



Latin American Journal of Aquatic Research

E-ISSN: 0718-560X

lajar@ucv.cl

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
Chile

Hernández, David R.; Santínón, Juan J.; Sánchez, Sebastián; Domitrovic, Hugo A.
Estudio histológico e histoquímico de la organogénesis del tubo digestivo de *Rhamdia quelen* en
condiciones de larvicultura intensiva
Latin American Journal of Aquatic Research, vol. 42, núm. 5, noviembre, 2014, pp. 1136-1147
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
Valparaíso, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=175032686017>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Research Article

Estudio histológico e histoquímico de la organogénesis del tubo digestivo de *Rhamdia quelen* en condiciones de larvicultura intensiva

David R. Hernández¹, Juan J. Santinón¹, Sebastián Sánchez¹ & Hugo A. Domitrovic¹

¹Instituto de Ictiología del Nordeste, Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Nordeste, Sargentó Cabral 2139 (3400), Corrientes, Argentina

RESUMEN. El desarrollo del tracto digestivo en larvas de *Rhamdia quelen* y su cronología de diferenciación fue estudiado histológicamente desde el nacimiento hasta los 20 días posteriores a la eclosión (dpe) con 530 unidades térmicas acumuladas (UTA). Las larvas se mantuvieron en condiciones de larvicultura intensiva, alimentadas con nauplios de *Artemia*. La diferenciación anatómica e histológica del tracto digestivo fue un proceso asíncrono, con un tubo recto e indiferenciado a 1 dpe (4,87 mm), mientras que al inicio de la alimentación exógena, se organizó en cuatro zonas histológicamente diferenciadas: cavidad bucofaríngea, esófago, estómago incipiente e intestino. A los 15 dpe (397,5 UTA), la organización fue semejante a la de los adultos. Al nacimiento, se observaron corpúsculos gustativos en los barbillones y cavidad bucofaríngea, distribuidos entre un epitelio estratificado con células mucosas. En el esófago, al inicio de la alimentación exógena, se observó epitelio estratificado con células mucosas de secreción neutra y ácida. En el estómago, las glándulas gástricas comenzaron a hacerse visibles entre 8 y 10 dpe (212 a 265 UTA), siendo completamente activas a 20 dpe. El primer día de vida, el intestino presentó el epitelio cilíndrico simple sin características de actividad absorbiva evidente, mientras que a 4 dpe (106 UTA) se observaron microvellosidades en la región apical y una importante acumulación de lípidos y proteínas intra-citoplásmicas en el intestino anterior y posterior, respectivamente. En este órgano, las células mucosas fueron ácidas y neutras, siendo ambos tipos los más abundantes en la región distal. Los resultados histológicos indican que las larvas de *R. quelen* son capaces de digerir y absorber eficientemente el alimento desde los primeros días de vida.

Palabras clave: *Rhamdia quelen*, desarrollo, histología, larva, tubo digestivo, Argentina.

Histological and histochemical study of *Rhamdia quelen* digestive tract organogenesis under intensive larviculture conditions

ABSTRACT. The development and the chronological differentiation of the digestive tract in *Rhamdia quelen* larvae were histologically studied from hatching up to 20 days post-hatch (dph) with 530 accumulated thermal units (ATU). Larvae were kept under intensive larviculture conditions and fed with *Artemia* nauplii. The anatomical and histological differentiation of the digestive tract was an asynchronous process with an undifferentiated straight tube at 1 dph (4.87 mm). Whereas, at the onset of feeding it was organized into four different histological regions: oropharyngeal cavity, oesophagus, incipient stomach and intestine. At 15 dph (397.5 ATU), the organization was similar to that found in adults. At hatching, taste buds were observed in barbels and oropharyngeal cavity, distributed among a stratified epithelium with mucous cells. A stratified epithelium with mucous cells secreting neutral and acid mucopolysaccharides was observed in the esophagus at the onset of feeding. In the stomach, gastric glands became visible between 8-10 dph (212 a 265 ATU), being entirely active at 20 dph. On the first day of life, the intestine showed a simple columnar epithelium without evident characteristics of absorptive activity, whereas 4 dph (106 ATU) microvilli on the apical region and a significant accumulation of intracytoplasmic lipid and protein in the anterior and posterior intestine were observed, respectively. In the intestine, the mucous cells were acid and neutral, being both types of cells most abundant in the distal region. Histological results indicate that *R. quelen* larvae are able to efficiently digest and absorb food from the first days of life.

Keywords: *Rhamdia quelen*, development, histology, digestive tract, larvae, Argentina.

INTRODUCCIÓN

En peces teleósteos, los mecanismos de desarrollo del sistema digestivo son similares a pesar que existen considerables variaciones interespecíficas respecto al momento de la diferenciación y la funcionalidad de los diferentes órganos (Treviño *et al.*, 2011), relacionadas principalmente con los procesos de digestión, absorción y asimilación de nutrientes (Dabrowski, 1984). Conocer los cambios que ocurren en el tracto digestivo durante el desarrollo ayuda a comprender la fisiología de la nutrición en larvas y a elegir el momento óptimo para iniciar la alimentación con raciones balanceadas, evitando altas mortalidades que ocurren cuando se suministran alimentos artificiales a ejemplares que no pueden asimilarlos (Person-Le Ruyet *et al.*, 1993; Gisbert *et al.*, 2004; Micale *et al.*, 2006; Hamza *et al.*, 2007).

En este sentido, los estudios histomorfológicos durante la ontogenia del sistema digestivo son una herramienta fundamental para evaluar la potencial utilidad de diferentes dietas para larvas, así como para dilucidar relaciones funcionales entre los diferentes órganos envueltos en los procesos digestivos (Hamza *et al.*, 2007; Önal *et al.*, 2008; Gisbert *et al.*, 2009; Treviño *et al.*, 2011).

