

Presence of cytochrome P₄₅₀ in the Caribbean corals *Siderastrea siderea* and *Montastraea faveolata*

Presencia del citocromo P₄₅₀ en las especies de coral *Siderastrea siderea* y *Montastraea faveolata* del Caribe

E. García*
R. Ramos
C. Bastidas

Departamento de Biología de Organismos
Universidad Simón Bolívar
Apartado 89000, Caracas 1080-A, Venezuela
* E-mail: emgarcia@usb.ve

Recibido en junio de 2004; aceptado en julio de 2004

Abstract

Cytochrome P₄₅₀ was detected in the animal tissue of the scleractinian corals *Siderastrea siderea* and *Montastraea faveolata* collected from a reef site on the west coast of Venezuela. The concentration of P₄₅₀ in these species (0.4–2.1 nmol mg⁻¹ of microsomal protein) was similar to the levels found in other marine invertebrates, but higher than previously reported for other organisms of the phylum Cnidaria. Maximum P₄₅₀ content was detected in samples collected during the reproductive season of *S. siderea*. These results confirm the presence of a functional cytochrome P₄₅₀ in two coral species. Its usefulness as a biomarker for environmental monitoring has to be further investigated.

Key words: Cytochrome P₄₅₀, coral reefs, cnidarians, scleractinians, biomarkers.

Resumen

Se detectó citocromo P₄₅₀ en el tejido de colonias de los corales *Siderastrea siderea* y *Montastraea faveolata* de un arrecife de la costa al oeste de Venezuela. La concentración de P₄₅₀ en estas especies (0.4–2.1 nmol mg⁻¹ de proteína microsomal) es similar a los niveles detectados previamente en otros invertebrados marinos, pero superior a los valores reportados para otros organismos del phylum Cnidaria. El mayor contenido de P₄₅₀ fue encontrado en muestras extraídas durante el periodo reproductivo de *S. siderea*. Estos resultados confirman la presencia de un citocromo P₄₅₀ funcional en dos especies de coral. La utilidad de este complejo enzimático como biomarcador en los monitoreos ambientales deberá ser investigada con mayor profundidad.

Palabras clave: Citocromo P₄₅₀, corales escleractínidos, cnidarios, biomarcadores.

Introduction

Techniques using molecular and cellular biomarkers have been proposed as sensitive tools for assessing the effects of environmental distress in biological systems. The cytochrome P₄₅₀ monooxygenases are among the markers currently used in field studies (Snyder, 2000). Although these enzymes metabolize a wide variety of substrates, including endogenous molecules (e.g., steroids, fatty acids, prostaglandins) (Livingston, 1991; Porte *et al.*, 1991), their enzymatic activity is considered an indicator of exposure to pollutants, particularly to polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls (PCBs) (Cajaraville *et al.*, 2000). It is difficult, however, to obtain a linear relationship between the concentration of contaminants and the activity of P₄₅₀ in samples from natural environments, where endogenous compounds and xenobiotics could be acting simultaneously, or even synergistically, as inducers of such activity (Livingstone, 1993).

Introducción

Las técnicas que utilizan marcadores moleculares o celulares han sido propuestas como herramientas de alta sensibilidad para evaluar el efecto de perturbaciones ambientales sobre los sistemas biológicos. Las monooxygenasas del citocromo P₄₅₀ están entre los marcadores usados actualmente en los estudios de campo con este fin (Snyder, 2000). Aun cuando estas enzimas metabolizan una amplia variedad de sustratos, incluyendo moléculas endógenas (e.g., esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas) (Livingston, 1991; Porte *et al.*, 1991), su actividad es considerada como un indicador de la exposición del organismo a los contaminantes, particularmente a los hidrocarburos policíclicos aromáticos y a los bifenilos policlorados (PCB) (Cajaraville *et al.*, 2000). Sin embargo, es difícil obtener una relación lineal entre la concentración del contaminante y la actividad del P₄₅₀ en muestras provenientes de ambientes naturales, donde los compuestos endógenos y los de

Many aquatic invertebrates respond to xenobiotic exposure by increasing the activity of cytochrome P₄₅₀ and of the mixed function oxidases (MFO) (Snyder, 2000). Little is known, however, about such enzymatic activities in the phylum Cnidaria. Successful detection of cytochrome P₄₅₀ and other enzymes from the MFO complex in cnidarians is limited to three anemone species (Heffernan and Winston, 1998) and the scleractinian coral *Favia fragum* (Gassman and Kennedy, 1992). In contrast, *Montastraea faveolata* did not exhibit cytochrome P₄₅₀ activity after exposure to chlordane in a laboratory assay (Firman, 1995).

Scleractinian corals inhabit nearshore environments where they constitute an important asset both in terms of their aesthetic value and by providing refuge for fish and other marine biota. These environments are often heavily contaminated with hydrocarbons and their derivatives (e.g., Guzmán and Jarvis, 1996). Hence, it is important to study the potential involvement of detoxification enzymes such as P₄₅₀ in order to understand the adaptive response of cnidarians to the environmental changes induced by anthropogenic activity.

