Técnica da reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR)**

A técnica do RT-PCR empregando oligonucleotídeos foi utilizada para amplificação e detecção dos genes *bax* e *bcl2*, em células Caco-2, expostas aos ácidos ocaídico e domóico. Nesta técnica, inicialmente o RNA total isolado da amostra é convertido em seu DNA complementar (cDNA). A seguir o cDNA é amplificado através da PCR com iniciadores (primers) específicos para o gene de interesse. A quantidade de cDNA reflete a quantidade de RNA mensageiro o qual, por sua vez, reflete o grau de ativação do gene.

##### **4.4.4.7.1. Extração e Purificação do RNA Total**

Para extração do RNA Total foi utilizado Kit Promega (High Pure RNA Isolation Kit). As células Caco-2 ( $1 \times 10^6$  cels/ml) foram incubadas em multiplacas de 6 poços com volume total de 3 ml a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após este período, as células foram tratadas com as concentrações de 15, 30 e 60 ng/ml de ácido ocaídico e de 30, 60 e 100ng/ml de ácido domóico e incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. A células foram lavadas em PBS gelado e colocadas em um microtubo contendo 175µl de tampão de lise (SV RNA lysis - Promega). Neste mesmo tubo, foram adicionados 350µl de uma solução de diluição do RNA (SV RNA dilution-Promega) e misturados por inversão do tubo. A mistura foi colocada a 70°C por 3 minutos e o material foi centrifugado por 10 minutos a 13000g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram adicionados 200µl de etanol 95%. O material, novamente, foi

centrifugado por 2 minutos a 13000g. Ao sedimento (pellet) foram adicionados 600µl de uma solução SV RNA Wash (Promega) e centrifugados a 12000 g. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200µl de uma solução de SV Dnase Stop (Promega) e centrifugados a 13000 g por 2 minutos. Por fim, foram adicionados ao pellet 100µl de nuclease free water (promega), centrifugado a 13000g por 1 minuto. O RNA purificado foi estocado a 20°C até sua utilização. O RNA foi quantificado por espectrometria a 260/280nm.

#### **4.4.4.7.2. RT-PCR**

Para a reação da transcrição reversa foi utilizado 1µg do RNA total extraído das células Caco-2, conforme mencionado acima, que permaneceu a 70°C por 10 minutos. Após este período, foram adicionados 20µl de uma solução contendo (cloreto de magnésio, dNTP, AMV reverse transcriptase, oligo(dT primer e nuclease free water - Promega). Esta solução foi incubada a 42°C por 15 minutos e 95°C por 5 minutos. Obtendo-se com isto, o DNA complementar (cDNA).

O cDNA foi diluído em 100µl de tampão TE (Promega) para amplificação. Em seguida foram preparados 50µl de uma solução de amplificação contendo: 20µl de cDNA, 10 mM dNTPs, 25 mM de cloreto de magnésio, 50 pmol de F-bax1, 50 pmol Rbax-2, 50 pmol Fbcl2-1, 50 pmol Rbcl2-2 e 2.5 unidades de Taq DNA polimerase. As condições da amplificação foram de 35 ciclos para todos os primers (Bax primer: inicializador ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTC,

Inverso: ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC e bcl2 Inicializador:  
TGACCTGACGCCCTTAC, Inverso: AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG).

O resultado da amplificação foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados pela coloração de brometo de etídio em um transiluminador de luz UV (TFX 35M – Vilber Lourmat) e fotografado com filme polaroide (Sigma, França).

## **6. Análise dos Dados**

A avaliação estatística para os dados do monitoramento da qualidade da água foi realizada através de média e desvio padrão e analisados por Student's t-test.

A avaliação estatística dos ensaios de citotoxicidade foi obtida através dos valores médios dos experimentos e suas réplicas e foram expressos em média e desvio padrão e analisados por Student's t-test.

Para os teste de genotoxicidade os dados foram comparados utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Para as análises do FISH as diferenças entre as medias e as porcentagens de centrômero positivo e negativo foram avaliadas pelo teste não paramétrico Mann-Whitney.

O nível de significância considerado, para todos os teste, foi de  $P < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Artigo 1: Water Quality and Occurrence of Toxic Phytoplankton in the Coast of Santa Catarina, Brazil

Carvalho Pinto-Silva, C.R<sup>1</sup>.; Schmitt, F. <sup>1</sup>; Vieira, F.C.S. <sup>1</sup>; Moser, M.<sup>1</sup>; Hoinaski, L<sup>1</sup>.; Pereira, N.C. <sup>2</sup> Rodrigues, A.M.T. <sup>3</sup>; Costa, R.H.R. <sup>1</sup> and Matias, W.G. <sup>1\*</sup>

1. Department of Environmental Engineering - Toxicological Laboratory of the Federal University of Santa Catarina – Brazil.

2. Department of Chemistry Engineering of the Federal University of Santa Catarina - Brazil

3. Brazilian Environmental Institute- CEPSUL- IBAMA / MMA

Corresponding author. Address: Laboratório de Toxicologia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFSC –Campus Universitário, 88010-970, Florianópolis, SC, Brazil. Tel: +55-48-3319597; Fax +55-48-3319823  
E-mail address:will@ens.ufsc.Br (W. G. Matias)

#### **Abstract**

The world's oceans teem with countless single-celled algae called phytoplankton. Among the thousands of living species are a few dozen that produce potent toxins or that cause harm in the other way. Impacts from the bloom of this tiny organism are many and diverse, ranging from the death or illness of humans, whales or the marine animals to discoloration of the water and fouling of beaches with foam and dead fish. The aim of this work is to provide current information of the spatial and temporal distribution of potentially toxic phytoplankton species and water quality in coastal waters of Santa Catarina. Our results showed that in general, all water quality parameters reported here are according to regulatory limit of Brazilian legislation (Conama 20/1986) except the values of phosphate and total and fecal coliform. The results of toxic phytoplankton analysis showed that Santa Catarina requires a comprehensive monitoring programme, because most known toxic phytoplankton are present in its waters.

**Keyword: Water quality, toxic phytoplankton, monitoring**



## 1. Introduction

The world's oceans teem with countless single-celled algae called phytoplankton. Among the thousands of living species are a few dozen that produce potent toxins or that cause harm in the other ways (Anderson et al, 2001). Impacts from the bloom of this tiny organism are many and diverse, ranging from the death or illness of humans, whales or the marine animals to discoloration of the water and fouling of beaches with foam and dead fish (AOAC, 1991).

The phytoplankton requires certain major and minor nutrients for their nutrition. These can be supplied either naturally from marine process, or through human activities, such as pollution. One of the explanations given for the increased incidence of toxic algae bloom outbreaks worldwide is that these events are a reflection of increased pollution and nutrient loading in coastal waters (Smayda, 1990).

The importance of macronutrient (N, P, Si) concentration ratios in controlling phytoplankton biomass and growth rates is an open question in relationship with eutrophication phenomena. Nitrogen is considered the most common limiting nutrient in the oceans and phosphorus in freshwaters (Figueras et al, 1998). However, in some marine areas, phosphorus appears to be the main limiting nutrient (Fraga, 1996). In marine waters, high phosphate concentrations relative nitrate are supposed to favour nitrogen fixation, while low phosphate concentrations relative nitrate have been associated with decrease bacterial activity and increase excretion of organic matter which could lead to noxious mucilage accumulations (Estrada et al, 1996).

Harmful algal bloom can be classified into three major groups, attending the problems they cause. The first group is formed by non-toxic species, which discolour the water. However, under some conditions the growth is so high that it generates anoxic conditions resulting in indiscriminate killing of both fish and invertebrates. Examples of dinoflagellates that cause these problems are *Gonyaulax* and *Noctiluca* (Hallegraeff, 1995).

A second group, some algal species can seriously damage fish gills, either mechanically or through production of hemolytic substances. Examples of species that cause these problems are *Gymnodinium mikimotoi*, *Chaetoceros convolutes*, etc.(Yasumoto et al, 1989).

A third group is integrated by those species which produce potent toxins which can find their way through the food chain to humans, causing a variety of gastrointestinal and neurological illness (Daranas et al, 2001). Such toxins are classified according to its chemical characteristics or simptomatology into 4 groups. The first group is formed by diarrheic shellfish poisoning (DSP) the causative organism are *Dynophysis sp.* and *Prorocentrum lima*, the main toxin produced is okadaic acid (Yasumoto et al, 1980).

The second group is formed by paralytic shellfish poisoning (PSP) the causative organisms are *Alexandrium sp* and *Gymnodinium catenatum*. In this group, the toxin produced is saxitoxin (Shimizu et al, 1984). The third group is integrated by amnesic shellfish poisoning (ASP), the causative organism is *Pseudo nitzschia sp.* The toxin produced is domoic acid (Wright et al., 1989).

Finally, the last one group is neurotoxic shellfish poisoning (NSP), the causative organism *Gymnodinium breve* and toxins produced brevetoxins (Lin et al., 1981)

The occurrence of some potentially toxic dinoflagellates and the information a massive intoxication occurred in Florianópolis, Santa Catarina (Brazil) in 1990 led us to suspect of recurrent toxins in the region (Proença et al, 1998). The main factor, which led us to start to deal with the phycotoxins issue, was the activity of mussel culturing. The Santa Catarina coast is located in southern Brazil and your coastal waters are intensively utilized for mussel aquaculture industry. The activity was introduced in the region in 1987 as an alternative for artesian fishermen to minimize negative effects caused by fall in capture fish. The first successful culture, at a small bay close to Florianópolis, several areas have spread along the northern coast of Santa Catarina state (ACAQ, 2003). According to the statistics in 2002, the total production of coastal aquaculture in Santa Catarina was 11.000 tons. This state is

responsible for 93% of the total production aquaculture in Brazil (Epagri, 2004). The main cultured species in Santa Catarina are the native mussel *Perna perna*.

The aim of this work is to provide current information of the temporal distribution of potentially toxic phytoplankton species and water quality in coastal waters of Santa Catarina.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Study Area**

Santa Catarina lies between coordinates 25° e 29° south latitude of the chance between tropical and tempered regions. This study was performed in Twenty one (21) locations in the Santa Catarina coast. The samples were collected all sites monthly for a 12 month period from August 2002 to August 2003.

### **2.2. Water samples**

The water samples were collected in aluminium bottles (Nansen Bottles) and analyzed for ammonium, nitrite, nitrate, phosphate and silicate according to the methods of Standard Methods (1998). The chlorophyll a was analyzed by spectrophotometer according to the methods of Nush (1980). The total and fecal coliform bacteria analyses were obtained according methods Colilert®.

Dissolved oxygen and salinity were measures using oximeter and salinometer. Water temperature was obtained from inverse thermometers fitted in Nansen bottles.

### **2.3. Phytoplankton Samples**

The phytoplankton samples were collected by vertical and horizontal plankton net (25µm) hauls for qualitative analysis. Net samples were preserved in 4% formaldehyde solution. Phytoplankton counts were done by the Uthermöhl technique after sedimentation of 20ml samples.

## **2.4. Mussel Samples**

Samples of 20 mussels (7-8 cm long) were collected from 10 sites bay in long line system and 11 site beach. This culture system used is a suspended method, where individuals fixed on a vertical rope, sustained by buoys attached to a long horizontal line. The hepatopancreas of the mussels were excised and then frozen until their analysis.

## **2.5. Toxin extraction for the mouse bioassay**

The toxin extraction was performed following method described by Yasumoto et al (1984). A portion of homogenate (1g) prepared from the hepatopancreas of mussels was blended with 80% methanol and centrifuged. A portion (2.5 ml) of the supernatant was extracted twice with the equal volume of dichloromethane. The fat-soluble extract was dissolved in 0.2 N NaOH in 90% methanol and refluxed at 60°C for 1h.

## **2.6. Mouse Bioassay**

Mouse bioassay was performed following method described by Yasumoto et al (1984). Three Swiss mice, weighing from 20 –25 g were injected intraperitoneally with 1ml of the extract in Tween 80% water fraction.

The toxicity of each extract is given as mean survival time based on time from i.p. administration of extract, to death of two mice within 24 h.

## **3. Results**

### **3.1 Physical-chemical and biological conditions**

The mean concentrations at each sampling sites for nitrite, nitrate and silicate are present in Fig 1. In each case, the bars represent the mean of 12 monthly observations. The results of nitrate, nitrite and silicate analysis showed that all sampling sites are in accordance with brazilian legislation that limit at nitrate and nitrite concentrations for seawater, utilized aquaculture in 0.70mg/L and 0.20mg/L, respectively. The higher concentration of nitrate was observed in Penha beach (0.46mg/L) during summer months and low

concentration in Laguna beach (0.15mg/L) during winter months. The higher concentration of nitrite was observed in Ratonés island (0.20mg/L) during winter and low concentration was observed in Arvoredo island (0.01mg/L) during winter months.

High concentrations of silicate (0,92mg/L) were found in (Barracaiaca bay, Penha beach and BarraItajaí estuary) and low concentration was observed in Laranjeiras beach (0.12mg/L).

The mean concentrations at each sampling sites for ammonium and phosphate are present in Fig 2. In each case, the bars represent the mean of 12 monthly observations. The results of ammonium concentration indicate that all sampling sites are in accordance with brazilian legislation (Conama 357/2005) that limit the ammonium concentration for seawater utilized from aquaculture production in Brazil in 0,70mg/L. The phosphate analyses reported here showed increase phosphate concentration in all sampling sites. According to brazilian legislation the regulatory limit for phosphate concentration for seawater utilized from production aquaculture in the Brazil is 0.093mg/L.

Dissolved oxygen, water temperature, salinity, chlorophyll a and Secchi disc depth at all sampling sites are shown in Fig.3. The results of dissolved oxygen are accordance with brazilian legislation that limit at oxygen concentrations for seawater, utilized aquaculture in 6 mg/L.

Fluctuation of water temperature was higher ranging from 26.5°C from summer and 18.5°C from winter with the maximal observed in summer 2003 at Penha beach (28.5°C). A seasonal trend of high temperature during the dry season and low temperatures during wet season was evident.

Salinity ranged between 31.9‰ during summer and 30.5‰ during winter. Our results clearly indicate salinity high and low values in Santa Catarina coast. The beach sites usually consisted of open water and higher values salinity concentrations are observed, however in small bay low values salinity are observed. The results obtained from the salinity are in accordance with brazilian legislation that limit at salinity for seawater, utilized aquaculture higher 30‰ and 0.5 at 30‰ for small bay and estuary. The magnitude of

seasonal changes in salinity reflected the duration and intensity of the wet and dry seasons.

A major chlorophyll-a concentration peak was observed in Laguna beach during summer months. In the winter and autumn months was observed a minor chlorophyll-a peak (BarraCaiacanga bay, Ratones island and Arga beach).

The results of transparency of water (Secchi disc depth) were much different in some sites, ranging 7.46 cm in Campeche island during autumn and 0.6 cm in BarraItajaí estuary during winter. In general, the beach site showed oceanic characteristics with observed in the results

The results obtained from the total and fecal coliform bacteria analyses are shown in Table 1. All sampling sites a significant increase of total and fecal coliform was observed. According to brazilian legislation (Conama 357/2005) the regulatory limit for total and fecal coliform bacteria concentration for seawater utilized from production aquaculture in the Brazil is 44NMP/100ml. However, only four sites (Campeche island, Corais island, Arvoredo island and 3 Irmãs island) were observed fecal coliform concentration bellow the regulatory limit brazilian legislation during winter.

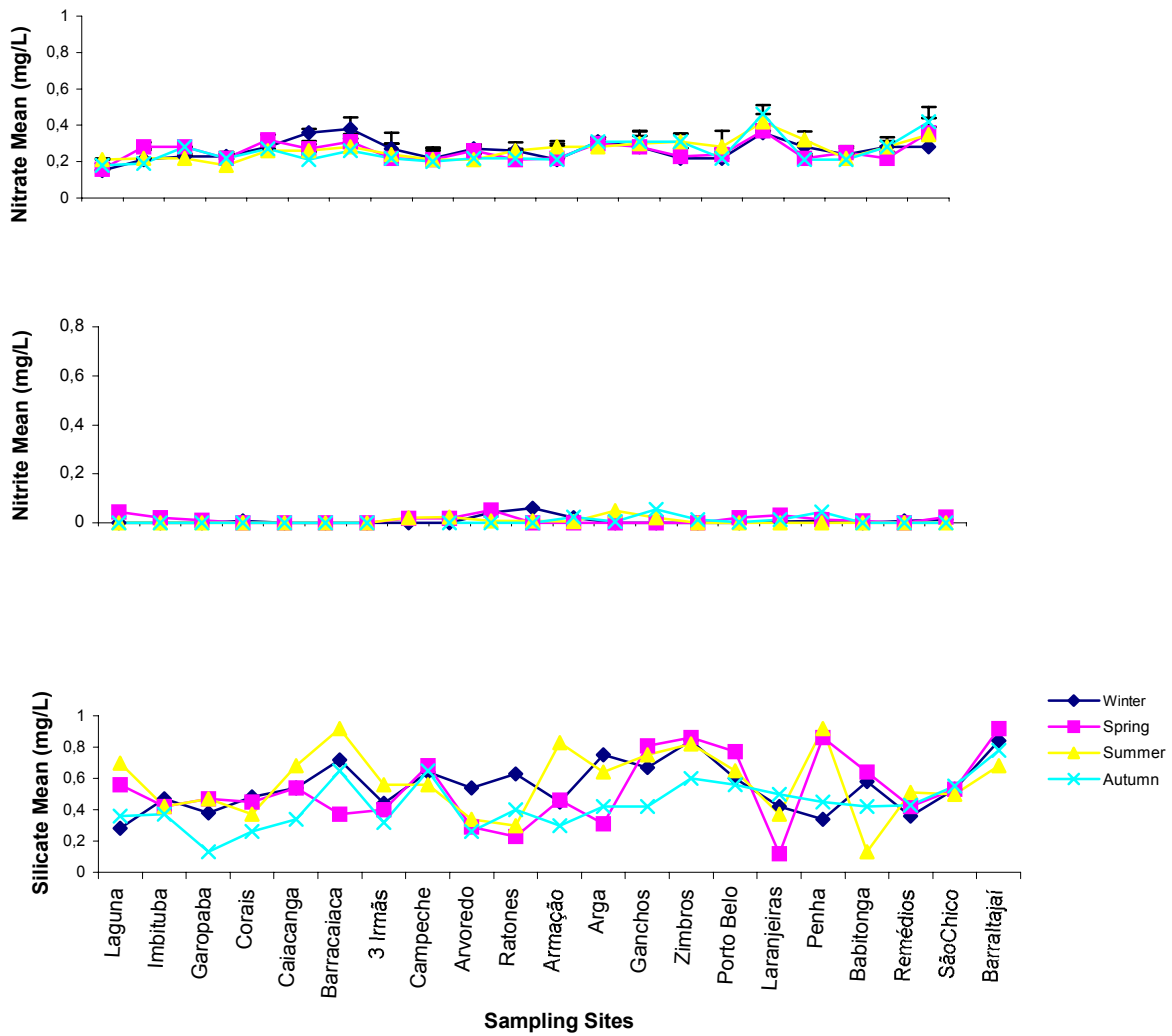


Figure 1. Nitrate, nitrite and silicate means of the sampling sites of Santa Catarina Coast.

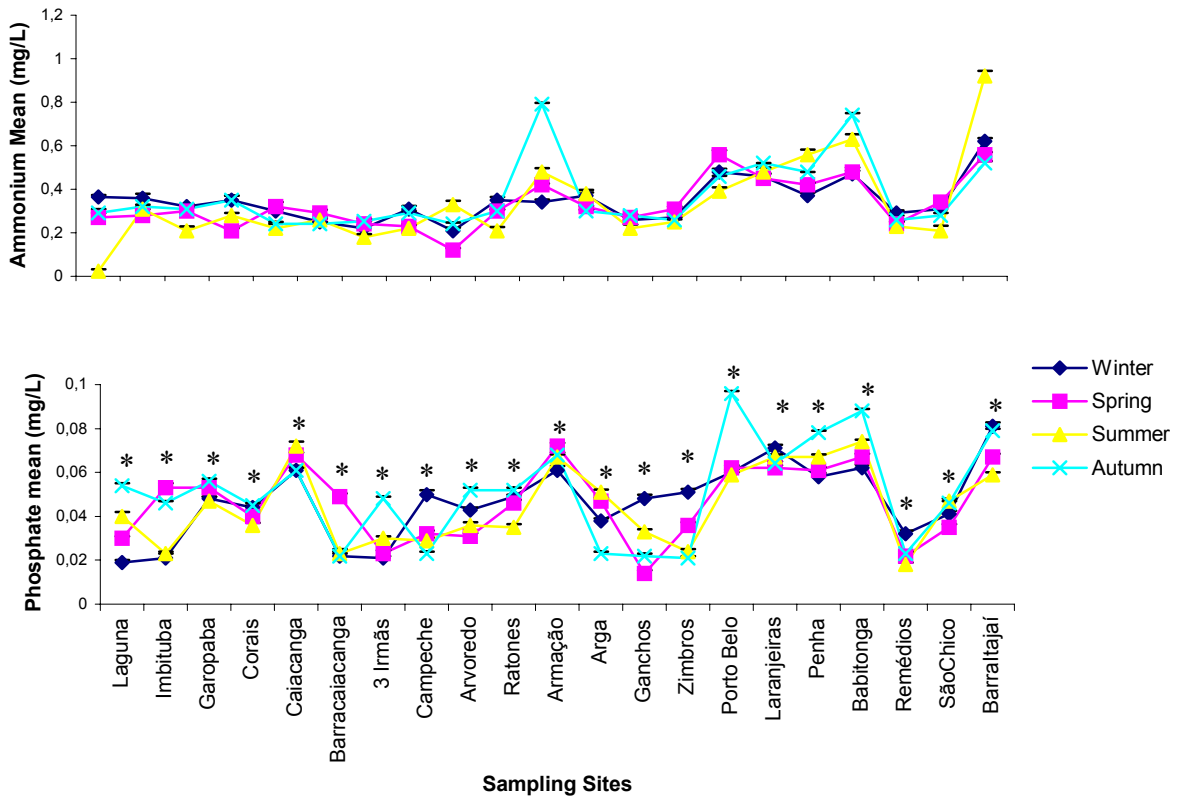
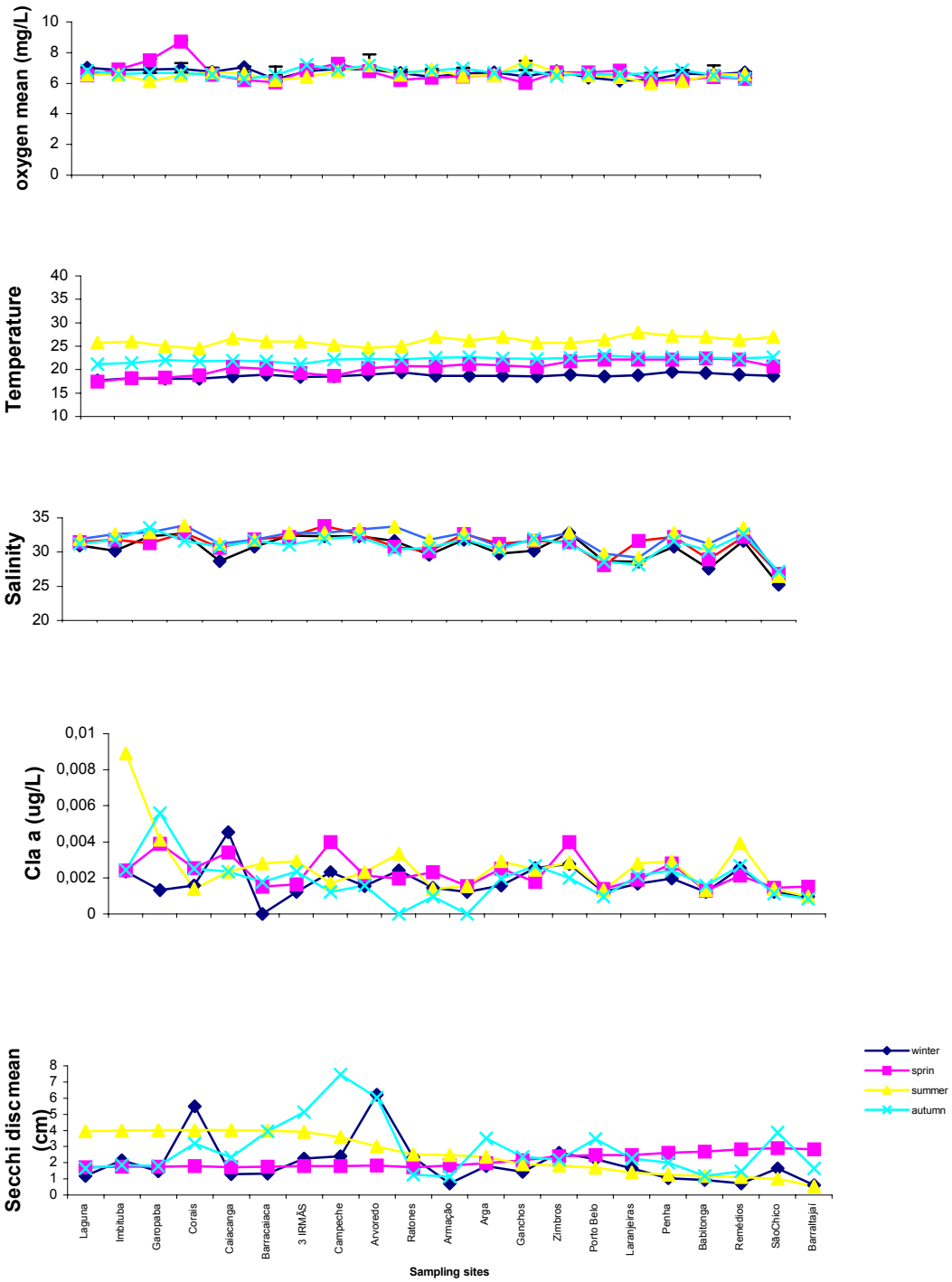


Fig. 2. Ammonium and, phosphate means of the sampling sites of Santa Catarina Coast. \* values greater than regulatory limit brazilian legislation.





**Fig. 4.** Hydrographical features of the sampling sites of Santa Catarina Coast.

**Table 1.** Results analyses of total and fecal coliforme bacteria (NMP/100 ml/) in 21 sampling sites of Santa Catarina Coast. Winter (W), Sprig (Sp), Summer (S) and Autumn (A). \* values bellow the regulatory limit braziliian legislation.

Sampling Sites	Total Coliform (NMP/100ml)				Fecal coliform (NMP/100ml)			
	W	Sp	S	A	W	Sp	S	A
Laguna beach	338	535.8	990.6	84	97	57	443	126
Imbituba beach	738	84	2.419	1.613	157	62	1811	327
Garopaba beach	553	131	2.419	1.669	187	55	1573	601
Corais island	228	41	639	402	14*	52	133	54
Caiacanga bay	378.2	94.5	1.359.5	767	89	56	526	218
Barracaiacanga bay	165.4	1.401	2.419	360.8	60	239	579	233
3Irmãs island	72	278	1.125	477	11*	62	1268	63
Campeche island	66	286	1.111	378	3*	54	127	24
Arvoredo island	98	1.065	1.673	340.6	20*	49	56	65
Ratones island	615	950	1.035.8	1.048.8	81	62	61	188
Armação bay	76.2	1.408	142	409	823	91	68	85
Arga beach	46	1.690	484	276	88	51	52	51
Ganchos bay	70	2.419	1.172.5	653.6	75	765	726	150
Zimbros bay	150.8	1.314	1.192.6	272	57	67	187	61
Laranjeiras bay	39	883	837	1.000	68	81	277	91
Penha beach	104	1.257	842	463	45	364	600	70
Babitonga bay	308	721	2.419	598	248	500	533	437
Remédios island	540.2	797.7	1.608.2	908	269	490	521	146
São Francisco beach	902	1.014. 8	1.961.5	854	182	96	417	276
BarraItajaí estuary	276.4	404	1.168	279	182	295	417	276

### **3.2. Toxic phytoplankton distribution**

Microscopic analysis revealed clearly rich community and different morphotypes of diatom and dinoflagellate from 21 sites in Santa Catarina Coast. Our results shown that toxic microalgae are present in the waters of Santa Catarina (Table 2) except Corais island, Caiacanga bay, Barracaiaca bay and Arga beach.

The dinoflagellate *Prorocentrum lima* was the dominating species in the all sites, with peak in the summer, of 1.600 cells/L and thereafter declined in winter and autumn (Arvoredo Island) following *Dynophysis caudata* 600 cells/L in the summer (Porto Belo beach) and diatom *Pseudo nitzschia sp.* 400 cells/L in the spring (Penha beach). The maximum concentration of *Alexandrium tamarense*, 300 cells/L, was registered in the spring (BarraIrajaí estuary). The concentration of *Gymnodinium catenatum* remained at low levels throughout the season in all sites. Our results shown too that the vertical and horizontal distribution the all species was similar (Table 3).