A pesar de los progresos recientes en nutrición de larvas de peces, en la mayoría de las especies la primera alimentación sigue basándose en alimento vivo, ya que independientemente de su valor nutritivo, es fácilmente detectado, capturado y altamente digestible (Conceição *et al.*, 2009). Si bien, numerosos trabajos fueron orientados a reemplazar el alimento vivo por dietas formuladas desde el inicio de la alimentación exógena, en muchas ocasiones no se obtuvieron buenos desempeños, principalmente en peces marinos (Cahu & Zambonino-Infante, 2001). Tales fracasos fueron atribuidos a un sistema digestivo inmaduro, rápido tránsito intestinal, baja capacidad enzimática, o a la inhabilidad de las larvas para reconocer el alimento, localizarlo e ingerirlo (Kolkovski, 2001; Kowalska *et al.*, 2006).

Estudios actuales buscan identificar la presencia y actividad de las enzimas digestivas desde el momento de apertura de la boca (Hamza *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Gisbert *et al.*, 2009) así como la diferenciación celular en células absorbativas (enterocitos), mucosas y endocrinas a nivel intestinal, las que cumplen importantes funciones, como absorción y digestión citosólica, defensa, osmoregulación e integración neuroendocrina, modulando los procesos digestivos y la toma de alimentos, entre otros (Mola *et al.*, 2004; Mangetti, 2006; Micale *et al.*, 2006; Önal *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010).

En *Rhamdia queLEN* se realizaron estudios del desarrollo embrionario y larvario, centrando su atención en las etapas tempranas de desarrollo (Cussac *et al.*, 1985; Matkovic *et al.*, 1985; Boiani *et al.*, 2003; De Amorim *et al.*, 2009). La propuesta de este trabajo es la descripción de los cambios histológicos e histoquímicos y ultraestructurales del tracto digestivo en larvas de *R. queLEN* hasta los 20 días posteriores a la eclosión (dpe) bajo larvicultura intensiva y la discusión de los resultados en vista a una alimentación práctica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en un sistema de larvicultura intensiva bajo condiciones controladas de laboratorio en las instalaciones de piscicultura experimental del Instituto de Ictiología del Nordeste (INICNE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE (Corrientes, Argentina). Las larvas de *R. queLEN* se obtuvieron mediante cruzamientos entre ejemplares adultos (peso corporal 450-500 g), por inducción artificial con extracto de hipófisis de *Prochilodus lineatus*. La incubación duró 24 h a 22°C. Posteriormente a la eclosión (longitud = 4,87 mm, peso = 0,66 mg), se colocaron 700 larvas en acuarios de 23 L, utilizados como unidades experimentales, abastecidos con agua de perforación y aireación forzada, con sustitución de agua continua a una tasa de 0,4 l min⁻¹ durante 12 h al día para la eliminación de residuos. Durante el período experimental, las larvas se alimentaron cuatro veces al día (8, 12, 16 y 20 h) con nauplios de *Artemia* no enriquecidos hasta saciedad aparente. La experiencia tuvo una duración de 20 días, con temperatura promedio de 26,5°C, pH 7,0; oxígeno disuelto 6,0 mg L⁻¹ y conductividad de 129,43 mS cm⁻¹. Con el registro diario de la temperatura del agua se calcularon las unidades térmicas acumuladas (UTA o °C día⁻¹) transcurridas desde la eclosión.

Histología e histoquímica

Se colectaron diariamente 10 larvas hasta 20 dpe. El material obtenido fue fijado en formol 10%, deshidratado e incluido en bloques de parafina. Posteriormente, se realizaron cortes seriados de 3 µm de espesor. Los cortes se colorearon en forma rutinaria con la técnica de hematoxilina y eosina (HE), además de otras técnicas especiales de coloración, como: ácido peryódico de Schiff (PAS), azul alcian (AA pH 2,5) y PAS/AA pH 2,5, para la observación de las mucosustancias (Culling, 1974).

Las microfotografías de las larvas se obtuvieron con cámara digital asociada a lupa binocular y microscopio.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Los segmentos del tracto digestivo destinados para MEB se fijaron en formol al 10%, realizándose un corte longitudinal para exponer la mucosa. Los mismos, se observaron por el método del punto crítico y se metalizaron con oro-paladio en un vaporizador en frío (Goldstein *et al.*, 2003). Las muestras se montaron y observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL 5800LV del Servicio de Microscopía Electrónica de la Secretaría de Ciencia y Técnica (UNNE).

RESULTADOS

Al nacimiento, el tracto digestivo fue identificado como un tubo recto, histológicamente indiferenciado, ubicado sobre el saco vitelino. Dentro de los dos primeros días de vida (53 UTA) se produjeron rápidos procesos de diferenciación del mismo, identificándose tres segmentos: i) Intestino cefálico (cavidad bucofaríngea), ii) Intestino medio (esófago y primordio del estómago), e iii) Intestino posterior (tubo digestivo posterior o intestino propiamente dicho) (Fig. 1a). A 6 dpe (159 UTA), el tubo digestivo posterior se diferenció en un intestino anterior y otro posterior (Fig. 1d), mientras que a 15 dpe (397,5 UTA), se plegó dentro de la cavidad permitiendo diferenciar intestino anterior, medio y posterior (Fig. 1e). Posteriormente a esta edad, el tubo digestivo adquirió características de adulto (Fig. 2).

Cavidad bucofaríngea

Luego de la eclosión, la cavidad bucal estaba revestida por un epitelio cúbico simple rodeado por una delgada capa de tejido conectivo: cambiando a epitelio estratificado de manera paulatina. Corpúsculos gustativos y células mucosas globosas fueron evidentes a partir de 4 dpe (106 UTA) en los barbillones y entre las células epiteliales de la cavidad bucofaríngea, respectivamente (Figs. 3a, 3c). La cantidad y tamaño de ambas estructuras aumentaron, a medida que las larvas avanzaron en edad.