Samples were collected from the Morrocoy National Park, which is located on the west coast of Venezuela. During several decades this park has been subjected to the impact of industrial activity, tourism, coastal development and sedimentation of terrestrial inputs, such as those derived from runoff (Bastidas and García, 1999). This situation has resulted in an overall deterioration of the coral reef conditions (Bone *et al.*, 2001; Laboy-Nieves *et al.*, 2001), similar to that of other Caribbean localities (e.g., Hughes, 1994). Sediments collected concurrently in different localities within the park contain hydrocarbons, but this contamination varies geographically and seasonally (Jaffé *et al.*, 1998; García and Farina, 2000). Despite these conditions, coral species such as *Siderastrea siderea* and *Montastraea faveolata* are still present in these reefs, suggesting that they have mechanisms for tolerating such levels of environmental stress.

The purpose of this paper is to demonstrate the existence of cytochrome P₄₅₀ in the tissue of *S. siderea* and *M. faveolata*. Our results contribute to elucidate the presence of this enzyme in cnidarians, particularly in corals, for which studies are scarce.

Materials and methods

Study site and sampling procedures

Fourteen colonies of *S. siderea* and ten colonies of *M. faveolata* were collected from the Playa Caimán reef, in the Morrocoy National Park. These colonies were collected during the dry and rainy seasons (table 1), corresponding to the non-reproductive and reproductive seasons, respectively, of both species (Szmant, 1986; Soong, 1991; Guzmán and Holst, 1993). Corals were frozen in liquid nitrogen, transported to the laboratory and stored at -80°C until tissue extraction.

origen xenobiótico podrían estar actuando simultáneamente, o incluso sinérgicamente, como inductores de tal actividad (Livingstone, 1993).

Muchos invertebrados acuáticos responden a la exposición a xenobióticos incrementando la actividad del citocromo P₄₅₀ y de las oxidasas de función mixta (MFO) (Snyder, 2000). Sin embargo, en el phylum Cnidaria se conoce poco sobre la actividad de tales enzimas. La detección positiva de citocromo P₄₅₀ y de otras enzimas del complejo MFO en los cnidarios se limita a tres especies de anémonas (Heffernan y Winston, 1998) y al coral escleractíneo *Favia fragum* (Gassman y Kennedy, 1992). Por otro lado, en ensayos de laboratorio, *Montastraea faveolata* no mostró actividad del citocromo P₄₅₀ luego de ser expuesta al clordano (Firman, 1995).

Los corales escleractíneos habitan ambientes costeros donde constituyen un valor importante en términos estéticos y por su importancia al proporcionar refugio y alimento para peces y otras especies marinas. Con frecuencia, estos ambientes presentan altos niveles de contaminación por hidrocarburos y sus derivados (e.g., Guzmán y Jarvis, 1996). De allí la importancia fundamental de estudiar la contribución potencial de las enzimas de detoxificación, como el P₄₅₀, para entender la respuesta adaptativa de los cnidarios a los cambios ambientales inducidos por la actividad antropogénica.

Las muestras de coral en este estudio fueron extraídas del Parque Nacional Morrocoy, ubicado en la costa occidental de Venezuela. Por varias décadas este parque ha estado sometido a impactos por actividades industriales, turismo, desarrollos costeros y aportes terrígenos (Bastidas y García, 1999). Esta situación ha ocasionado un deterioro generalizado de las condiciones en el arrecife (Bone *et al.*, 2001; Laboy-Nieves *et al.*, 2001), similar al encontrado en otras localidades del Caribe. (e.g., Hughes 1994). Los sedimentos recolectados simultáneamente en distintas localidades del parque contienen cantidades de hidrocarburos que varían geográfica y estacionalmente (Jaffé *et al.*, 1998; García y Farina, 2000). Sin embargo, a pesar de estas condiciones, ciertas especies de coral como *Siderastrea siderea* y *Montastraea faveolata* están aún presentes en los arrecifes, lo cual sugiere que ellas poseen algún mecanismo que les permite tolerar tales niveles de estrés ambiental.

El propósito del presente trabajo es evidenciar la existencia de citocromo P₄₅₀ en el tejido de *S. siderea* y *M. faveolata*. Nuestros resultados contribuyen a revelar la presencia de esta enzima en los cnidarios, particularmente en los corales, para los que se han realizado escasos estudios.

Materiales y métodos

Lugar de estudio y procedimiento de muestreo

Se extrajeron catorce colonias de *S. siderea* y diez colonias de *M. faveolata* del arrecife Playa Caimán, en el Parque Nacional Morrocoy. Dichas colonias fueron recolectadas durante las estaciones de sequía y lluvia (tabla 1), correspondientes a la

Tabla 1. Microsomal P₄₅₀ activity in *Siderastrea siderea* and *Montastraea faveolata* from Morrocoy National Park (Venezuela) during the dry (non-reproductive) and rainy (reproductive) seasons.

Tabla 1. Actividad microsomal del P₄₅₀ en *Siderastrea siderea* y *Montastraea faveolata* del Parque Nacional Morrocoy (Venezuela) en la época de sequía (no reproductiva) y la de lluvia (reproductiva)

Species	Sampling season	Sampling date	P ₄₅₀ (nmol mg ⁻¹ microsomal protein)	P value
<i>Siderastrea siderea</i> (n = 5)	Dry	February 2002	0.434 ± 0.022	<0.001
<i>Siderastrea siderea</i> (n = 5)	Rainy	September 2002	2.177 ± 0.310	
<i>Siderastrea siderea</i> (n = 4)	Dry	March 2003	0.481 ± 0.061	<0.01
<i>Montastraea faveolata</i> (n = 5)	Dry	March 2003	0.705 ± 0.028	

Values are mean ± SD of individual coral colonies; n = number of colonies; P value for a Student *t*.