The results of water quality parameters in the sampling sites where toxic algae were observed are summarized in the Table 4.

### **3.3. Mouse bioassays**

In the mouse bioassay we only have analyzed the mussels collected at the sites samples where toxic algae were observed. No toxins in mussels were detected after 24h exposed.

**Table 2.** Results qualitative analysis of potentially toxic algae in 21 sampling sites of Santa Catarina Coast. Winter (W), Sprig (Sp), Summer (S) and Autumn (A).

<b>Sampling Sites</b>	<b>Toxic Phytoplankton</b>	<b>Season</b>
Laguna beach	<i>P. lima</i> , <i>A. tamarensense</i> , <i>Noctiluca scintillans</i>	Sp - S
Imbituba beach	<i>D. caudata</i> , <i>P. lima</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i>	Sp - S
Garopaba beach	<i>D. caudata</i> , <i>G. catenatum</i> , <i>Noctiluca scintillans</i> , <i>P. lima</i> , <i>D. acuminata</i> , <i>Pseudo nitzschia</i> sp	Sp-S-A
3 Irmas island	<i>P. lima</i> , <i>Pseudo nitzschia</i> sp, <i>N. scintillans</i>	SP -S
Campeche island	<i>Alexandrium</i> sp, <i>Pseudo nitzschia</i> sp, <i>N. scintillans</i>	S
Arvoredo island	<i>P. lima</i> , <i>D. caudata</i> , <i>Gonyaulax</i> sp	W-Sp-S-A
Ratones island	<i>D. caudata</i> , <i>P. lima</i> , <i>P. micans</i> , <i>Pseudo nitzschia</i> sp	Sp -S
Armação bay	<i>P. minimum</i> , <i>N. scintillans</i> , <i>P. lima</i> , <i>G. catenatum</i>	Sp -S -A
Ganchos bay	<i>Gymnodinium</i> sp, <i>P. minimum</i>	W
Zimbros bay	<i>P. minimum</i> , <i>G. catenatum</i>	W - Sp
Porto Belo beach	<i>P. minimum</i> , <i>D. caudata</i>	Sp -S
Laranjeiras beach	<i>Gonyaulax</i> sp, <i>D. caudata</i> , <i>D. acuminata</i> , <i>Noctiluca</i> sp., <i>Pseudo nitzschia</i> sp.	S
Penha beach	<i>P. lima</i> , <i>G. catenatum</i> , <i>D. caudata</i> , <i>Pseudo nitzschia</i> sp, <i>N. scintillans</i>	W-Sp-S-A
Babitonga bay	<i>G. catenatum</i> , <i>N. scintillans</i> , <i>A. tamarensense</i>	Sp-S
Remédios island	<i>G. catenatum</i> , <i>P. lima</i> , <i>Pseudo nitzschia</i> sp.	S
São Francisco beach	<i>Gonyaulax</i> sp, <i>G. catenatum</i> , <i>P. gracile</i> , <i>P. lima</i>	S-A
BarraItajai estuary	<i>Gonyaulax</i> sp, <i>A. tamarensense</i> , <i>G. catenatum</i>	W-Sp-S-A

**Table 3.** Results of cell density (cells/L) in the vertical and horizontal distribution of potentially toxic algae in 21 sampling sites of Santa Catarina Coast. Winter (W), Spring (Sp), Summer (S) and Autumn (A).

Sites	Toxic algae	Vertical distribution				Horizontal distribution			
		W	Sp	S	A	W	Sp	S	A
Laguna	<i>P. lima</i>	-	0.3x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	-	-	0.2x10 <sup>3</sup>	0.8x10 <sup>3</sup>	-
	<i>A. tamarense</i>	-	0.2x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.2x10 <sup>3</sup>	-	-
	<i>N. scintillans</i>	-	-	0.3x10 <sup>3</sup>	-	-	0.1x10 <sup>3</sup>	0.3x10 <sup>3</sup>	-
Imbituba	<i>P. lima</i>	-	-	0.6 x10 <sup>3</sup>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	0.2 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>D. caudata</i>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-
	<i>G. catenatum</i>	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-	-
Garopaba	<i>D. caudata</i>	-	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	0.1 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>D. acuminata</i>	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-
	<i>G. catenatum</i>	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-
	<i>P. lima</i>	-	-	0.4 x10 <sup>3</sup>	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	0.2 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>N. scintillans</i>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>P nitzschia sp</i>	-	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-
3 Irmãs island	<i>P. minimum</i>	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>P nitzschia sp</i>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>N. scintillans</i>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-
Campeche	<i>P nitzschia sp</i>	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	0.2 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>N. scintillans</i>	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>Alexandrium sp</i>	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-
Arvoredo	<i>P. lima</i>	0.2 x10 <sup>3</sup>	0.2 x10 <sup>3</sup>	1.6 x10 <sup>3</sup>	0.4x10 <sup>3</sup>	0.1 x10 <sup>3</sup>	0.4 x10 <sup>3</sup>	1.2 x10 <sup>3</sup>	0.2 x10 <sup>3</sup>
	<i>D. caudata</i>	-	0.6 x10 <sup>3</sup>	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	0.2 x10 <sup>3</sup>	0.1 x10 <sup>3</sup>	0.1 x10 <sup>3</sup>
	<i>Gounyaulax sp</i>	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-
Ratones	<i>D. caudata</i>	-	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>P. micans</i>	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-
	<i>P nitzschia sp</i>	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-
Armação	<i>P. minimum</i>	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	0.2 x10 <sup>3</sup>	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	0.3x10 <sup>3</sup>	-	-
	<i>P. lima</i>	-	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.2x10 <sup>3</sup>	-
	<i>N. scitillans</i>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-
	<i>G. catenatum</i>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-

Ganchos	<i>G. catenatum</i>	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. mimimum</i>	0.3 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Zimbros	<i>P. lima</i>	0.3x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-
	<i>P. mimimum</i>	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>G. catenatum</i>	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-
Porto Belo	<i>D. caudata</i>	-	-	0.6 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>P. mimimum</i>	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-	-
Laranjeiras	<i>Gonyaulax sp</i>	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-
	<i>D. caudata</i>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>D. acuminata</i>	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-
	<i>Noctiluca sp</i>	-	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>P nitzschia sp.</i>	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-
Penha	<i>D. caudata</i>	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	0.1 x10 <sup>3</sup>	0.1 x10 <sup>3</sup>	0.1 x10 <sup>3</sup>	0.3 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>G. catenatum</i>	0.3 x10 <sup>3</sup>	-	0.2x10 <sup>3</sup>	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>Pseudo nitzschia</i>	-	0.4 x10 <sup>3</sup>	0.3x10 <sup>3</sup>	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	0.3 x10 <sup>3</sup>	0.1 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>P. lima</i>	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	0.2 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>N. scintillans</i>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	0.1 x10 <sup>3</sup>	-
Babitonga	<i>A. tamarense</i>	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.30x10 <sup>3</sup>	0.20x10 <sup>3</sup>	-
	<i>G. catenatum</i>	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-
	<i>N. scintillans</i>	-	-	0.4 x10 <sup>3</sup>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-
Remedios	<i>G. catenatum</i>	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-
	<i>P. lima</i>	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	0.2 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>P nitzschia sp</i>	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-
São Francisco	<i>P. lima</i>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	0.2x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.3 x10 <sup>3</sup>
	<i>P. gracile</i>	-	-	-	0.2x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
	<i>Gonyaulax sp</i>	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-
	<i>G. catenatum</i>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
BarraItajaí	<i>Gonyaulax sp</i>	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	0.2 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
	<i>A. tamarense</i>	-	0.3 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-
	<i>G. catenatum</i>	-	-	0.1 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-

**Table 4.** Results of water quality parameters at the sampling sites where toxic phytoplankton were observed. Sprig (Sp), Summer (S), Autumn (A), Winter (W), Temperature (T) (°C), Salinity (Sal) (‰), Dissolved oxygen (O) (mg/L), Ammonium (A) (mg/L), Phosphate (P) (mg/L), Nitrate + Nitrite (N) (mg/L), Silicate (S) (mg/L), Fecal Coliform (CF) (NMP/100ml), Total Coliform (CT) (NMP/100ml), Chlorophyll a (Cla) (ug/L). \* values above the regulatory limit brazilian legislation.

Sites	Season	Water quality parameters									
		T	Sal	O	A	P	N	S	CF	CT	Cla
Laguna beach	Sp	18	31.5	6.53	0.27	0.3*	0.16	0.56	57*	538.8*	0.02
	S	23.8	31.9	6.56	0.38	0.4*	0.21	0.7	443*	990.6*	0.08
Imbituba beach	Sp	19	31.8	6.8	0.37	0.53*	0.28	0.42	62*	84*	0.03
	S	24.4	32..	6.5	0.31	0.23*	0.22	0.42	1811*	2.419*	0.04
Garopaba beach	Sp	19.5	31.8	7.5	0.30	0.53*	0.28	0.47	55*	131*	0.02
	S	24.7	32.9	6.13	0.20	0.47*	0.22	0.47	1573*	2.419*	0.01
	A	21.9	33.6	6.67	0.31	0.36*	0.28	0.13	601*	1.669*	0.02
3 Irmãs island	Sp	19.3	32.2	6.8	0.24	0.49*	0.31	0.4	62*	278*	0.03
	S	25.8	32.8	6.42	0.18	0.23*	0.28	0.56	1268*	1.125*	0.01
Campeche island	S	25.7	32.8	6.78	0.21	0.3*	0.24	0.56	127*	1111*	0.02
Arvoredo island	Sp	20.3	32.6	6.79	0.29	0.51*	0.21	0.29	49*	1.065*	0.01
	S	24.6	33.3	7.16	0.33	0.29*	0.21	0.34	56*	1.673*	0.03
	A	22.2	32.2	7.0	0.24	0.68*	0.20	0.26	65*	341*	0.03
	W	18.9	32.3	6.88	0.34	0.5*	0.22	0.54	20	98*	0.02
Ratones island	Sp	20.7	30.8	6.21	0.3	0.53*	0.26	0.23	62*	950*	0.02
	S	25.2	33.7	6.55	0.21	0.36*	0.21	0.3	61*	1.036*	0.02
Armação bay	Sp	20.6	30.1	6.50	0.22	0.46*	0.21	0.46	91*	1.408*	0.01
	S	26.2	31.8	6.90	0.46	0.35*	0.26	0.83	68*	142.3*	0.01
	A	22.5	30.6	6.80	0.79*	0.65*	0.22	0.3	85*	409*	0.01
Ganchos bay	W	18.7	29.8	6.69	0.26	0.38*	0.31	0.67	726*	1.172*	0.02
Zimbros bay	Sp	20.5	30.2	6.01	0.27	0.48*	0.28	0.84	67*	1.314*	0.03
	W	18.5	31.6	6.43	0.31	0.14*	0.28	1.17*	57*	1.192*	0.02
Porto Belo beach	Sp	21.8	31.5	6.0	0.46	0.34*	0.23	0.77	81*	883*	0.01
	S	25.7	32.8	6.7	0.42	0.36*	0.31	0.65	277*	837*	0.01
Laranjeiras beach	S	26.4	29.8	6.5	0.48	0.4*	0.28	0.37	600*	842*	0.02
Penha beach	Sp	22.2	31.6	6.8	0.42	0.3*	0.37	0.86	500*	712*	0.02
	S	26.4	29.2	6.4	0.5	0.3*	0.42	1.05*	533*	2.419*	0.02
	A	22.9	28.2	6.5	0.48	0.6*	0.46	0.45	437*	598*	0.02
	W	18.8	28.6	6.1	0.57	0.7*	0.36	0.34	248*	308*	0.01
Babitonga bay	Sp	22	28.9	6.4	0.48	0.3*	0.22	0.64	500*	798*	0.01
	S	26.9	31.2	6	0.53	0.3*	0.32	0.13	533*	1.608*	0.01
Remédios island	S	27	32.8	6.1	0.23	0.74*	0.22	0.51	521*	1.962*	0.03
São Francisco beach	S	26.3	31.6	6.5	0.20	0.74*	0.28	0.5	417*	1.117*	0.01
	A	22.4	33.6	6.5	0.28	0.88*	0.28	0.55	276*	297*	0.01
BarraItajaí estuary	Sp	20.6	26.8	6.3	0.42	0.34*	0.36	1.05*	295*	480*	0.01
	S	26.2	26.5	6.5	1.5*	0.30*	0.35	1.34*	417*	2.419*	0.09
	A	22.3	27.2	6.3	0.51	0.78*	0.42	1.05*	276*	1.742*	0.08
	W	18.6	25.2	6	0.69	0.43*	0.28	0.84	182*	360*	0.09

#### 4. Discussion

In the present study, we have evaluated the water quality and the occurrence of toxic phytoplankton in the Santa Catarina Coast. In general, all water quality parameters reported here are according to regulatory limits of Brazilian legislation (Conama 357/2005) except the values of phosphate and total/fecal coliform. The results obtained with phosphate and total/fecal coliform analysis in all sites (mussels farms) showed a similar increase from these parameters.

The results of toxic phytoplankton analysis showed that Santa Catarina requires a comprehensive monitoring programme, because most known toxic phytoplankton are present in its waters. However, our results did not show any clear relationship between nutrient concentration and cell densities of toxic phytoplankton. The cell density to different nutrient conditions was very similar during most of the monitoring period (Table 3). This indicates that in our results nutrient conditions may never have occurred. These results are in accordance with those obtained by Johansson et al (2002) who demonstrated that cell densities in nutrient sufficient cultures and nutrient deficient cultures were almost identical.

However, some species of dinoflagellates seem to produce more toxins when subjected to physiological stress, such as nutrient limitation (Reguera & Oshima, 1990). In the species *Alexandrium tamarense* the toxin production per cell has been observed to decrease in nitrogen limited cultures, while phosphorus limited cultures showed an increase in toxin production per cell at end of the stationary phase (Lassus et al, 1996). Similarly, McLachlan et al (1994) showed an increase in toxicity under phosphorus limitation in *Prorocentrum lima*. These results suggest that toxin producing cells require a particular N:P ratio for growth, and that excess nitrogen or phosphate results in further toxin production (Anderson et al, 2002). This does not seem to be the case in this monitoring study, since excess phosphate (a high N:P ratio) did not



result in higher toxin production with observed in mouse bioassay. Mice injected with concentrated extracts of mussels collected in the sampling sites did not show any toxic symptom.

High values of phosphate are relation with the volume of wastewater generated by human populations. At present, some 65% of existing large cities are located along the coast. It is highly likely that a substantial proportion of wastewater generated from population will be directly discharged into the coastal marine environment with little or no treatment, thereby adding to the already high nutrient input. Various studies have attempted to estimate the anthropogenic input of nutrients into the marine environment (Fogel & Paerl, 1993; Gabric & Bell, 1993; Cornell et al., 1995). Although the various estimates do not agree with each other, there is little doubt that the magnitude of global anthropogenic flux of N and P is comparable to that of natural flux, indicating that human activities have already caused major disturbance in the distribution and balance of nutrients on earth (Wu, 1999).

The increased phosphate concentrations seen in all sites from Santa Catarina coast those shown possible wastewaters generated by human populations are consistent with the results obtained from the total and fecal coliform bacteria analyses. If there are any fecal coliforms in a seawater sample, it has likely been contaminated by sewage or animal wastes (Kegley & Andrews, 1998). Although fecal coliform bacteria might not make you sick, their presence indicates that more harmful bacteria and viruses that accompany fecal material might also be present. However, Boher et al (1995) pointed out that the presence use of bacteria indicators for sanitary standards is largely unsatisfactory, and cannot afford adequate protection of public health.

The extremely high frequency the fecal coliform observed in our results in all sampling sites of Santa Catarina is dangerous. Santa Catarina has a long tradition of shellfish mariculture. The estimated annual production of cultured shellfish is 15.000 tons, produced by approximately 200 shellfish farmers (Epagri, 2004). Nevertheless, according to brazilian legislation (Conama 357/2005) the regulatory limit for total and fecal coliform bacteria

concentration for seawater utilized from production aquaculture in the Brazil is 44NMP/100ml. Our results showed that all sampling sites, except campeche, Corais, Arvoredo and 3Irmãs island, was observed a significant increase of total and fecal coliform. This strongly suggests that production of cultured shellfish in Santa Catarina could be not occurring.

The results of toxic phytoplankton distribution indicated a rich community and different morphotypes of diatom and dinoflagellate from 21 sites in Santa Catarina Coast. The *Prorocentrum lima* species was a common component of the toxic algae in Santa Catarina Coast. It is maximum cell density represented 35.3% of the total phytoplankton abundance, with a considerable variation between 100 to 1.600 cells/L. It is nevertheless interesting to find that this kind of organism is always present in the waters of Santa Catarina during all the sampling period with seasonal peaks in spring and summer (Table 2). Furthermore, 8 potentially toxic species were observed such as *P. lima*, *D. caudata*, *D. acuminata*, *A. tamarensis*, *G. catenatum*, *Pseudo nitzschia* sp., *Gonyaulax* sp, *P. micans*, *P. minimum*. Among this species *P. lima*, *D. caudata*, *A. tamarensis* and *Pseudo nitzschia* were more abundant. Although these species produce potent toxins, this does not seem to be the case in this monitoring study with observed in mouse bioassay results. Any Mice injected with concentrated extracts of mussels collected in the sampling sites did not show any toxic symptom. Nevertheless, Proença et al (1998, 1999) demonstrate the presence of the toxin okadaic acid and domoic acid in mussels collected in Penha beach from 1996.

Our results showed that in Santa Catarina the toxic species could be produce principally the toxins okadaic acid, domoic acid, saxitoxin.

In conclusion, our results showed that all water quality parameters reported here are according to regulatory limit of brazilian legislation (Conama 20/1986) except the values phosphate and total and fecal coliform. The results of toxic phytoplankton analysis showed that Santa Catarina requires a comprehensive monitoring programme, because most known toxic phytoplankton are present in its waters. It can be concluded that rapid

population growth and industrialization have brought about resource degradation and a decline in environmental quality. Untreated wastewater discharged directly and indirectly to the waterways is the most serious problem of the Santa Catarina coast. Santa Catarina need implemented a program on marine pollution control, including basically the components the monitoring studies, water quality criteria establishment and identification of sources, pathways and quantity of pollutants.

**Acknowledgements:** This work was supported by Brazilian Environmental Institute- CEPSUL-IBAMA / MMA. The authors are grateful to the Military Police (Environmental Protection Division) of Santa Catarina State for invaluable assistance during sampling.

## References

- ACAQ. Associação Catarinense de Aquicultura. Disponível em [www.acaq.org.br](http://www.acaq.org.br). Acesso em 12/11/2003.
- Anderson, D.M.; Andersen, P.; Bricelj, V.M.; Cullen, J.J. and Rensel, J.E. (2001). Monitoring and management strategies for harmful algal blooms in coastal waters, APEC 201 – MR –01.1, Asia Pacific Economic Program, Singapore and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series 59, Paris.
- AOAC. Domoic acid in mussels, liquid chromatographic method, first action.(1991). Official Methods of Analysis. Association Official Analytical Chemists, secs. 991-26.
- Boher, S., Piclet, G., Stien, C., Masson, D., Delonce, R., Biziago, E.,Schwartzbrod, L. (1995). Viral contamination and depuration of oysters under field conditions. Shellfish Depuration Purification Des Coquillages, eds. R. Poggi and J. Y. Le-Gall, 21, 562-567.
- Connell, D. W., Wu, R. S. S., Richardson, B. J., Leung, K., Lam, P. K.S. and Connell, P. A. (1998) Fate and risk of persistent organic contaminants and related compounds in Victoria Harbour, Hong Kong. Chemosphere 36, 2019-2030.

- Daranas, A. H.; Norte M.; Fernandez, J. J.(2001) Toxic Marine Microalgae. *Toxicon*, v. 39, p. 1101-1132..
- Epagri/UFSC. (1994). *Manual de cultivo de mexilhão Perna perna*. Florianópolis, 139 p.
- Figueiras, F.G.; Alvarez-Salgado, X.A.; Castro, C.G. and Villarino, M.L. (1998). Accumulation of *Gymnodinium catenatum* graham cells in western Iberian shelf waters in response to poleward flowing slope currents. Harmful Algae: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Vigo, Spain.
- Fogel, M. L. and Paerl, H. W .(1993). Isotopic tracers of nitrogen from atmospheric deposition to coastal waters. *Chemical and Geology*,107, 233-236.
- Fraga, S. Wintering of *Gymnodinium catenatum* graham (Dinophyceae) in Iberia waters.(1996). Harmful and Toxic Algae Blooms Proceedings of the 7 international conference on toxic phytoplankton, IOC of UNESCO, Sendai, Japan.
- Gabric, A. J. and Bell, P. R. F. (1993) Review of the effects of non-point nutrient loading on coastal ecosystems. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 44, 261-283.
- Hallegraeff, G. M (1995)..Harmful Algae blooms: a global overview. *Manual on Harmful Marine Microalgae*, IOC/Unesco, v, 33, p,1-23.
- Jonhansson, N.; Granéli, E.; Yasumoto, T.Carlsson, P. and Legrand, C. (2002). Toxin production by *Dynophysis acuminata* and *D. acuta* cell grown under nutrients sufficient and deficient conditions. Harmful and Toxic Algal Bloom, IOC, UNESCO.
- Lassus, P.; Wildish, D.J.; Bardouil, M.; Martin, J.L.; Bohec, M. and Bougrier, S. (1996). Ecophysiological study of toxic *Alexandrium* sp effects on the oyster *Crassostrea gigas*. Harmful and Toxic Algal Blooms, IOC,UNESCO.
- Lin, Y.; Risk, M.; Ray, S.M.; Van Engen, D.; Clardy, J.; Nakanishi, K. (1981). Isolation and structure of brevetoxin B from the red tide dinoflagellate *Ptychodiscus brevis* (*Gymnodinium breve*). *J. Am. Chem. Soc.* 103, 6773-6775.

- MaLachlan, J.L. (1994). Toxic phytoplankton. *Nat. Tox*, 2:263-270.
- Proença, L. A.; Schmitt, F.; Costa, T. and Rorig, L.(1998) Just a diarrhea? Evidence of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina, Brazil. *Ciência e Cultura*. v. 50:6, p. 458-462.
- Proença, L. A.; Lagos, N.; Rörig, L.; Silva, M. and Guimarães, S. (1999).Occurrence of paralytic shellfish toxins - PST in southe Brazilian waters. *Ciência e Cultura*, v. 51:1, p. 16-21.
- Smayda T. J. What is a bloom? A commentary. *Limnology and Oceanography*, v. 42, p. 1132-1136.
- Reguera, B. & Oshima, L. (1990). Phase cell division and other biological observations in field populations of *Dynophysis* sp during cell cycle studies. Harmful and Toxic Algal Blomm. IOC, UNESCO.
- Shimizu, Y.; Norte, M.; Hori, A.; Genenah, A. And Kobayashi, M. (1984). Biosynthesis of saxitoxin analogues: the unexpected pathway. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 6433-6434.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20<sup>th</sup> Edition. 1998. Edited by Lenore, S.; Clesceri, A.E. and Eaton, A.D. and Arnold, J.L.
- Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Sugawara, W.; and Yamaguchi, M. (1980). Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Journal Society Scientific Fisherie*, 46: 1405-1411..
- Yasumoto, T., Murata, M. and Oshima, Y.(1985). Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, 41: 1019-1025.
- Yasumoto, T., Murata, M; Lee, J.S. and Torigoe, K.(1989). Polyether toxins produced by dinoflagellate. *Mycotoxins and Phycotoxins*, 10: 375-382.
- Wu, R.S.S. (1999). Eutrophication, Water borne, pathogens and xenobiotic compounds: Environmental risks and challenges. *Marine Pollution Bulletin*, 39:11-22.
- Wright, J.L.C.; Boyd, R.K.; DeFreitas, A.S.W.; Falk, M.; Thibault, P.; Gilga, M. And Dewar, D. (1989). Identification of domoic acid a neuroexictatory amino acid in toxic mussels from eastern P.E.I. *Can. J. Chem.* 67, 481-490.

### 5.1.1 Discussão Artigo nº 1

Este estudo teve como objetivo verificar a qualidade da água em 21 locais da costa catarinense com ênfase na ocorrência de microalgas tóxicas. Os resultados mostram que, de uma maneira geral, os parâmetros físico-químicos e biológicos estão todos de acordo com a legislação brasileira (Conama 357/2005) exceto para os índices de fosfato e coliformes fecais e totais.

Ressalta-se a importância do equilíbrio dos parâmetros físicos-químicos e biológicos. O oxigênio, por exemplo, é, dentre os gases, um dos mais importantes no ambiente marinho. Altamente dinâmico o oxigênio interage de diversas maneiras na vida dos organismos aquáticos. Diretamente, provoca problemas de respiração e, indiretamente, participa de todas as reações de oxidação e redução do ambiente (Poli et al, 2003). Segundo Anderson et al., (2001), altos níveis de oxigênio dissolvido, aproximadamente 8mg/L., podem diminuir o risco ecológico de florações de microalgas tóxicas, pois além de aumentar o potencial de degradabilidade das microalgas por ação bacteriana, níveis supersaturados de oxigênio aumentam a concentração de O<sub>2</sub> no sangue dos organismos aquáticos, tornando-os mais resistentes às florações. Os resultados obtidos mostraram valores próximos a este nível em quase todos os pontos de coleta.

A temperatura atua de forma direta sobre determinados íons e, indiretamente, dependendo da espécie, atua sobre o metabolismo das células, produzindo alterações no crescimento celular (Allan, 1991). Laing (1991) relata que em locais de baías as temperaturas ótimas para o crescimento de microalgas variam de 15 a 27°C. Temperatura abaixo de 16°C reduz as taxas de crescimento e temperatura acima de 35°C são letais para muitas espécies de microalgas (Colt, 1996). Bourne *et al.* (1989) acreditam que a faixa de 18 até 30°C é ideal para as microalgas. Esta grande variação de temperatura, suportável pelas microalgas, foi observada nos resultados com média de 18°C durante os meses de inverno e de 28°C durante o verão.

A salinidade é influenciada diretamente pelas massas de água e o aporte fluvial. Locais que apresentam baixa salinidade indicam alterações por

estressores antrópicos tais como coliformes, fosfato, nitrogênio, etc (Colt, 1996). Entretanto, a tolerância às variações de salinidade das espécies de microalgas marinhas pode ser ampla de 12 a 40‰, com ponto ótimo ao redor de 20‰ (Morales, 1991). Os resultados mostraram que a menor salinidade encontrada, nos pontos amostrais, foi na Barra do Rio Itajaí durante o inverno (25,2‰). Esta salinidade é esperada, pois a Barra de Itajaí é um local onde a água marinha mistura-se com água doce oriunda das áreas terrestres (estuário). Entretanto, os resultados não estão de acordo com a afirmação de Colt (1996) que relata que locais contaminados por estressores antrópicos tais como coliformes, a salinidade é baixa. Durante todo o período amostral foram obtidos altos índices de coliformes, nas águas de Santa Catarina, e sempre com a salinidade dentro dos padrões característicos de água salina.

Os resultados da transparência da água, medida pelo disco de Secchi, nos 21 locais amostrados, revelaram uma transparência média de 2m. Observou-se também que a maior transparência da água ocorreu na Ilha do Campeche, durante o outono e a menor na Barra do Rio Itajaí, durante o inverno. Em geral, a transparência da água está relacionada com as condições do tempo que provocam mobilização de toda massa d'água, aumentando a turbidez. Segundo Anderson *et al.* (2001) a medição da profundidade de Secchi não fornece um parâmetro importante para a avaliação de risco de florações de microalgas. Porém, uma longa série temporal de dados, pode fornecer uma idéia de eutrofização do ambiente marinho.

Uma outra medida realizada neste estudo foi à clorofila -a. Esta medida é bastante utilizada na obtenção da biomassa fitoplanctônica, por ser um pigmento comum a todos os organismos fotossintéticos, constituindo em média 1,5% do peso da matéria orgânica das algas (Poli *et al.*, 2003). Os resultados mostraram valores baixos da clorofila-a (biomassa fitoplanctônica). Entretanto, esses valores estão de acordo com a baixa densidade celular de microalgas observada.

Quanto aos nutrientes inorgânicos nitrato, nitrito, silicato e amônia, todos estiveram dentro dos limites da legislação Conama 357/2005. Resultados

como esses são muito relevantes, pois na produtividade aquática os nutrientes, em equilíbrio, são extremamente importantes. A partir da captação dos nutrientes pelo fitoplâncton, se formarão as cadeias tróficas.

Foram registrados valores elevados de fosfato em todos os pontos amostrais. Dentre esses locais, todos eles apresentaram aumento concomitante nas concentrações de fosfato e de coliformes fecais e totais.

