

**ORIGINAL ARTICLE /ARTÍCULO ORIGINAL****ELECTROLYTE ADJUSTMENTS AND RNA/DNA RATIO IN *PERNA VIRIDIS* (LINNAEUS, 1958) SUBJECTED TO SALINITY CHANGES****AJUSTES ELECTROLÍTICOS Y RELACIÓN ARN/ADN EN *PERNA VIRIDIS* (LINNAEUS, 1958) SOMETIDO A CAMBIOS DE SALINIDAD**Mairin Lemus^{1,3*}, Nilis Rojas², Kyung Chung³ & Amalia Barceló³¹Laboratorio de Biología Celular, Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente. *Correo electrónico: mlemus88@gmail.com²Postgrado de Biología Aplicada, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.³Laboratorio de Ecofisiología y Ecotoxicología, Departamento de Biología Marina, Instituto Oceanográfico de Venezuela.

The Biologist (Lima), 2014, 12 (1), jan-jun: 23-32.

ABSTRACT

The salinity in coastal areas is one of the most variable environmental parameters due to the contributions of continental waters; their effects are important in the osmoregulatory processes of invertebrates, particularly sessile organisms such as bivalves. Very little is known about the risks of prolonged exposure to low concentration of salinity in *Perna viridis* and their effects on the physiological condition. In this study, *P. viridis*, an important mariculture species, was exposed at different salinities of 36, 16 and 12 ups, which were reduced 2 ups every two days up to eight weeks in the experimental conditions. During the experimental period a 12:12 photoperiod and a temperature of 25 ± 1.5 °C were maintained, and the organisms were fed daily with a mixture of microalgal monocultures (about $30000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$) of *Chaetoceros gracilis* and *Tetraselmis chuii*. In all samples were determined pH and the intra- and extracellular ions sodium, potassium and chloride. Proteins, DNA, RNA concentration and the RNA/DNA ratio were evaluated in abductor muscle. Significant variations ($P < 0.001$) were observed in electrolytic parameters and RNA/DNA ratio, which indicate that *P. viridis* is an excellent osmoconformer when subjected to reduced salinity and that it might maintain a light hyperionic condition of its internal fluids in relation to its environment. However, 12 ups salinities compromise the physiological condition of *P. viridis*, reducing its growth rate.

Keywords: electrolytic parameters, *Perna viridis*, RNA/DNA ratio, salinity.

RESUMEN

La salinidad en las zonas costeras es uno de los parámetros ambientales más variables debido a los aportes de aguas continentales y sus efectos son importantes en los procesos osmoregulatorios de los invertebrados, particularmente los sésiles, como los bivalvos. Se conoce muy poco, acerca de los riesgos de la exposición prolongada a baja concentración de salinidad en *Perna viridis* y sus efectos sobre la condición fisiológica. En este estudio, *P. viridis*, una especie de importante en maricultura, fue expuesta a diferentes salinidades de 36, 16 y 12 ups, que se redujeron en 2 ups cada dos días hasta alcanzar ocho semanas, en las salinidades experimentales. Durante el período experimental se mantuvo el fotoperíodo en 12/12 y la temperatura de $25 \pm 1,5^\circ\text{C}$. Los organismos fueron alimentados diariamente con una mezcla de los monocultivos de microalgas (alrededor de $30000 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$) de *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis chuii*. En todas las muestras se determinó pH, iones intra y extracelular: sodio, potasio y cloruro. Proteínas, ADN, ARN y la relación Prot/ADN y ARN/ADN. Variaciones significativas ($P < 0,001$) fueron observadas en los parámetros electrolíticos, asociados a los cambios de salinidad y la relación de ARN/ADN disminuyó significativamente cuando los ejemplares fueron expuestos a salinidad de 12. Estos resultados indican que *P. viridis* es un buen osmoconformador cuando se somete a condiciones de salinidad reducida y mantiene una condición hiperiónica de los fluidos internos en relación con el medio ambiente; sin embargo, salinidades de 12 comprometen la condición fisiológica de *P. viridis*, reduciendo su tasa de crecimiento.