Enzyme preparation

The coral tissue was removed with a water-pick (Johannes and Wiebe, 1970) from the coral skeleton using a homogenization buffer, following Gassman and Kennedy (1992), as modified by Heffernan and Winston (1998). The homogenization buffer also included protease inhibitors and antioxidants: 0.15 M KCl, 0.02 M Hepes, N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-(2-ethane sulfonic acid) pH 7.4, 2 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), and 1 mM Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF).

The tissue was homogenized on ice with an Ultra-Turrax homogenizer, which disrupts the animal tissue but preserves the integrity of the zooxanthellae. The homogenate was serially centrifuged at 2000 g for 5 min at 4°C using a Sorvall RC-26 Plus Super Speed centrifuge to remove the zooxanthellae and the remaining skeletal elements. The supernatant was centrifuged at 110,000 g for 60 min in a Beckman L8-55 ultracentrifuge to sediment the microsomes. The microsomal fraction was resuspended in homogenization buffer with 20% glycerol (v/v) and stored at -80°C for no longer than 15 days prior to analysis. The protein concentration was measured using Bradford's (1976) method for all fractions. All enzymatic tests were run in duplicate.

Enzyme assay

Cytochrome P₄₅₀ was measured according to Omura and Sato (1964a). The carbon monoxide (CO) difference spectrum was recorded by adding sodium dithionite (DTN) and performing a background correction prior to the addition of CO. The P₄₅₀ content was determined in a 1-cm cuvette containing approximately 100–400 µg of microsomal protein solubilized with 10 mM potassium phosphate pH 7.4, which contained 1 mM EDTA, 1 mM DTT and 150 mM NaCl. The spectra were scanned (400–500 nm) at room temperature (22°C) on a dual

época no reproductiva y reproductiva, respectivamente, de ambas especies (Szmant, 1986; Soong, 1991; Guzmán y Holst, 1993). Los corales fueron congelados en nitrógeno líquido, transportados al laboratorio y preservados a -80°C hasta el momento de la extracción del tejido.

Preparación de las enzimas

El tejido fue extraído del esqueleto del coral mediante un *water-pick* (Johannes y Wiebe, 1970) utilizando tampón de homogenización, de acuerdo con Gassman y Kennedy (1992), con las modificaciones de Heffernan y Winston (1998). El tampón de homogenización fue complementado con inhibidores de proteasas y antioxidantes: 0.15 M de KCl, 0.02 M de Hepes, N-2-hidroxietil piperazina-N'-(2-etano ácido sulfónico) pH 7.4, 2 mM de DTT (ditiotreitól), 1 mM de EDTA (ácido etilendiamintetraacético), y 1 mM de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo).

El tejido se homogenizó en hielo con un homogenizador Ultra-Turrax que rompe el tejido animal, conservando la integridad de las zooxantelas. El homogenizado fue centrifugado varias veces a 2000 g por 5 min a 4°C, en una centrifuga Sorvall RC-26 Plus Super Speed, para eliminar la zooxantela y los restos de esqueleto. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 110,000 g durante 60 min, en una ultracentrifuga Beckman L8-55, para sedimentar los microsomas. La fracción microsomal fue resuspendida en tampón de homogenización con 20% de glicerol (v/v) y preservado a -80°C por un máximo de 15 días hasta efectuar los análisis. La concentración de proteínas en todas las fracciones fue determinada, por duplicado, mediante el método de Bradford (1976).

Ensayo enzimático

El citocromo P₄₅₀ fue medido según Omura y Sato (1964a). El espectro diferencial de monóxido de carbono (CO) fue

beam Perkin Elmer Lambda 35 spectrophotometer. The P_{450} concentration was calculated using the extinction coefficient ($\epsilon = 450\text{--}490 = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). If a peak was observed at 420 nm, the concentration of P_{420} was calculated in the same way but using an extinction coefficient of $110 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Omura and Sato, 1964b; Schenkman and Jansson, 1998).

Results

Colonies of *S. siderea* and *M. faveolata* consistently exhibited a typical 448–450-nm peak corresponding to the CO-reduced cytochrome P_{450} complex (figs. 1 y 2). The microsomal cytochrome P_{450} spectra were well resolved when DTN was added prior to the CO. In the extracts from both coral species the maximum peak at 450 nm was attained about 2–5 min after the addition of CO. Often, the 450-nm peak was accompanied with a positive reading at 420 nm. This value, however, was never higher than the absorbance obtained at 450 nm for the same sample.

The concentration of cytochrome P_{450} in *S. siderea* showed seasonal fluctuations (table 1). The concentrations in February were significantly lower than the concentrations found in September, when this species reproduces, i.e., broadcasts its gametes (Soong, 1991; Guzmán and Holst, 1993). In each species, the P_{450} concentration was very similar amongst colonies, and highly consistent between years for *S. siderea* (February 2002 and March 2003, table 1).

Montastraea faveolata also showed the presence of cytochrome P_{450} in March. Furthermore, the mean concentration of

registrado con adición de ditionita (DNT), realizando una corrección de fondo antes de agregar el CO. El contenido de P_{450} fue determinado en cubetas de 1 cm que contenían de 100 a 400 μg de proteínas microsomales solubilizadas en 10 mM de fosfato de potasio pH 7.4, 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT y 150 mM de NaCl. Los perfiles de espectro fueron barridos (400–500 nm) a temperatura ambiente (22°C) en un espectrofotómetro de doble haz Perkin Elmer Lambda 35. La concentración de P_{450} se calculó de acuerdo con la ecuación de la Ley de Beer y el coeficiente de extinción ($\epsilon = 450\text{--}490 = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Cuando se encontró un pico de actividad a 420 nm, la concentración de P_{420} se calculó de igual manera utilizando un coeficiente de extinción de $110 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Omura y Sato, 1964b; Schenkman y Jansson, 1998).