O aumento da carga de nutrientes, de origem antropogênica, presente nos ambientes aquáticos é decorrente das atividades agrícolas e da poluição por esgotos industriais e domésticos (os detergentes, por exemplo, contêm grandes quantidades de ortofosfatos) (Morales, 1986). O excesso de nutrientes num ambiente aquático pode levar a eutrofização, pois, este excesso provoca crescimento exagerado de certo tipo de algas. Quando os nutrientes se esgotam, as algas morrem e os decompositores bacterianos consomem o oxigênio dissolvido na água, dando uma forte demanda de oxigênio, chegando a esgotá-lo completamente (Esteves, 1988).

Os resultados revelam que os pontos amostrais apresentam poluição por esgoto doméstico, pois tanto os valores de fosfato foram altos como o número mais provável de coliformes fecais e totais.

Segundo Esteves (1998), como numa reação em cadeia, o aumento da concentração de fosfato tem efeitos diretos sobre a densidade de organismos fitoplânctônicos e, conseqüentemente, sobre a produção primária do sistema. Os resultados mostraram que apesar do aumento de fosfato, nestas áreas de cultivo de molusco, a densidade de microalgas tóxicas foi baixa (Tabela 3). No entanto, não se pode descartar a possibilidade de ocorrer florações de microalgas tóxicas, pois estes eventos ocorrem, principalmente, em determinadas épocas do ano, temperaturas elevadas, ventos calmos e disponibilidade de nutrientes.

Os resultados do número mais provável de coliformes totais e fecais, observado no litoral de Santa Catarina, mostram um aumento desses microorganismos em todos os locais amostrados (exceto Ilha do Campeche e



Ilha Três Irmãs durante os meses de inverno) (Tabela 1). Isto mostra, claramente a falta de saneamento básico do litoral.

Atualmente Santa Catarina é o sexto estado mais rico da Federação e o quinto maior exportador. Possui o quarto índice de desenvolvimento humano (IDH) mais alto do país. Paradoxalmente, o estado tem um dos piores índices de coleta e tratamento de esgoto do país, enfrentando problemas sérios de degradação ambiental (Santos, 2004). Esta realidade ficou evidente nos resultados obtidos neste estudo.

Sendo Santa Catarina responsável por 93% da produção brasileira de moluscos marinhos e tendo, aproximadamente, 200 fazendas de cultivo de molusco em toda extensão de seu litoral (Epagri, 2004) resultados como esses, são extremamente preocupantes. A legislação Conama 357/2005, determina um limite de 44 o número mais provável de coliformes fecais e totais para 100ml de água onde estão sendo cultivados organismos destinados à alimentação humana. Diante disso, pode-se afirmar que as águas onde estão sendo cultivados organismos marinhos, no litoral de Santa Cartarina, estão totalmente impróprias segundo a legislação Conama 357/2005. Os coliformes além de serem um indicador de risco ecológico, são caracterizadores, também, da balneabilidade das praias.

Os resultados da ocorrência de fitoplâncton tóxico revelaram que Santa Catarina requer um abrangente programa de monitoramento, uma vez que potentes microalgas tóxicas estão presentes em 17 dos 21 pontos amostrados.

Não foi observada diferença significativa na distribuição vertical e horizontal das espécies. No entanto, observou-se que as principais espécies tóxicas ocorrem durante a primavera e o verão, conforme relatado na literatura.

As espécies tóxicas (Figura 9) encontradas no litoral de Santa Catarina foram: *Prorocentrum lima*, *Dynophysis caudata*, *Dynophysis acuminata*, *Alexandrium tamarense*, *Gymnodinium catenatum*, *Pseud-nitzchas* sp., *Gonyaulax* sp. Essas espécies são responsáveis por produzirem toxinas capazes de afetar a saúde humana. Também foram registradas as ocorrências de *Prorocentrum micans*, *Prorocentrum minimum*, *Noctiluca scintillans* e *Mesodinium*

*rubrum* que afetam os organismos marinhos. Cinco dessas espécies foram as mais abundantes: *Prorocentrum lima* e *Dynophysis caudata* microalgas que produzem a toxina ácido ocadáico e que provoca a síndrome diarréica em humanos. *Pseudo-nitzschia* sp. responsável pela toxina ácido domóico e que causa a síndrome amnésica no homem. Finalmente, as espécies *Gymnodinium catenatum* e *Alexandrium* sp. que produzem a saxitoxina que causa a síndrome neurológica no homem.

A espécie *Noctiluca scintillans*, observada no monitoramento, não é tóxica ao homem, no entanto, é conhecida por produzir grandes florações no ambiente marinho. Sua floração é caracterizada por causar anoxia na água e, em consequência, mortandade de peixes

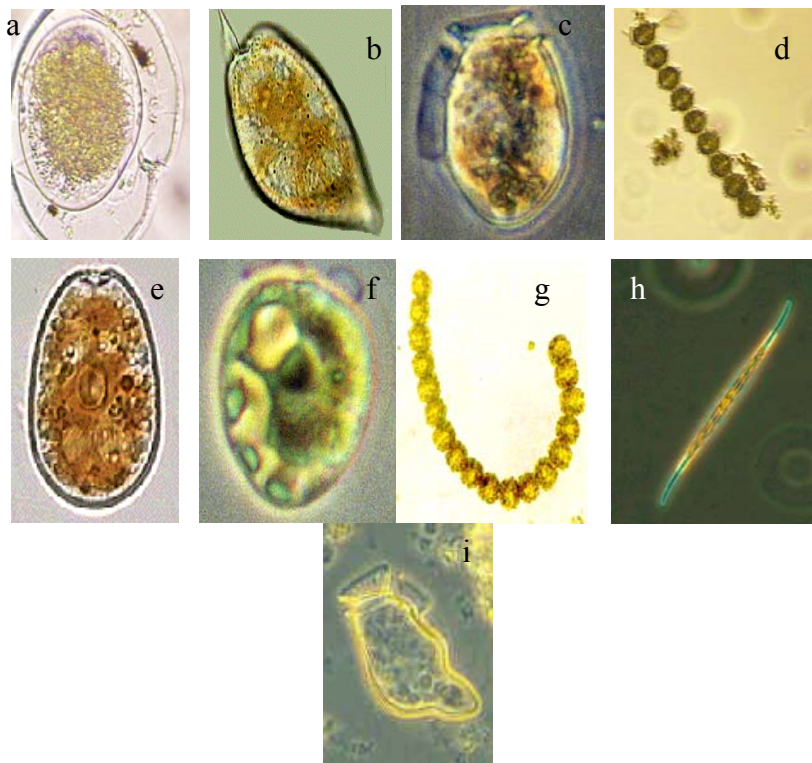
A espécie *Mesodinium rubrum*, observada somente na praia de Porto Belo e Laranjeiras, também não é tóxica ao homem, porém, sua floração é caracterizada por dar uma cor avermelhada na água. Proença et al., (2002), registraram a ocorrência de *M. rubrum* em uma floração de 10 Km de extensão em Balneário Camboriú e Itajaí.

Cabe ressaltar que a simples ocorrência de uma espécie potencialmente causadora de floração tóxica pode não representar um risco ecológico significativo.

Os resultados do bioensaio com camundongos mostraram que os mexilhões, coletados nos locais onde foi registrada a ocorrência de algas tóxicas, não apresentavam toxina ou apresentavam quantidades mínimas não detectáveis no ensaio. Entretanto, estudos realizados na praia da Armação do Itapocoroí (Penha) no ano de 1996, mostraram a presença das toxinas ácido ocadáico e ácido domóico nos hepatopâncreas dos mexilhões coletados em cultivos (Proença et al, 1998, 1999).

De uma maneira geral, os padrões de qualidade da água estão dentro dos limites recomendados. No entanto, os valores de coliformes fecais e totais são preocupantes. Pode-se perceber que uso desordenado das Zonas Costeiras para os mais diferentes fins, tem ajudado muito para o declínio da qualidade ambiental. O lançamento de esgotos domésticos nos corpos

receptores é o mais sério problema na Costa Catarinense. As tentativas de buscar soluções eficientes e de longo prazo apontam à necessidade de implementação de monitoramento da qualidade ambiental para subsidiar a elaboração de normas de controle, visando à conservação do litoral de Santa Catarina.



**Figura 9-** Espécies de microalgas tóxicas encontradas na Costa Catarinense. a) *Noctiluca scintillans*, b) *Prorocentrum micans*, c) *Dynophysis acuminata*, d) *Alexandrium tamarense*, e) *Prorocentrum lima*, f) *Gymnodinium catenatum*, g) *Prorocentrum minimum*, h) *Pseudo-nitzschia* sp., i) *Dynophysis caudata*

## 5.2. Artigo 2: Micronucleus test in mussels *Perna perna* fed with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*.

Carvalho Pinto - Silva, C.R.<sup>1a</sup>; Creppy, E.E.<sup>b\*</sup>; Matias, W.G.<sup>a</sup>

a- Department of Environmental Engineering - Toxicological Laboratory of the Federal University of Santa Catarina - Brazil

b- Toxicology Department - University of Bordeaux 2, 146, Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

\*Address for correspondence: Prof. Dr E.E. CREPPY, Laboratory of Toxicology and Applied Hygiene – University Victor Segalen Bordeaux2, 146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux, France.  
e-mail: [edmond.creppy@tox.u-bordeaux2.fr](mailto:edmond.creppy@tox.u-bordeaux2.fr)

Tel: +33-557-571217 Fax: +33-556-986685

**Abstract:** Both micronucleus and others nuclear abnormalities have been measured in haemocytes of mussels *Perna perna*, in order to verify whether feeding mussels with different concentrations of *Prorocentrum lima* results in accumulation of okadaic acid capable of inducing genotoxic effects at the chromosome level as evidenced by micronuclei and nuclear abnormalities. Four groups of 12 mussels housed individually in aquaria containing filtered seawater were fed by different concentrations of *P. lima*. An other group was collected directly from the production area and served as outdoor control. A significantly higher frequency of micronucleus and nuclear lesions was observed in haemocytes from the groups fed *P. lim.a*.

**Keyword:** *Prorocentrum lima*, marine toxins, mussel, micronucleus, *Perna perna*, DSP toxins

## 1. Introduction

*Prorocentrum lima* (Ehrenberg) (Dodge, 1975) is a toxic benthic, epiphytic, photosynthetic dinoflagellate usually found attached or associated to macrophytes, floating detritus, debris or other substrates and less commonly found in plankton (Steindinger, 1983). *P. lima* is widely distributed in both temperate and tropical regions. It is an important primary producer of okadaic acid (OA) (Faust, 1991) that has been associated to diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episodes in different regions of the world (Murakami et al., 1982, Morton et al., 1999). Murakami et al. (1982) identified one of the lipid-soluble toxins in *P. lima* as OA, one of the causative toxins responsible for DSP.

OA was first isolated from the black sponge *Halimnobia okadaei* (Tachibana et al., 1981) and later in the dinoflagellate *P. lima* (Murakami et al., 1982). OA is gaining considerable interest since it is a tumor promoter, which accumulates in the digestive organs of filter-feeding shellfish and is the cause of DSP in humans, therefore representing an environmental and public health problem (Sueoka & Fujiki, 1997). The most prominent human symptoms are gastro-intestinal, including diarrhea, nausea, vomiting and abdominal pain (Yasumoto et al., 1978).

Some authors have verified the cytotoxic, neurotoxic, genotoxic and tumorigenic effects of OA by different tests (Fessard et al., 1996; Matias & Creppy, 1998; Matias et al., 1999; Carvalho Pinto-Silva et al., 2003). These authors tried to elucidate the possible interaction of OA with the genetic material of mammals and its mechanism of action in tumor promotion.

One of methodologies currently utilizes an alternative and simpler approach to assess chromosome damage in vivo in the micronucleus (MN) assay. This type of test has been recommended for environmental biomonitoring studies, principally due to its capacity to evaluate structural and numeric alterations in chromosomes at certain stages in the life cycle of cells (Carrano & Natarajan, 1988). MN are small DNA containing bodies that appear near the cell nucleus during interphase originate from acentric chromosome

fragments or whole chromosomes lagging behind during cell division (Fenech, 2000).

The MN assay in haemocytes from mussels has proved an excellent indicator of cumulative chromosomal damage, even during short exposure or contamination (Wrisberg et al., 1992). Considering that mussel cells filter high quantities of seawater every day, the micronuclei assay performed in these cells is a suitable test to monitor the extent of genotoxic action of marine toxins.

The main purpose of this study was to verify whether the feeding of the mussels with different concentrations of *P. lima*, results in accumulation of OA capable of inducing genotoxic effects at the chromosome level as evidenced by MN formation and nucleoplasmic bridges (NL) in mussel haemocytes of *Perna perna*, native species in south coast of Brazil.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Culture of *P. lima* clones**

Clones of *P. lima* strain PL2V were obtained from Vigo (Spain). Liquid culture growth was promoted in 1 L of K medium (Keller & Guillard, 1985) under a 12:12 light/dark cycle (4 X 20 W cool-white fluorescent lamps), at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , and under constant stirring.

### **2.2. Chemicals**

Ethanol, methanol, acetic acid, basic fuchsin were purchased from Merck (Germany). Ultra pure water was prepared by use of a MILLI Q plus Millipore water purification system (Bedford, MA, USA). Fast green was purchased from Sigma- Aldrich (Brazil).

### **2.3. Mussels**

Mussels (*Perna perna* 7-8 cm shell length) were collected in 2002 from Experimental Mussel-Farming Station on Ratones Island (located in the North Bay of Santa Catarina Island -Brazil  $27^\circ28'30''\text{S}$  and  $48^\circ33'40''\text{W}$ ) that belongs

to the Marine Mollusks Farming Laboratory of the Federal University of Santa Catarina, Brazil. The mussels were transferred to the Environmental Toxicology Laboratory (UFSC) where the experiments were carried out. Animals were placed in aquaria of aerated filtered seawater at 24°C and acclimated to laboratory conditions for 7 days.

#### **2.4. Contamination of mussels with toxins by feeding with *P. lima***

The experiments were carried out with four groups of 12 mussels housed individually in 1 L aquaria containing filtered seawater. To assess the possible induction of MN by the stress produced by laboratory one other group (12 mussels) was collected directly from the open-air site of production and served as outdoor control. The first of from groups was used as a laboratory control and mussels were fed with approximately 6.000 cells/animal of non-toxic *Chaetoceros* sp, twice a day for 2 days. The of from groups was fed, with 200cells/animal of *Prorocentrum lima*, twice a day for 2 days. Under the same experimental conditions, another group received 1.000 cells of *P. Lima* and finally, the last group was fed 10.000 cells of *P. lima*/animal. Haemocytes were extracted at 24 and 48 hours.

#### **2.5. Determination of micronuclei frequency**

Hemolymph was with drawn from the posterior adductor muscle into a sterile 5 ml hypodermic syringe containing 1 ml of a solution of methanol and acetic acid (1.1 v/v). The preparations were then fixed in the syringe for 7 min, after which two slides per animal were prepared for microscopic analysis. The slides were dried at room temperature, fixed in methanol for 10 min, and stained using the Feulgen/Fast-Green method (Beçak & Paulete, 1976). From each animal, 1000 cells (500 per slide whenever possible) were scored under 1000x magnification to determine the average of MN and NL. Coded and randomized slides were scored using blind review by a single observer.

## **2.6. Extraction of OA in the mussels**

Extraction was carried out according to the procedure described by Lee et al (1987). The hepatopancreas were homogenised with 80% methanol in water for 2 min at room temperature. The homogenate was centrifuged at 1000 x g for 10 min and the supernatant was transferred to a test tube to be extracted with petroleum ether. To the lower phase were added 1 ml of water and chloroform. The mixture was shaken for 20 sec on a vortex and centrifuged at 3000 x g for 15 min. The lower phase was transferred to a graduated test tube and the upper phase was reextracted with chloroform.

## **2.7. HPLC system**

An HP 1050 chromatograf equipped with HP 1046A spectrofluorometer was used. Analysis of the toxin extracted from hepatopancreas was performed at room temperature on an ultrasep C18 column (250 x 4 mm) using acetronitrile – metanol-water 8:1:1 (v/v/v) as the mobile phase. The flow rate was maintained at 0.5ml/min. The excitation and emission wavelengths were 365 and 412 nm, respectively.

## **2.8. Statistical analysis**

The results of cytogenetics for MN and NL frequencies found in the five groups were showed in means±SD. The Kruskal-Wallis test was employed to compare the MN and NL frequencies between the groups. The 0.05 level of probability was used as significance criterion.

## **3. Results**

In the cells studied two main types of nuclear abnormality were found: MN and NL. MN were only non-refractory particles, with the same color as the nucleus of cells and with a round or ovoid shape (Carrasco et al., 1990) (Figure 1a). NL were considered only binucleated cells with nucleoplasmic bridges (Figure 1b) and binucleated cells with extruded nuclear buds that appears like



a micronucleus with nucleoplasmic connection to the main nucleus (Figure 1c) (Fenech et al, 2003).

The Mean $\pm$ SD of MN can be observed for the groups of animals fed with different concentrations of *P.lima* and in the animals of the controls groups, for different periods of exposure. The significant increase in the MN formation occurred in the animals fed with 200 and 1000 cells of *P.lima*. However, it could be observed that in these groups the OA concentration is low. On the other hand, in the animals fed with 10.000 cells of *P.lima* decrease the incidence of MN. Our results showed that the highest concentration of OA reduced the MN formation (Figure 2).

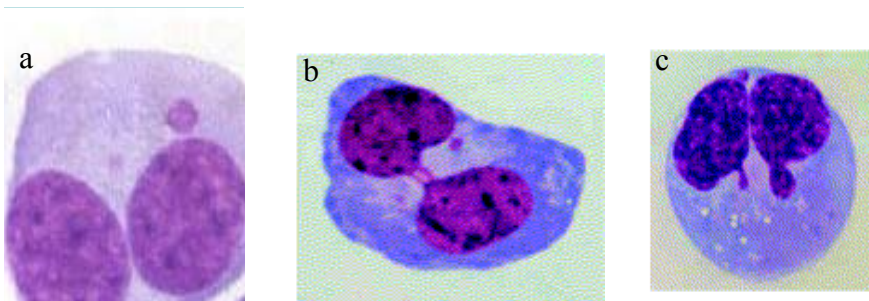


Figure 1- a) binucleated cells with micronuclei ; b) binucleated cells with nucleoplasmic bridges and c) binucleated cells with nuclear buds

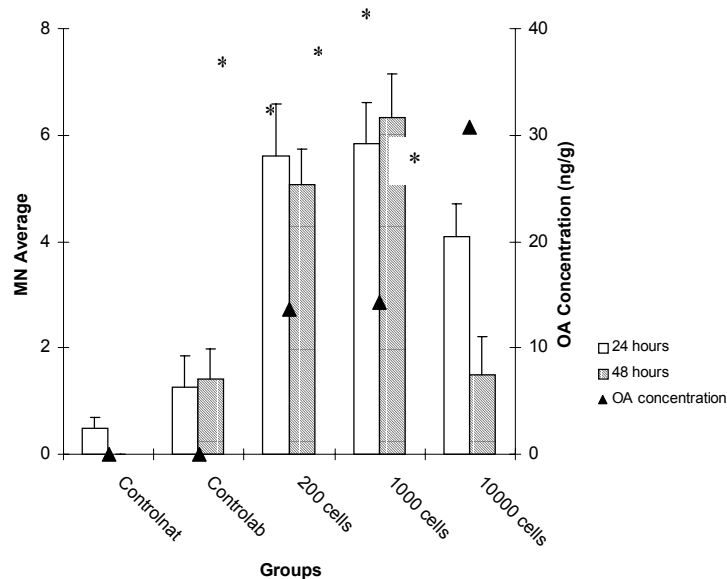


Figure 2. Mean±SD (n=12) of MN and OA concentration observed for the groups of animals fed with different concentrations of *P.lima* and in the animals of the control groups, for different periods of exposure. \* Represents significant levels (Kruskal-Wallis test) from controls.

The Figure 3 demonstrated the NL average in the groups of animals fed with different concentrations of *P.lima* and in the animals of the controls groups, for different periods of exposure. The results suggest that only in the group fed 10.000 cells of *P. lima*, NL was substantially increased when compared to controls.

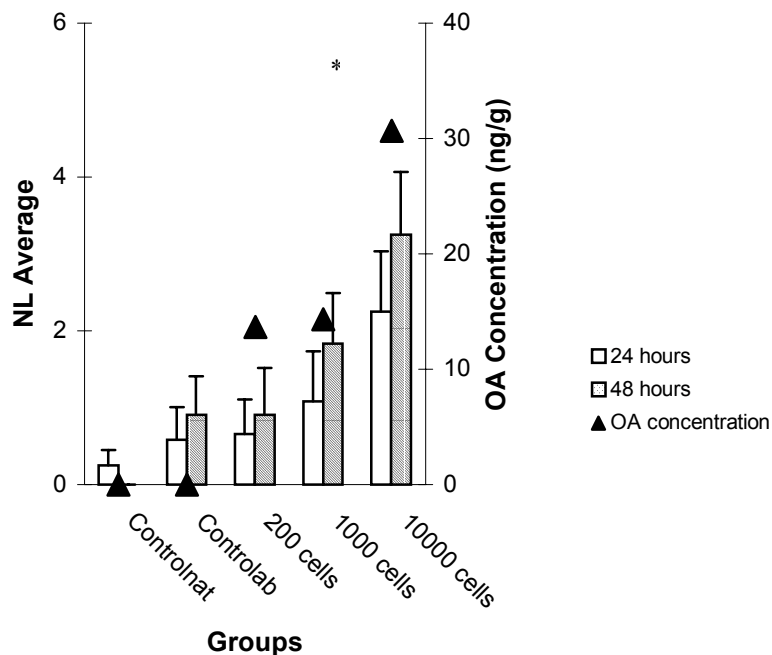


Figure 3. Mean±SD (n=12) of NL and OA concentration observed for the groups of animals fed with different concentrations of *P.lima* and in the animals of the control groups, for different periods of exposure. \* Represents significant levels (Kruskal-Wallis test) from controls.

#### 4. Discussion

Although intensively studied in various mammalian systems, the cytotoxicity and impact of marine toxins in mollusks, the main vectors for DSP, has been given little attention. Some mussels are exposed to marine toxins during prolonged periods each year. Even so, no apparent increase in mortality within populations of mussels has been observed. Thus, it seems likely that organisms, which are naturally exposed to marine toxins, have some protective mechanisms against its harmful effects (Svensson & Forlin, 1998).

In the sea water the number of *P. lima* is never zero what ever is the period of season. Thus, mussels are continuously under pressure of cytotoxic and genotoxic shellfish poisons.

Our results indicate that, in the tested conditions, only in the groups of animals fed with 200 and 1000 cells of *P. lima* significantly increased the frequency of MN. Since the average of MN in these groups were the highest as compared to the controls, it can be concluded that the OA present in the cells de *P. lima* is genotoxic even at low concentrations. Botana et al. (1996) have shown cytotoxicity in similar condition.

Svensson & Forlin (1998) demonstrated that the mussels fed *P. lima* accumulated OA corresponding to concentrations seen in Swedish mussel populations during blooms of toxic dinoflagellates. Several authors using other types of tests have observed the genotoxic action of OA. Matias and Creppy (1998) showed that OA induced hypermethylation of DNA in Vero cells, the ratio of 5-methylcytosine in nuclei increases from 3.8 to 7.8%, indicating a possible interference of OA with the expression, replication and regulation of DNA.

Carvalho Pinto-Silva et al. (2003) showed that pure OA induces a significant increase and higher frequency of MN in mussels *Perna perna*.

The highest average of MN was found after 24 hours of exposure suggesting a rapid effect of OA. According to Matias & Creppy (1998), the rapid establishment of the genotoxic effect of OA could be due to a rapid metabolic transformation of OA into a very active compound during the first hours of exposure, suggesting a mechanism of action in which the DNA becomes ultimately target of OA possible derivatives directly or indirectly. The fact that genotoxicity is higher after 24 h may also be explained by reduction of the toxin concentration following the transformation of OA into a less active metabolite during the course of incubation. Such a hypothesis is reinforced by the data of Tohda et al. (1993) who demonstrated that OA significantly higher level of SCEs, increase of mitotic cells which were characterized by a marked chromosome condensation and OA also induced chromosome fragmentation in human lymphoblastoid cells and fragmented nuclei in Chinese hamster cells.

The decrease in the average of MN in the mussels fed 10.000 cells of *P. lima* and increase in the average of NL may be due to cell mortality caused by

excessive exposure to the genotoxic and cytotoxic agent and/or to a chronic effect, although the length of time the mussel is able to tolerate this stress is not known. It is believed, however, that these results are due to the death of haemocytes, once OA interferes with various cell functions and inhibits the synthesis of proteins. This can be observed in the study of Matias et al. (1999) who demonstrated that in a mammalian system, *in vitro*, (Vero cells), pure OA at a concentration of 15ng/mL caused cell death. Furthermore, Traore et al (2001) demonstrated that OA induces apoptosis in caco2 cells. On the other hand, Fenech et al (2003) demonstrated that the nucleoplasmic bridges observed in figures 1b and 1c arise from elimination of amplified DNA and possibly elimination of DNA-repairs complexes. The authors suggest that nuclear buds originate from dicentric chromosomes whose centromeres are pulled apart to opposite poles of the cell at anaphase.

The influence of the stress caused by experimental conditions was observed in our results in the increase average of MN in the laboratory control group.

In conclusion, micronucleus as well as other nuclear buds occurs in mussels fed *Prorocentrum lima*. After 48 hours exposure, the laboratory control group of mussel increase the frequency of MN effect probably of the stress conditions.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)- Brazil. Authors are grateful to the French National Academy of Medicine for the prize awarded to Prof. E.E. Creppy, 2001.

### **References**

BecaK W, Paulete J (1976) Técnicas de Citologia e Histologia, vol.I, Livro Técnicas Científicas (Ed) S.A Rio de Janeiro RJ 305p

- Botana LM, Rodrigues-Vieytes M, Alfonso A, Louzão CM (1996) Phycotoxins: Paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning. Handbook of Food Analysis 2: edit Leo M.L. Nollet.
- Carrano AV, Natarajan AT (1988) Considerations for populations monitoring using cytogenetic techniques. *Mut. Res.* 204: 379-406.
- Carvalho Pinto-Silva CR, Ferreira JF, Costa RHR, Belli Filho P, Creppy EE, Matias WG (2003) Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. *Toxicol.* 41: 93-97.
- Dodge JD (1975) Revision of the Taxonomy within the genus *Prorocentrum*. *Bot. J. Linn. Soc.* 71: 102-105.
- Faust M (1991) Morphology of ciguatera-causing *Prorocentrum lima* (Pyrrophyta) from widely differing sites. *J. Phycol.* 24: 642-648.
- Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mut. Res.* 455: 81-95.
- Fenech M, Chang WP, Kirsh-Volders M, Holland N, Bonassi S and Zeiger E (2003) HUMN project: detailed description on the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mut. Res.* 534:65-75.
- Fessard V, Grosse Y, Pfohl-Leszkowics A, Puiseux-Dao S (1996) Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts, HESV keratinocytes. *Mut. Res.* 361: 133-141.
- Keller MD, Guillard RRL (1985) Media for the Culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.* 23: 633-638.
- Lee JS, Yanagi T, Kenma R and Yasumoto T (1987) Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agri. Biol. Chim.* 51:877-881.
- Matias W G, Creppy EE (1998) 5-Methyldeoxycytosine as a biological marker of ADN damage induced by okadaic acid in Vero cells. *Environmental Toxicology/ Water Quality.* 13: 83-88.
- Matias WG, Traore A, Bonini M, Sanni A, Creppy EE (1999) Oxygen reactive radicals production in cell culture by okadaic acid and their implication in

- protein synthesis inhibition. *Human & Experimental Toxicology* 18: 634-639.
- Morton DL, Leighfield TA, Haynes BL, Van Dolah FM, Gowan J (1999) Evidence of diarrhetic shellfish poisoning along the Coast of Marine. *J. Shellfish Res.* 18: 681 - 686.
- Murakami Y, Oshima Y, Yasumoto T (1982) Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima* . *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48: 69 - 72.
- Steindinger KA (1983) A reevaluation of toxic Dinoflagellate Biology and Ecology, *Physiological Research* 2: 147-188.
- Sueoka E, Fujiki HJ (1997) Carcinogenesis of okadaic acid class tumor promoters derived from marine natural products. *Cancer Res. Clin. Oncol.* 123: 413-419.
- Svensson S, Forlin L (1998) Intracellular effects of okadaic acid in the blue mussel *Mytilus edulis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Marine Environmental Research* 46: 449-452.
- Tachibana K, Scheur PJ, Tsukitani Y, Kikuchi H, Engen DV, Clardy J, Gopichand Y (1981) Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 2469-2471.
- Tohda H, Nagao M, Sugimura T, Oikawa A (1993) Okadaic acid. A protein phosphatase inhibitor induces sister-chromatid exchanges depending on the presence of bromdeoxyuridine. *Muta Res.* 289: 275-280.
- Traoré A, Baudrimont I, Ambaliou S, Dano SD, Creppy EE (2001) DNA breaks and cell cycle arrest induced by okadaic acid in Caco-2 cells, a human colonic epithelial cell line. *Arch. Toxicol* 75: 110-117.
- Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M (1978) Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district *Nippon Suisan Gakkai Shi.* 44: 1249 - 1275.
- Wrisberg MN, Bulbo C, Spliid H (1992) Induction of micronuclei in haemocytes of mussels and statistical analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 23: 191 - 205.