Entre 3 y 4 dpe (79,5 y 106 UTA), coincidiendo con la finalización del período de alimentación endógena, se observaron dientes que emergían desde el tejido subyacente entre el epitelio de la cavidad bucal y faríngea. Estos aumentaron en número con la edad, especialmente hasta 12 dpe (318 UTA), donde ya estaban completamente constituidos como dientes faríngeos (Fig. 3d).

Esófago

A partir de 2 dpe (53 UTA) un corto y rudimentario esófago comunicó la cavidad bucofaríngea con la

porción anterior del tubo digestivo posterior (primordio de estómago) a través de un lumen estrecho. La mucosa del esófago presentó un epitelio estratificado con escasa cantidad de células mucosas, las que fueron más abundantes a partir de 4 dpe (106 UTA). Las células mucosas del tercio proximal fueron escasas y de morfología globosa, mientras que las del tercio distal fueron prismáticas y más abundantes. Al final del período evaluado (20 dpe), se observó un tercer tipo celular constituido por células eosinófilas grandes ubicadas en la porción media del epitelio. Entre 8 y 10 dpe (212 a 265 UTA), se observaron importantes cambios en el esófago, que se alarga y expande con pliegues complejos y ramificados con proyecciones hacia la luz del órgano.

Al tercer día, una capa de tejido conectivo laxo separó al epitelio de una túnica muscular escasamente formada. De 3-4 dpe (79,5-106 UTA) se apreció una túnica muscular de músculo estriado esquelético de disposición circular. Luego la túnica muscular se constituyó como una delgada capa de tejido muscular estriado esquelético de disposición circular interna y longitudinal externa (Fig. 5d) y la túnica adventicia rodeó al órgano con una fina capa de tejido conectivo laxo.

Estómago

Entre 2 y 3 dpe (53 y 79,5 UTA), el estómago consistió en un tubo corto y sacular, de paredes delgadas y pliegues mucosos cortos, haciendo visible como una dilatación en la porción posterior del esófago y revestida por epitelio cúbico simple (Figs. 1b-1c). Posteriormente, el epitelio consistió en células cilíndricas mucosecretoras asentadas sobre un escaso tejido conectivo sub-epitelial (propia-submucosa), al tiempo que la túnica muscular presentó una delgada capa de fibras musculares lisas, que se hizo más espesa en la región pilórica acompañando el crecimiento de la larva. A partir de 10 dpe (265 UTA) el estómago adquirió forma de "J" ocupando gran parte de la región central de la cavidad abdominal. En este momento, el estómago estaba separado hacia la región proximal del esófago mediante una escasa constrictión de la mucosa, mientras que en distal se separó del intestino a través de una espesa capa muscular a modo de esfínter pilórico (Fig. 1f). La túnica serosa formada por tejido conectivo laxo y mesotelio, rodea al órgano y lo separa del hígado y páncreas (Figs. 1e-1f). Entre 8 y 10 dpe (212 a 265 UTA) se identificaron algunas glándulas gástricas en la lámina propia (Fig. 4a), mientras que a 20 dpe presentaron un desarrollo completo (Fig. 4b). Las mismas consistieron en glándulas tubulares rectas donde las células oxintopépticas fueron el único tipo celular identificado.