Resultados

Las colonias de *S. siderea* y *M. faveolata* mostraron consistentemente un pico a 448–450 nm, característico del complejo citocromo P_{450} reducido por CO (figs. 1 y 2). El espectro del citocromo P_{450} microsomal fue bien resuelto cuando el DTN se añadió antes de agregar el CO. La máxima lectura a 450 nm fue alcanzada entre 2 y 5 min luego de agregar el CO para ambas especies. Con frecuencia el pico a 450 nm era acompañado de una lectura positiva a 420 nm. Sin embargo, cuando ambos picos estaban presentes, la absorbancia a 420 nm nunca superó la absorbancia a 450 nm en la misma muestra.

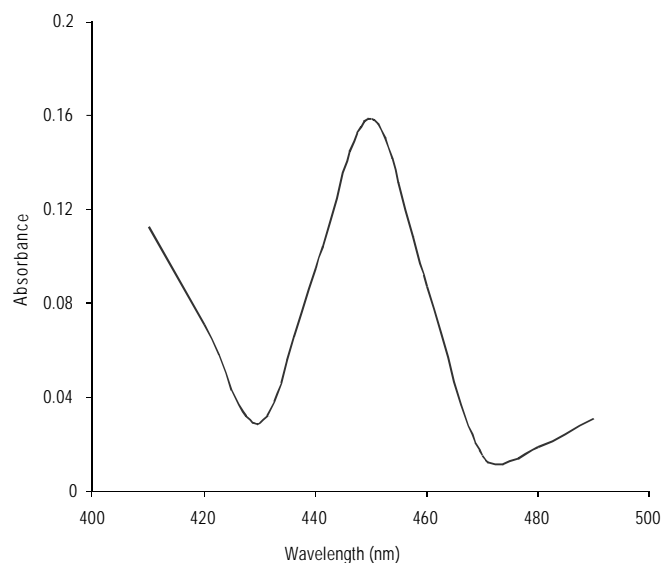


Figure 1. A typical carbon monoxide difference spectrum of dithionite-reduced microsomes from *Siderastrea siderea*. Cytochrome P_{450} concentration was $2.78 \text{ nmoles mg}^{-1}$ protein.

Figura 1. Típico espectro de monóxido de carbono de la fracción microsomal reducida con ditionita en *Siderastrea siderea*. La concentración de citocromo P_{450} fue $2.78 \text{ nmoles mg}^{-1}$ proteína microsomal.

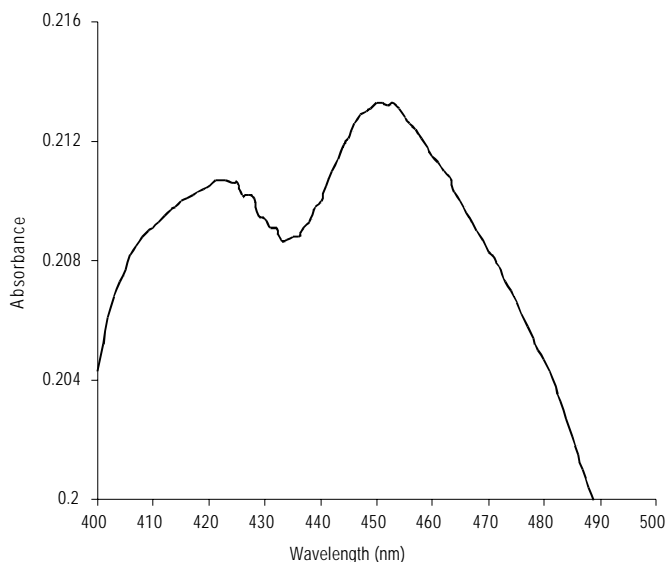


Figure 2. A typical carbon monoxide difference spectrum of dithionite-reduced microsomes from *Montastraea faveolata*. Cytochrome P_{450} concentration was $0.727 \text{ nmoles mg}^{-1}$ protein.

Figura 2. Típico espectro de monóxido de carbono de la fracción microsomal reducida con ditionita en *Montastraea faveolata*. La concentración de citocromo P_{450} fue $0.727 \text{ nmoles mg}^{-1}$ proteína microsomal.

cytochrome P₄₅₀ was significantly higher in *M. faveolata* than in *S. siderea* during the dry season studied (Student-*t* $P < 0.01$, table 1). The microsomal cytochrome P₄₅₀ spectra for *M. faveolata* differed from the spectra obtained for *S. siderea* in the reproductive season. Three colonies of *M. faveolata* collected in July 2003 only showed a peak of absorbance at 420 nm. Since no further activity was detected at 450 nm, it is difficult to compare these results with the values obtained for individuals collected in other seasons of the year, when the main activity was found exclusively at 450 nm. The cytochrome P₄₂₀ concentration for these colonies varied between 2.05 and 36.10 nmol mg⁻¹ microsomal protein.