### 5.2.1. Discussão artigo nº 2

As análises dos parâmetros físico-químicos da água do mar do litoral Catarinense mostraram que, de uma maneira geral, esses parâmetros estão em equilíbrio (artigo 1). Diante disto, cultivamos em laboratório, o dinoflagelado *Prorocentrum lima*, espécie mais abundante em nosso litoral, e verificamos se em condições ideais de nutrientes, temperatura, salinidade e disponibilidade de oxigênio, essas microalgas são capazes de produzir a toxina ácido ocadáico(OA). Além disso, outro objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de danos em hemócitos de mexilhões (*Perna perna*), através avaliação da freqüência de micronúcleos e de lesões nucleares, alimentados com este dinoflagelado.

As toxinas produzidas por microalgas tóxicas, são muito pouco estudadas em moluscos, vetores da síndrome diarréica em humanos (DSP), apesar de bastante estudadas nos vários sistemas de mamíferos. Alguns moluscos são expostos, todos os anos, às toxinas marinhas durante prolongados períodos. No entanto, não é observado nenhum aumento, aparente, da mortalidade em populações destes organismos. Assim, parece, provavelmente, que os organismos os quais são expostos naturalmente às toxinas marinhas, possuem mecanismos contra os seus efeitos nocivos (Svensson & Forlin, 1998).

As concentrações foram escolhidas com base em dados publicados por Botana *et al.* (1996) que relatam que os mexilhões, expostos a uma densidade celular de 200 cels/L de *P. lima*, já acumulariam quantidades suficientes de OA para afetar a saúde humana. A concentração de 10.000 cels/L foi escolhida para tentar simular no laboratório uma floração desses dinoflagelados.

Pode-se citar pelo menos dois motivos pelos quais este experimento torna-se relevante dentro dos objetivos deste trabalho: 1) verificar se a quantidade de 200 células de *P. lima* capaz de causar problemas a saúde humana, conforme descrito por Botana *et al.* (1996), também é capaz de induzir genotoxicidade nos hemócitos dos mexilhões; 2) verificar se o aumento da concentração de *P. lima* é diretamente proporcional ao aumento de genotoxicidade nos hemócitos de mexilhão da espécie *Perna perna*.



Os resultados mostraram que o dinoflagelado *P. lima*, mesmo em condições ideais produz a toxina ácido ocadáico, mesmo que em baixas concentrações (Figura 2) (Lemieszeck, 2001).

Os resultados da alimentação dos mexilhões com *P. lima*, indicam que, nas condições experimentais, apenas os grupos alimentados com 200 e 1000 células de *Prorocentrum lima* aumentaram, significativamente, a frequência de micronúcleos (Figura 2). Mostrando que o OA é genotóxico em baixas concentrações. Vários autores utilizaram outros tipos de testes para observar a ação genotóxica do OA. Matias & Creppy (1998) provaram que o OA induz uma hipermetilação do DNA em células Vero, a taxa da 5-metilcitosina, nos núcleos, aumenta de 3.8 para 7.8%, indicando uma possível interferência do OA com a expressão e regulação do DNA. Carvalho Pinto-Silva et al (2003) mostraram que o OA puro induz um aumento significativo na frequência de micronúcleos nos moluscos da espécie *Perna perna*.

Nossos resultados mostram que a maior frequência de micronúcleos foi encontrada após 24 horas de exposição, sugerindo um rápido efeito do OA. De acordo com Matias & Creppy (1998), esse rápido efeito do OA deve-se a uma rápida transformação metabólica do OA num composto muito ativo, durante as primeiras horas de exposição, sugerindo um mecanismo de ação no qual o DNA torna-se, finalmente, alvo dos possíveis derivados do OA. Um outro fato que é importante e deve ser salientado com relação aos resultados obtidos, é a tendência de que quanto maior a concentração de células de *P. Lima* (10.000cels/ml) menor é a frequência de micronúcleos e maior a frequência de lesões nucleares (Figura 2 e 3). Esta mortalidade observada, provavelmente, é devido à mortalidade das células provocadas por uma exposição excessiva ao ácido ocadáico produzido pelo *P. Lima*. No entanto, o tempo de exposição que os moluscos possam tolerar a exposição a essa toxina ainda não é conhecido. Acredita-se, no entanto, que estes resultados devem-se à morte dos hemócitos, uma vez que o OA interfere em diversas funções celulares e inibe a síntese das proteínas. Além disso, testes realizados com o OA puro, em células Caco2,

mostram que na concentração de 100ng/ml o OA causa 100% de morte celular (Artigo 4).

Os resultados das análises das lesões nucleares mostram uma diferença significativa, em relação aos grupos controles, nos animais alimentados com 10.000 cels/ml de *P.lima* por 48 horas. Fenech *et al.* (2003) mostraram que as pontes nucleoplásmicas, observadas nas figuras 1b e 1c, resultam da eliminação do DNA duplicado e, provavelmente, da eliminação dos complexos de reparação do DNA. Os autores propõem que as lesões nucleares provenham de partes de cromossomos ou de cromossomos inteiros que estão sendo separados em pólos opostos durante a divisão celular na anáfase e estão relacionadas com apoptose.

Foi observada também, uma tendência ao aumento da freqüência de micronúcleos, no grupo controle laboratorial, proporcional ao tempo de manutenção nos aquários, isto só pode ser entendido como decorrência do estresse causado por condições experimentais.

Este estudo mostrou que, mesmo em condições ideais, o dinoflagelado *P. lima* é capaz de produzir a toxina ácido ocadáico. Sua presença em locais de cultivo de organismos marinhos, mesmo sem produzir florações, torna-se um risco para os organismos. Sabemos que os mexilhões possuem considerável importância econômica em todo o litoral de Santa Catarina. Em vista disso, torna-se imperativo que avaliações como as realizadas neste estudo, juntamente com outros tipos de metodologias, sejam realizadas rotineiramente para a detecção precoce de genotóxicos no ambiente marinho. O conhecimento dos efeitos dessas toxinas, juntamente com a crescente produção de moluscos no estado de Santa Catarina, realça a necessidade de um controle eficiente da qualidade sanitária dos mexilhões, baseado em um Programa de Controle de Florações de Algas Tóxicas, com o objetivo de proteção do ambiente marinho e de redução de riscos para saúde pública.

### **5.3.Artigo 3: Evaluation of the Cytotoxicity and Genotoxicity of Domoic Acid in Caco-2 cells.**

Carvalho Pinto-Silva<sup>1</sup>, C.R.; Moukha, S.<sup>2</sup>; Creppy, E.E<sup>3</sup>. ✉ and Matias, W.G<sup>1</sup>

1- Department of Environmental Engineering - Toxicological Laboratory of the Federal University of Santa Catarina - Brazil

2- Unit of Mycology and Food Safety, National Institute of the Agronomic Research - INRA – Villenave d’Ornon, France

3- Department of Pharmaceutical Sciences - Toxicological Laboratory of the University of Bordeaux II - France.

✉ Edmond Ekue Creppy

Universite Victor Segalen Bordeaux 2, Sciences Pharmaceutiques - Laboratoire de Toxicologie et d’hygiène Appliquée . 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

Email:[edmond.creppy@tox.u-bordeaux2.fr](mailto:edmond.creppy@tox.u-bordeaux2.fr) .

Phone: +33-557-571219 Fax: +33-556-986685

#### **Abstract**

Domoic acid (DA) is a neurotoxin produced by sea-water phytoplankton. Shellfish feeding on the phytoplankton can bio-concentrate DA leading to a potentially serious health hazard for people consuming the contaminated shellfish. DA is the principal toxin responsible for amnesic shellfish poisoning (ASP). The toxic mechanism of DA is believed to be mediated at the level of the mitochondria, where uncoupling of oxidative phosphorylation decreases membrane permeability causing cell swelling and ultimately lysis. Literature is poor concerning data on the possible genotoxicity and cytotoxicity of DA. In the present study, we have evaluated the cytotoxicity and genotoxicity of domoic acid on a human colorectal adenocarcinoma cell line (Caco-2). Our results clearly demonstrate that DA (100ng/ml) decreased cell viability, induced direct DNA damage and apoptosis in Caco2 cells.

**Keywords:** Marine toxin, Domoic acid, Genotoxicity, Cytotoxicity, Apoptosis

## **1. Introduction**

Domoic acid (DA) is a neurotoxin produced by sea-water phytoplankton. During phytoplankton blooms, which are stimulated by environmental conditions, elevated concentrations of DA occur. Shellfish feeding on the phytoplankton can bio-concentrate DA leading to a potentially serious health hazard for people consuming the contaminated shellfish (Jeffery et al, 2004).

The DA it is principal toxin responsible for amnesic shellfish poisoning (ASP) (Wright et al 1990) and its isomers are water-soluble and do not degrade under ambient temperatures or when exposed to light in sterile saline solution (Johannessen, 2000). However, it has been shown to decompose under acidic conditions (50% domoic acid loss in 1 week at pH 3). (Quilliam et al., 1989).

DA present in seafood is absorbed through the gastrointestinal mucosa, but the rate of absorption is very low (Iverson et al, 1990). The ionic form of DA and its inability to be effectively up-taken through glucose and amino acid transport mechanisms restricts its entry into the central nervous system (Preston & Hynie, 1991). Symptoms as hypoactivity, sedation-akinesia, rigidity, loss of postural control, tremors convulsion has been observed in mice (Tasker et al., 1991).

DA acts as an agonist to glutamate receptor and binds with high affinity to glutamate receptors of the quisqualate type. The glutamate receptor conducts sodium ion channels in the postsynaptic membrane inducing depolarization, this in turn increases the calcium ion permeability, which ultimately leads to cell death (IOC, 1995).

The toxic mechanism of DA is believed to be mediated at mitochondria level by uncoupling of oxidative phosphorylation, decreased membrane permeability, cell swelling and ultimately cell lysis (IOC, 1995).

As observed by Jeffery et al., (2004) in a review data on possible genotoxicity and cytotoxicity of DA are reported by very few studies. Many studies have used small numbers of animals and in some cases shellfish extracts contaminated with DA have been used instead of the pure compound. Those requiring further serious investigations both in vivo and in vitro

In the present study, we have evaluated the cytotoxicity and genotoxicity of domoic acid on a human colorectal adenocarcinoma cell line (Caco-2) investigating on DA effects on cell viability, genotoxicity and apoptotic pathway.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Cell Culture**

Caco2 cells, a human colorectal adenocarcinoma cell line, were obtained from Dr. Jing Yu, Tufts School of Medicine (Medford, Mass., USA). The cells ( $10^5$ /ml) were grown as monolayer cultures in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO<sub>2</sub> in high glucose (25 mM) DMEM medium supplemented with glutamine (8 mM), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml), and 10% heat-inactivated fetal calf serum at 37°C.

### **2.2. Cytotoxicity assay**

#### **2.2.1. Trypan Blue Assay**

The viability of the cells was measured by trypan blue exclusion assay. The Caco-2 cells were incubated for 24 h at 37 °C at DA concentrations ranging from 30 to 300 ng/ml. The cells were rinsed in PBS (pH 7.4) after treatment, an aliquot of cells suspension was added to 0.4% Trypan blue dye and viable cells (uncolored cells) were scored. The cell viability was calculated as the percent ratio of the referent control.

#### **2.2.2. MTT Assay**

The inhibitory effect of DA on the growth of cells was evaluated by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay). Cells in triplicates were plated onto a series of 96-well culture plates ( $2 \times 10^4$  cells/200 µl/well). Following 24 h incubation at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 200 µl culture medium containing concentrations of 30, 60, 100, 200 and 300ng/ml of DA were added and the cells were further incubated for 24 h. Then the media were removed and, following the addition of culture medium aliquots (20µl) of 0.5 mg/ml MTT, cells were further incubated at 37 °C for 3 h. The supernatants

were then removed and, following the addition of formazan crystals dissolved with 1N HCl-isopropanol (1/23; v/v) the absorbance was read at 540 nm using a Microplate Autoreader (MR4000, Dynatech, St. Cloud, France). Dose-response curves were computer plotted after converting the mean data values to percentages of the control response. The 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was derived from the dose-response curves.

### **2.2.3. Neutral Red Assay**

The effect of DA on cell viability was determined also using the neutral red accumulation assay. The cells were plated on 96-multiwell plates with 10.000 cells/well. The cells were allowed to attach for 24 h and then treated with different concentrations (30, 60, 100, 200 and 300n/ml) of DA for 24 h. After this treatment the medium was changed and the cells were incubated for additional 4h under cell culture conditions with 150 µl neutral red solution. After this incubation the cells were rinsed with 150µl PBS and lysed (50% ethanol/49% water/1% acetic acid). The concentration of accumulated neutral red as marker for cell viability was measured photometrically at 540 nm using a Microplate Autoreader (MR4000, Dynatech, St. Cloud, France). Cell viability is shown graphically as percent of the control value.

## **2.3. Genotoxicity Assay**

### **2.3.1. Conventional Agarose Gel Electrophoresis (CAGE)**

For CAGE the Genomic DNA purification Kit – Promega, France was used to isolate DNA from cells treated with 15, 30, 60 and 100 ng/ml DA for 24 h. The medium from treated cell was decanted into microcentrifuge tube and the cells were rinsed with PBS. To obtain DNA from attached as well as detached cells, the medium from each plate was centrifuged at 13000xg. Nucleus lysis solution and Rnase solution were added followed by incubation at 37°C for 30 minutes. DNA was then precipitated from the cell lysates with isopropanol. The DNA was collected by centrifugation (13000xg) dissolved in DNA rehydration

solution. Total DNA was quantified using the ratio of absorbance at 260/280. Qualitative evaluation of DNA fragmentation was carried out by electrophoresis of the DNA in 1% agarose gel containing ethidium bromide (60 V, 1h).

### **2.3.2. Comet assay**

The alkaline comet assay at pH > 13 was performed as described by Singh et al. (1988). After 24 h incubation ( $2 \times 10^5$  cells/ml) with DA (15, 30, 60 and 100 ng/ml) the cells were trypsinized and the pellet by gently centrifuged at 800 *g* for 2 min. The pellet was re-suspended in PBS at a final cell density of  $1 \times 10^5$  cells/ml and used directly for comet assay. A prepared suspension of cells was mixed with 120  $\mu$ l low melting agarose (0.75% in PBS) and added to microscope slides, which had been precoated with a bottom layer of 1.5% agarose (high melting point). Slides were lysed for 1 h (pH 10; 4 °C) and processed according to a standard protocol using a time of alkali denaturation and electrophoresis (1.6 V/cm) of 40 min. Slides were coded and images of 100 randomly selected cells stained with ethidium bromide were analysed by image analysis. The mean tail moment (percentage of DNA in the tail  $\times$  tail length) of the individual cells was determined according to the image analysis software.

### **2.3.3. Acridine orange–ethidium bromide staining**

Caco2 were cultured in 6-well plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells/ml for 24h with DA (15, 30, 60 and 100ng/ml). The cells were labeled using the nucleic acid-binding dye mix of 100 $\mu$ g/ml acridine orange and 100  $\mu$ g/ml ethidium bromide in PBS. The cells were examined by fluorescence light microscopy (Helmut Hund GmbH, HS500, Wetzlar, Germany) connected to a camera and a video system (Cohu, CCD, Japan). For each concentration, at least 100 cells were counted, and the percentage of apoptotic cells was determined. The experiment was repeated at least three times for control and treatment group on separate occasions.

#### **2.3.4. RNA Isolation and RT-PCR Amplification**

We utilised the high Pure RNA Isolation Kit from Promega. RNA concentration was quantified by measuring the absorbance at 260/280 nm. Following reverse transcription, cDNA samples were diluted to a final volume of 50µl was used for each polymerase chain reaction (PCR) analysis. Specific primers were designed to selectively amplify, Bax (forward primer:ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTC;reverse primer:ACAAAGATGGTCACGGTC TGCC;amplified size:365bp), Bcl2 (forward primer:TGCACCTGACGCCCTTAC;reverse primer:AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG; amplified size: 299 bp) and GAPDH (forward primer:TTCATTGACCTCAACTACAT;reverse primer:AGGGGCCATCCACAGTCTT; amplified size: 467 bp). For PCR analyses, a master mixture including all reaction components except cDNA template was prepared. Appropriate volumes of the mix were aliquoted and the cDNA template or control materials were added to each reaction mixture. The final 50 µl PCR reaction contained 10 pmol of each primer and 1 unit of Taq DNA polymerase. The PCR conditions were 35 cycles of all primers. The amplified products were detected by electrophoresis in a 1% agarose gel, visualised by ethidium bromide staining and ultraviolet transillumination.

#### **2.4. Statistical analysis**

Data obtained represent mean values of at least three different experiments and expressed as the means±SD and analyzed by Student's t-test.  $P < 0.05$  was considered to be the limit of statistically significant differences.

### **3. Results**

The cytotoxicity analyses reported here showed that DA decreased the viability of Caco-2 cells after a 24h incubation period, as measured in MTT, neutral red and trypan blue assay. The effect was mostly evident at concentrations of 60, 100, 200 and 300ng/ml of DA. The difference between control and treated cells (100, 200, 300ng/ml) was statistically significant ( $P < 0.01$ ) (Figure 1). The  $IC_{50}$  was estimated to be 60ng/ml for MTT and Trypan



Blue assay and 76ng/ml for Neutral red assay (Figure 2). That makes an approximate IC<sub>50</sub> value of 70 ng/ml (0.22 μM).

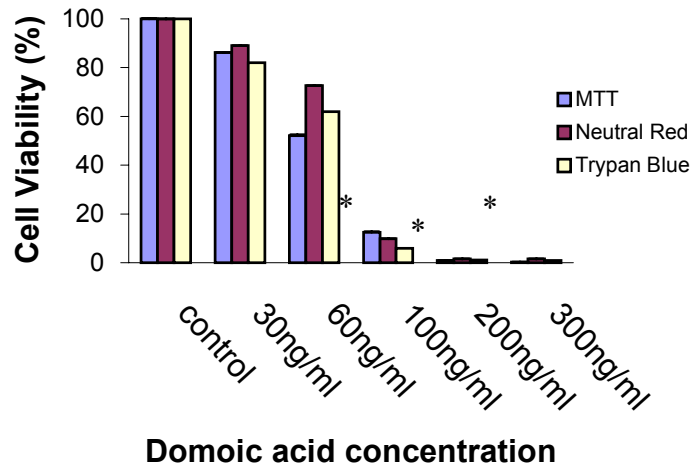


Figure. 1. MTT, Neutral Red and Trypan Blue assay in Caco-2 cells after 24 h incubation with domoic acid in DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum ( $n=3$ ). Treated groups (100, 200 and 300ng/ml) are significantly different as compared to control ( $P<0.05$ ). \*= significantly increased as compared to control cells

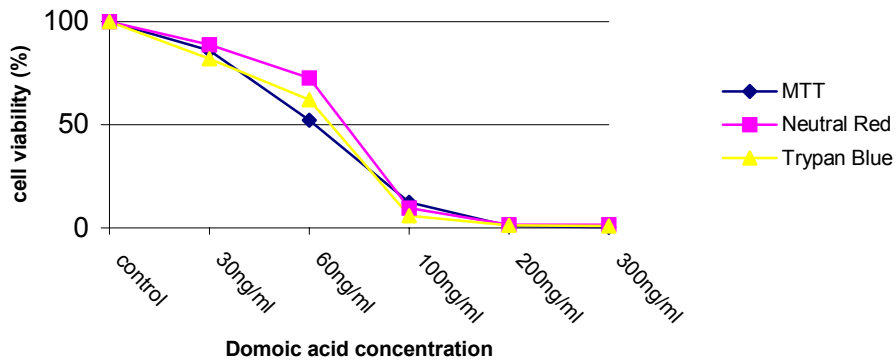
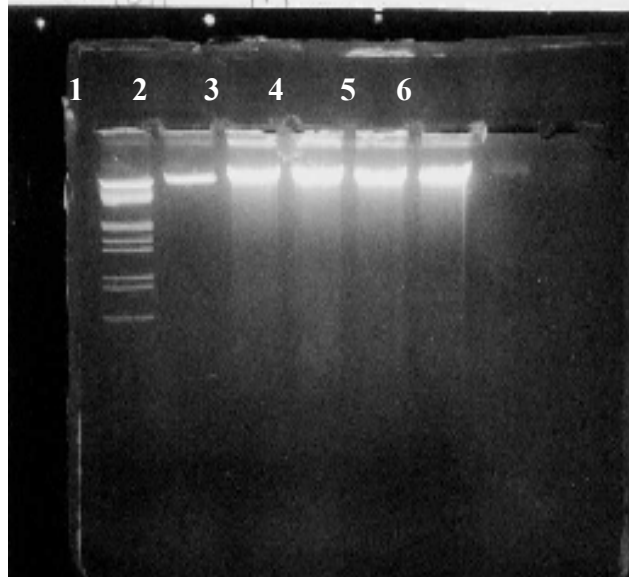


Figure. 2. Domoic acid inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) obtained in MTT, Neutral Red and Trypan Blue assay in Caco-2 cells after 24 h incubation. Add a regression curve that will show the mean value of 70 ng/ml (0.22μM).

The results of DNA fragmentation after 24h exposure showed domoic acid- induced DNA fragmentation in Caco2 cells for all concentrations (15, 30, 60 and 100ng/ml). Cells incubated with DA 100ng/ml showed the DNA fragmentation pattern characteristic of apoptotic cells (Fig. 3).



**Figure 3.** DNA fragmentation after domoic acid treatment. Genomic DNA was isolated from caco2 cells and electrophoresed on a 1% agarose gel, in the following lanes. 1: size marker; 2: control; 3:15ng/ml; 4: 30ng/ml; 5:60ng/ml; 6:100ng/ml.

Apoptotic cells were numbered and the results from acridine orange-ethidium bromide staining are shown in Figure. 4a and b. Viable cells had yellow-green fluorescent nuclei with an organized structure. In early apoptotic cells, nuclei containing yellow chromatin were highly condensed or fragmented. Apoptotic cells also exhibited membrane blebbing. After 24h of domoic acid treatment no apoptotic body was found with 15 and 30 ng/ml. A significant increase in apoptotic cells number was found with 60 and 100ng/ml as compared to control cultures (Figure. 5).

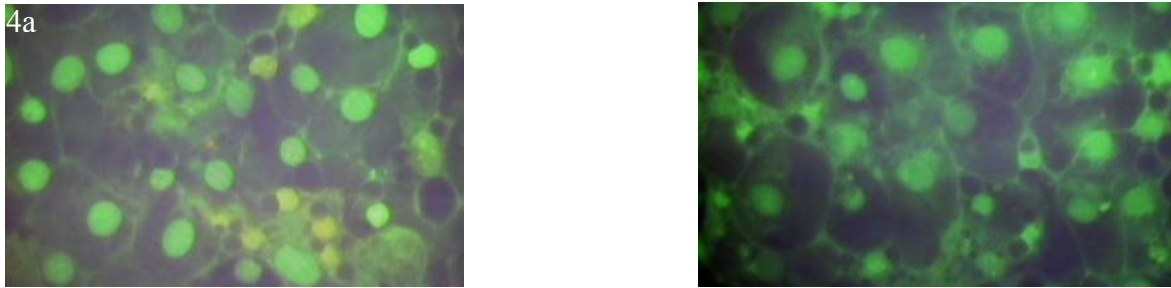


Figure.4 . a) Control cells, b) DA-treated cells (100ng/ml)

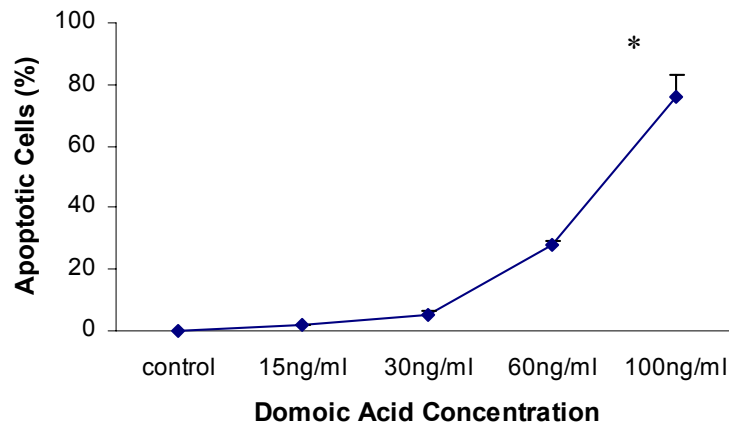


Figure. 5 . The Mean  $\pm$  SD (n=3) of apoptosis cells after 24 h incubation with DA (15, 30, 60 and 100 ng/ml)( $P < 0.05$ ) \*= significantly increased as compared to control cells.

To determine the pathway of domoic acid in apoptosis, it has been assessed by evaluating *bcl-2* and *bax* mRNA accumulation according to the concentrations of DA. Our data indicated that while *bcl2* (anti-apoptotic) is

down regulated, *bax* (pro apoptotic) gene is up-regulated favoring Caco-2 cells concentration-dependent apoptosis in DA-treated cells, (Figure 6a and 6b).

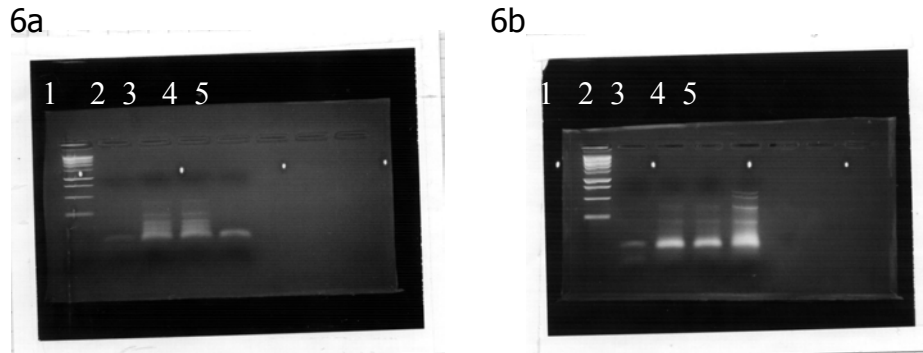


Figure. 6a) Expression of *bcl2* gene in Caco-2 cells after 24 h incubation with domoic acid (15, 30, 60 ng/ml) in DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. 6b) Expression of *bax* gene in Caco-2 cells after 24 h incubation with domoic acid (15, 30, 60 ng/ml) in DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Lane 1: size Marker; 2: control; 3: 15 ng/ml; 4: 30 ng/ml; 5: 60 ng/ml .

The results obtained from the Comet assay, performed on Caco-2 cells, presented as treated versus control mean of comet tail length, are shown in Figure. 7. In three independent experiments on Caco-2 cells, a statistically significant increase of comet tail length was observed in the 60 and 100 ng/ml concentration. The concentrations of 15 and 30 ng/ml did not induce a statistically significant increase in the frequency and size of comet tail in Caco-2 cells. In the positive control (MMC) large increase of comet length is also observed, (Figure 7). The comet images of cells in the control and DA-treated (100 ng/ml) are shown in Figure. 8a and 8b respectively.

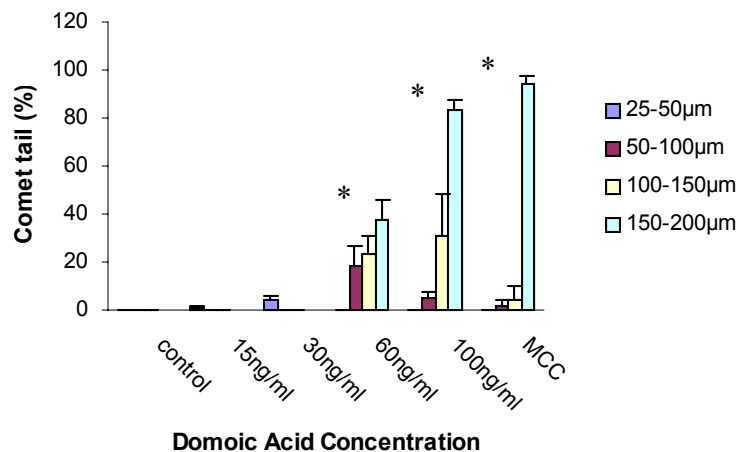


Figure.7. Comet assay on Caco-2 cells treated with domoic acid (15, 30, 60 and 100 ng/ml) for 24 h. The figure represent the distribution of 100 comets. Data are mean of three independent experiments. MMC= positive control (60mg/ml). \*= significantly increased as compared to control cells.