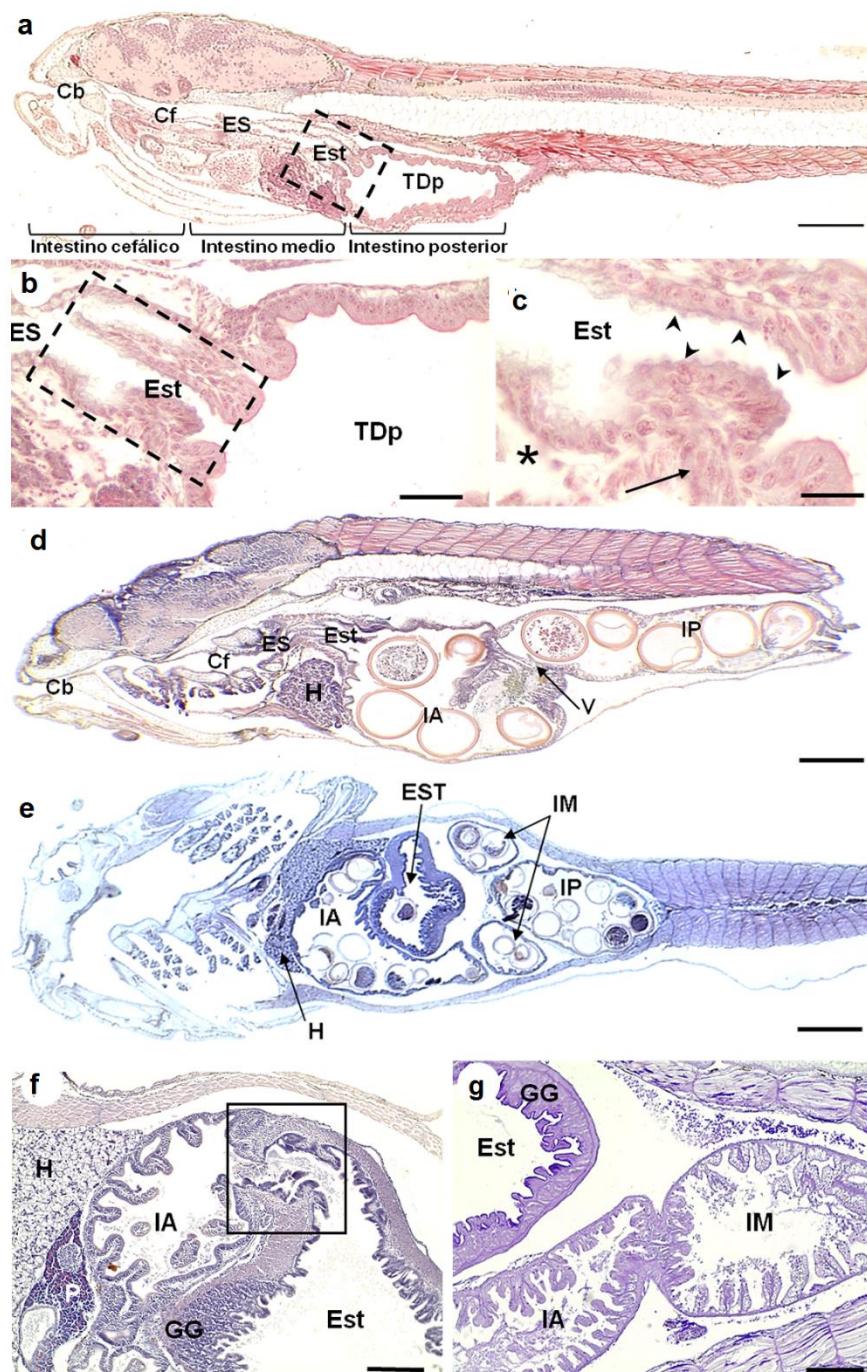


Figura 1. Larva de *R. quelen* de 3 (a-c), 6 (d) y 15 (e-f) días de vida. a) corte sagital de una larva previa a la alimentación exógena donde se observan las diferentes porciones del tracto digestivo, b) magnificación del recuadro de a, donde se observa el estómago (Est) delimitado en proximal por el esófago (ES) y en caudal por el tubo digestivo posterior (TDp), c) alta magnificación del recuadro de b, donde se observa el epitelio cúbico mucosecretor (►) del estómago incipiente. El asterisco (*) marca el tejido conectivo laxo rodeado por una capa muscular (→), d) la flecha (→) muestra la separación del intestino anterior del posterior por medio de una válvula (V), e) vista general de las diferentes porciones del tubo digestivo totalmente desarrollado en una larva de 15 dpe, f) corte sagital del estómago (Est) e intestino anterior (IA), separados por un esfínter pilórico (recuadro), g) separación del intestino anterior del intestino medio (IM). gg: glándulas gástricas, h: hígado, IP: intestino posterior, P: páncreas. Barras: a = 200 μ m, b = 50 μ m, c = 25 μ m, d = 250 μ m, e = 500 μ m, f-g = 200 μ m.

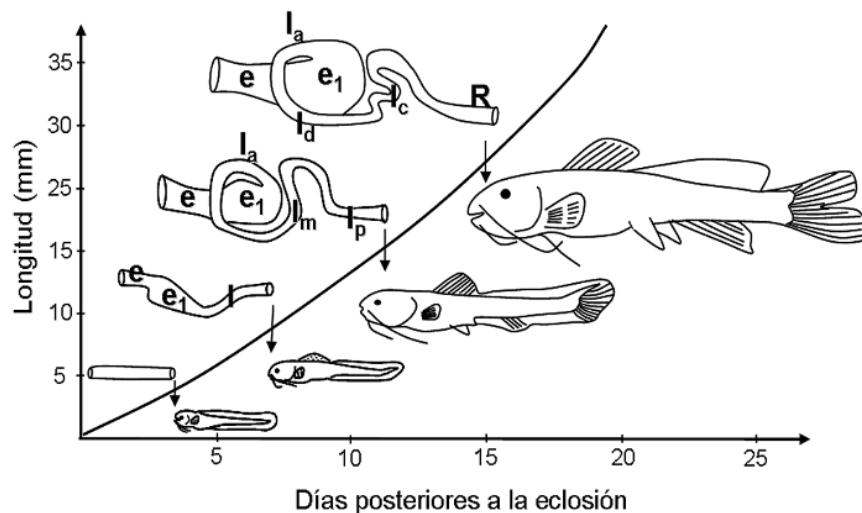


Figura 2. Esquematización de los cambios más importantes en la disposición del tubo digestivo en larvas de *R. quelen* a medida que efectúa su metamorfosis a juvenil, culminando a 20 dpe con un tubo digestivo similar al adulto. e: esófago, e₁: estómago, I: intestino, I_a: intestino anterior, I_m: medio, I_p: posterior, I_d: intestino descendente, I_c: intestino convoluto, R: recto.