Discussion

The P₄₅₀ concentrations in *S. siderea* and in *M. faveolata* were within the range reported for other marine invertebrates (0.43–2.77 nmol mg⁻¹ microsomal protein) and were substantially higher than those reported for other species of the phylum Cnidaria. In the sea anemone *Bunodosoma cavernata*, the P₄₅₀ content observed within a pool of 30 organisms was 52 pmol mg⁻¹ microsomal protein (Heffernan and Winston, 1998), whereas in the coral *Favia fragum*, Gassman and Kennedy (1992) detected a mean value of 0.09 nmol mg⁻¹ microsomal protein when working with individual colonies using a method similar to the one used in this study.

The detection of P₄₅₀ and some other components of the MFO system in marine invertebrates has proved difficult due to technical problems during the preparation of the microsomal fraction (Snyder, 2000). It is likely that this is why detection of such activity has been elusive for most studies in cnidarians.

Despite these difficulties, strong evidence points towards the existence of P₄₅₀ and MFO activity in these organisms. Heffernan and Winston (1998) reported the activity of the NAD(P)H-dependent cytochrome *c* (P₄₅₀) reductase in the microsomal fraction of the sea anemones *Anthopleura elegantissima*, *A. xanthogrammica* and *B. cavernata*. Nevertheless, P₄₅₀ was only found in the last species. Gassman and Kennedy (1992) detected the activity of glutathione-S-transferase (GST) and the presence of P₄₅₀ in the microsomal fraction of the coral *F. fragum*. In this study, we showed the presence of P₄₅₀ in the microsomal fraction of *S. siderea* and *M. faveolata*. Furthermore, these two coral species exhibited GST and NAD(P)H cytochrome *c* reductase activity (Ramos and García, 2003). These results strongly suggest the existence of a functional P₄₅₀-dependent MFO system in cnidarians, similar to that found in other marine invertebrates.

Siderastrea siderea and *Montastraea faveolata* expressed cytochrome P₄₅₀ in colonies from their natural environment. The major peak occurred at 450 nm and a second component at 420 nm. This spectral pattern differed from that reported for other marine invertebrates, such as anemones and echinoderms (den Besten, 1998; Heffernan and Winston, 1998), for which the highest peak occurred at 418 and 420 nm, respectively.

La concentración de citocromo P₄₅₀ en *S. siderea* varió estacionalmente (tabla 1). Las concentraciones en el mes de febrero fueron significativamente inferiores a las de septiembre, época en que dicha especie se reproduce por emisión de gametos (Soong, 1991; Guzmán y Holst, 1993). En cada especie, la concentración de P₄₅₀ fue muy similar entre las distintas colonias y consistente en distintos años para *S. siderea* (febrero de 2002 y marzo de 2003, tabla 1).

Montastraea faveolata también mostró la presencia de P₄₅₀ en marzo. Mas aún, la concentración media de citocromo P₄₅₀ fue significativamente superior en *M. faveolata* que en *S. siderea* durante las estaciones de sequía estudiadas (*t* de Student $P < 0.01$, tabla 1). El espectro de citocromo P₄₅₀ microsomal en *M. faveolata* se diferenció del de *S. siderea* durante la época reproductiva. Tres de las colonias de *M. faveolata* extraídas en julio de 2003 sólo mostraron un pico de absorbancia a 420 nm. En estas colonias no se detectó ninguna actividad a 450 nm, lo que hace difícil comparar estos resultados con los valores obtenidos en aquellos individuos recolectados en otras épocas del año en las que la mayor actividad se encontró exclusivamente a 450 nm. El rango de concentración del P₄₂₀ en estas colonias fue entre 2.05 y 36.10 nmol mg⁻¹ proteína microsomal.

Discusión

Las concentraciones de P₄₅₀ detectadas en *S. siderea* y *M. faveolata* se encuentran dentro del rango reportado en otras especies de invertebrados marinos (0.43–2.77 nmol mg⁻¹ proteína microsomal), pero fueron considerablemente superiores que las reportadas para otras especies del phylum Cnidaria. En la anémona de mar *Bunodosoma cavernata*, Heffernan y Winston (1998) observaron que el contenido de P₄₅₀ en un extracto microsomal de 30 organismos, fue de 52 pmol mg⁻¹ proteína microsomal, mientras que en el coral *Favia fragum*, Gassman y Kennedy (1992) encontraron, trabajando con colonias individuales, y de manera similar a nuestro estudio, un valor medio de 0.09 nmol mg⁻¹ proteína microsomal.

La detección de P₄₅₀ y otros componentes del sistema MFO, en invertebrados marinos, usualmente no ha sido fácil por las dificultades técnicas encontradas durante la preparación de la fracción microsomal (Snyder, 2000). Ésta es probablemente la razón por la cual su detección ha sido difícil en cnidarios.