Palabras claves: parámetros electrolíticos, *Perna viridis*, relación ARN/ADN, salinidad.

INTRODUCCIÓN

Los organismos que viven en ambientes costeros y estuarinos enfrentan considerables variaciones diurnas y estacionales de salinidad, que alteran su ritmo y su actividad metabólica (Erk *et al.* 2011). Los principales problemas que los organismos deben enfrentar en este ámbito son los ajustes osmóticos y electrolíticos (Carregosa *et al.* 2014). La presión osmótica de las células de un gran número de invertebrados marinos eurihalinos tiende, en general, al estar cerca de la salinidad del ambiente, y también se orienta a reflejar las variaciones ambientales. Sin embargo, una variación ilimitada en el medio ambiente puede ser perjudicial. Por lo tanto, ante un desafío osmótico, se inician mecanismos osmoregulatorios para mantener la concentración óptima de electrolitos intracelulares (Montecinos *et al.* 2009).

La salinidad en particular, determina cambios fisiológicos importantes en relación a la regulación iónica y osmótica, controlando el agua y sales mediante procesos de difusión pasiva y transporte activo de iones hacia el interior o exterior de las células o del organismo, que a su vez son regulados por proteínas, actividad de algunas enzimas y controlados genéticamente (Podlipaeva & Berger 2012, Zhao *et al.* 2012).

El concepto de balance o equilibrio ácido-básico implica mantener un valor relativamente constante del pH extracelular y de valores algo inferiores y generalmente variables para el medio intracelular. La regulación del pH es un aspecto importante y universal de la homeostasis fisiológica. En general, los moluscos muestran valores bajos de pH, inferiores o cercanos a 7, a consecuencia de los reducidos valores de los iones bicarbonatos (Hill *et al.* 2006).

Los líquidos corporales están constituidos por cantidades variables de solutos y de componentes iónicos, según la especie animal y el medio ambiente. Los iones más abundantes en el líquido extracelular son el sodio y el cloruro, mientras que en el interior de las células predomina el potasio y los fosfatos y, en algunos animales, otros solutos como la úrea y el óxido de trimetilamina (Hill *et al.* 2006).

Los ajustes metabólicos que se producen en los organismos durante cambios en las condiciones ambientales y situaciones estresantes pueden comprometer la condición fisiológica de los organismos, afectando la tasa de crecimiento, pudiendo ser evaluado a través del índice ARN/ADN (Nusetti & Morales 1988, Lesser *et al.* 2010).

En bivalvos, esta relación ha sido utilizada para determinar el estado fisiológico de organismos (Chícharo *et al.* 2001; Antón *et al.* 2008). Así mismo, el cociente ARN/ADN ha sido definido como un índice de crecimiento por aumento del volumen celular asociado con el proceso de biosíntesis de proteínas (Bulow 1987, Chícharo *et al.* 2007).

Muy poco se conoce, sobre los riesgos de la exposición prolongada a bajas concentraciones de salinidad de *Perna viridis* Linnaeus, 1758 (Mytilidae), una especie originaria del océano Indo-Pacífico e invasora para Venezuela, que ha logrado establecerse a lo largo de la zona costera del oriente venezolano (Agard *et al.* 1992), logrando desplazar a *Perna perna* Linnaeus, 1758 (Mytilidae) de áreas donde naturalmente se ha distribuido (Rylander *et al.* 1996). En este estudio, *P. viridis*, una importante especie de maricultura (Gallardo *et al.* 1992, Sreenivasan *et al.* 1989), fue expuesta a salinidades de 36, 16 y 12 ‰, durante ocho semanas en las salinidades experimentales, para determinar los ajustes osmóticos y su efecto sobre la condición fisiológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura de los organismos: los ejemplares de *P. viridis* fueron recolectados utilizando un equipo básico de buceo en Chacopata (10° 40' N, 63° 50' W), estado Sucre, Venezuela. Los mejillones se transportaron en contenedores isotérmicos con agua de mar de la localidad hasta el laboratorio de Ecofisiología del Instituto Oceanográfico de Venezuela, donde se mantuvieron en acuarios por 48 h, sin suministro de alimento.