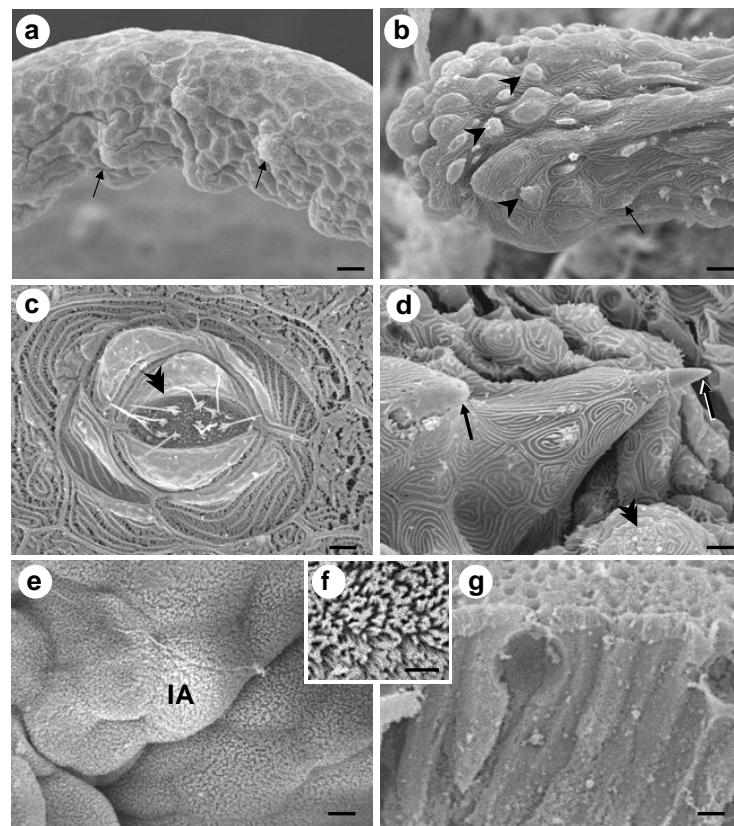


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido de los barbillones (a-b), cavidad bucofaríngea (c-d) e intestino (e-g) en larvas de 7 dpe. a) superficie ventrolateral de un barbillón donde se observan corpúsculos gustativos (→), b) extremo de un barbillón donde se observan células mucosas (►) y corpúsculos gustativos (→), c) corpúsculo gustativo en la cavidad faríngea (►), d) dientes faríngeos emergiendo entre las células epiteliales (→). Además, se observa un corpúsculo gustativo en la proximidad (►), e) superficie del epitelio intestinal, f) inserción de alta magnificación donde se observan microvellosidades de la superficie apical de los enterocitos, g) epitelio intestinal. Barras en: a-e = 20 µm, b = 10 µm, c-d = 2,5 µm, f = 1 µm, g = 3 µm.

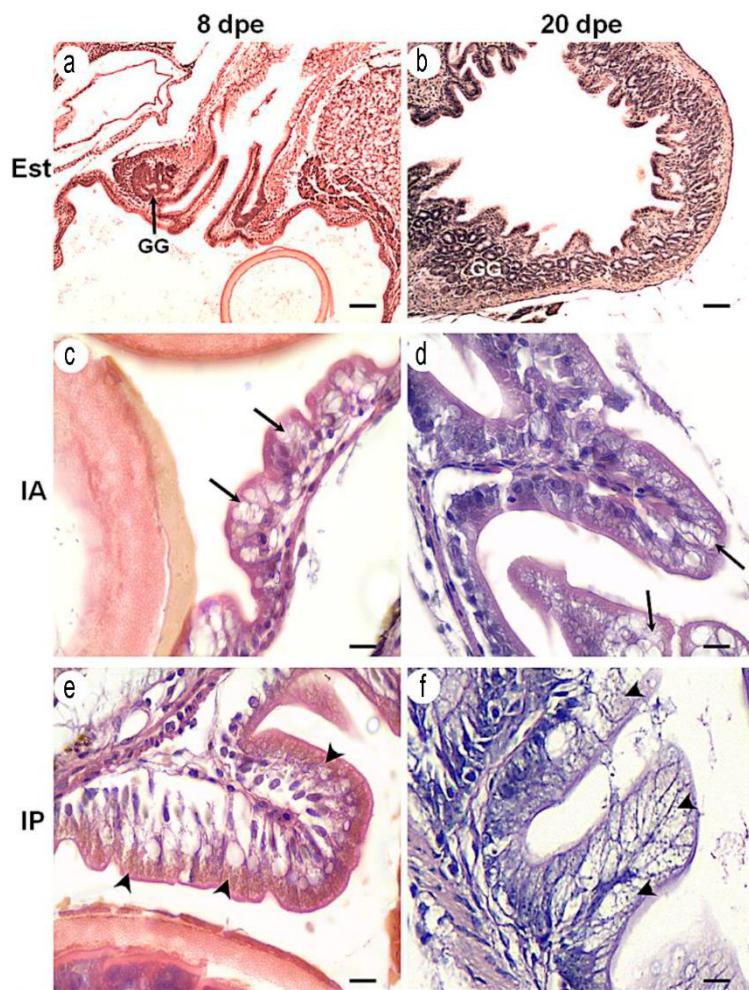


Figura 4. Imagen comparativa de los diferentes tipos de vesículas en los enterocitos del intestino anterior (IA) e intestino posterior (IP) en larvas de *R. quelen* de 8 y 20 dpe. a-b muestran la pared del estómago con glándulas gástricas. a) glándulas escasas y poco diferenciadas, b) buen desarrollo glandular, formadas por un único tipo celular “oxintopéptica”. En c-d se observan las vesículas lipídicas (→) al interior de los enterocitos del intestino anterior, e-f se observan vesículas eosinofílicas en los enterocitos del intestino posterior (►). Barras en: a y b = 50 μ m, c-f = 10 μ m.

Intestino

En el primer día de vida, las larvas presentaron un intestino primordial de aspecto tubular aparentemente cerrado en toda su longitud con excepción de la porción posterior al saco vitelino, donde se observó una luz estrecha. Entre 5 y 6 dpe (132,5 y 159 UTA), se diferenció una válvula intestinal, manifestando una separación en un intestino anterior (pre-valvular) y otro posterior (post-valvular) (Fig. 1d). A 10 dpe (265 UTA), el intestino experimentó una inclinación de 180° curvándose hacia craneal y adquiriendo una posición antero-derecha dentro de la cavidad abdominal desplazando el estómago hacia medial de la cavidad. Asimismo, se apreció que el intestino también se pliega por detrás del estómago, diferenciándose en intestino medio. De esta manera, a 15 dpe (397,5 UTA) el

intestino se encontró dividido en tres porciones morfológicas distintas, intestino anterior, medio y posterior (Fig. 1e).

Una vez que se inició la alimentación exógena (2-3 dpe) (53 a 79,5 UTA), el epitelio intestinal consistió en una capa simple de células prismáticas de superficie regular, y a 4 dpe (106 UTA) se constató la formación de microvellosidades en la frontera absorbiva (Figs. 3e-3g). Además, se identificaron vacuolas translúcidas intracitoplásmicas supra e infranucleares en los enterocitos del intestino anterior (Figs. 4c-4d), mientras que en los enterocitos del intestino posterior se observaron solamente vacuolas eosinofílicas supranucleares (Fig. 4e). Estas vacuolas intracelulares eosinofílicas se presentaron durante todo el período larval, siendo prominentes desde 8 dpe (212 UTA) hasta la aparición

de las glándulas gástricas, donde disminuyeron paulatinamente del día 12 al 15 (318 a 397,5 UTA), para casi no ser identificadas a 20 dpe (Fig. 4f).