A pesar de estas dificultades, una serie de evidencias señalan la existencia de P₄₅₀ y MFO en estos organismos. Heffernan y Winston (1998) encontraron actividad citocromo *c* (P₄₅₀) reductasa dependiente de NAD(P)H en la fracción microsomal de las anémonas de mar *Anthopleura elegantissima*, *A. xanthogrammica* y *B. cavernata*, aunque el P₄₅₀ sólo fue encontrado en la última de estas especies. Así también, Gassman y Kennedy (1992) detectaron actividad de glutathione-S-transferasa (GST) y presencia de P₄₅₀ en la fracción microsomal del coral *F. fragum*. En este estudio, se muestra la presencia de P₄₅₀ en la fracción microsomal de *S. siderea* y *M. faveolata*. Más

Asteria rubens and *Echinus esculentus* only showed a 420-nm peak in June and July, during the reproductive season (den Besten *et al.*, 1990; den Besten 1998). In this study, *M. faveolata* also showed this pattern with only one peak at 420 nm in July, before the onset of the reproductive season. It is important to emphasize that, at the present time, our findings regarding the shifting pattern of P₄₂₀ activity concomitant with the onset of the reproductive season can only be interpreted as a coincidence. Any further relationship of P₄₂₀ and its role in the *M. faveolata* reproductive activity remain to be proved. High P₄₂₀ activity in other organisms has been related to the size and reproductive status of the individuals, and to environmental pollution gradients (Livingston, 1991). In the literature, the absorbance peak at 420 nm has been interpreted in different ways. Omura and Sato (1964b) referred to P₄₂₀ as the solubilized form of cytochrome P₄₅₀. Livingstone *et al.* (1989) and Livingston (1991) suggested that P₄₂₀ is a degraded form of P₄₅₀, due to high proteolytic activity within the microsomes of marine invertebrates. On the other hand, Heffernan and Winston (1998) consider that P₄₁₈ is unlikely to be a degraded form of P₄₅₀.

Interspecific and intraspecific variability in the concentration of P₄₅₀ has been commonly found in marine invertebrates (Snyder, 2000) such as anemones, polychaetes, equinoderms, mollusks and crustaceans (Livingstone, 1991; den Besten, 1998; Heffernan and Winston, 1998; James and Boyle, 1998; Lee, 1998). Overall, the content of cytochrome P₄₅₀ in *S. siderea* and *M. faveolata* was similar to that in other marine invertebrates. These results contrasted with the very low concentration of P₄₅₀ reported in the coral *F. fragum* (Gassman and Kennedy, 1992) and its absence in *M. faveolata* (Firman, 1995). Our results show that the content of P₄₅₀ in *M. faveolata* was 1.5 times higher than in *S. siderea*, both collected in March 2003.

In the Caribbean, the reproductive seasons of *S. siderea* and *M. faveolata* spans from July to September (Szmant, 1986; Soong, 1991; Guzmán and Holst, 1993; Bastidas *et al.*, in press). The seasonal fluctuations of P₄₅₀ in *S. siderea* seemed to be coincident with its reproductive cycle. Lower levels of P₄₅₀ were detected in February, during the non-reproductive period of the year, whereas higher levels of P₄₅₀ were found in samples collected when this species attains its reproductive peak (September). Also, a difference in the absorbance spectrum of *M. faveolata* was observed during the reproductive season, when this shifted from a dominance at 450 nm to a unique peak at 420 nm. For the month of July, during the reproductive season, the activity ratio of cytochrome P₄₂₀/P₄₅₀ is about 5. In other marine crustaceans and echinoderms, increased cytochrome activity has been related to reproductive activity, by playing a role in the regulation of steroid synthesis and in the production of gametes (Lee *et al.*, 1981; Lee, 1982; den Besten, 1998; Hall, 1988). Assuming that P₄₅₀ and P₄₂₀ are the oxidized/reduced forms of the same cytochrome, it could be

aún, estas dos especies de coral muestran actividad GST y citocromo *c* reductasa dependiente de NAD(P)H (Ramos y García, 2003). Estos resultados sugieren la existencia del sistema funcional del P₄₅₀ y las enzimas dependientes del MFO en cnidarios, similar a lo encontrado en otros invertebrados marinos.

Siderastrea siderea y *Montastraea faveolata* muestran una clara presencia del citocromo P₄₅₀ en colonias provenientes de ambientes naturales donde fueron recolectadas. Esta presencia fue determinada en la diferencia de espectro de CO, con un pico principal a 450 nm y un segundo componente de menor actividad a 420 nm. El perfil de espectros difiere de los reportados para otros invertebrados marinos como anémonas y equinodermos (den Besten, 1998; Heffernan y Winston, 1998), donde el mayor pico se encuentra a 418 y 420 nm, respectivamente. *Asteria rubens* y *Echinus esculentus* sólo muestran un pico a 420 nm en junio y julio, durante su época reproductiva (den Besten *et al.*, 1990; den Besten, 1998). En este estudio, *M. faveolata* también mostró este tipo de espectro con un solo pico a 420 nm en julio, antes de su periodo reproductivo. Es importante enfatizar que nuestros resultados referentes al cambio de patrón de actividad a P₄₂₀ concomitante con el inicio de la época reproductiva, sólo pueden ser interpretados hasta ahora como una coincidencia. Cualquier interpretación ulterior del rol del P₄₂₀ en la actividad reproductiva de *M. faveolata* debe ser demostrada. En otros organismos, un incremento en la actividad de P₄₂₀ ha sido relacionada con la talla y el estado reproductivo del individuo, así como con la presencia de un gradiente de contaminación ambiental (Livingston, 1991). En la literatura, el pico de absorbancia a 420 nm ha sido interpretado de diferentes formas. Omura y Sato (1964b) se refieren al P₄₂₀ como una forma solubilizada del citocromo P₄₅₀. También Heffernan y Winston (1998) consideran que es poco probable que el P₄₁₈ sea una forma degradada del P₄₅₀. Sin embargo, Livingstone *et al.* (1989) y Livingstone (1991) sugieren que el P₄₂₀ es un producto de degradación del P₄₅₀, debido a la gran actividad proteolítica de las fracciones microsomales de los invertebrados marinos.