Período de aclimatación de los organismos: los mejillones fueron aclimatados durante 15 días a la temperatura de 25±1,5°C y salinidad de 36 ups en dos acuarios de 60 L, posteriormente fueron separados en grupo control y grupos experimentales con una densidad de 1 org/2 L, las tallas estuvieron comprendidas entre 8,3 y 10,7 cm de longitud antero-posterior medidos con un calibrador vernier de 0,01mm de precisión. Después de este lapso de aclimatación, a los ejemplares de los grupos experimentales se le ajustó la salinidad de 16 ups y 12ups, descendiendo 2ups cada dos días y posteriormente fueron mantenidos por ocho semanas. Estos organismos fueron alimentados con una mezcla de monocultivos microalgales (aprox 30,000 cel·mL⁻¹) de *Chaetoceros gracilis* Schütt, F. 1895 (Chaetocerotaceae) y *Tetraselmis chuii* Butcher, 1959 (Chlorodendraceae).

Obtención de las muestras: transcurrido el tiempo de aclimatación, se extrajo el líquido intervalvar (hemolinfa) a los moluscos, utilizando jeringas impregnadas con heparina y en condiciones de estricta anaerobiosis, de inmediato fueron introducidas en la cubeta modular de un microanalizador de pH y gases fisiológicos (Ciba Corning modelo 238) previamente calibrado con soluciones buffers y gases estandarizados. También se les disectó el músculo aductor e inmediatamente estos

tejidos fueron pesados, congelados y almacenados en envases previamente rotulados a la temperatura de -17°C hasta el momento del análisis.

Determinación de los iones: Los iones sodio y potasio de la hemolinfa e intramusculares fueron medidos en un fotómetro de llama BioDynamics modelo Lytetex, diluyendo las muestras en proporciones de 1:200 y 1:100, respectivamente y utilizando patrones previamente preparados para ambos iones según el procedimiento de Belmar & Rey de Viñas (1971). Los iones cloruros se cuantificaron por el método mercurimétrico de Schales (1953).

Determinación de los ácidos nucleicos: Los ácidos nucleicos (ARN, ADN) se determinaron por el método fluorométrico con bromuro de etidio (Karstens & Wolleberger 1977). Para ello, se tomaron 20 mg de músculo abductor y se homogeneizaron en 1 mL de buffer Tris-HCl pH 7,5, usando un homogeneizador marca Polytron modelo Brinkmann de alta velocidad durante 30 seg en tres tiempos de 10 seg cada uno. Esto se realizó en tubos de ensayos sumergidos en hielo a temperatura aproximadamente de 4°C . Inmediatamente el homogeneizado fue centrifugado a 15.000 rpm por 10 min y el sobrenadante obtenido fue usado para determinar las concentraciones de las biomoléculas ARN, ADN y proteínas.

Para la determinación de la fluorescencia de ADN y ARN se tomaron 900 μL del sobrenadante y se mezclaron con 100 μL de sarcosina. Los tubos con las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 30 min, seguidamente se centrifugo 5000 rpm por 15 minutos. Se tomó 100 μL del sobrenadante y se mezcló con 400 μL de buffer Tris-HCl $0,2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ y pH 7,5. A cada muestra se le añadió 500 μL de reactivo de Hoeschst para medir ADN, excepto al blanco y para determinar ARN se le agregó 500 μL de

bromuro de etidio y se agitaron. Posteriormente, se dejó reposar por 4 min. La lectura de la fluorescencia de las muestras se llevó a cabo usando un Sequoia-Turner Model 450 con longitudes de onda de excitación y emisión de 585 y 360 nm. Cada muestra fue analizada por duplicado. La cuantificación se estimó por extrapolación en una curva estándar de ADN (SIGMA tipo XXI de *Escherichia coli*) y ARN (SIGMA tipo I altamente polimerizado de corteza de timo). La concentración de los ácidos nucleicos fue expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de tejido.