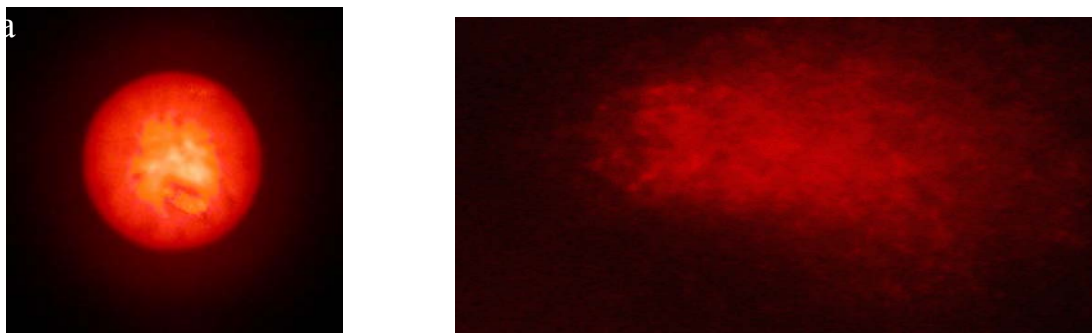


Figure. 8. Comet images of Caco-2 cells . a) Control cells, b) Damaged cell with comet tail.

#### **4. Discussion**

The current experiments were designed to study cytotoxicity and genotoxicity of the neurotoxin domoic acid (ASP toxin) in a human colorectal adenocarcinoma cell line (Caco2 cells).

Our results showed that increasing concentrations of DA (30, 60, 100, 200 and 300ng/ml) elicited cytotoxic responses in Caco-2 cells after 24h exposure period. Cell viability was determined by the MTT, trypan blue and neutral red assays. The MTT is oxidized by mitochondrial dehydrogenase enzymes of viable cells to a blue formazan product. The MTT assay assesses mitochondrial function and the amount of formazan generated is directly proportional to the number of viable cells. Exposure of Caco-2 cells to DA at different concentrations (15–300 ng/ml) for 24 h period resulted in a dose-dependent decrease of mitochondrial metabolic activity. The IOC (1995) reported that DA toxic mechanism proceeds through uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria that modify membrane permeability causing cell swelling and ultimately lysis.

This mechanism seems to be confirmed in Caco-2 cells. It appears that all these cellular events occurred since all cytotoxicity tests, trypan blue, MTT and neutral red assay led to similar IC<sub>50</sub> concentrations in the range of 60 to 76 ng/ml i.e. approximately 0.22  $\mu$ M. In addition it may be assumed that in the case of DA in Caco-2 cells the membrane integrity has been lost (implication of trypan blue test) and lysosomes are injured (implication of neutral red test). This mechanism very much resembles the one described by Yuan et al., 2002 involving destabilization of both mitochondria and lysosomes leading finally to cell death.

These results of cytotoxicity are in accordance with those obtained by Larm et al. (1997) who demonstrated the neurotoxic effects of DA in vitro, in pure populations of primary cortical cell cultures. The authors concluded that DA (75 $\mu$ M) induced considerable neural cell loss (80%) similarly to our data on Caco-2 cells.

Furthermore Bresler et al., (1999) demonstrated that intravenous injection of 250 ng/kg of DA revealed clear cytotoxic alteration in the sensitive brain area of monkeys. These are the few data that can be collected from the literature on the cytotoxicity of DA in experimental animals, (Jeffery et al., 2004).

The genotoxicity assays showed that DA induced genotoxic effects in Caco-2 cells after 24h exposure as measured by DNA fragmentation for all concentrations (15, 30, 60 and 100ng/ml). In addition Caco-2 cells incubated with 100ng/ml of DA for 24h showed DNA fragmentation pattern characteristic of apoptotic cells. Following DNA fragment gel electrophoresis, used as a marker of end-stage apoptosis, the induction of apoptosis has been confirmed by acridine orange/ethidium bromide staining. The chromatin condensation characteristic of apoptosis was observed in 76% of Caco-2 cells at concentration of 100ng/ml of DA. The chromatin condensation during apoptosis may be a consequence of DNA cleavage within the dying cell. Apoptosis was confirmed by up-regulation of *bax* and down-regulation of *bcl2*, beginning for DA concentrations ranging from 30 to 60ng/ml which is below the IC50 value in cytotoxicity assays. This strongly suggests that with DA cell death proceeds essentially through apoptosis.

Indeed, Erin & Billingsley (2004) showed that apoptotic changes in rat brain slices, such as caspase-3 activation were detected following 18h domoic acid treatment at concentration of 10  $\mu$ M on brain slices. Our data are in line with these findings except that Caco-2 cell line is at least 40 times more sensitive than this ex-vivo model.

The results obtained from the comet assay indicated a frank increase of comet tail length at DA concentration of 100ng/ml, suggesting that DA is a potent inducer of DNA strand breaks in Caco-2 cells. This is already seen between the concentrations of 30 to 60 ng/ml of DA showing the reliability between data of comet assay and that from RT-PCR on *bax* and *bcl2* mRNA accumulation.

The possibility that DNA breaks induced by DA in mammalian cells is the signal for apoptosis through the p53 gene regulation and caspase activation is seriously suggested by our data combined to that of Erin and Billingsley, (2004). Concerning seafood in general and mussels in particular, Dizer et al., (2001) showed that increase of the concentrations of DA also elicited genotoxic responses in the digestive glands, especially after 48 h following injection into mussels.

The result obtained in the present investigation is not a direct genotoxic effect but rather a pathway proceeding by mitochondria and lysosomes destabilization leading to apoptosis. It is not known yet if the observed effects may be consecutive to a direct interaction between DA and DNA. Thus the genotoxic potential has to be more precisely evaluated by either <sup>32</sup>P-postlabelling method or determination of covalent binding index (CBI) using radio labeled DA or both. A lot remains to be done to understand how DA, induces possible genotoxic effects and/or apoptosis and to know whether it might be carcinogenic or not, although it seems to be non mutagenic.

Rogers and Boyes (1989) examined the mutation frequency in V79 Chinese hamster lung cells exposed to DA without a rat-derived metabolising enzymes system and found that DA did not increase mutation frequency in this cell line as measured by thioguanine, sister chromatid exchange or micronucleus assays. Indeed, DA may also possess epigenetic properties.

In conclusion, our results clearly demonstrate that DA (60-100ng/ml) decreases Caco-2 cells viability, damages membranes, lysosomes and mitochondria and induces apoptosis. This pathway, if elicited in consumers, may lead to diseases, loss of cells in certain organs, or eventually to carcinogenesis. However others studies are needed to define the exact role of DA in tumour causation and to really assess the risk for humans. The DA effective dose in shellfish is 40µg/g wet weight when consumed by humans. If homogenously distributed in human body (tissues and fluids) it may fairly reach 66 ng/g or 66ng/ml for 100g of wet mussels only, thus giving way to all observed effects. At least, it could be already postulated that DA represents



risks for humans, since the mussels containing DA have the same effect as pure domoic acid (Todd, 1990).

**Acknowledgements:** This work was supported by French Academy of Medicine. Carvalho Pinto-Silva thanks the Brazilian National Research Councils (CAPES and CNPq) for his PhD Grant.

## References

- Bresler, V., Bissinger, V., Abelson, A., Dizer, H., Sturm, A., Krätke, R., Fishelson, L, Hansen, P.D. 1999. Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. *Helgol. Mar. Res.* 53, 219-243.
- Dizer, H., Fischer, B., Harabawy, A.S.A., Hennion, M.C. and Hansen, P.D. 2001. Toxicity of domoic acid in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol.* 12,149-56.
- Erin, N. and Billingesley, M.L. 2004. Domoic acid enhances Bcl-2-calcineurin-inositol-1,4,5-trisphosphate receptor interactions and delayed neuronal death in rat brain slices. *Brain Research.* 1014,45-52.
- IOC- Intergovernmental Oceanographic Commission. (1995). *Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)* . HAB Publication Series, Vol.1, UNESCO.
- Jeffery, B., Barlow, T., Moizer, K., Paul, S., Boyle, C. 2004. Amnesic shellfish poison. *Food Chem Toxicol.* 42, 545-557.
- Iverson, F., Truelove, J., Tryphonas, L. and Nera, E.A. 1990. The toxicology of domoic acid administrated systemically to rodents and primates. In: *Proc. Symp. Domoic Acid Toxicity.* (Eds. Hynie, I. And Todd, E.C.D.) *Can. Dis. Weekly Rep.*, 16 SIE, 15-19.
- Johannessen, J.N. 2000. Stability of domoic acid in saline dosing solutions. *Journal of AOAC Internationa.* 83, 411-412.
- Larm, J.A., Beart, P.M. and Cheung, N.S. 1997. Neurotoxin Domoic Acid produces cytotoxicity via Kainate and AMPA- sensitive receptors in cultured cortical neurones. *Neurochem. Internat.* 31, 677-682.

- Preston, E. and Hynie, I. 1991. Transfer constants for blood-brain barrier permeation of the neuroexcitatory shellfish toxin, domoic acid. *Can. J. Neurol. Sci.* 18,39-44.
- Quilliam, M.A., Thomas, K. and Wright, J.L.C. 1998. Analysis of domoic acid in shellfish by thin-layer chromatography. *Natural Toxins.* 6,147-152.
- Rogers, C.G. and Boyes, B.G. 1989. Evaluation of the genotoxicity of domoic acid in a hepatocyte-mediated assay with V79 Chinese hamster lung cells. *Mutation Research* 226, 191-195.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, L.E. 1988 A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research.* 175, 184-191.
- Tasker, R.A.R., Connel, B.J. and Strain, S.M. 1991. Pharmacology of systemically administered domoic acid in mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69,378-382.
- Todd, E.C.D. 1990. Amnesic shellfish poisoning – A new seafood toxin syndrome. In: *Toxic marine phytoplankton. Proceedings of the Fourth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Lund, Sweden.* (Eds. Granéli, E.; Sundstrom, B.; Edler, L. and Anderson, D.M., Elsevier, New York, Amsterdam, London, 504-508.
- Wright, J.L., Bird, C.J., de Freitas, A.S., Hampson, D., McDonald, J. and Quilliam, M.A. 1990. Chemistry, biology, and toxicology of domoic acid and its isomers. *Canadian District Weekly Report.* 16, 21-26.
- Yuan, X.M., Li, W., Dalen, H., Lotem, J., Kama, R., Sachs, L., Brunk, U.T. 2002. Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99,6286-6291.

### 5.3.1. Discussão artigo nº 3

Durante o monitoramento realizado na Costa Catarinense, observamos que a espécie *Pseudo-nitzschia* sp., produtora da toxina ácido domóico (DA), está presente em vários locais do nosso litoral. Desse modo, resolvemos verificar os efeitos citotóxicos e genotóxicos desta toxina em cultura de célula humana. A ocorrência do ácido domóico já foi relatada em mexilhões coletados em nosso estado (Proença *et al.*, 1998, 1999).

O objetivo desse estudo foi avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade da neurotoxina ácido domóico (DA) responsável pela síndrome ASP em humanos, em cultura de células decâncer de intestino grosso(Caco-2).

Neste estudo, os primeiros testes realizados foram os de citotoxicidade e as concentrações utilizadas variaram de 30 a 300ng/ml. Nossos resultados mostraram que a partir de 200ng/ml a porcentagem de inibição do crescimento celular foi de 98,8%. Por este motivo, para os testes de genotoxicidade utilizamos concentrações entre 15 a 100 ng/ml.

Os resultados dos testes de citotoxicidade (MTT, vermelho neutro e azul de tripan) mostraram que o aumento da resposta citotóxica, após 24 horas de exposição, é proporcional ao aumento das concentrações do DA (100, 200 e 300ng/ml) (Figura 1). A exposição das células Caco2 as diferentes concentrações de DA resulta em uma diminuição, dose-dependente, da atividade metabólica da mitocôndria (teste do MTT), danos na integridade da membrana (teste azul de tripan) e alterações morfofisiológica nos lisossomos (teste do vermelho neutro). Nossos resultados mostram ainda que a concentração de inibição da viabilidade celular (IC<sub>50</sub>), foi similar para todos os testes, variando entre 60 a 70ng/ml, aproximadamente 22µM (Figura 2).

O IOC (1995), relata que o mecanismo tóxico do DA se dá através da separação da atividade da fosforilação oxidativa da membrana da mitocôndria, modificando a permeabilidade desta, causando o inchaço nesta organela e, conseqüentemente, a sua lise. Yuan *et al.* (2002) relatam que os mecanismos envolvendo a desestabilização da mitocôndria e/ou dos lisossomos pode levar a morte celular (Apoptose). A apoptose é a morte celular programada

que ocorre sob circunstâncias fisiológicas e é caracterizada por progressivas contrações do volume celular, condensação difusa da cromatina e preservação da integridade das organelas. As células em apoptose são, rapidamente, fagocitadas pelas células adjacentes (Zeischwitz *et al.*, 1997). Estes mecanismos podem ser observados em nossos resultados nas células Caco<sub>2</sub> expostas ao DA.

Os resultados dos testes de genotoxicidade mostraram que o DA induz efeitos genotóxicos, em células Caco-2, observados pela fragmentação do DNA em todas as concentrações (15, 30, 60 and 100ng/ml). Cabe ressaltar, que as células incubadas com a concentração de 100ng/ml mostraram fragmentação do DNA com características padrões de células apoptóticas (Figura 3). A indução de apoptose foi confirmada pelo teste de coloração com acridine orange/brometo de etídio. A condensação da cromatina, característica de apoptose (Figura 4) foi observada em 76% das células Caco-2 incubadas com 100ng/ml de DA (figura 5). Esta condensação durante a apoptose pode ser conseqüência da separação do DNA dentro da célula morta. A apoptose foi confirmada também pela expressão do gene *bax* (gene próapoptótico) em função da baixa expressão do gene *bcl2* (gene antiapoptótico), observado nas concentrações de 30 e 60ng/ml de DA (figura 6a e b). Estas concentrações estão abaixo dos valores da IC<sub>50</sub>, observada nos teste de citotoxicidade, sugerindo que o processo de morte celular, causado pelo DA se dá, essencialmente, através da apoptose.

Os resultados obtidos com o teste do cometa indicam um aumento do tamanho da cauda do cometa na concentração de 100ng/ml (Figura 8), sugerindo que o DA é um potente indutor de quebras nas fitas do DNA em células Caco-2. O teste do cometa permite observar a formação de uma cauda constituída de fragmentos de DNA que foram separados por eletroforese.

Em conclusão, os resultados, claramente, demonstram que o DA (60 e 100ng/ml) diminui a viabilidade celular, causa danos nas membranas, alterações morfofisiológicas nos lisossomos, diminuição da atividade metabólica das mitocôndrias e induz apoptose em células Caco-2. Diante dos resultados,

pode-se pressupor que o DA, presente nos moluscos consumidos pelos homens, representa risco para saúde pública, uma vez que segundo Todd (1990) o DA nos hepatopâncreas dos moluscos apresenta os mesmos efeitos do DA puro. No entanto, outros estudos são necessários para definir o exato papel do DA na promoção de tumor e riscos para a saúde pública.

#### **5.4. Artigo 4: Mechanistic approach to the apoptosis induced by Okadaic Acid in Caco-2 cells using *bax*, *bcl2* expression ,cytotoxicity and genotoxicity assays**

Carvalho Pinto-Silva<sup>1</sup>, C.R.; Moukha, S.<sup>2</sup>; Creppy, E.E<sup>3</sup>. ✉ and Matias, W.G<sup>1</sup>

1- Department of Environmental Engineering - Toxicological Laboratory of the Federal University of Santa Catarina - Brazil

2- Unit of Mycology and Food Safety, National Institute of the Agronomic Research - INRA – Villenave d’Ornon, France

3- Department of Pharmaceutical Sciences - Toxicological Laboratory of the University of Bordeaux II - France.

✉ Edmond Ekue Creppy

Université Victor Segalen Bordeaux 2, UFR des Sciences Pharmaceutiques - Laboratoire de Toxicologie et d’hygiène Appliquée . 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

Email:edmond.creppy@tox.u-bordeaux2.fr

Phone: +33-557-571219 Fax: +33-556-986685

**Acknowledgements:** This work was supported by French Academy of Medicine. Carvalho Pinto-Silva thanks the Brazilian National Research Councils (CAPES and CNPq) for his PhD Grant.

#### **Abstract**

Okadaic acid (OA) is a polyether fatty acid and the major component of the group of toxins responsible for diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in humans. The DSP occurs in bivalves worldwide and poses threats to both public health and sustainable aquaculture industry. Our aim was to investigate the cytotoxic and genotoxic effects of OA on a human colorectal adenocarcinoma cell line (Caco-2) cells. Our results indicate that okadaic acid inhibits more than 80% of Caco-2 cells growth. The genotoxicity assays show that OA induces DNA fragmentation and apoptosis in Caco2 cells after 24h exposure, as measured by several tests including comet assay, agarose gel electrophoresis and RT-PCR for gene encoding Bax and Bcl2 to assess molecular pathway of this apoptosis. It is concluded that the cytotoxic properties of okadaic acid, its ability to damage DNA and induced-DNA modified bases result in cell death, mainly by apoptosis.

**Keywords:** Marine toxin, Okadaic acid, Cytotoxicity, Genotoxicity, *bax*, *bcl2*

## **1. Introduction**

Okadaic acid (OA) is a polyether fatty acid. It is the major component of the group of toxins responsible for diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in humans (Yasumoto et al., 1985). The DSP occurs in bivalves all over the world and poses serious problems to public health and to sustainable aquaculture industry. The toxins accumulate to high levels and usually reside in shellfish for long time (Fujiki & Suganuma, 1993).

Previous toxicokinetic studies have shown that OA is widely distributed in the bodies of mammals after consumption (Matias et al., 1999) although the main target is the intestinal tract where it possibly causes digestive tumours in humans (Cordier et al., 2000).

The effect of the OA on cellular metabolism is not completely understood. OA is involved in tumour promotion and yet is also involved in the conflicting response of cell death by apoptosis, (Chatfield K and Eastman A, 2004; Parameswaran et al., 2004).

The unrestrained cell proliferation inherent in tumour growth, and the cell removal occurring in apoptosis, are converse responses induced by OA, whose understanding demands a detailed description of molecular pathways underlying these effects induced by the toxin in living systems (Rossini, 2000).

The cell cycle is regulated by a delicate balance between phosphorylation and dephosphorylation of key control proteins. The specific dephosphorylation of Ser/Thr residues plays an essential role in control of the cell, with more than 97% of protein phosphorylation occurring at Ser/Thr residues. These effects have been chiefly investigated using OA, as this toxin is effective at very low concentrations on a wide variety of cells (Gehringer, 2004).

The aim of this study was to investigate the cytotoxic and genotoxic effects of okadaic acid and the mechanistic relationship in a human colorectal adenocarcinoma cell line (Caco-2) cultured cells.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Cell Culture**

Caco2 cells, a human colorectal adenocarcinoma cell line, were obtained from Dr. Jing Yu, Tufts School of Medicine (Medford, Mass., USA). The cells were grown as monolayer cultures in high glucose (25 mM) DMEM culture medium supplemented with glutamine (8 mM), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml) and 10% heat-inactivated fetal calf serum. Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO<sub>2</sub>.

### **2.2. Cytotoxicity assay**

#### **2.2.1. Trypan Blue Assay**

The Caco2 cells were seeded in 96-well dishes (1x10<sup>4</sup> cells/well) in 200 µl medium and incubated for 24h at 37°C, time for one generation. Then OA was added (15, 30, 60 and 100ng/ml) and cells incubated for further 24h at 37°C. Afterwards, the cells were rinsed with PBS, dispersed with a solution of 0.05% trypsin and 0.02% EDTA, centrifuged (800xg) and supernatant was removed. The viable cells were assessed by trypan blue staining and counting in a Neubauer chamber.

#### **2.2.2. MTT Assay**

Cell viability was determined using the MTT assay. In viable cells, MTT is converted to the purple formazan dye, which is measured spectrophotometrically following dissolution; No conversion occurs in dead cells. The Cells were plated in 96-well microplates, following 72 h contact with OA (15, 30, 60 and 100ng/ml). At the end of the treatment, the medium was replaced by 20 µl medium containing 0.5 mg/ml MTT and the plates were kept for 3 h in the incubator. After a PBS wash, the formazan was solubilized with 1N HCl-isopropanol (1/23; v/v) and the absorbance was read at 540 nm using a Microplate Autoreader (MR4000, Dynatech, St. Cloud, France). Cell viability was expressed as a percentage of the control.



### **2.2.3. Neutral Red Assay**

The Cells were plated in 96-well microplates. After 48-72h of contact with OA (15, 30, 60 and 100ng/ml), 150 µl of neutral red solution was added to each well and cells incubated further 4 h. The cells were rinsed with 150 µl PBS and subsequently, 150µl of acetic acid/ethanol 50% (1:99 v/v) was added and plates were shaken for 15 min. The absorbance was determined at 540 nm using a Microplate Autoreader (MR4000, Dynatech, St. Cloud, France). The absorbance is proportional to the number of viable cells.

### **2.3. Genotoxicity Assay**

#### **2.3.1. DNA fragmentation analysis by agarose Gel Electrophoresis**

Total DNA of cells treated with OA (15, 30, 60 and 100 ng/ml) during 24 h was isolated using a DNA purification Kit (Promega, France). Briefly, the medium from treated cell was poured into 1.5ml tube centrifuged (800xg) rinsed and considered as detached cells. The other cells, attached to the wells were gently rinsed with PBS. To obtain DNA from attached as well as detached cells, nuclei lysis solution and Rnase solution were added followed by incubation at 37°C for 30 min. The lysis solution from each plate was centrifuged 13000xg. DNA was then precipitated from the cell lysates with isopropanol. The DNA was collected by centrifugation, (13 000xg, 10 min) dissolved in DNA rehydration solution.

Total DNA was quantified using the ratio of absorbance at 260/280. Qualitative evaluation of DNA fragmentation was carried out by electrophoresis of in 1% agarose gel containing ethidium bromide (60 V, 1h).

#### **2.3.2. Comet assay**

The comet assay was performed under alkaline conditions essentially according to the procedure described by Singh et al. (1988). The cells were cultured as previously indicated. After 24 h incubation ( $2 \times 10^5$  cells/ml) with OA

(15, 30, 60 and 100 ng/ml) and with only ethanol (10 µl/ml of culture medium) for control, the cells were trypsinized and the pellet gently centrifuged at 800xg for 2 min. Then pellet was re-suspended in PBS at a final cell density of  $1 \times 10^5$  cells/ml and used directly for comet assay.

A freshly prepared suspension of cells in 0.75% low melting point agarose (Sigma-France) dissolved in PBS was cast onto microscope slides precoated with 0.5% normal melting agarose. The cells were then lysed for 1 h at 4 °C in a buffer consisting of 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 mM Tris, pH 10. After the lysis, DNA was allowed to unwind for 20 min in electrophoretic solution consisting of 300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13. Electrophoresis was conducted at 4 °C for 40 min at electric field strength 20 volts and 300 mA. The slides were then neutralized with 0.4 M Tris, pH 7.5, stained with ethidium bromide and covered with cover slips.

The slides were examined at 400x magnification in an fluorescence microscope (Olympus BX40) attached to a video camera equipped with a UV filter block consist an excitation filter (590 nm) and connected to a personal computer-based image analysis system. Hundred images were randomly selected from each sample and the comet tail DNA was measured.

### **2.3.3. Morphological Assessment of Apoptosis in Cells**

After 24 h incubation ( $2 \times 10^5$  cells/ml) with OA (15, 30, 60 and 100 ng/ml) and with only ethanol (10 µl/ml of culture medium) for control, cells were trypsinized and centrifuged at 800xg for 2 min. The cells were stained with 1 µl of a mixture of acridine orange (100 µg/ml) (Sigma-France) and ethidium bromide (100 µg/ml) (Sigma-France) in PBS and immediately examined under a fluorescence microscope (Helmut Hund GmbH, HS500, Wetzlar, Germany) connected to a camera and a video system (Cohu, CCD, Japan).

#### **2.3.4. RNA Isolation and RT-PCR Amplification**

Total RNA was extracted from the caco2 cells using RNA extraction Kit (Promega, France). The RNA samples were treated with RNase-free DNase to eliminate any contaminating DNA. First-strand cDNA was synthesized from 1µg of purified cells RNA with AMV reverse transcriptase (Promega) using the supplied random primers (10 pmol). Following reverse transcription, cDNA samples were diluted to a final volume of 50µl was used for each polymerase chain reaction (PCR) analysis.

Specific primers were designed to selectively amplify, Bax, Bcl<sub>2</sub> and GAPDH mRNAs. For PCR analyses, a master mixture including all reaction components except cDNA template was prepared. Appropriate volumes of the mix were aliquoted and the cDNA template or control materials were added to each reaction mixture. The final 50 µl PCR reaction contained 10 pmol of each primer and 1 unit of Taq DNA polymerase. The PCR reaction conditions consisted of 20-35 cycles at 94 °C for 1 min, 55°C for 1 min. and 72 for 2 min depending on the amplified material.

Following amplification, 2 µl of DNA loading buffer was added to each sample and 10 µl was then fractionated on a 1% agarose gel in TE buffer containing ethidium bromide (50 µg/l).

#### **2.4. Statistical analysis**

The data are expressed as means±SEM for at least three independent determinations in triplicate for each experimental point. The statistical differences between treated cells and controls were determined by the Student's *t*-test, and the levels of probability were noted ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ).

### **3. Results**

The results of cytotoxicity assay are summarized in Figure 1 and 2. OA decreased the viability of Caco-2 cells after a 72h incubation-period, as

observed in MTT and Neutral Red assay. The estimated  $IC_{50}$  is 15ng/ml (18.6 nM) in MTT assay and 18ng/ml (21,5nM) in Neutral red assay (Figure 1). These results are in accordance with those obtained with the trypan blue exclusion test with regard to viability (Figure 2).

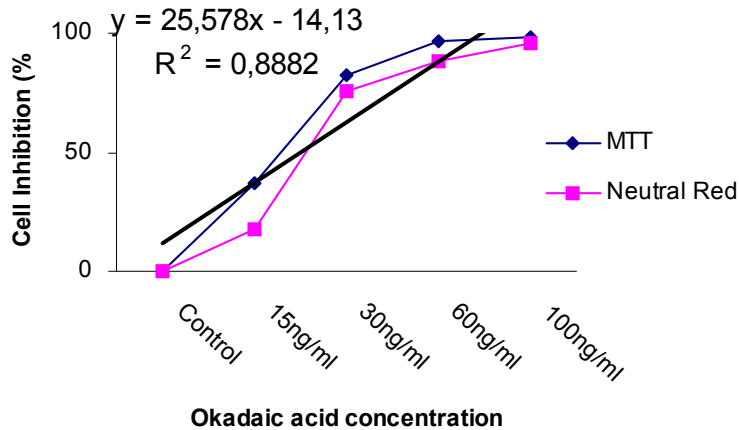


Figure 1. MTT and Neutral Red Tests in Caco-2 cells after 72 h incubation with OA (15, 30, 60 and 100 ng/ml) in DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum ( $n=3$ ). Treated groups are significantly different compared to control ( $P<0.01$ ).

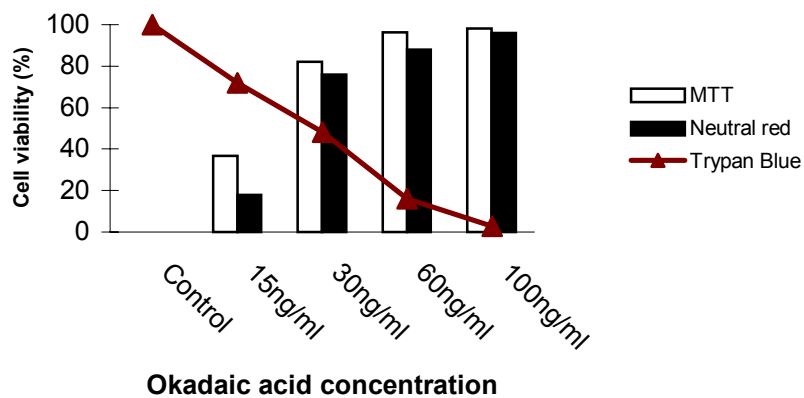


Figure 2. Comparison of results obtained in MTT, Neutral Red and Trypan Blue assays in Caco-2 cells after incubation with OA (15, 30, 60 and 100 ng/ml) in DMEM culture medium.

Occurrence of apoptosis was confirmed by the appearance of changes in the nuclear morphology of Okadaic acid-treated Caco2 cells. Staining with acridine orange/ethidium bromide revealed that nuclei in OA-treated cells showed condensation or fragmentation of chromatin (Figure 3b) compared to negative control cells (Figure 3a). In the negative control group, no apoptotic body was found among 100 cells. In contrast, at concentrations of 30 and 60 ng/ml OA, respectively, 32% and 66% of cells showed apoptotic characteristics. At OA concentration of 100ng/ml, 100% of cells were apoptotic. For the positive control (MMC) 95% of cells show apoptotic body (Figure 4).