En invertebrados marinos como anémonas, poliquetos, equinodermos, moluscos y crustáceos (Livingstone, 1991; den Besten, 1998; Heffernan y Winston, 1998; James y Boyle, 1998; Lee, 1998) resulta muy común encontrar gran variabilidad inter e intraespecífica en la concentración de citocromo P₄₅₀ (Snyder, 2000). En general, el contenido de P₄₅₀ encontrado en este estudio para *S. siderea* y *M. faveolata* fue similar al hallado en otros invertebrados marinos. Estos resultados, sin embargo, contrastan con la baja concentración de P₄₅₀ encontrada en *F. fragum* (Gassman y Kennedy, 1992) y su ausencia en *M. faveolata* (Firman, 1995). Nuestros resultados mostraron que para la misma época del año (marzo de 2003) el contenido de P₄₅₀ en *M. faveolata* fue 1.5 veces mayor que en *S. siderea*.

En el área del Caribe la época reproductiva de *S. siderea* y *M. faveolata* va de julio a septiembre (Szmant, 1986; Soong, 1991; Guzmán y Holst, 1993; Bastidas *et al.*, en prensa). Las fluctuaciones estacionales del P₄₅₀ en *S. siderea* parecen

speculated that the increase in activity observed may be involved in the reproduction of this coral species.

In conclusion, our results show: (1) a detectable P₄₅₀ enzymatic system in *S. siderea* and *M. faveolata*; (2) levels of P₄₅₀ in *S. siderea* and *M. faveolata* similar to those previously reported for other marine invertebrates and the largest ever reported for cnidarians; and (3) a seasonal variation of the content of cytochrome P₄₅₀ in *S. siderea*, this being highest during the reproductive period. Studies to elucidate the level of enzymatic activity in different seasons and localities, as well as the potential role of P₄₅₀ as a detoxifying mechanism in *S. siderea* and *M. faveolata* are currently underway in our laboratory.

Acknowledgements

We would like to thank G. Farache for his advice during the study and helpful comments during the preparation of the manuscript. We also thank L. Márquez, H. Guzmán, R. Cipriani and F. Osborn for critical reviews of this work, and are grateful to three anonymous reviewers whose comments improved the manuscript. This research was supported by FONACIT, under project S1-2001000368.

References

- Bastidas, C. and García, E., (1999). Metal content on the reef coral *Porites astreoides*: An evaluation of river influence and 35 years of chronology. *Mar. Pollut. Bull.*, 38: 899–907.
- Bastidas, C., Ramos, R., Croquer, A., Leon, A., Weinberger, C., Kortnik, V., and Marquez L. (in press). Coral mass- and split-spawning at a coastal and an offshore Venezuelan reefs, southern Caribbean. *Hydrobiologia*, XX: 1–6.
- Bone, D., Cróquer, A., Klein, E., Pérez, D., Losada, F., Martín, A., Bastidas, C., Rada, M., Galindo, L. y Penchaszadeh, P. (2001). Programa CARICOMP: Monitoreo a largo plazo de los ecosistemas marinos del Parque Nacional Morrocoy, Venezuela. *Interiencia*, 26: 457–462.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C. and Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *Sci. Total Environ.*, 247: 295–311.
- den Besten, P.J. (1998). Cytochrome P₄₅₀ monooxygenase system in echinoderms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121C: 139–146.
- den Besten, P.J., Herwig, H.J., Donselaar, E.G. and van Livingstone, D.R. (1990). Cytochrome P₄₅₀ monooxygenase system and benzo(a)pyrene metabolism in equinoderms. *Mar. Biol.*, 107: 171–177.
- Firman, J.C. (1995). Chronic toxicity of pesticides to reef-building corals: Physiology, biochemical, cellular and developmental effects (*Montastraea faveolata*, *Porites divaricata*, *Aiptasia pallida*). Ph.D. dissertation, Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Science, University of Miami, 125 pp.
- García, E. y Farina, O. (2000). Evaluación de la calidad del agua y de los indicadores de la contaminación del Parque Nacional Morrocoy y sus áreas de influencia. En: Estudio Integral del Sistema Parque Nacional Morrocoy con Vías al Desarrollo de coincidir con el ciclo reproductivo. En febrero, durante la época no reproductiva, se encontraron niveles bajos de P₄₅₀, mientras que los niveles más altos aparecieron en las muestras recolectadas cuando la especie alcanza su pico reproductivo (septiembre). También se observaron diferencias en el espectro de absorbancia de *M. faveolata* durante la época reproductiva, ya que la dominancia del pico a 450 nm cambia a un pico único a 420 nm. En el mes de julio, durante la época reproductiva, el cociente de la actividad de los citocromos P₄₂₀/P₄₅₀ es alrededor de 5. En otros crustáceos marinos y equinodermos, el incremento en la actividad del citocromo se ha relacionado con la actividad reproductiva mediante su intervención en la regulación de la síntesis de esteroides y en la producción de gametos (Lee *et al.*, 1981; Lee, 1982; den Besten, 1998; Hall, 1988). Suponiendo que el P₄₅₀ y P₄₂₀ son las formas oxidada y reducida del mismo citocromo, se podría especular que el incremento de actividad que se observa en nuestro estudio juega un papel en la reproducción de esta especie de coral.
- En conclusión, nuestros resultados mostraron: (1) la presencia de un sistema enzimático P₄₅₀ detectable en los corales *S. siderea* y *M. faveolata*; (2) niveles de P₄₅₀ en *S. siderea* y *M. faveolata* similares a los reportados previamente para otros invertebrados marinos, y superiores a los reportados para cnidarios; y (3) una variación estacional del contenido del citocromo P₄₅₀ en *S. siderea*, alcanzando su valor más alto durante el periodo reproductivo. Actualmente en nuestro laboratorio se realizan estudios para determinar el nivel de la actividad enzimática del P₄₅₀ en *S. siderea* y *M. faveolata* en diferentes periodos del año y localidades, así como el potencial de esta actividad como mecanismo detoxificador.