Determinación de proteínas: las proteínas se determinaron por el método de Bradford (1975), 50 μL del sobrenadante del homogeneizado de cada uno de los ejemplares se colocó en 1 mL del reactivo de Bradford, se agitó y se dejó reposar por 10 min. Posteriormente, la lectura de la absorbancia de las muestras fue realizada en un Spectronic -20D a una longitud de onda de 595 nm. La cuantificación de las proteínas se obtuvo usando suero de albúminas de bovino como patrón ($0,5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). La concentración de proteínas se expresó en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

Análisis estadístico: los resultados obtenidos fueron sometidos a un tratamiento estadístico con un nivel de confianza del 95% empleando un análisis de varianza de una vía y una prueba *a posteriori* por el método de las comparaciones simultáneas de Duncan con el objeto de establecer diferencias entre los grupos experimentales.

RESULTADOS

El pH del plasma sanguíneo en los organismos expuestos a 36, 16 y 12ups no mostraron diferencias significativas, sin embargo, a la salinidad de 12ups se observó una disminución con respecto a los grupos de 36 y 16ups (Figura 1).

Los valores medios y desviaciones estándares de la concentración de los iones extra e intracelulares determinados en los tres grupos experimentales de *P. viridis* sometidos a salinidades diferentes se observan en la Tabla 1. Para los iones sodio, potasio y cloruro en los líquidos extra e intracelulares, los resultados del análisis de varianza ($p < 0,001$) indican que los grupos se diferencian estadísticamente. Los valores medios más elevados se presentaron en el grupo de 36ups, mientras que los menores en los grupos 16 y 12ups.

Los niveles de ADN y ARN en el músculo abductor de los organismos expuestos a las diferentes salinidades presentaron variación significativa ($P > 0,05$) y la relación ARN/ADN también varió significativamente ($P < 0,001$) entre los grupos experimentales. Este mismo comportamiento fue observado para los niveles de proteínas y la relación Prot/ADN (Tabla 2).

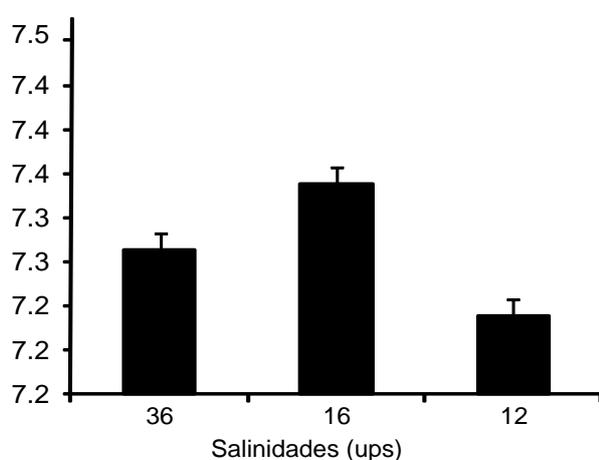


Figura 1. Variaciones medias de pH en plasma sanguíneo de *Perna viridis* sometido a salinidades (ups) de 36, 16 y 12 durante ocho semanas.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se determinó que *P. viridis* sometida a salinidades de 36, 16 y 12ups durante dos meses, mostró ajustes fisiológicos que le permitieron aclimatarse

hasta la salinidad de 12ups. El pH en el plasma sanguíneo de *P. viridis* no varió significativamente entre salinidades, sin embargo, se observó una tendencia a la disminución en salinidades más bajas. En líneas generales los valores estuvieron comprendidos entre $7,20 \pm 0,30$ para 12 y $7,41 \pm 0,20$ para 36 ups; conservándose la variación en un estrecho rango y por debajo del agua de mar, como en la mayoría de los organismos marinos que presentan valores de pH entre 0,5 y 2,0 unidades por debajo del pH en ambientes marinos (pH 8,0 a 8,1) y esto es debido a la retención de algunos iones, como sulfatos y cloruro abundantes en este medio (Belmar *et al.* 1997).