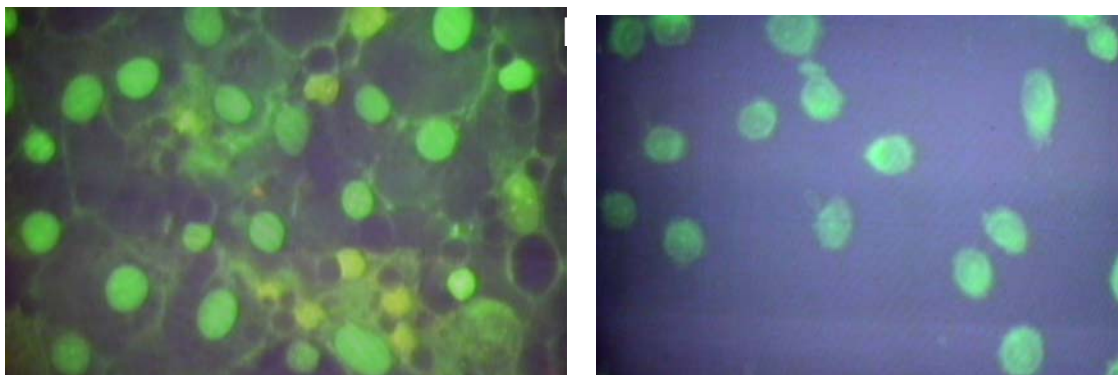


Figure 3. a) Control cells, b) OA-treated cells

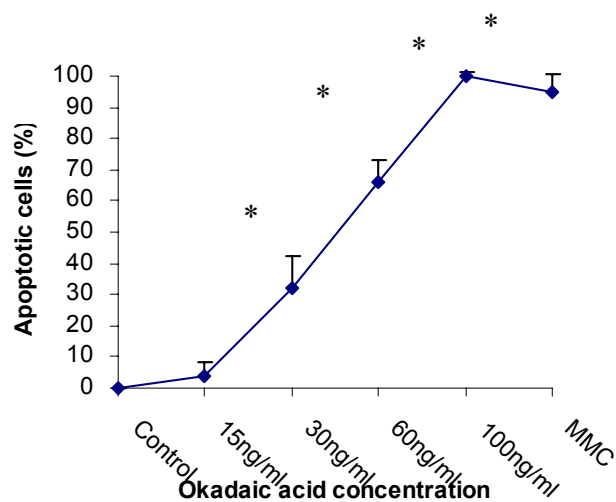


Figure 4. The Mean and SEM (n=3) of apoptosis cells after 24 h incubation with OA (15, 30, 60 and 100 ng/ml).

The apoptotic response was obtained with RT-PCR too. The apoptotic response is a complex biological process that requires the regulation of a variety of genes that interact with and respond to intracellular and extracellular stimuli.

The balance between genes *bcl2* and *bax* expression can influence cell viability versus cell death. The *bcl2* has been shown to prevent apoptosis caused by a variety factors. The *bax* gene does not block apoptosis (Figure 5a and 5b).

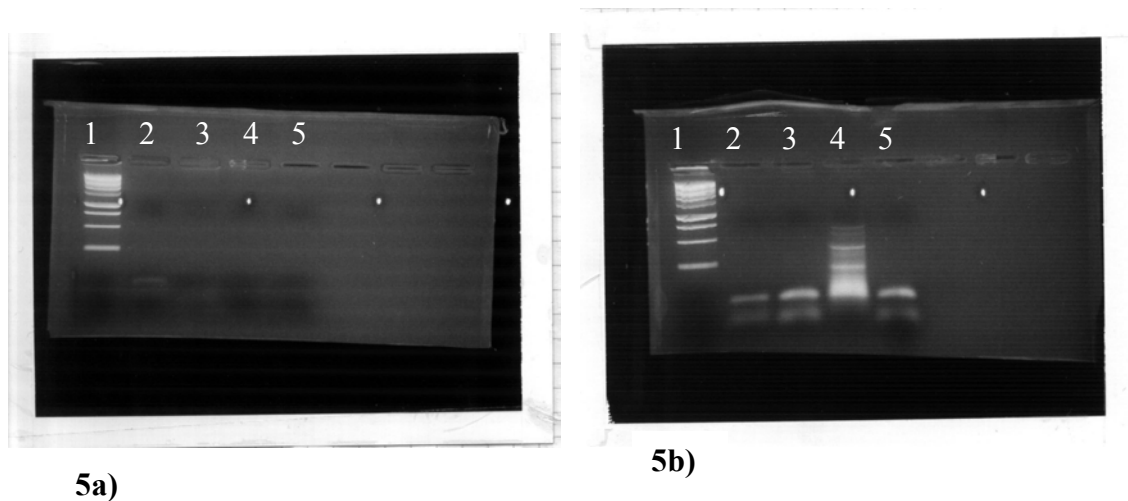


Figure 5a) Expression *bcl2* gene in Caco-2 cells after 24 h incubation with okadaic acid (15, 30, 60 ng/ml) in DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. 5b) Expression *bax* gene in Caco-2 cells after 24 h incubation with okadaic acid (15, 30, 60 ng/ml) in DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Lane 1: Size Marker; 2: control; 3:15ng/ml; 4:30ng/ml; 5:60ng/ml .

Cells incubated with OA (100ng/ml) for 24 h showed the DNA fragmentation pattern characteristic of apoptotic cells (Figure 6).

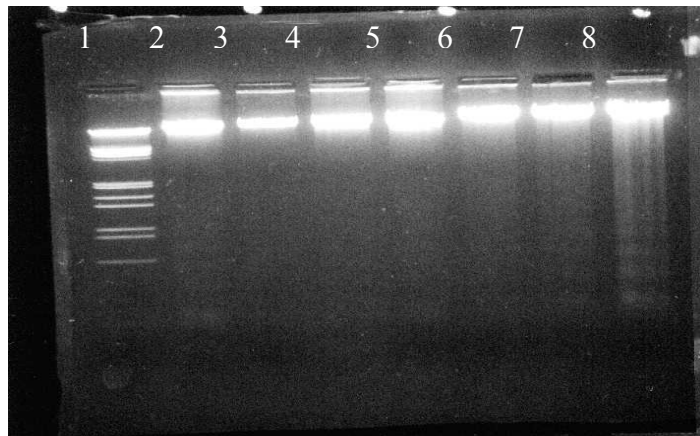


Figure 6. Analysis of genomic DNA after okadaic acid treatment. Genomic DNA was isolated from adherent cells and electrophoresed on a 1% agarose gel. Lane 1: Size Marker; 2: control; 3: solvent; 4:7,5ng/ml; 5:15ng/ml; 6:30ng/ml; 7:60ng/ml; 8:100ng/ml

The comet images of cells in the control and OA-treated group are shown in Figure 7a and 7b. Almost no comet tail was found in the control cells Figure 7a whereas obvious tailings were observed in OA-treated cells, the figure 7b, indicating the occurrence of DNA strand breaks and fast migration of the DNA fragments.

The mean comet tail-lengths after incubation with OA increase concentrations-dependently and were significantly high when compared to the control group. In the positive control (MMC) significantly increase of comet length was observed, (Figure 8).



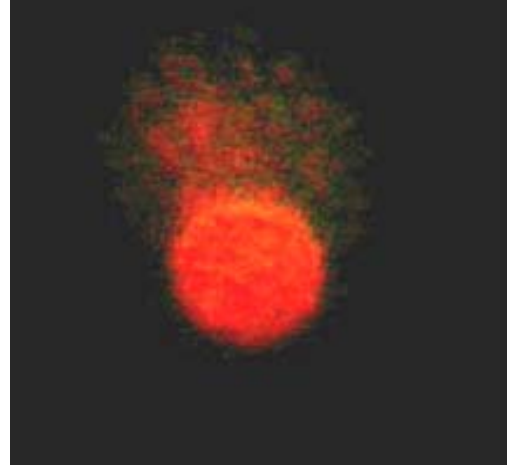


Figure 7. Comet images of Caco-2 cells . a) Control cells, b) Damaged cell nuclei with comet tail.

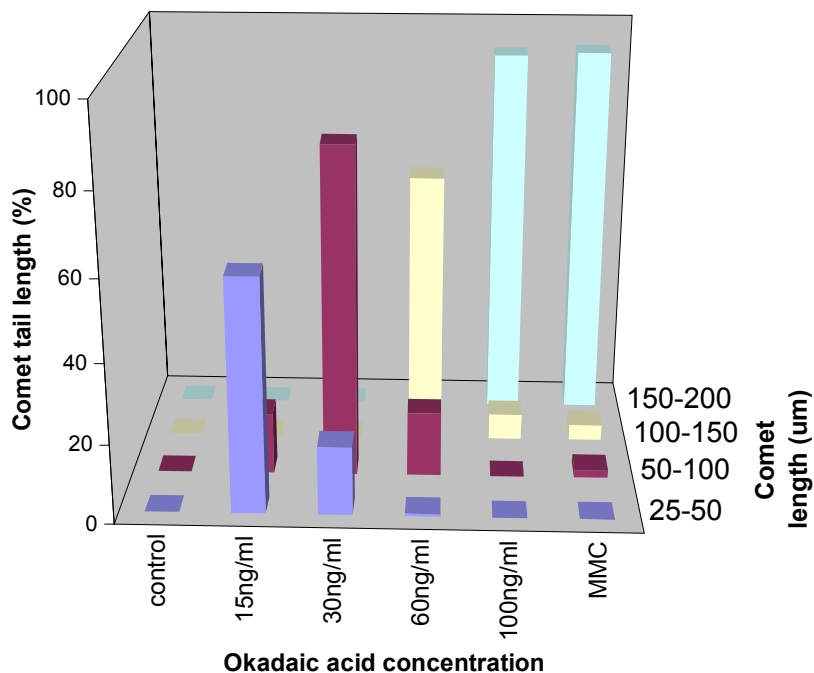


Fig. 8. Comet assay on Caco-2 cells treated with okadaic acid (15, 30, 60 and 100 ng/ml) for 24 h. The figure shows the distribution of 100 comets (per concentration). Data are mean of three independent experiments

## 6. Discussion

In the present study, we have evaluated in vitro the cytotoxic and genotoxic effects of OA. OA induces an important cytotoxicity and genotoxicity on Caco2 cells as visualized by growth inhibition, DNA fragmentation and apoptotic bodies.

Our results of cytotoxicity assays indicate that the OA induced more than 80% of growth inhibition of the cells. An even more pronounced effect was observed after a 72 h exposure to the toxin, reaching nearly 90% at 60 and 100ng/ml (74.5 nM and 124.5 nM, respectively). This strongly suggests that mitochondria as well as lysosomes are targeted by OA according to the mechanism described by Yuan et al., 2002. Interestingly the MTT test that reflects the mitochondrial function and the neutral red test that rather shows the integrity of lysosomes and membranes revealed very similar IC50 concentration indicating that OA equally targets all these cell compartments.

The results of genotoxicity assay showed that OA induced DNA fragmentation and apoptosis in Caco2 cells after 24h exposure. The number of cells showing condensed nuclear material and of apoptotic bodies increases considerably from the OA concentration of 60 to 100ng/ml. Thus, the reduction in viable cell number reflects apoptotic cell death and possibly inhibition of cell growth. The mechanism of this apoptosis is clearly *bax* (apoptosis promoting gene)-dependent since this seems to be up regulated as shown by the transcript accumulation assay by RT-PCR whereas *bcl2* is almost not detectable for the apoptotic concentrations of OA. Several authors have observed the genotoxic action of OA. Traore et al. (2001) and Rossini et al (2001) also found that OA induced apoptosis in mammalian cells and specifically in human cancer cells (Fujita et al., 2004, Traore et al. 2001) suggested that the apoptosis induced by OA might be considered as an early response of Caco-2 cells to this marine toxin, since it is an active mechanism requiring a still running protein synthesis machinery and energy and since OA is a specific inhibitor of protein synthesis and protein- phosphatases, (Fujuki et al., 1993; Matias et al., 1996; Messner at al., 2001). The considerable increases of apoptosis, which is exponentially related to OA concentrations, as compared to previous data (Traoré et al., 2001) can be explained by the OA concentrations that are used in the present experiments. The IC50 of OA on cell viability is of about 15 ng/ml versus 30-100 ng/ml that are used herein. Extrapolation to in vivo conditions reveals that observed effects are very comparable considering the concentration in culture medium and the quantities found in intestinal tissues and intestinal contents in animals given diarrheic and no diarrheic doses of OA, (Matias et al., 1999). When a dose of 50 µg/kg, not diarrheic, is given orally to the mouse, OA is found after 24h at a concentration of 17 ng/g of intestinal tissue. However, when a diarrheic dose of OA 90 µg/kg is given to mouse, a concentration of 30 ng/g was found in intestinal tissues with diarrhea, desquamation of intestinal epithelium likely through apoptosis. This concentration is perfectly in the range of those inducing huge number of apoptotic cells in vitro. Thus these in vitro

data help explaining the mechanism of this diarrhea that might be indeed exclusively triggered through apoptosis for high doses.

Hégarat et al (2004) observed that OA fails to induce direct DNA damage in vitro in CHO-K1 cells at the Hprt locus as well as primary DNA damage in rat hepatocytes. The authors demonstrated that the genotoxicity of OA relied on chromosome loss and/or non-disjunction and that its aneuploidy potential should be taken into account as a mode of action for its carcinogenic effect.

Our results showed that the increase of DNA lesions is in accordance with the morphologic test with acridine orange/bromide ethidium. The chromatin condensation characteristic of apoptosis was observed in 100% of the Caco2 cells at concentration of 100 ng/ml of OA. All these features, DNA single strand breaks due to genotoxic effects of OA, DNA hypercondensed, and fragmented DNA following the apoptotic process, could be combined together by the fact that OA induces cell cycle arrest in the S-phase (Traore et al, 2001).

Our results clearly indicate that okadaic acid efficiently enhances the genotoxic effect as measured by the comet assay in Caco-2 cells. The dose-dependent increase in comet length, indicating that OA is a potent inducer of DNA strand breaks. The damage detected by the comet assay is repairable. The method does not require cell division, and under alkaline conditions, permits the assessment of double- and single-strand breaks and alkali-labile sites (Belpaeme et al, 1996; Fuscoe et al, 1996). Although in general the comet assay may thus be considered as a more sensitive method to assess DNA damage by genotoxic agents, different mechanisms are involved when positive results appear in the comet assay.

In conclusion, the results clearly demonstrate that OA is a potent cytotoxic and genotoxic agent, inducing apoptosis through up-regulation of *bax* gene at concentration above 15 ng/ml in Caco-2 cells that is not observed, or at a very low extend, at lower concentrations. One may assume that at low concentrations of OA its promoter effects will prevail leading to survival of cells with DNA damages or mutations giving way to tumours. Considering our data

on cytotoxicity and genotoxicity it could be postulated that the risk in humans will come from frequent consumption of contaminated mussels.

## References

- Belpaeme, K., Delbeke, L., Zhu, L., and Kirsch-Volders, M. (1996). Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis* . 11, 485–492.
- Chatfield, K., Eastman, A. (2004). Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A differentially prevent intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 323,1313-20.
- Cordier, S., Monfort, C., Miossec, L., Richardson, S., Belin, C. (2000). Ecological analysis of digestive cancer mortality related to contamination by diarrhetic shellfish poisoning toxins along the coasts of France. *Environ Res.* 84,145-50.
- Fujiki, H., and Suganuma, M. (1993). Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Adv. Cancer Res.* 61, 143-194.
- Fujita, M., Goto, K., Yoshida, K., Okamura, H., Morimoto, H., Kito, S., Fukuda, J., Haneji, T. (2004). Okadaic acid stimulates expression of Fas receptor and Fas ligand by activation of nuclear factor kappa-B in human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol.* 40,199-206.
- Fusco, J.C., Afshari, A.J., and George, M.H. (1996). In vivo genotoxicity of dichloroacetic acid: evaluation with the mouse peripheral blood micronucleus assay and the single cell gel assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 27,1-9.
- Gehring, M. M. (2004). Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett.* 16 (1-3),1-8.

- Hégarat, L., Nessler, F., Mourot, A., Marzin, D., and Fessard, V. (2004). Lack of DNA damage induction by okadaic acid, a marine toxin, in the CHO-Hprt and the in vitro UDS assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental mutagenesis*. 564,139-147.
- Matias, W.G., Traoré, A., Creppy, E.E. (1999). Variations in the distribution of okadaic acid in organs and biological fluids of mice related to diarrhoeic syndrome. *Hum Exp Toxicol*. 18,345-350.
- Messner, D.J., Ao, P., Jagdale, A.B., Boynton, A.L. (2001). Abbreviated cell cycle progression induced by the serine/threonine protein phosphatase inhibitor okadaic acid at concentrations that promote neoplastic transformation. *Carcinogenesis*. 22(8),1163-72.
- Parameswaran, N., Spielman, W.S., Brooks, D.P., Nambi, P.(2004). Okadaic acid stimulates caspase-like activities and induces apoptosis of cultured rat mesangial cells. *Mol Cell Biochem*. 260(1-2,7-11).
- Rossini, G.P. (2000). Neoplastic activity of DSP toxins. In: Botana, L.M., Editor, 2000. *Seafood and Freshwater Toxins*, Marcel Dekker, New York, pp. 257–288.
- Rossini, G.P., Sgarbi, N., and Malaguti, C. (2001). The toxic responses induced by okadaic acid involve processing of multiple caspase isoforms. *Toxicol* , 39, 763–770.
- Seegers, J.C., Böhmer, L.H., Kruger, M.C., Lottering, M.L., De Kock, M. (1994). A comparative study of ochratoxin A-induced apoptosis in hamster kidney and Hela cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 129,1-11.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, L.E. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research* 175, 184–191.
- Traore, S., Baudrimont, I., Ambaliou, A., Dano, S.D., and Creppy, E.E. (2001). DNA breaks and cell cycle arrest induced by okadaic acid in Caco2 cells, a human colonic epithelial cell line, *Arch. Toxicol*. 75, 110-117.
- Yang, H., Sadda, M.R., Li, M., Zeng, Y., Chen, L., Bae, W., Ou, X., Runnegar, M.T., Mato, J.M., and Lu, S.C.(2004). S-adenosylmethionine and its

metabolite induce apoptosis in HepG2 cells: Role of protein phosphatase 1 and Bcl-x(S). *Hepatology*.. 40(1),221-31.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G.K. and Clardy, J. (1985). Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*. 41, 1019–1025.

Yuan, X.M., Li, W., Dalen, H., Lotem, J., Kama, R., Sachs, L., Brunk, U.T. 2002. Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99,6286-6291.

#### 5.4.1. Discussão artigo nº 4

Durante o monitoramento realizado na Costa Catarinense, foi observado que as espécies *Prorocentrum lima* e *Dinophysis caudata*, produtoras da toxina ácido ocadáico (DA), estão presentes em vários locais do litoral. O *P. lima* foi à espécie tóxica mais abundante. Desse modo, verificou-se o efeito citotóxico e genotóxico da toxina produzida por este dinoflagelado em cultura de célula humana.

No presente estudo foi avaliado *in vitro* os efeitos citotóxicos e genotóxicos do ácido ocadáico (OA) em culturas de células de câncer de intestino grosso humano (Caco-2). Os resultados mostraram que o OA induz citotoxicidade e genotoxicidade, nas células Caco-2, visualizadas através da inibição do crescimento celular, fragmentação do DNA e apoptose.

Os resultados das análises dos testes de citotoxicidade mostram que o OA induz mais de 80% de inibição do crescimento celular. Observou-se também que, após 72 h de exposição, o OA induz quase 90% de inibição do crescimento celular nas concentrações de 60 e 100ng/ml (74.5 nM e 124.5 nM, respectivamente) (Figura 1). Isto sugere que as mitocôndrias assim como os lisossomos são alvos do OA, de acordo com o mecanismo descrito por Yuan *et al.* (2002). O teste do MTT, que avalia a diminuição da atividade metabólica das mitocôndrias, e o teste de vermelho neutro, que mostra alterações nos lisossomos e nas membranas, mostraram uma concentração de inibição da viabilidade celular (IC<sub>50</sub>) muito semelhantes, indicando que o OA visa igualmente todos os compartimentos celulares (Figura 2).

Os resultados dos testes de genotoxicidade confirmaram que o OA induz fragmentação no DNA (Figura 6) e apoptose, em células Caco2, após 24 h de exposição. O número de células com o material nuclear condensado e corpos apoptóticos aumentou, consideravelmente, nas concentrações de 60 e 100ng/ml de OA (Figura 3). Sugerindo que, a redução do número de células viáveis reflete a morte das células e, provavelmente, a inibição do crescimento celular por apoptose. Os resultados mostram que o mecanismo do apoptose está claramente bax dependente (gene promotor de apoptose), como mostrado



pela análise da reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR). (Figura 5a e b).

Vários autores já observaram a ação genotóxica do OA. Traore *et al.* (2001) e Rossini *et al.* (2001) constataram, igualmente, que o OA induz apoptose em células de mamíferos e, especificamente, em células de câncer humano. Sugerindo que a apoptose, induzida pelo OA, possa ser considerada como a primeira resposta das células à esta toxina marinha, pois a apoptose é um mecanismo que exige muito do metabolismo celular e necessita da síntese de proteína e vários estudos já mostraram que o OA é um inibidor específico da síntese de proteína (Fujuki *et al.*, 1997; Matias *et al.*, 1996; Messner *et al.*, 2001).

Alguns estudos mostraram que quando uma dose de 50 µg/Kg, não diarréica, é dada oralmente a um camundongo, após 24h, o OA é encontrado em uma concentração de 17 ng/g de tecido intestinal. Entretanto, quando uma dose diarréica (90 µg/Kg) de OA é dada ao camundongo, uma concentração de 30 ng/g é detectada nos tecidos intestinais, apresentando sintomas de diarréia, esfoliação do epitélio intestinal, sugerindo que isto aconteça, provavelmente, por apoptose. Esta concentração, está perfeitamente na gama das concentrações utilizadas neste estudo, que induziu *in vitro* o enorme número de células apoptóticas. Desse modo, os resultados, observados neste estudo, ajudam a avaliar o mecanismo de ação desta toxina diarréica que pode ser desencadeado exclusivamente por apoptose para as doses elevadas.

Hégarat *et al.* (2004) observaram que o OA não induz danos diretos no DNA em células CHO-K1. Os resultados mostraram que a genotoxicidade do OA se dá pela perda de cromossomos. Os autores relatam que o potencial de aneuploidia (alteração no número de cromossomo) do OA deve ser levado em consideração como modo de ação para o seu efeito cancerígeno. Contrariamente, nossos resultados provaram aumento das lesões no DNA, conforme mostrado no teste da coloração com acridine orange/brometo de etídio (Figura 3). A condensação da cromatina característica de apoptose foi detectada em 100% das células Caco-2, exposta a concentração de 100 ng/ml

de OA (Figura 4). Traore *et al.* (2001) relatam que todos os danos no DNA, devidos aos efeitos genotóxicos do OA tais como: hipercondensação do DNA, fragmentação do DNA, podem acontecer pelo fato do OA induzir a suspensão do ciclo das células na fase S.

Os resultados do ensaio do cometa confirmam que o OA causa efeito genotóxico em células Caco-2 (Figura 7). O aumento do comprimento da cauda do cometa é dose-dependente (Figura 8).

Em conclusão, os resultados mostram, claramente, que o OA é um agente citotóxico e genotóxico eficaz, induzindo apoptose. Cabe ressaltar que na concentração de 15 ng/ml de OA, em células Caco-2, não foi observada apoptose. Os testes de citotoxicidade e genotoxicidade mostraram que, nesta concentração, as células ainda são viáveis, porém com alterações no DNA. Pode-se supor que o OA, em baixas concentrações, causa efeitos nas células, que podem levar à produção de tumores.

Levando em consideração os dados encontrados em nossos resultados sobre a citotoxicidade e genotoxicidade do OA, pode-se sugerir que o risco para o homem se dá através do consumo, freqüente, de moluscos contaminados.

## 5.5. Artigo 5: Genotoxicity of Okadaic and Domoic Acid Evaluated by Micronucleus Assay and FISH Technique

Carvalho Pinto-Silva<sup>1</sup>, C.R.; Moukha, S.<sup>2</sup>; Creppy, E.E<sup>3</sup>. ✉ and Matias, W.G<sup>1</sup>

1-Department of Environmental Engineering - Toxicological Laboratory of the Federal University of Santa Catarina – Brazil, Campus Universitário – Trindade, 88040-900. Email: ccb1crs@ccb.ufsc.br

1-Department of Environmental Engineering - Toxicological Laboratory of the Federal University of Santa Catarina – Brazil, Campus Universitário – Trindade, 88040-900. Email: will@ens.ufsc.br

2- Unit of Mycology and Food Safety, National Institute of the Agronomic Research - INRA – Villenave d'Ornon, France. Email: [s-m.moukha@wanadoo.fr](mailto:s-m.moukha@wanadoo.fr)

3- Department of Pharmaceutical Sciences - Toxicological Laboratory of the University of Bordeaux II - France. Email: [edmond.creppy@tox.u-bordeaux2.fr](mailto:edmond.creppy@tox.u-bordeaux2.fr)

✉ Edmond Ekue Creppy

Université Victor Segalen Bordeaux 2, UFR des Sciences Pharmaceutiques - Laboratoire de Toxicologie et d'hygiène Appliquée . 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex  
Email: [edmond.creppy@tox.u-bordeaux2.fr](mailto:edmond.creppy@tox.u-bordeaux2.fr) Phone: +33-557-571219 Fax: +33-556-986685

---

### Abstract

Micronucleus (MN) arise from fragments that fail, because of the lack of a centromere, to incorporate into daughter nuclei during cell division and can also be formed by entire chromosomes that lag behind during mitosis due to a failure of mitotic spindle or by complex chromosomal configurations that pose problems during anaphase. In order to evaluate the ability of okadaic acid (OA) and domoic acid (DA) to induce DNA damage the micronucleus assay was performed in the Caco2 cell. To discriminate between a clastogenic or aneugenic effect of OA and DA the micronucleus assay was carried out in combination with fluorescence in situ hybridization (FISH) using a concentrated human Pan-centromeric chromosome paint probe. Our results showed that OA and DA significantly increased the frequency of MN in Caco2 cells. The results of FISH analysis showed that OA induced centromere-positive micronuclei and DA increased the percentage of MN without a centromeric signal. In conclusion, both OA and DA bear mutagenic potential as revealed in Caco-2 cells by induction of MN formation. Moreover, OA induced whole chromosome loss suggesting a specific aneugenic potential, whereas DA seems simply clastogenic. At present, it could be postulated that the carcinogenic risk in humans will come from frequent consumption of mussels contaminated by these marine toxins, either alone or combined, since repair systems could be overloaded.

**Keywords:** Okadaic acid, Domoic acid, Micronuclei, Clastogenicity, Aneugenicity

---

## **1. Introduction**

Micronuclei (MN) are chromosome aberrations which have been used as an indicator of chromosome damage for over 20 years. MN arise from fragments that fail, because of the lack of a centromere, to incorporate into daughter nuclei during cell division (Heddle and Carrano, 1977). MN can also be formed by entire chromosomes that lag behind during mitosis due to a failure of mitotic spindle or by complex chromosomal configurations that pose problems during anaphase (Schmid, 1975). Thus, a micronucleus will contain either a chromosomal fragment or a whole chromosome. The use of the cytokinesis – block micronucleus (CBMN) assay in combination with the fluorescence in situ Hybridation (FISH) technique with centromeric probes, has been developed to characterize the origin of MN occurring either spontaneously, or following exposure to various chemical agents (Chung et al., 2002).

The MN assay and FISH using chromosome-specific centromeric probes have met widespread acceptance both as screening tool for genotoxic compounds and for monitoring of humans exposure to environmental carcinogens (Fenech, 1993; Schuler et al., 1997). The usefulness of the MN and FISH assay can be further enhanced by the incorporation of cytotoxicity measures, such as counts for apoptotic and necrotic cells (Fenech, et al 1993), and by the detection of centromeres in micronucleus to differentiate between aneugens causing whole chromosome loss and clastogens which produce acentric fragments (Schuler, et al., 1997).

Among species of marine phytoplankton about 40 species have the capacity of producing potent toxins (Sournia et al.,1991). Among these toxins, okadaic acid (OA) and domoic acid (DA) are considered important since they accumulate in filter-feeding animals consumed by humans, therefore representing an environmental and public health problem (Sueoka and Fujiki,1997). The cytotoxic, neurotoxic and genotoxic effects of OA has been verified by some authors (Matias et al.,1999; Traore et al.,2001; Carvalho Pinto-Silva et al, 2003; Le Hegarat et al., 2004), whereas Jeffery et al (2004) observed

that only very few data on the possible genotoxicity and toxicology of DA are available.

Therefore the present experiments were designed to evaluate genotoxic effects of DA and to discriminate between clastogenic or aneugenic effect of both Okadaic acid and Domoic acid using the MN assay combined with FISH technique on a human intestinal cell line Caco-2.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Cell Culture**

Caco2 cells, a human colorectal adenocarcinoma cell line, were obtained from Dr. Jing Yu, Tufts School of Medicine (Medford, Mass., USA). The cells were grown as monolayer cultures in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO<sub>2</sub> in high glucose (25 mM) DMEM supplemented with 8 mM glutamine, penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml), and 10% heat-inactivated fetal calf serum at 37°C.