Agradecimientos

Queremos agradecer a G. Farache sus acertados consejos durante la realización de este estudio y su ayuda en la preparación del manuscrito. También agradecemos a L. Márquez, H. Guzmán, R. Cipriani y F. Osborn la revisión bilingüe del manuscrito y a los tres revisores anónimos. Esta investigación es financiada por el FONACIT en el proyecto Ref. S1-2001000368.

Traducido al español por los autores.

Planes de Uso y Gestión para su Conservación. Primer Informe Técnico CONICIT, Caracas, Venezuela, 33 pp.

- Gassman, N.J. and Kennedy, C.J. (1992). Cytochrome P₄₅₀ content and xenobiotic metabolizing enzyme activities in the scleractinian coral, *Favia fragum* (ESPER). *Bull. Mar. Sci.*, 50: 320–330.
- Guzmán, H.M. and Holst, I. (1993). Effects of chronic oil-sediment pollution on the reproduction of the Caribbean reef coral *Siderastrea siderea*. *Mar. Pollut. Bull.*, 26: 276–282.
- Guzmán, H.M. and Jarvis, K.E. (1996). Vanadium century record from Caribbean reef corals: A tracer of oil pollution in Panama. *Ambio*, 25: 523–526.
- Hall, P.F. (1988). Cytochromes P-450 and the regulation of steroid synthesis. *Steroid*, 48: 131–136.

- Heffernan, L.M. and Winston, G.W. (1998). Spectral analysis and catalytic activities of the microsomal mixed-function oxidase system of the sea anemone (phylum: Cnidaria). *Comp. Biochem. Physiol.*, 121C: 371–383.
- Hughes, T.P. (1994). Catastrophes, phase-shift, and large-scale degradation of Caribbean coral reefs. *Science*, 265: 1547–1551.
- Jaffé, R., Leal, I., Alvarado, J., Gardinali, P. and Sericano, J. (1998). Baseline study on the levels of organic pollutants and heavy metals bivalves from the Morrocoy National Park, Venezuela. *Mar. Pollut. Bull.*, 36: 925–929.
- James, M.O. and Boyle, S.M. (1998). Cytochrome P₄₅₀ in Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121C: 157–172.
- Johannes, R.E. and Wiebe, W.J. (1970). Method for determination of coral tissue, biomass and composition. *Limnol. Oceanogr.*, 15: 822–824.
- Laboy-Nieves, E.D., Klein, E., Conde J., Losada, F., Cruz, J. and Bone, D. (2001). Mass mortality of tropical marine communities in Morrocoy, Venezuela. *Bull. Mar. Sci.*, 68: 163–179.
- Lee, R.F. (1982). Mixed function oxygenases (MFO) in marine invertebrates. *Mar. Biol. Lett.*, 2: 87–107.
- Lee, R.F. (1998). Annelid cytochrome P-450. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121C: 173–179.
- Lee, R.F., Singer, S.C. and Page, D.S. (1981). Responses of cytochrome P-450 systems in marine crab and polychaetes to organic pollutants. *Aquat. Toxicol.*, 1: 355–365.
- Livingstone, D.R. (1991). Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. *Adv. Comp. Environ. Physiol.*, 7: 45–185.
- Livingstone, D.R. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 57: 195–211.
- Livingstone, D.R., Kirchin, M.A. and Wiseman, A. (1989). Cytochrome P₄₅₀ and oxidative metabolism in mollusks. *Xenobiotica*, 19: 1041–1062.
- Omura, T. and Sato, R. (1964a). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, 239: 2370–2378.
- Omura, T. and Sato, R. (1964b). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 239: 2379–2385.
- Porte, C., Cole, M., Albagaiges, J. and Livingstone, D.R. (1991). Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C: 183–186.
- Ramos, R. y García, E. (2003). Determinación de la glutatión transferasa, citocromo c NADPH reductasa y citocromo P₄₅₀ en dos especies de corales escleractinidos en el Parque Nacional Morrocoy, Venezuela. Décimo Congreso Latinoamericano de Ciencias Marinas, San José, Costa Rica, 379 pp.
- Schenkman, J.B. and Jansson, I. (1998). Spectral analyses of cytochromes P₄₅₀. In: I.R. Phillips and E.A. Shephard, E.A. (eds.), *Cytochrome P₄₅₀ Protocols. Methods in Molecular Biology*, 107. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 25–33.
- Snyder, M.J. (2000). Cytochrome P₄₅₀ enzymes in aquatic invertebrates: Recent advances and future directions. *Aquat. Toxicol.*, 48: 529–547.
- Soong, K. (1991). Sexual reproductive patterns of shallow-water reef corals in Panama. *Bull. Mar. Sci.*, 49: 832–846.
- Szmant, A.M. (1986). Reproductive ecology of Caribbean reef corals. *Coral Reefs*, 5: 43–54.