Esta tendencia a la disminución de pH también se atribuye a la acidosis generada por la activación del metabolismo anaeróbico (Montecinos *et al.* 2009) y la acumulación de piruvato, lactato, octopina, succinato, alanina, acetato, propionato y CO_2 que experimentan los bivalvos a consecuencia del cierre valvar observado por los organismos cuando son colocados a baja salinidad, particularmente los expuestos a 12ups.

Con una disminución de la salinidad se pudo evidenciar que los electrolitos sodio, potasio y calcio en *P. viridis* disminuyen su concentración molar. Este ajuste de electrolitos lo realizan los organismos con el objeto de mantener una concentración isoosmótica en relación a su entorno. El agua de mar (36ups) presenta una concentración promedio de sodio 478 mOsm y la especie presenta una concentración de 416 mOsm, cuando la salinidad es disminuida a 16 la concentración molar de sodio en el agua de mar se encuentra aproximadamente por el orden de los 220 mOsm, observándose una caída significativa en el plasma sanguíneo hasta 276 mOsm. En la salinidad de 12ups esta caída también es evidente. Un comportamiento similar es observado por el potasio y el cloro del plasma sanguíneo.

En lo referente a los valores obtenidos para el ión cloruro del plasma sanguíneo se observó una disminución en la concentración directamente proporcional con la reducción de la salinidad, esto podría ser debido al transporte pasivo de agua hacia el organismo, por estar sometido a soluciones hipotónicas con respecto al organismo.

De lo anterior, se demuestra que las células del mejillón *P. viridis* poseen una gran capacidad de funcionar dentro de un amplio espectro de presiones osmóticas sanguíneas, por lo que las células de estos osmoconformistas eurialinos muestran un ajuste osmótico a su entorno, lo cual viene acompañado de una gran capacidad de regular el volumen celular.

En las células musculares se observó un comportamiento similar al señalado anteriormente lo que indica que los cambios iónicos observados en el plasma sanguíneo e intramuscular de *P. viridis* obedecen a fenómenos de redistribución entre el líquido extracelular e intracelular como también puede ser debido a que estén involucrados mecanismos hormonales con el objeto de mantener estables las condiciones osmóticas de los líquidos corporales.

Se sabe que los mecanismos de regulación hídrica, iónica y osmótica que desarrollan los organismos acuáticos, son respuestas adaptativas ante los cambios en las condiciones ambientales, que son propias de las especies, sin embargo se desconoce el costo energético de este ajuste fisiológico, sin embargo la condición fisiológica puede estar comprometida. En algunos pectinidos como *Euvola zigzac* Linnaeus, 1758 (Pectinidae) en condiciones de estrés usa sus reservas de glucógeno para ajustes metabólicos a las condiciones externas, como cambios de temperatura y salinidad. Nusetti & Morales (1988), definen la importancia del músculo abductor como el sitio de reserva energética y la relaciona con la necesidad que tiene el mejillón de una fuente de energía fácilmente disponible. Por otro lado, se ha demostrado que los ajustes a nuevas condiciones de salinidad pueden producir estrés oxidativo que desencadenan respuestas antioxidantes que demandan un gasto energético importante (An & Choi 2010).

Se determinó una disminución significativa de la concentración de ARN, asociado a una caída significativa de ADN en *P. viridis* a medida que disminuye la salinidad. El

Tabla 1. Variaciones iónicas extra e intracelulares de *Perna viridis* sometido a salinidades de 36, 16 y 12ups durante ocho semanas. Valores medios y desviación estándar en mEq·L⁻¹.