### **2.2. Chemicals**

Okadaic acid (OA), domoic acid (DA) and Mytomycin C (MMC) were purchased from Sigma (France). OA was dissolved in ethanol and DA was dissolved in MilliQ Water.

Concentrated Human Pan-Centromeric Chromosome Probe was purchased from Cambio (UK).

### **2.3. Cell treatment**

Exponentially growing cells were plated in a 6-well plate on glass coverslips (1.5x10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>) and cultured for 24 h prior to toxins treatments. Duplicate coverslips were established for each concentration. Cells were exposed to the OA and DA for 24 h, ranging from (15, 30, 60 and 100ng/ml). The control cultures receiving an equivalent amount of solvent. Mytomycin C (MMC) has been used as positive control.

#### **2.4. Micronucleus assay**

Cells were cultured at 37 °C for 24 h. At the end of the incubation the cultures were centrifuged (250×*g*, 10 min) resuspended in buffer (0.9 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> and 132 mM NH<sub>4</sub>Cl) for 20 min at room temperature and centrifuged for 15 min at 250×*g*. This procedure was repeated twice. Cells were then fixed in cold fixative (methanol: acetic acid, 3:1) for 20 min at room temperature. Samples for microscopic observation were obtained by carefully dropping the cell suspension onto clean wet slides. Microscopic slides were stained with acridine orange (Sigma, France) or hybridized within 1 week of preparation.

#### **2.5. Fluorescence in situ hybridization (FISH)**

Centromeric FISH was performed using an concentrated human Pan-centromeric chromosome probe for all centromeres (Star FISH – Cambio –UK). The slides were allowed to age for at least 3 days and treated with 10% pepsine (Sigma) in 10 mM HCl for 10 min at 37 °C. The slides were then washed briefly in distilled water and phosphate-buffered-saline (PBS) and post-fixed for 10 min at room temperature with 3% formaldehyde (Sigma, France) in PBS. They were then washed with PBS and dehydrated in an 80%–90%–95% ethanol series. DNA denaturation was performed in 70% formamide (Sigma) in 2xSSC (saline–sodium citrate buffer) at 70 C for 2 min and dehydrated in the same ethanol series of increasing concentration.

The hybridization mixture containing the probe (2.5µg/ml) and 500µg/ml salmon sperm DNA (Salmon testes DNA, Sigma) in 2xSSC, was denatured at 80°C for 5 min, followed by chilling on ice for 4 min. An aliquot of 12,5µl per slide was applied, which were then covered with coverslips and sealed with rubber cement.

Hybridization was performed for 16 h at 37°C in a moist chamber. After the incubation, the slides were washed two times in 2xSSC for 4 min, and then in Tween-20 (Sigma) buffer for 5 min. The slides were then incubated with the blocking reagent (5% skimmed milk in 4xSSC) at 37°C for 10 min. The slides were washed with 4× SSC, covered with a 1:250-dilution of anti-biotin antibody

(Sigma) in IB (immunological buffer: 0.5% skimmed milk in 4xSSC) and incubated at 37°C for 30 min. After a wash in Tween-20 buffer, the slides were incubated in a 1:20-dilution of FITC-conjugated anti-mouse antibody (Sigma), followed by incubation with a 1:20-dilution of FITC-conjugated anti-sheep antibody (Sigma) for 30 min at 37°C.

All incubations were performed in a moist chamber, and were followed by washes in the Tween-20 buffer. After the last wash the slides were dehydrated with the increasing series of ethanol and stained with propidium iodide (5µg/ml, Sigma).

## **2.6. Microscopic analysis**

Acridine orange stained slides were coded and scored blind under a magnification of 400x. A total of 1000 cells with preserved cytoplasm were scored for each concentration. The MN frequency was calculated as the number of micronucleated cells.

For FISH analyses the slides were scored with an fluorescence microscope (Olympus BX40) attached to a video camera equipped with a UV filter block and connected to a personal computer-based image analysis system. The micronuclei present in the cells were examined for the presence of one or more centromeric signals and were classified as centromere-positive (CEN+) or centromere-negative (CEN-). A total of 100 MN were scored for each concentration.

## **2.7. Statistical analysis**

The data of MN are expressed as means±SD for at least three independent determinations in triplicate for each experimental point. The data from controls and exposed groups (OA and DA) were compared by non-parametric two-tailed Kruskal-Wallis test. For FISH analysis, differences between means and between the percentages of CEN+ and CEN- were evaluated by the non-parametric Mann-Whitney test. A *P* value of less than 0.05 was considered as statistically significant.

### 3. Results

The results of MN assay in Caco-2 cells after 24 h exposure to different OA and DA concentrations are shown in Figure 1.

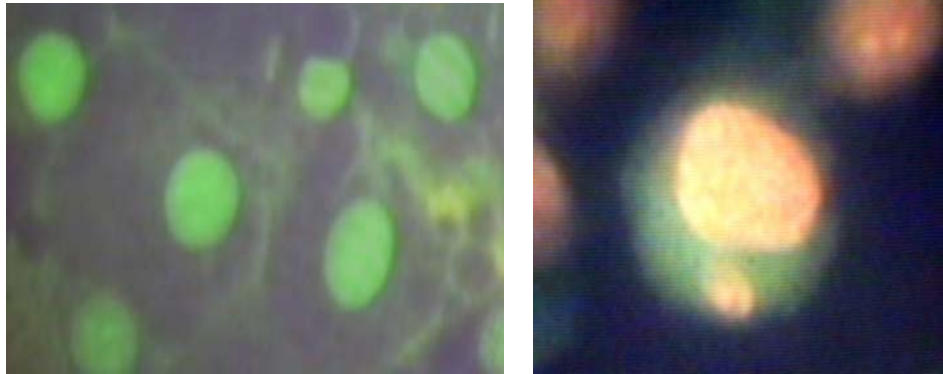


Figure 1. a) Control cells (400X), b) MN Cells (1000X)

Significant differences in the incidence of MN were observed in Caco-2 cells exposed to 15, 30 and 60 ng/ml OA concentration. OA induced formation 50 % MN cells at concentration of 60ng/ml. The positive control (MMC) induced the formation 58 % MN cells (Figure 2).



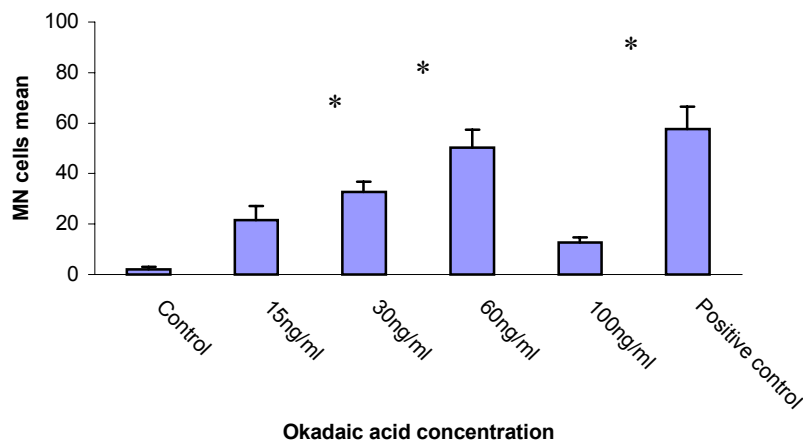


Figure 2. MN frequency in Caco-2 cells exposed to OA. Data are expressed as mean±SD. \* indicates significant difference from negative control ( $P<0.05$ ).

The results of MN assay after 24 h exposure to different DA concentrations are shown in Figure 3 DA clearly caused a dose-dependant increase in MN frequency. At concentration of 100ng/ml DA induced formation 56 % MN cells. The positive control (MMC) induced the formation 58 % MN cells.

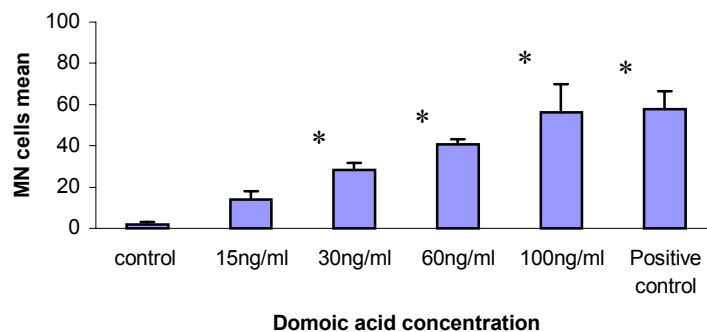


Figure 3. Micronuclei (MN) frequency in Caco-2 cells exposed to DA. Data are expressed as mean±SD. \* indicates significant difference from negative control ( $P<0.05$ ).

A comparison of MN formation rate in Caco-2 cells after 24 h exposed to different OA and DA concentrations has been made. This showed the same profile for both toxins except at 100 ng/ml where OA-treated cells showed a decreased number of MN (Figure 4).

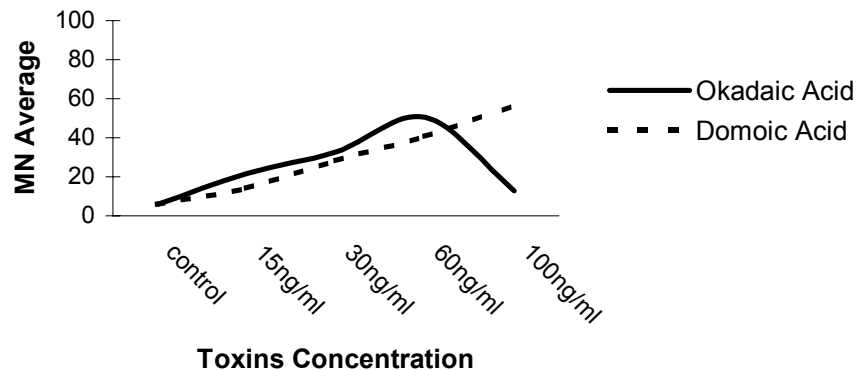


Figure. 4. Micronucleus (MN) formation in Caco2 cells after 24h OA and DA exposure. Results are means of three independent experiments.

To determine the nature of the MN induced by OA and DA, we carried out a MN assay in combination with FISH using a centromeric DNA probe. The results obtained with the FISH analysis in Caco2 cells exposed to OA are shown in Figure 5. An increase in CEN+ was found in OA-treated Caco-2 cells as compared to control, indicating a major contribution of CEN+ in the total MN scored in exposed cells.

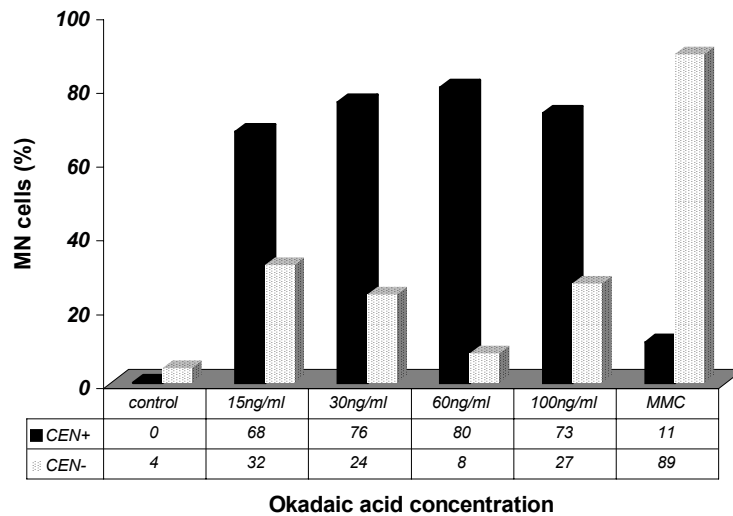


Figure. 5. FISH analysis in Caco2 cells after 24h exposure to OA. MN=number of micronucleated cells; CEN+= percent of MN containing one or more centromeric signals; CEN-=percent of MN containing no centromeric signal (CEN-); MMC= Mytomicin C (clastogenic compound). Results presented are yielded by 3 independent experiments.

The results obtained with the FISH analysis in Caco2 cells exposure DA are shown in Figure 6. The frequency of CEN- increased in Caco-2 cells exposed to DA after 24 h. No correlation between MN and frequency of CEN+ was observed.

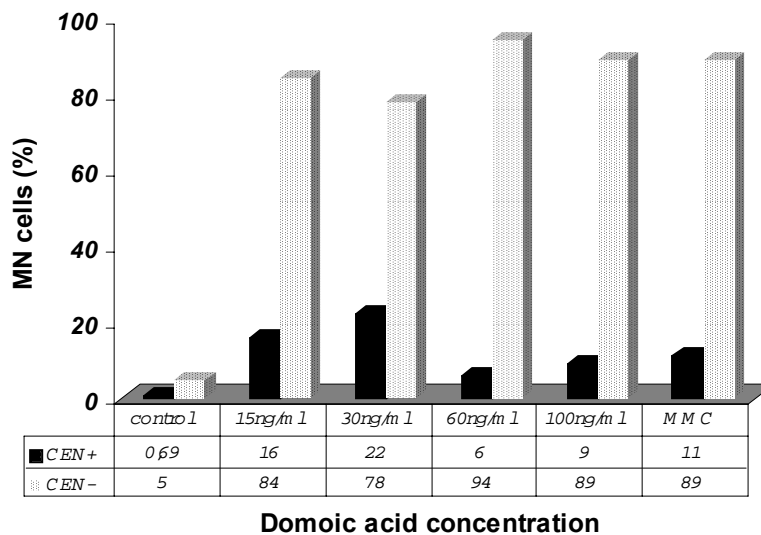


Figure 6. FISH analysis in Caco2 cells after 24h exposure to DA. MN= number of micronucleated cells; CEN+= percent of MN containing one or more centromeric signals; CEN-= percent of MN without a centromeric signal; MMC= Mytomicin C (clastogenic compound). Results are means of 3 independent experiments

#### 4. Discussion

The present study describes the use of *in situ* hybridization (FISH) with concentrated human pan-centromeric chromosome probe for the discrimination of MN arising from acentric fragments and from whole lagging chromosomes in Caco-2 cells exposed to okadaic acid and domoic acid.

Our results showed that only at OA concentration of 15, 30 and 60 ng/ml the frequency of MN significantly increased in Caco-2 cells. However, the concentration of 100 ng/ml decreased the incidence of MN to about 13 %. It could be observed that the highest concentration of OA reduced the MN formation. This fact has to be attributed to OA cytotoxicity because this concentration induced apoptosis in Caco-2 cells as previously shown (Traoré et al., 2001). The reduction in viable cell number reflects apoptotic cell death suggesting that MN cells that are lacking disappeared due to apoptosis.

FISH analyses in Caco-2 cells exposed to OA showed that this toxin increases the percentage of MN containing one or more centromeric signals (CEN+). A centromeric signal in a MN indicates that one entire chromosome resulting from chromosome mal-segregation (non-disjunction) (Chung et al., 2002) has been lost. Our results demonstrated that OA induced whole chromosome loss suggesting that OA is a compound with aneugenic potential. This results is in accordance with those obtained by Le Hegarat et al (2004) how showed that OA is an aneugenic compound that induces chromosome loss in chinese hamster ovary (CHO) cells by disturbing the mitotic phase, modifying the number of chromosomes in cells, which can be considered as one of the pathways leading to its carcinogenic effect in vivo. Le Hegarat et al (2003) related that aneuploidy occurs when replicated chromosomes fail to accurately segregate between the two daughter cells. The final result is the production of cells with abnormal number of chromosomes. In this context one may wonder what properties prevail in the present findings, genotoxic ones or epigenetic ones (Creppy et al., 2002) or both. If only genotoxic properties are involved one should find broken chromosomes. Instead lacking chromosomes are mostly found as indicated by MN- CEN+ in FISH technique. Aneugens could act on different cell targets, but disturbance of the mitotic spindle, kinetochores, centrosomes, microtubules and the anaphase promoting complex are mostly reported.

Our results in DA-exposed cells showed a significant increase in MN frequency for 30, 60 and 100ng/ml. This effect is a consequence of chromosomal aberrations and spindle disturbance, suggesting that DA is a genotoxic compound. The genotoxic response of DA in digestive glands cells has been demonstrated by Dizer et al., (2001). Conversely Rogers and Boyes (1989) have previously reported that DA did not increase MN frequency in V79 Chinese hamster lung cells. These cells are may be too much sensitive to DA and just disappeared when incubated with cytotoxic and genotoxic concentrations of DA. Our data do not permit any equivocation on the potential DNA damaging capacities of DA.

Using the FISH assay with pan-centromeric probes, our results revealed that DA increase the percentage of MN without a centromeric signal (CEN-) showing a deficit in centromere-positive MN (CEN+) in Caco-2 cells exposed to DA. These results suggest that DA induces clastogenic damage but is not aneugenic.

The MN associated to FISH test revealed that although OA and DA induce MN, OA is rather aneugenic whereas DA is clastogenic. The consequences of these effects remain to be evaluated in vivo in experimental animal models.

In conclusion, both Okadaic acid and Domoic acid bear mutagenic potential as revealed in Caco-2 cells by induction of MN formation. Moreover, OA induced whole chromosome loss suggesting a specific aneugenic potential, whereas DA seems simply clastogenic. At present, it could be postulated that the carcinogenic risk in humans will come from frequent consumption of mussels contaminated by these marine toxins, either alone or combined, since repair systems could be overloaded. The risk may be worsened by the presence of several heavy metals such as Cd, also contaminating mussels, that induces synergistic effects (Traoré et al., 2000).

**Acknowledgements:** This work was supported by French Academy of Medicine. Carvalho Pinto-Silva thanks the Brazilian National Research Councils (CAPES and CNPq) for his PhD Grant.

## References

- Carvalho Pinto-Silva, C. R., Ferreira, J.F., Costa, R.H.R., Belli Filho, P., Creppy, E.E., and Matias, W.G. (2003). Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. *Toxicol.* 41, 93-97.
- Chung, H. W., Kang, S. J., and Kim, S.Y. (2002). A combination of the micronucleus assay and FISH technique for evaluation of genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. *Mutation Research.* 516, 49-56.

- Creppy, E.E., Traoré, A., Baudrimont, I., Cascante, M., and Carratu, M.R. (2002). Recent advances in the study of epigenetic effects induced by the phycotoxin okadaic acid. *Toxicology*. 181-182, 433-439.
- Dizer, H., Fischer, B., Harabawy, A.S.A., Hennion, M.C., and Hansen, P. D. (2001). Toxicity of domoic acid in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol*. 12, 149-56.
- Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*. 285, 35-44.
- Heddle, J. A., and Carrano, A.V. (1977). The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutation Research*. 44, 63 – 69.
- Jeffery, B., Barlow, T., Moizer, K., and Paul, S., and Boyle, C. (2004). Amnesic shellfish poison. *Food Chem Toxicol*. 42, 545-557.
- Le Hegarat, L., Puech, L., Fessard, V., Poul, J.M., and Dragacci, S. (2003). Aneugenic potential of okadaic acid revealed by the micronucleus assay combined with the FISH technique in CHO-K1 cells. *Mutagenesis*. 18, 293-298.
- Le Hegarat, L., Fessard, V., Poul, J.M., Dragacci, S., and Sanders, P. (2004). Marine toxin okadaic acid induces aneuploidy in CHO-K1 cells in presence of rat liver postmitochondrial fraction, revealed by cytokinesis-block micronucleus assay coupled to FISH. *Environ Toxicol*. 19, 123-131.
- Matias, W.G., Traoré, A., and Creppy, E. E. (1999) Variations in the distribution of okadaic acid in organs and biological fluids of mice related to diarrhoeic syndrome. *Hum Exp Toxicol*. 18, 345-350.
- Rogers, C.G., and Boyes, B.G. (1989). Evaluation of the genotoxicity of domoic acid in a hepatocyte-mediated assay with V79 Chinese hamster lung cells. *Mutation Research*, 226, 191-195.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, 31, 9- 15.

- Schuler, M., Rupa, D.S., and Eastmond, D.A. (1997). A critical evaluation of centromeric labelling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage in vitro. *Mutation research*. 392, 81-95.
- Sournia, A., Chretiennot, D., Ricard, M. (1991). Marine phytoplankton: how species in the world ocean? *J. Plankton Res.* 13, 1093-1099.
- Sueoka, E., and Fujiki, H.J. (1997). Carcinogenesis of okadaic acid class tumor promoters derived from marine natural products. *Cancer Res. Clin. Oncol.* 123, 413-419.
- Traore, A., Ruiz, S., Baudrimont, I., Sanni, A., Dano, S.D., Guarigues, P., Narbonne, J.F. and Creppy, E.E. (2000). Combined effects of okadaic acid and cadmium on lipid peroxidation and DNA bases modifications (m5dC and 8-(OH)-dG) in Caco-2 cells. *Arch Toxicol.* 74, 79-84.
- Traore, S., Baudrimont, I., Ambaliou, A., Dano, S.D., and Creppy, E. E. (2001) DNA breaks and cell cycle arrest induced by okadaic acid in Caco2 cells, a human colonic epithelial cell line, *Arch. Toxicol.* 75, 110-117.



### 5.5.1. Discussões artigo nº 5

O presente estudo teve como objetivo verificar se os micronúcleos produzidos pelo ácido ocadáico (OA) e ácido domóico (DA), em células Caco-2, são formados por partes de cromossomos (clastogênese) ou formados por cromossomos inteiros (aneugênese). Para tanto, utilizou-se a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda centromérica para todos os cromossomos (STARFISH). Este método permite a detecção de sequências específicas de DNA/RNA em cromossomos metafásicos, bem como em núcleos interfásicos (Ribeiro *et al*, 2003).

Os resultados mostraram que nas concentrações de 15, 30 e 60 ng/ml de OA a frequência de micronúcleos aumentou, significativamente, em comparação ao grupo controle. Entretanto, na concentração de 100 ng/ml não houve diferença significativa em relação ao grupo controle. A incidência de micronúcleos nesta concentração foi cerca de 13%. Pode-se verificar que na maior concentração de OA (100ng/ml) houve uma redução na formação de micronúcleos (Figura 2). Este fato deve ser atribuído a citotoxicidade do OA, pois esta concentração induz apoptose em células Caco-2 como mostrado nos resultados apresentados no artigo 4. A redução do número viável de células reflete na morte das células por apoptose. Sugerindo que nesta concentração, a baixa incidência de micronúcleos se dá em razão da morte celular por apoptose. A análise do FISH em células Caco-2 expostas ao OA, provou que esta toxina aumenta a porcentagem de micronúcleos contendo um ou mais sinais centroméricos (CEN +). A presença do CEN+ no micronúcleo indica que o micronúcleo é formado por um cromossomo inteiro. Os resultados mostraram que o OA induz a perda de cromossomos inteiros, mostrando que esta toxina é um composto com potencial aneugênico. Na aneuploidia o resultado final é um número anormal de cromossomos nas células. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Hegarat *et al.* (2004), que mostraram que o OA é um composto aneugênico e induz a perda de cromossomos inteiros, em células de Hamster chinês (CHO) agindo na fase mitótica e alterando o número de cromossomos nas células. Esta ação pode ser considerada como uma das vias

que o OA age para efetuar o seu potencial cancerígeno *in vivo*. Neste contexto, pode-se questionar quais as propriedades reinam nos nossos resultados: a ação genotóxica ou a epigenética<sup>8</sup> (Creppy *et al.*,2002) ou ambas. Se apenas as propriedades genotóxicas fossem as implicadas dever-se-ia encontrar quebras cromossômicas (CE-). Ao invés disso, os cromossomos são, na maioria das vezes, encontrados como indicado por CEN+ (cromossomos inteiros) na técnica do FISH. Os agentes aneugênicos podem agir sobre diferentes alvos nas células, mas a ação no fuso mitótico, nos cinetócoros, nos centrômeros e na anáfase, que favorecem o complexo celular são na maior parte os mais atingidos.

Os resultados em células Caco-2 expostas ao DA, mostram um aumento significativo da frequência de micronúcleos nas concentrações de 30, 60 e 100ng/ml. Este efeito é uma consequência das aberrações cromossômicas e alteração no fuso mitótico sugerindo que DA é um composto genotóxico.

A resposta genotóxica de DA em células de glândulas digestivas foi mostrada por Dizer *et al.* (2001). Contrariamente, Rogers & Boyes (1989) mostraram que o DA não aumenta a frequência de micronúcleos em células pulmonares de Hamster chinês (V79). No entanto, a célula estudada pelos autores, pode ser, demasiadamente, sensível ao DA e morre uma vez incubada com concentrações citotóxicas e genotóxicas.

Os resultados das análises do FISH em células Caco-2 expostas ao DA, mostraram que a porcentagem de micronúcleos sem sinal centromérico (CEN-) é maior em relação a porcentagem de micronúcleos com sinal centromérico (Figura 6). De posse desses resultados, podemos sugerir que o DA induz quebra nos cromossomos, ou seja, age como um composto clastogênico.

---

#### 8. Mudanças no fenótipo sem alteração do genótipo

O ensaio do micronúcleo associado ao FISH mostrou que embora o OA e o DA aumentarem a frequência de micronúcleos nas células Caco-2, o processo de formação dos micronúcleos é diferente, pois o OA é aneugênico e o DA é clastogênico. Os agentes aneugênicos agem no fuso mitótico e originam

cromossomos que se atrasam na migração anafásica da divisão celular, alterando o número de cromossomos nas células. Os agentes clastogênicos induzem a formação de fragmentos cromossômicos ou cromatídicos acêntricos e na grande maioria das vezes estão relacionados com a promoção de tumores.

Em conclusão, o OA e o DA apresentam potencial mutagênico, como mostrado nas células Caco-2, com o aumento da formação de micronúcleos. No entanto, o OA induz a perda de cromossomos inteiros, que sugere um potencial aneugênico, enquanto o DA causa quebra nos cromossomos com potencial clastogênico. Pode-se sugerir, que o risco de câncer no homem vêm do consumo freqüente de moluscos contaminados por estas toxinas marinhas, pois os sistemas reparo podem ser sobrecarregados.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

No litoral de Santa Catarina estão sediados alguns dos principais núcleos urbanos do Estado, exibindo belezas naturais que atraem turistas do Brasil e do exterior, evidenciando a vocação ao turismo. A zona litorânea catarinense é composta por baías, enseadas, praias, costões rochosos e manguezais. Também no litoral de SC, encontra-se estabelecido o principal pólo pesqueiro nacional, com cerca de 32% do pescado nacional. A aqüicultura encontra-se em franco desenvolvimento, com mais de 2.000 famílias operando neste segmento.

Neste sentido, há de se considerar os relevantes aspectos sócio-ambientais relacionados à prática da aqüicultura. Em todo o planeta, as técnicas desenvolvidas têm sido utilizadas na propagação e na preservação de espécies, cujas populações foram reduzidas devido às atividades antrópicas. Além disso, ressalta-se o papel coadjuvante que exibem na conservação do meio aquático, uma vez que os cultivos devem ser mantidos com nível de qualidade que permita a manutenção saudável dos organismos.

Entretanto, os resultados apresentados neste estudo mostram que esta não é a realidade das águas costeiras do estado de Santa Catarina. Os valores de coliformes fecais foram altos durante todas as estações do ano. Apesar de não haver na literatura relação entre o aparecimento de

florações de algas e altos índices de coliformes, não se pode descartar a possibilidade destes eventos acontecerem.

Sabe-se que as florações de microalgas aparecem naturalmente. No entanto, vários relatos na literatura apontam para um aumento da probabilidade dessas florações em águas eutróficas. A eutrofização artificial, ou seja, induzida pelo homem, pode ser originada de efluentes domésticos, efluentes industriais e/ou decorrentes de atividades agrícolas. Além das florações, a degradação da alta biomassa oriunda dos processos eutróficos pode causar depleção de oxigênio, prejudicando, não somente espécies de valor comercial, como também os demais organismos que são incapazes de viver em zonas anóxicas. A co-ocorrência de vários fatores como, luz, nutrientes, salinidade, temperatura e oxigênio são necessários para amplificar ou minimizar os efeitos da qualidade de água (Zingone & Enevoldsen, 2000).

Os resultados deste estudo mostraram a presença de microalgas tóxicas, conhecidas por produzir potentes toxinas. Apesar dos parâmetros físico-químicos estarem nos níveis desejáveis, a simples presença desses organismos já demonstra que precauções devem ser tomadas a fim de evitar problemas de saúde pública e ambiental.

Os resultados, em condições laboratoriais, mostraram que o dinoflagelado *Prorocentrum lima*, espécie tóxica mais abundante nos pontos amostrados, mesmo em baixa densidade já é capaz de produzir quantidades de toxina que causam mutações nos hemócitos de mexilhões,

principal vetor de contaminação humana. Além disso, as espécies tóxicas observadas no litoral de Santa Catarina podem produzir, principalmente, as toxinas ácido ocadáico, ácido domóico e saxitoxina. Testes com o ácido ocadáico e domóico, em cultura de células humana, mostraram que em baixas concentrações, essas toxinas são citotóxicas e genotóxicas representando um risco para saúde pública através do consumo de moluscos contaminados.