Entre 3 y 10 dpe (79,5 y 265 UTA), se observaron células mucosas entre los enterocitos, aumentando en número con la edad y adquiriendo una forma de cáliz con acúmulo de vesículas de secreción en la parte central y apical. A partir de 12 dpe (318 UTA), algunos pliegues mucosos, con un delgado eje de tejido conectivo laxo, se extendieron a corta distancia de la luz intestinal. Posteriormente, los pliegues comenzaron a hacerse más numerosos y, a su vez, más largos y ramificados, principalmente en el intestino anterior.

Histoquímica

Las células mucosas del sistema digestivo de las larvas mostraron distintas mucusustancias durante los primeros 20 dpe (neutra, ácida o mixta), siendo las neutras el tipo más común (Fig. 5). Las células mucosas epiteliales del tracto digestivo fueron fuertemente PAS-positivas, especialmente en esófago y estómago, las que presentaron mucinas neutras dando una reacción de color rojo. Por su parte, las células mucosas que manifestaron color azul con AA pH 2,5 indicando la presencia de mucinas ácidas. Las secciones del tracto digestivo teñidas con AA pH 2,5 fueron esófago, estómago e intestino, siendo en el primer y segundo caso, fuertemente ácidas dentro de la primera semana de vida. En esófago, se identificaron tres tipos de células mucosas: de formas alargadas, redondeadas o de copa secretoras de mucinas neutras, ácidas y mixtas. Con base en las observaciones, se determinó que entre los 8-10 dpe (212-265 UTA) las células mucosas del tercio anterior del esófago permanecen fuertemente ácidas y negativas hacia el tercio posterior. Este cambio comenzó a ocurrir en el momento en que aparecieron las glándulas gástricas (Figs. 5e-5h).

En el estómago se detectó un gran número de células mucosas de forma columnar secretoras de mucinas neutras y ácidas, mientras que durante el período de diferenciación de las glándulas gástricas (8-15 dpe) (212-397,5 UTA), las mucinas ácidas fueron menos frecuentes hasta ser negativas a los 15 días de vida (Fig. 5f).

A lo largo del intestino, las células mucosas presentaron forma columnar o de copa, siendo de secreción neutra, ácida o mixta, que incrementaron en número desde 12 dpe (318 UTA) hasta el final del período en estudio. Sin embargo, la primera porción del intestino presentó menor número de células mucosas con mucusustancias neutras y ácidas respecto a la porción posterior.

DISCUSIÓN

Durante el primer día de vida, el tracto digestivo en larvas de *R. quelen* es un tubo recto indiferenciado en toda su longitud, ubicado en la parte dorsal del saco vitelino similar a lo descrito en otras especies (Gisbert *et al.*, 2004; Micale *et al.*, 2006; Önal *et al.*, 2008). Al inicio de la alimentación exógena se diferenciaron cuatro zonas histológicamente distintas: cavidad bucofaríngea, esófago, estómago incipiente e intestino, mientras que luego de los 20 dpe presenta un tubo digestivo morfológicamente similar al del adulto (Hernández *et al.*, 2009).

De manera diferente, las larvas de salmonídos nacen con los órganos del tracto digestivo altamente diferenciados (Takahashi *et al.*, 1978), como ocurre en otros peces de ontogenia directa (Green & McCormick, 2001), teniendo, al inicio de la alimentación exógena, un estómago funcional. En la mayoría de las especies con ontogenia indirecta y escaso vitelo, el inicio de la alimentación exógena se realiza sin tener un desarrollo importante del sistema digestivo y posiblemente ineficiente como para digerir dietas complejas (Boiani *et al.*, 2003; Civera-Cerecedo *et al.*, 2004), observándose altas mortalidades en larvas de muchas especies, alimentadas exclusivamente con dietas formuladas (Dabrowski, 1984).

La presencia de barbillones y corpúsculos gustativos en larvas de *R. quelen*, presentes antes de la alimentación exógena, les permitiría evaluar la palatabilidad del alimento al momento de ingerir la dieta (Boglione *et al.*, 2003). Micale *et al.* (2006) observaron que los corpúsculos gustativos en larvas de *Pagellus erythrinus* aparecen recién a 17 dpe, momento en que ellas son capaces de decidir si aceptar o rechazar el alimento. Asimismo, Baskerville-Bridges & Kling (2000) evaluaron la palatabilidad en larvas de *Gadus morhua* con seis alimentos (cuatro dietas experimentales, una comercial y un control con alimento vivo) y observaron que las dietas experimentales mostraron menor palatabilidad. Estos autores comprobaron que como resultado de ello, el desarrollo de las larvas llevó más tiempo y verificaron una mayor mortalidad en estos grupos.