Parámetros (mEq·L ⁻¹)	Salinidades (ups)			
	36	16	12	
Extracelular:				
Na ⁺	416 ± 55,80 ^b	274,18 ± 28,25 ^a	161,86 ± 3,40 ^a	***
K ⁺	14,23 ± 1,09 ^b	8,80 ± 1,91 ^a	6,06 ± 0,78 ^a	***
Cl ⁻²	544 ± 106,85 ^b	261,70 ± 68,32 ^a	310,86 ± 6,66 ^a	***
Intracelular				
Na ⁺	197,14±22,50 ^c	81,82±21,67 ^a	57,14±12,78 ^b	***
K ⁺	34,43±3,06 ^b	22,18±3,56 ^a	17,86±4,16 ^a	***

***: p<0,001; Letras iguales indican promedios estadísticamente similares para la pruebas de ámbitos múltiples de Duncan.

primero, se asocia a una caída en la síntesis de proteínas y el segundo a un aumento del volumen celular, tal como lo señala Bulow (1987). Esto pudiera indicar que el volumen celular está siendo afectado por el flujo de agua entre el entorno y el organismo para compensar la disminución de la fuerza iónica provocada por la baja en la salinidad y donde a su vez se observa una disminución significativa del potasio y el sodio en el plasma sanguíneo producto del flujo de agua al interior de la célula.

Frente a una baja salinidad (12ups) los organismos disminuyen su condición fisiológica significativamente hasta tener una reducción del 30% de la tasa ARN/ADN en relación a las presentadas en salinidades superiores a 16ups. Esto se ve confirmado porque los bivalvos expuestos a salinidad de 12 cerraron sus valvas durante casi todo el período de exposición, por lo que consecuentemente disminuyó la tasa de filtración del organismo, traduciéndose en una muy baja tasa de crecimiento. Se ha planteado que los bivalvos responden reduciendo su actividad de alimentación, ya que cierran sus valvas y disminuyen la tasa de filtración; por

consecuente, su balance energético se hace negativo (Hutchinson & Hawkins 1992). Bajo condiciones controladas se ha determinado que el alto índice de crecimiento del *P. viridis* se relaciona con la alta salinidad y una abundancia del fitoplancton (Chatterji *et al.* 1984).

Resultados similares se han registrado en *Ostrea chilensis* G.B. Sowerby II, 1871 (Ostreidae) en los que una baja en la salinidad (< 20 psu) ha afectado la tasa de crecimiento (Toro *et al.* 1995); por su parte Hutchinson & Hawkins (1992) en *O. edulis* Linnaeus, 1758 (Ostreidae) observaron una reducción en el consumo de oxígeno producto del cierre de las valvas frente a una baja en la salinidad. En *Choromytilus chorus* Molina, 1782 (Mytilidae) también se observó que a salinidades cercanas a 15 ups, estos bivalvos permanecen con sus valvas parcialmente cerradas (Navarro 1988).

En la presente investigación se demuestra que *P. viridis* tiene capacidad de realizar ajustes fisiológicos significativos a condiciones hiposmóticas durante períodos crónicos, lo cual podría explicar en parte su gran

Tabla 2. Valores promedios de ADN, ARN, Proteínas, relaciones ARN/ADN y Proteína/ARN en el músculo de *Perna viridis* sometido a salinidades de 36, 16 y 12ups durante ocho semanas. Valores medios y desviación estándar.

Salinidad	ARN ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)	ADN ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)	ARN/ADN	Proteína ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Prot/ADN
36	3,42±2,26 ^b	3,32±3,89 ^a	1,01±0,43 ^a	45,63±11,51 ^b	12,95±5,29 ^b
16	3,25±1,68 ^b	2,27±0,69 ^a	1,42±0,35 ^a	26,32±15,16 ^b	11,08±4,89 ^{ab}
12	0,70±1,23 ^a	1,64±0,63 ^b	0,51±0,52 ^b	14,16±9,91 ^a	8,16±5,61 ^a
Significancia	***	*	***	**	*

*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; *: $p<0,001$; Letras iguales indican promedios estadísticamente similares para la pruebas de ámbitos múltiples de Duncan.

capacidad de colonización de las costas del estado Sucre, ocupando los espacios de la especie autóctona *P. perna*. Resgalla et al. (2007), demuestra que *P. perna* no presenta capacidad de aclimatación durante periodos de 20 días a salinidades de 15ups; a esta salinidad el organismo permanece con las valvas cerradas, tiene una tasa de filtración nula y con condiciones fisiológicas deficientes durante exposiciones de 20 días. Por otro lado, Segnini et al. (1998), demostraron que *P. viridis* es capaz de soportar hasta 0ups con un 4% de mortalidad, durante periodos cortos de 11 días.