No Brasil, o arcabouço legal que normatiza e orienta a busca do uso harmônico e equilibrado dos recursos naturais é constituído por várias leis, decretos, portarias e resoluções. Neste sentido, podemos inferir que em Santa Catarina a elaboração de políticas públicas voltadas para a questão da qualidade da água onde são cultivados organismos, utilizados na alimentação humana, se faz necessária e urgente.

Na aqüicultura, a sustentabilidade da atividade e a conseqüente qualidade do produto dependerão sempre do nível de consciência dos usuários dos recursos naturais, independentemente, da qualidade e da quantidade de leis disponíveis.

Contudo, a resolução Conama 357/2005, sobre balneabilidade das águas marinhas, no seu artigo 2º, parágrafo quarto, inciso (f) considera águas impróprias ao cultivo de organismos utilizados na alimentação humana, aquelas que apresentam floração de microalgas ou outros organismos, até que se comprove que não oferecem riscos à saúde pública. Como no Brasil ainda não existe uma política específica para as florações

de microalgas no oceano, podemos considerar esta resolução como um grande avanço.

Cabe ressaltar, que em várias regiões do mundo já foi possível demonstrar que os danos gerados por microalgas tóxicas e moluscos contaminados, para a saúde pública e meio ambiente podem ser minimizados com o emprego de diferentes técnicas, além da adoção de procedimentos de segurança como o monitoramento e a avaliação ambiental. Neste sentido, o monitoramento ambiental se constitui numa das ferramentas mais úteis e de possível implementação. Como resultado imediato, fornece dados atualizados para identificar as diferentes formas de impacto ambiental, sendo também capaz de apontar os riscos potenciais, trabalhar a prevenção e contribuir, inclusive, para dirimir os referidos conflitos de uso e assegurar condições adequadas dos produtos oriundos das áreas controladas. Os benefícios advindos deste trabalho favorecem a população consumidora de recursos pesqueiros, reduz custos à saúde pública no combate às enfermidades, resultantes da ingestão de produtos inadequados, e orienta as políticas públicas quanto à preservação e conservação dos ecossistemas.

Enquanto esta não é nossa realidade, podemos partir de alguns pontos básicos para evitar riscos à saúde pública e ao meio ambiente. Chamando a atenção dos órgãos competentes para que coloquem em prática a LEI Federal 9605/98, que prevê e incide penas à prática dos crimes ao meio ambiente, especificamente o artigo 54, que diz: “é crime

causar poluição de qualquer natureza em níveis tais que resultem ou possam resultar em danos à saúde humana, ou que provoquem a mortandade de animais ou a destruição significativa da flora”.



## **8. PERSPECTIVAS**

Com os resultados alcançados neste trabalho, acredita-se que ainda são necessários muitos estudos para o esclarecimento do risco da formação de floração de microalgas tóxicas no litoral de Santa Catarina.

Por outro lado, se faz urgente e necessária a criação de um programa de monitoramento da qualidade da água e de florações de microalgas tóxicas na costa catarinense, principalmente nas áreas utilizadas para maricultura. Este programa avaliaria também a qualidade sanitária dos moluscos.

Poder-se-ia também pensar na criação de uma comissão responsável pela criação de um plano para discutir e avaliar os caminhos sustentáveis da maricultura, desde a produção até o controle da qualidade. A interação de várias áreas nesta comissão poderia garantir o sucesso de uma proposta de gestão de risco de florações de microalgas tóxicas.

Os resultados mostram que o número de coliformes fecais na zona costeira alerta para necessidade de se dirigir esforços para a implementação de saneamento básico no litoral catarinense. Esforço este que deverá contar com a vontade política nas esferas Municipal, Estadual e Federal. A elevada quantidade de coliformes fecais no litoral catarinense remete a perguntas tais como, a consciência dos usuários dos recursos naturais e a competência e fiscalização dos órgãos governamentais.

Por fim, acredita-se que mais trabalhos devem ser realizados com a toxina ácido domóico para verificação de seus danos nos organismos

aquáticos. Além disso, a saxitoxina necessita ser estudada para avaliação de seu potencial citotóxico e genotóxico em culturas de células animal e humana.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACAQ. Associação Catarinense de Aqüicultura. Disponível em [www.acaq.org.br](http://www.acaq.org.br). Acesso em 12/11/2003.
- Allan, G. Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short-term oxygen stress on subsequent growth of juvenile *P. monodon*. **Aquaculture**, v. 94, p. 27-34, 1991.
- Aminot, A & Chaussepied, M. **Manuel de analyses chimiques en milieu marin**. Brest: CNEXO, 86 p., 1983.
- Anderson, D. M.; Andersen, P.; Bricelj, V.,M; Cullen, J. .J. and Rensel, J.E. **Monitoring and Management Strategies for Harmful algal Blooms in Coastal Waters**. IOC-UNESCO, 59. Paris, 268 p. , 2001.
- Aonuma, S.; Ushijima, T.; Shima and H., Nagau, M. Mutation induction by okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, in CHL cells but not in *S. typhimurium*. **Mutation Research**, v. 250, p. 375-381, 1991.
- APHA, WEF, AWWA. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 14 ed. Washington, p. 10-1-10-54, 1992.
- Azevedo, S.M.F. Toxinas de cianobactérias: causas e conseqüências para a saúde pública. **Medicina on line**, p. 1-3, 1998.
- Bayne, B. **Marine Mussel: Their Ecology and Physiology**. Cambridge. University Press Cambridge. International Biology Program, v.10, 126p., 1976.

- Beçak, W. & Paulete, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Eds. Livro de Técnicas Científicas, S.A., Rio de Janeiro, RJ. 305p, 1976.
- Belin, C.; Berthome, J.P. and Lassus, P. Dinoflagellés toxiques et phénomènes déaux colorées sur les côtes françaises: évolution et tendances entre 1975 et 1988. **Equinoxe**, v. 25, p. 30-38, 1989.
- Berthome, J.; James, M.; Curtis, T. and Nozawa, L. The biosynthesis of marine natural products. **Chemical**, v. 33, p. 1699-1733, 1985.
- Bevilacqua, V. **Cultivo sustentável de molusco traz benefícios: Produção aliada à preservação tem recursos do Banco Mundial e cria perspectivas ao produtor**. Diário Catarinense, Florianópolis, p. 40, 14 dezembro de 2001.
- Bhattacharya, D. & Medlin, L. Algal phylogeny and the origin of land plants. **Plantae Physiology**, v. 116, p. 9 -15, 1998.
- Bolch, T.; Kautsky, L. and Green, N. **Técnicas utilizadas para estudios de polución en macroalgas marinas**. In: Manual de Métodos Ficológicos. Eds. Alveal, K., Ferrario, M.E , Oliveira, E.C. and Sar, F. Universidad de Concepción, Concepción, Chile, p. 779-793, 1999.
- Botana, L.M.; Rodrigues-Vieytes, M.; Alfonso, A. and Louzao, C.M. **Phycotoxins: Paralytic Shellfish Poisoning and Diarrhetic Shellfish Poisoning. Handbook of Food Analysis**. Edit by Nollet, L.M., vol.2, 1996.
- Bourne, N.; Hodgson, C.A. and Whyte, C.A. **Manual of scallop culture in British Columbia. Canadian technical report of fisheries and aquatic sciences**, Nanaimo 1694, 215p., 1989.

- Boyd, C. **Water Quality in waterwater fishponds**. Agricultural Experimental Station. Auburn University. Opelika, Alabama, USA, 359 p., 1996.
- Branco, S. **Limnologia Sanitária, estudo de la polución de águas continentales**. Secretaria General da Organizaciion de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico e Tecnológico. *Série de Biología Monografía*, n.28. Washington, D.C.,120 p., 1984.
- Brandini, F. P.; Lopes, R. M.; Gutseit, K. S.; *et al.* **Planctonologia na plataforma continental do Brasil: diagnose e revisão bibliográfica**. REVIZEE, 188 p., 1997.
- Brusick, D. **Principles of genetic toxicology**. 2 ed. New York: Plenum Press, 236 p., 1988.
- Carmody, E.P.; James, K.J. and Kelly, S.S. Dinophysistoxin-2: The predominant diarrhoetic shellfish toxin in Ireland. **Toxicon**, v. 34, p.351-359, 1996.
- Carmouze, J. P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. São Paulo: Edgard Blucher/ FAPESP, 82p.,1997.
- Carrano, A.V.; Nataranjan, S. Considerations for populations monitoring using cytogenetic techniques. **Mut. Res.** V. 204, p. 379-406, 2002.
- Carreto, J. I.; Akselman, R.; Benavides, H. R.; Montoya, N. G.; Negri, R. M. El **Proyecto “maré roja” del instituto nacional de investigacion y desarrollo pesquero (INIPED)**. In: Eds. Sar, E. A.;

- Ferrario, O, M. E.; Reguera, B. Floraciones Algales em el Cono Sur Americano, Instituto Espanõl de Oceanografia, p. 269-288, 1991.
- Carvalho Pinto -Silva, C.R.; Ferreira, J.F.; Costa, R.H.R.; Belli Filho, P.; Creppy, E.E. and Matias, W.G. Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. **Toxicon**, v. 41, p. 93-97, 2003.
- CNUMAD. **Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento**. *Agenda 21*. Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações, Série Ação Parlamentar, nº 56,. 471p. 1995
- Cembella, D.R. A new shellfish poisoning from the bivalve. **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 4027-4030, 1996.
- Chapin , F.S.; Walter,B.H.; Hobbs, R.J.; Hooper, D.U.; Lawton, J.H.; and Tilman, Biotic control over the functioning of ecosystems. **Science**, v., 277, p. 500-504, 1997.
- Charlson, R.D.; James, K.J.; Kelly, S.S. and Tindall, D.R. Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in the Virgin Island. **Aquatic Toxicology**, v. 38, p.171-176, 1987.
- Chen, D.Z.X.; Boland, M.P.; Smillie, M.A.; Andersen, R.J. and Holmes, C.F.B. Identification of protein phosphatase inhibitors of the microcystin class in the marine environment. **Toxicon**, v. 31, p. 1407-1414, 1993.
- Creppy, E.E., Traoré, A., Baudrimont, I., Cascante, M., and Carratu, M.R. Recent advances in the study of epigenetic effects induced by the phycotoxin okadaic acid. **Toxicology**. V. 181, p. 433-439, 2002.

Ciotti, A., M. **Fitoplâncton da Plataforma Continental do Sul do Brasil: clorofila, feopigmentos e análise preliminar primária.**

Tese de mestrado, UFRGS, 1990.

Colt, J. Gás supersaturation. Impact on the design on and operation of aquatic systems. **Aquacultural Engineering**, v.5, p. 49-85, 1996.

Corrêa, I.C.S. Sedimentos superficiais da plataforma e talude do sul do Brasil. **Proceedings of the International Conference on Marine Resources of the Pacific. Vinã del Mar**, p. 155-163, 1983.

CTTmar - **Centro de Tecnologias da Terra e do Mar**. Disponível em :  
<[www.cttmar.univali.br/praias/informacoes/implementacaop](http://www.cttmar.univali.br/praias/informacoes/implementacaop)>.

Acesso em 22/11/2003.

Dales, B. & Yentsh, M. Seafood toxins. **Oceanus**, v.21, p. 41-52, 1978.

Daranas, A. H.; Norte M.; Fernandez, J. J. Toxic Marine Microalgae. **Toxicon**, v. 39, p. 1101-1132. 2001.

Depledge, M.H. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. **Mutation Research**, v.399, p. 109-122, 1998.

Diegues, A.C.S: **Povos e mares: leituras em sócio - Antropologia marítima**. Ed. Nupaub -USP, São Paulo, 206 p., 1995.

Dizer, H., Fischer, B., Harabawy, A.S.A., Hennion, M.C., and Hansen, P. D. Toxicity of domoic acid in the marine mussel *Mytilus edulis*. **Aquat Toxicol**. V. 12, p. 149-56, 2001.

Dodge, J.D. Revision of the Taxonomy within the genus *Prorocentrum*. **Botanical Journal Limnology**, v. 71, p. 102-105, 1982.

- Duve, C. The birth of complex cells. **Scientific American**, v, 274, p. 50-57, 1996.
- Epagri/UFSC. **Manual de cultivo de mexilhão *Perna perna***. Florianópolis, 139 p., 2004.
- Esteves, F. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência – FINEP, 575 p., 1988.
- Fast, A. & Boyd, C. **Water circulation, aeration and other management practices**. In: Marine Shrimp Culture: Principles and Practices. Arlo Fast & James Lester (Eds). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 457-495, 1992.
- Fenech M, Chang WP, Kirsh-Volders M, Holland N, Bonassi S and Zeiger E HUMN project: detailed description on the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mut. Res.**, v. 534, p.65-75, 2003.
- Ferreira, J. & Magalhães, A. **Desenvolvimento do cultivo de mexilhões em Santa Catarina (Sul do Brasil)**. In: VI Congresso Latinoamericano de Ciências del Mar. Mar Del Plata, Chile, p. 80, 1995.
- Fessard, V.; Grosse, Y.; Pfl-Leszkowicz, A. and Puisex-Dao, S. Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts , HESV keratinocytes. **Mutation Research**, v. 361, p. 133 -141, 1996.
- Fiala, M. **Phytoplankton:biomasse, production, numeration et culture**. Jacques, G., ed. UNESCO, 1979.



- Fillmann, G. **Caracterização química das massas de água da plataforma continental do sul do Brasil.** Tese de Mestrado, Universidade de Rio Grande, Brasil, 1990.
- Fleming, L. E.; Bean, J. A. and Baden, D.G. **Epidemiology and public health. Manual on Harmful Marine Microalgae.** IOC: Manual and Guides, UNESCO, p. 475-486, 1995.
- Freitas, J.C. **Toxinas de algas fitoplanctônicas. Manual de Métodos Ficológicos,** p. 311-327, 1995.
- Fujiki, H.; Sueoka, E.; Komori, A. and Suganuma, M. Tumor promotion and TNF- $\alpha$  gene expression by the okadaic acid class tumor promoters. **Environmental Carcinogenesis. & Ecotoxicologic Research,** v. 15:1, p. 1-40, 1997.
- Gad, S.C. & Weil, C.S. **Statistics for toxicologists.** In: Principles and methods of toxicology, student edn. Raven Press, New York. pp 273-320, 1982.
- Gago-Martinez, A.; Vazquez-Rodrigues, J.A.; Thibaut, P. and Quilliam, M. Simultaneous occurrence of Diarrhetic and Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Spanish Mussels in 1993. **Natural Toxins,** v.4, p.72-79, 1996.
- Hallegraeff, G. M. **Harmful Algae blooms: a global overview.** Manual on Harmful Marine Microalgae, IOC/Unesco, v, 33, p,1-23, 1995.
- Halstead, B.W. **Intoxications marine animals of the world.** Ed. Princeton: Darwin, 136 p., 1988.
- Hégarat, L., Nessler, F., Mourot, A., Marzin, D., and Fessard, V. Lack of DNA damage induction by okadaic acid, a marine toxin, in the

- CHO-Hprt and the in vitro UDS assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental mutagenesis**, v. 564, p.139-147, 2004.
- Hernandez-Becerril, D.U. **Fitoplancton marino en Mexico. Journal Latinoamerican of Microbiology**, v.29, p. 171-174, 1987.
- Hubold, G. Hydrography and plankton off southern Brazil and Rio of Prata. **Atlântica**, v. 4, p. 1-21, 1980.
- IBAMA. **Instituto brasileiro do Meio Ambiente, Anuário Estatístico**, 1998.
- IOC - Intergovernmental Oceanographic Commission. **Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)** . HAB Publication Series, Vol.1, UNESCO, 1995.
- Iverson, F.; Truelove, J.; Tryphonas, L. and Nera, E. The toxicology of domoic acid administered systemically to rodents and primates. **Journal Organic Chemical**, v. 63, p. 2475-2480, 1990.
- Kasting, J. F. Earth's early atmosphere. **Science**, v. 259, p. 920-926, 1993.
- Keller, M,D. & Guillard, R.R.L. Media for the Culture of oceanic ultraphytoplankton. **J. Phycol.**,v. 23, p. 633-638, 1985.
- Kumagai, M.; Yanagi, T.; Murata, M.; Yasumoto, Y.; Kat, M;Lassus, P. and Rodriguez-Vasquez, L. Okadaic acid as the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning in Europe. **Agric. Biol. Chem.**, v. 50, p. 2853-2857, 1986.
- Kuhnen, S.; Bueno, A.M.S.; Ferreira, J.F. and Agostini, J.M.S. **Padronização do teste do micronúcleo em hemócitos do**

- mexilhão *Perna perna*** . Resumos do 43º Congresso Nacional de Genética, Goiânia, Brasil, p. 118, 1997.
- Kurelec, B. The genotoxic disease syndrome. **Marine Environmental Research**, v. 35, p. 341-348, 1993.
- Laing, I. Cultivation of marine unicellular algae. Lab. Leaflet. MaMAFF Direct. **Fish. Res., Lowestoft**, v. 67, 31p., 1991.
- Lassus, P. Intoxications par les coquillages: une nette recrudescence. **Le Généraliste**, v.548, p. 22-33, 1989.
- Lassus, P.; Herbland, A. and Lebaut, M.C .Toxic blooms and toxic effects along the French Coast. **World Aquaculture**, v. 22, p. 49-54, 1991.
- Lima, I.D. **Distribuição e abundância de anchoita (*Engraulis anchoita*) em relação aos processos oceanográficos na plataforma continental do sul do Brasil**. Dissertação de Mestrado, Univ. Rio Grande, Brasil, 1992.
- Longhurst, A.; Sathyendranath, S.; Platt, T. and Caverhill, C. An estimate of global primary production in the ocean from satellite radiometer data. **Journal Plankton Research**, v.17:6, p. 1245 - 1271, 1995.
- López-Barea, J. & Pueyo, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. **Mutation Research**, v. 399, p. 3-15, 1998.
- Margaleff, R. **Ecologia**. Ediciones Omega S.A., Barcelona. 951 p, 1983.

- Martins, A.S. Distribution, abundance and interactions of the fish *Trichiurus lepturus* in the southern Brazil subtropical convergence ecosystem. **Fisheries Research**, v. 30, p. 217-227, 1997.
- Matias, W. G. & Creppy, E. E. Evidence for enterohepatic circulation of okadaic acid in mice. **Journal Toxicology Substancy Mechanisms**, v. 15, p. 405-414, 1996.
- Matias, W.G. & Creppy, E.E. Biological marker of ADN damage induced by okadaic acid in Vero cells. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 13, p, 83- 88, 1998.
- Matias, W. G.; Traore, A.; Bonini, M. and Creppy E.E. Oxygen reative radicals production in cell culture by okadaic acid and their implication in protein synthesis inhibition. **Human & Experimental Toxicology**, v.18: 5, p.345–350, 1999.
- Matthews, S. G. & Pitcher, G. C. **Worst recorded marine mortality on the South African coast.** In Yasumoto, T.. Oshima, Y.; Fukuyo, Y. (Eds.). Harmful and toxic algal blooms. Sendai:UNESCO, p. 89-92, 1996
- Mellgren, G.; Vintermyr, O.K.; Boe, R and Doskeland, S.O. Hepatocyte DNA republication is abolished by inhibitors selecting protein phosphatase 2A rather than phosphatase 1. **Cell Research**, v, 205, p, 293-301, 1993.
- Messner, D.J., Ao, P., Jagdale, A.B., Boynton, A.L. Abbreviated cell cycle progression induced by the serine/threonine protein phosphatase inhibitor okadaic acid at concentrations that promote neoplastic transformation. **Carcinogenesis**, v. .22 (8), p.1163-72, 2001.

- Moestrup **O. Economic aspects: blooms, nuisance species, and toxins.** In: Green, J. C. & Leadbeater, B. S. (Eds.). *The Haptophyte Algae*. Oxford: Clarendon Press, v. 51, p. 265-285, 1997.
- Moslen, M.T. & Legator, M.S. Advantages of a combined testing protocol (CCTP) with multiple endpoints: the reverse tier approach. **Mutation Research**, v. 205, p. 91-97, 1988.
- Morales, J.C. **Acuicultura marina animal.** Ed. Mundi-prensa, Madrid, 671p., 1991.
- Nusch, E.A Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. **Archivesl Hydrobiology**, v, 14, p.14-36, 1980
- Odebrecht, C.; Garcia, V.M. and Abreu, P.C. **Raphidophycean in southern Brazil.** IOC/Unesco Harmful Algae News. v, 4, p.12-13, 1995.
- Odebrecht, C.; Rorig, L.; Garcia, V.M. and Abreu, P.C. **Shellfish mortality and a red tide event in southern Brasil.** Harmuful marine algal blooms. Lavoisier Publishing: Paris, p. 213-218, 1995b.
- Odum, E.P. **Ecologia.** Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de janeiro, 434 p., 1986.
- Park, D.L. Detection of Ciguatera and Diarrheic Shellfish Toxins in Finfish and Shellfish with Ciguatera kit. **Journal of AOAC International**, v.78:2, p. 533-537, 1995.
- Poli, R., Poli, A.T., Andreatta, E. e Beltrame, E. **Aqüicultura: Experiências Brasileiras**, Ed. UFSC, 455 p., 2003

- Pourriot, R. **Écologie du plancton des eaux continentales**. Editora Masson, Rio de Janeiro, 198 p., 1982.
- Proença, L. A.; Schmitt, F.; Costa, T. and Rorig, L. Just a diarrhea? Evidence of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina, Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 50:6, p. 458 -462, 1998.
- Proença, L. A.; Lagos, N.; Rörig, L.; Silva, M. and Guimarães, S. Occurrence of paralytic shellfish toxins - PST in southe Brazilian waters. **Ciência e Cultura**, v. 51:1, p. 16-21, 1999.
- Proença, L.A.; Tamanaha, M.S. and Schmitt, F. **Floração de *Mesodinium rubrum*, um ciliado autotrófico não tóxico, no litoral de Santa Catarina**, In: IX Reunião Brasileira de Ficologia. Santa Cruz – Aracruz/ES. Algas, Biodiversidade e Exploração Racional, p. 246, 2002.
- Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F. and Marques, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Editora Ulbra, 356p., 2003.
- Rieber, M.S. & Rieber, M. Accessibility to DNA in carcinoma chromatin is promoted by nanomolar okadaic acid: effect on AT-rich DNA binding proteins. **Cancer Research**, v, 52, p. 6397-6399, 1992.
- Rios, E.C. **Seashell of Brasil**. Rio Grande, Editora da Furg, 2 edição, 492 p.,1994.
- Rogers, C.G., and Boyes, B.G. Evaluation of the genotoxicity of domoic acid in a hepatocyte-mediated assay with V79 Chinese hamster lung cells. **Mutation Research**, v. 226, p. 191-195, 1989.

- Rossini, G.P., Sgarbi, N., and Malaguti, C. The toxic responses induced by okadaic acid involve processing of multiple caspase isoforms. **Toxicon** , v. 39, p. 763–770, 2001.
- Sampayo, L. A. Freshwater tolerance of marine and estuarine larvae of *Odontesthes argentinenses* (Pisces: Atherinidae). **Archival Biology Technology**, v,35:1, p. 85-90, 1992.
- Santos, L. Santa Catarina esta de olho no saneamento. **Revista Ambiental**. Ano 4, n. 10, 2004.
- Schantz, E.J.; Ghzarossian, V.E.; Scoes, H.K.; Prezzanite, I.O. and Clardy, J. The structure of saxitoxin. **Journal American Chemical Society**, v. 97, p. 1238-1239, 1975.
- Seelinger, U.; Odebrecht, C. and Castello, J.P. **Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil**. Ed. Ecoscientia, 341p., 1998.
- Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R. and Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v, 175, p.184-191, 1988.
- Smayda T. J. What is a bloom? A commentary. **Limnology and Oceanography**, v. 42, p. 1132-1136, 1990.
- Sournia, A.; Chretiennot, D. and Ricard, M. Marine phytoplankton: how species in the world ocean?. **Journal Plankton Research**, V. 13, p. 1093-1099, 1991.

- Spector, D.L.; Goldman, R.D. and Leinwand, L.A. Fluorescence in situ hybridization to DNA. In: Subcellular Localization of Genes and their Products. **Cells A Laboratory Manual**, v. 3, p. 1-45, 1998.
- Steidinger, K. A. **Some taxonomic and Biologic Aspects of Toxic Dinoflagellates. Algal toxins in seafood and drinking water.** New York: Academic Press, p. 1-139, 1993.
- Steinert, S.A.; Steib-montee, R.; Leather, J.M. and Chadwick, D.B. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. **Mutation Research**, v. 399, p. 65-85, 1998.
- Suárez- Ilha, K. Marine biotoxins. **Journal Association Analysis Chemical**, v. 31, p. 160 - 198, 1999.
- Sueoka, E. ; Sueoka, N.; Suganuma, M. and Fujiki, H. Carcinogenesis os okadaic acid class tumor promoters derived from marine natural. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**, v. 123, p. 413 - 419, 1997.
- Suganuma, M.; Fujiki, H.; Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Hirota, M. and Sugimara, T. Okadaic acid: An additional non-phorbol-12-tetratecadenanoate-13-acetate-type tumor promoter. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 58, p. 1768-1771, 1988
- Svensson S. & Forlin, L. Intracellular effects of okadaic acid in the blue mussel *Mytilus edulis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, **Marine Environmental Research**, v. 46, p. 449-452, 1998.
- Tachibana,K.; Scheuer, P.J.; TsukitanI,Y.; Kikuchi, H.; Engen, D.V.; and chimitz, F.J. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two



marine sponges of the genus *halichondria*. **Journal American Chemical Society**, v. 103, p. 2469-2471, 1981.

Todd, E.C.D. **Amnesic shellfish poisoning – A new seafood toxin syndrome**. In: Toxic marine phytoplankton. Proceedings of the Fourth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Lund, Sweden. (Eds. Granéli, E.; Sundstrom, B.; Edler, L. and Anderson, D.M., Elsevier, New York, Amsterdam, London, p. 504-508, 1990.

Tohda, H.; Nagao, M.; Sugimura, T. and Oikawa, A. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, induces sister-chromatid exchanges depending on the presence of bromodeoxyuridine. **Mutation Research**, v. 289, p. 275-280, 1993.

Traore, S., Baudrimont, I., Ambaliou, A., Dano, S.D., and Creppy, E.E. DNA breaks and cell cycle arrest induced by okadaic acid in Caco2 cells, a human colonic epithelial cell line, **Arch. Toxicol.** V.75, p. 110-117, 2001.

Unesco. Organização das Nações Unidas para Educação, a Ciência e a Cultura. Disponível em “[www.unesco.org/ioc](http://www.unesco.org/ioc) .” Acesso em 14/05/2003.

Vieytes, M.R.; Fontal, O.I. and Botana, L.M. A fluorescent microplate assay for diarrheic shellfish toxins. *Analytical Biochemistry*, v.248, p. 258-264, 1997.

Vitousek, P.M.; Mooney, H.A.; Lubchenco, J. and Melillo, J.M. Human domination of earth's ecosystems. **Science**, v. 277, p. 494-499, 1997.

- Voltera, L.; Gucci, P.M.B. and Bruno, M. Problem of phenomenon of DSP (diarrhetic shellfish poisoning). **Ambiente Risorsa Salute**, v. 5, p. 12-17, 1990.
- Yasumoto, T.; Oshima, Y. and Yamaguchi, M. Occurrence of new type of shellfish poisoning in the Tokohu District. Bull. **Journal Society Scientific Fisheries**, v. 44, p. 1249-1255, 1980.
- Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Sugawara, W.; and Yamaguchi, M. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. **Journal Society Scientific Fisheries**, v. 46, p. 1405-1411, 1984.
- Yasumoto, T., Murata, T. and Oshima, Y. Diarrhetic shellfish toxins. **Tetrahedron**, v. 41, p. 1019-1025, 1989.
- Yuan, X.M., Li, W., Dalen, H., Lotem, J., Kama, R., Sachs, L., Brunk, U.T. Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v 99, p. 6286-6291, 2002
- Wright, J.L.C.; Boyd, R.K. and Freitas, A.S.W. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern PEI. **Cancer Journal Chemical**, v. 67, p. 481-485, 1989.
- Zenebon, O. & Pregnotatto, N. P. **Memórias técnico-científicas da divisão de bromatologia e química. In: Antunes, J. L. F.** Instituto Adolfo Lutz: 100 Anos de Saúde Pública. Secretaria de Estado da Saúde/SP. Instituto Adolfo Lutz, p. 173 - 198, 1992.
- Zeischwitz, C.V.; Vorwerk, H.; Tergau, F. and Steinfeld, H.J. Apoptosis induction by inhibitors of Ser/Thr phosphatases 1 and 2 A is associated with transglutaminase activation in two different

human epithelial tumour lines. **FEBS Lett**, v. 413, p. 147-151, 1997.

Zingone, A. & Enevoldsen, H. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. **Ocean & Coastal Management**. v. 43, p. 725-748, 2000.