En este estudio, se distinguieron diferencias morfológicas de las células mucosas distribuidas en dos zonas del esófago, que presentó células globosas en el tercio proximal y células alargadas en la porción distal. Diferenciaciones similares fueron halladas en otras especies (Baglole *et al.*, 1997; Mangetti, 2006; Jaroszewska & Dabrowski, 2008). En el epitelio del esófago de otras especies se observaron células mucosas conteniendo mucinas neutras, ácidas y mixtas (Sarasquete *et al.*, 1995; Ostaszewska, 2005; Yang *et al.*,

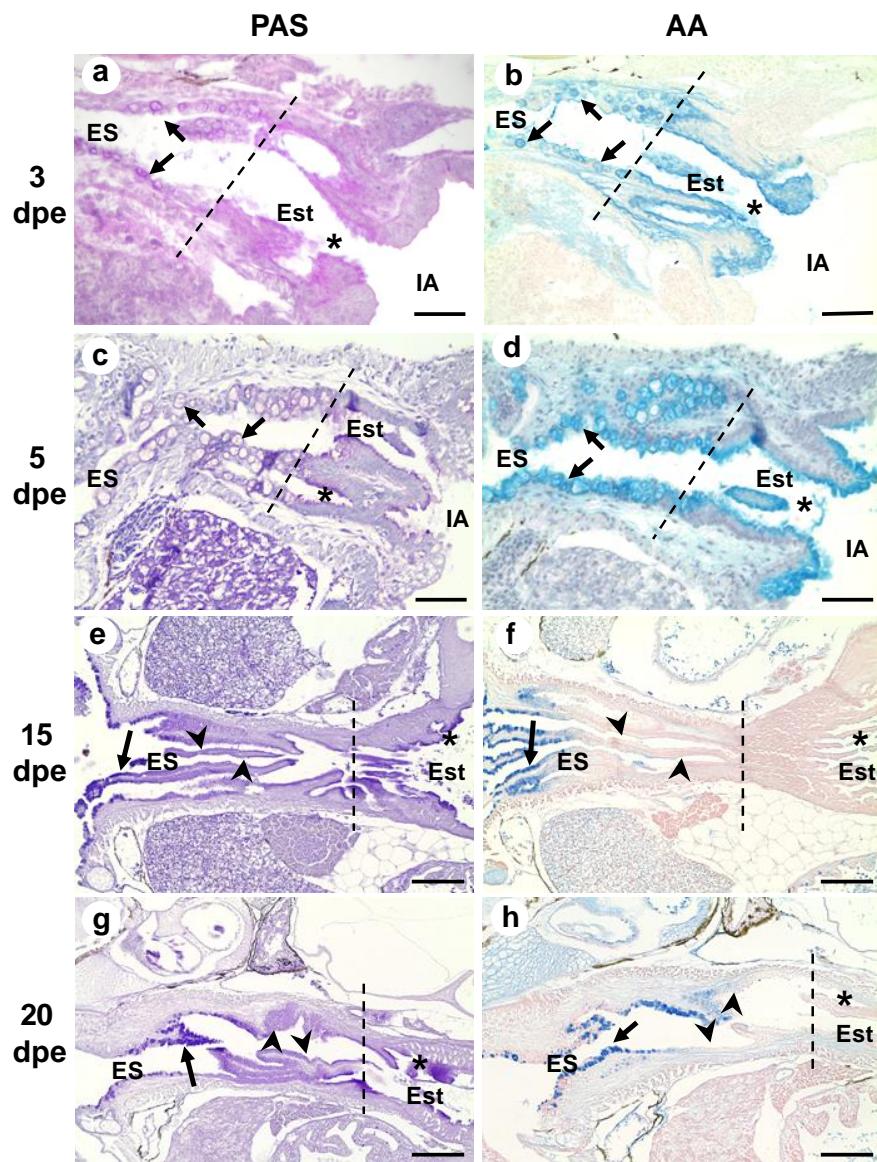


Figura 5. Imagen comparativa de la reactividad histoquímica (PAS y AA) de las células mucosas del esófago (ES) y estómago (Est). a-h) las flechas (→) indican células mucosas intensamente coloreadas. e-g) las cabezas de flecha (►) indican una débil coloración en el tercio distal del esófago, en f-h) indican coloración nula en el tercio distal del esófago. Los asteriscos (*) muestran reactividad en estómago a los colorantes, excepto a AA en larvas luego de 15 dpe. IA: intestino anterior. Las líneas discontinuas (---) demarcan la zona de transición entre esófago y estómago. Barras en: a-d = 50 μ m. e-h = 200 μ m.

al., 2010). En *R. quelen*, las células mucosas mostraron una reacción fuertemente neutra y ácida en la porción anterior del órgano, siendo leve en la porción posterior. Pasando 10 dpe, sólo las mucinas neutras se encontraron en la porción posterior, siendo el tipo de mucina más abundante en toda la longitud. De manera contraria, Ostaszewska (2005) observó que las células mucosas en el esófago de larvas de *Sander lucioperca* producen más mucinas ácidas que neutras, principalmente en la porción posterior. Estas células juegan un

importante rol en la lubricación y protección del ataque de microorganismos (Zimmer *et al.*, 1992; Gisbert *et al.*, 2004), así como una posible participación en la digestión pregástrica (Bagole *et al.*, 1997).

El desarrollo de las glándulas gástricas y de un estómago funcional sugiere una transición de la etapa larval a juvenil (Kolkovski, 2001; Lo & Weng, 2006). La presencia de las glándulas gástricas permite la digestión de una mayor variedad de alimentos, pudiendo pasar de un alimento vivo a una dieta formu-

lada, reduciendo los costos de producción (Önal *et al.*, 2008). Boiani *et al.* (2003) evaluaron el desarrollo histológico del tubo digestivo en larvas de *R. quelen* alimentadas con ración balanceada y nauplios de *Artemia*, y observaron que a 15 dpe (aproximadamente 310 UTA) las glándulas gástricas aún no se encontraban desarrolladas, mientras que en el presente estudio, la diferenciación de las glándulas gástricas se registró entre 8 y 10 dpe (212 a 265 UTA), diferencia que podría relacionarse con la temperatura de cultivo en que se realizaron ambos estudios. En este sentido, cabe mencionar que Boiani *et al.* (2003) criaron las larvas entre 19° y 22°C, mientras que en el presente estudio se trabajó con temperaturas promedio de 26,5°C, valor muy próximo al óptimo sugerido para la cría de esta especie (27°C, Forgati *et al.*, 2007), lo que permite suponer que el desarrollo de los peces pudo verse favorecido. Tal apreciación coincide con los resultados obtenidos por Elbal *et al.* (2004), quienes mencionan que las condiciones de cría (temperatura o fotoperiodo), pueden afectar más el desarrollo de los peces que el tipo de alimentación.