En cuanto a las proteínas determinadas en los organismos estudiados hubo diferencias significativas entre los experimentales ($p < 0,01$), presentándose las más bajas concentraciones en el grupo expuesto a 12 ups. Cuando el crecimiento se mide mediante el índice Proteína/ADN como indicador del tamaño celular se determinó que los organismos expuestos a 16 y 12ups disminuyeron la biosíntesis de proteínas y por lo tanto un menor índice se hizo evidente, indicando que estos organismos están en estrés por la disminución de la salinidad y que una gran porción de las proteínas podría ser utilizada para compensar los ajustes metabólicos a cambios de salinidad (Acosta & Lodeiros 2001).

En síntesis, estos resultados indican que *P. viridis* sometido a condiciones reducidas de salinidad, se comporta como un excelente organismo osmoconformador, manteniendo una ligera condición hiperiónica de sus fluidos internos en relación al medio ambiente, posiblemente esta característica, haya permitido que esta especie exótica se estableciera en las costas del oriente del país, sin embargo, su condición fisiológica disminuye considerablemente a baja salinidad.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el financiamiento parcial de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, V. & Lodeiros, C. 2001. Evaluación del efecto del cobre sobre juveniles del mejillón verde *Perna viridis* mediante la concentración de ADN y la relación ARN/ADN en el músculo abductor. Revista Científica FCV-LUZ, 1: 485-490.
- Agard, J.; Kishore, R. & Baine, B. 1992. *Perna viridis* (Linnaeus, 1758). First records of the Indo-Pacific green mussel (Mollusca: Bivalvia) in the Caribbean. Caribbean Marine Studies, 3: 59-60.
- An, M.I. & Choi, C.Y. 2010. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: effects on hemolymph and biochemical parameters. Comparative Biochemistry and Physiology, 155: 34-42.
- Antón, Y.; Lemus, M. & Chung, K. 2008. Índice ARN/ADN como indicador de la condición fisiológica en ejemplares de *Donax denticulatus* expuestos a dosis subletales de cadmio. Saber, 20: 149-154.
- Belmar, M. & Rey De Viñas, J. 1971. Temperatura corporal y catecolaminas. Anales de la Real Academia de Farmacia, 37: 257-280.
- Belmar, M.; Armas, J.; Belmar, D.; Riveros, W.; Yegres, S. & Carrillo, G. 1997. Mecanismos de regulación ácido-básica en algunos vertebrados e invertebrados del Oriente de Venezuela. Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela, 36:37-43.

- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Bulow, E. 1987. RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: A review. pp. 45-71. In Summerfelt, R.C. & Hall, G.E. P. (Eds). *The age and growth of fish*, The Iowa State University, Chapman and Hall. London.
- Carregosa, V.; Figueira, E.; Gil A.M.; Pereira S.; Pinto J.; Soares, A.M. & Freitas, R. 2014. Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: Osmotic and metabolic aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 171: 36-43.
- Chatterji, A.; Ansari, Z.; Ingole, B. & Parulekar, A. 1984. Growth of the green mussel, *Perna viridis* L., in a sea water circulating system. *Aquaculture*, 40: 47-55.
- Chícharo, L.M.; Chícharo, M.A.; Alves, F.; Amaral, A.; Pereira, A. & Regala J. 2001. Diel variation of the RNA/DNA ratios in *Crassostrea angulata* (Lamarck) and *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758) (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259: 121-129.
- Chícharo, M.A.; Amaral, A.; Morais, P. & Chícharo, L. 2007. Effect of sex on ratios and concentrations of DNA and RNA in three marine species. *Marine Ecology Progress Series*, 332: 241-245.
- Erk, M.; Ivankovi, D. & Strižak, Ž. 2011. Cellular energy allocation in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the stratified estuary as a physiological biomarker. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 1124-1129.
- Gallardo, W.; Samonte, P. & Ortega, R. 1992. Raft culture of green mussel *Perna viridis* in Sapián Bay, Philippines. *Journal of Shellfish Research*, 11: 195-196.
- Hill, R.W.; Hill, R.W. Jr. & Wyse, G.A. 2006. *Fisiología Animal*. Médica Panamericana, Madrid, España.
- Hutchinson, S. & Hawkins, L.E. 1992. Quantification of the physiological responses of the European flat oyster *Ostrea edulis* L. to temperature and salinity. *Journal of Molluscan Studies*, 8: 215-226.
- Karsten, U. & Wolleberger, A. 1977. Improvements in the ethidium bromide method for a direct fluorometric estimation of DNA and RNA in cell tissue homogenates. *Analytical Biochemistry*, 77: 464-470.
- Lesser, M.P.; Bailey, M.A.; Merselis, D.G. & Morrison, J.R. 2010. Physiological response of the blue mussel *Mytilus edulis* to differences in food and temperature in the Gulf of Maine. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 56: 541-51.
- Montecinos, L.A.; Cisterna, J.A.; Cáceres, C.W. & Saldías, G.S. 2009. Equilibrio ácido-base durante la exposición aérea en el molusco bivalvo *Perumytilus purpuratus* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mytilidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44: 181-187.
- Navarro, J.M. 1988. The effect of salinity on the physiological ecology of *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) (Bivalvia: Mytilidae) *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 122: 19-33.
- Nusetti, O. & Morales, D. 1988. Crecimiento de algunos tejidos del mejillón *Perna perna* (L. 1758): Composición de ADN, relaciones ARN/ADN y reservas energéticas. *Acta Científica Venezolana*, 39: 289-293.
- Podlipaeva, Y.I. & Berger V.J. 2012. The Effect of Environmental Salinity on the Level of Heat Shock Proteins in Gill Epithelium of mussel *Mytilus edulis* L. *Cell and Tissue Biology*, 6: 498-502.
- Resgalla, J.C.; Brasil, E.S. & Salomão, L.C.

2007. The effect of temperature and salinity on the physiological rates of the Mussel *Perna perna* (Linnaeus 1758). Brazilian Archives of Biology and Technology, 50: 543-556.
- Rylander, K.; Pérez, J. & Gómez, J. 1996. The distribution of the brown mussel. *Perna perna* and the green mussel *P. viridis* (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae) in North eastern Venezuela. Caribbean Marine Studies, 5: 86-87.
- Schales, O. 1953. *Standard methods of clinical chemistry*. pp. 37-43. Vol. 1, New York, Academic Press.
- Segnini, M.; Chung, K. & Pérez, J. 1998. Salinity and temperature tolerances of the green and brown mussels, *Perna viridis* and *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae). Revista de Biología Tropical, 46: 121-125.
- Sreenivasan, P.; Thangavelu, R. & Poovannan, P. 1989. Biology of the green mussel, *Perna viridis* (Linnaeus) cultured in Muttukadu Lagoon, Madras. Indian Journal of Fisheries, 36: 149-155.
- Toro, J.E.; Sanhueza, M.A.; Winter, J.E.; Senn, C.M.; Agula, P. & Vergara, A.M. 1995. Environmental effects on the growth of the Chilean oyster *Ostrea chilensis* in five mariculture locations in the Chiloé Island, Southern Chile. Aquaculture, 136: 153-164.
- Zhao, X.; Yu, H.; Kong, L. & Li, Q. 2012. Transcriptomic responses to salinity stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Plos One, 7:e46244.

Received January 21, 2014.
Accepted March 3, 2014.