En *Amphiprion percula* se observó que las glándulas gástricas aparecen en diferentes momentos, a 5 dpe (Gordon & Hecht, 2002) 11 dpe (Önal *et al.*, 2008), diferencias que también serían atribuibles a la temperatura y fotoperiodo. Ostaszewska *et al.* (2005a) no encontraron diferencias en el desarrollo del estómago y en la presencia de las glándulas gástricas en larvas de *S. lucioperca* alimentadas con *Artemia* y cuatro raciones formuladas hasta 21 dpe, aunque al final de la experiencia solamente las larvas alimentadas con *Artemia* y dos iniciadores comerciales mostraron un desarrollo glandular normal. Esto indica que la aparición de las glándulas gástricas se debe a una condición genética y ambiental más que a la respuesta a un factor nutricional, aunque este último influenciaría una rápida diferenciación y un desarrollo completo a temprana edad.

Las mucinas neutras en el estómago podrían ejercer una función de cooperación en la digestión enzimática de los alimentos y su transformación en quimo, así como un efecto amortiguador sobre el contenido ácido del estómago y podrían promover el transporte y absorción de macromoléculas en la membrana plasmática (Petrinec *et al.*, 2005; Cao & Wang, 2009). Por lo tanto, la presencia de mucinas neutras en larvas de *R. quelen* desde el inicio de la alimentación exógena y su permanencia junto al completo desarrollo de las glándulas gástricas sugiere que poseen la capacidad de proteger y a la vez facilitar la digestión y absorción de los alimentos ingeridos, tal como fue señalado en otras especies (Gisbert & Doroshov, 2003; Gisbert *et al.*, 2004). De la misma manera, las mucinas ácidas observadas en el estómago en el presente trabajo,

podrían tener un efecto en la neutralización de microorganismos (Gisbert *et al.*, 2004) o la participación en algún tipo de digestión ácida hasta la formación de las glándulas gástricas (Baglioni *et al.*, 1997), momento en que desaparecen. Mangetti (2006) observó cambios similares en la secreción de las mucinas ácidas en el epitelio del estómago en larvas de *Pseudoplatystoma coruscans*. Asimismo, el desarrollo del esfínter pilórico durante este período prolongaría el tiempo de retención del alimento en el estómago, que posiblemente mejoraría la digestión y asimilación de los nutrientes conforme a lo propuesto para larvas de *Pelteobagrus fulvidraco* por Cao & Wang (2009).

En este estudio, entre 4 y 6 dpe se observaron los primeros signos de absorción intestinal identificados como vacuolas lipídicas en los enterocitos del intestino anterior y gránulos eosinófilos en intestino posterior. Similares observaciones fueron efectuadas por diferentes investigadores en otras especies (Mangetti, 2006; Micale *et al.*, 2006; Önal *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010). En coincidencia con De Amorim *et al.* (2009), en el presente estudio no se observaron vesículas de absorción en los enterocitos durante el período de alimentación endógena.

A 8 dpe se comprobó una diferenciación del segmento intestinal en dos porciones, intestino anterior y posterior. El intestino anterior está implicado en la absorción de lípidos y se caracteriza por la presencia de inclusiones lipídicas en los enterocitos, considerado como lugar de almacenamiento temporal (Elbal *et al.*, 2004; Kowalska *et al.*, 2006). Varios investigadores indican que dietas con alto contenido lipídico, ya sea de origen animal o vegetal, pueden alterar la funcionalidad de los enterocitos por la acumulación de lípidos en la región supranuclear, principalmente del segmento intestinal anterior (Caballero *et al.*, 2003; Ostaszewska *et al.*, 2005b; Moraes *et al.*, 2006, 2007). Esto se manifiesta por el aumento en el tamaño del enterocito acompañado por una vacuolización excesiva como consecuencia del almacenaje de lípidos y/o de la inhibición de la nueva esterificación de los ácidos grasos. Así, la menor cantidad de estas vesículas podría sugerir una correcta absorción, síntesis y transporte de lipoproteínas a la circulación general (Ostaszewska *et al.*, 2005a). Similares observaciones fueron señaladas por Baskerville-Bridges & Kling (2000) en larvas de *Gadus morhua* alimentadas con rotíferos. También, Ostaszewska *et al.* (2005b) indican que en los enterocitos de larvas de *Chondrostoma nasus* alimentadas con nauplios de *Artemia* se observa una acumulación de vacuolas lipídicas, estimando que esto pueda deberse a un desequilibrio en los ácidos grasos presentes en este tipo de alimento, el cual no es el alimento natural de estos peces.

La absorción de proteínas fue evidenciada como vesículas supranucleares eosinofílicas presentes en las células epiteliales del intestino posterior en larvas de *R. quelen*, mostrando una disminución paulatina de las mismas a medida que ocurrió la diferenciación de las glándulas gástricas. Observaciones similares fueron descritas en larvas de otras especies de peces (Luizi *et al.*, 1999; Mai *et al.*, 2005; Önal *et al.*, 2008). La captación de macromoléculas por pinocitosis y su posterior digestión intracelular en el intestino posterior fue propuesta como el principal mecanismo de absorción de proteínas en ausencia de un estómago funcional (Govoni *et al.*, 1986). Además, este evento es marcado por la eficiencia en la digestión citosólica, manifestado por la abundancia de enzimas en el citoplasma del enterocito que, posteriormente, disminuyen en cantidad al ir diferenciándose y al aumentar la cantidad de enzimas en las microvellosidades, hecho considerado como una transición hacia la digestión de adulto (Zambonino-Infante & Cahu, 2001). Este acontecimiento es apreciado después del desarrollo de las glándulas gástricas (inicio de la digestión ácida y enzimática de las proteínas en estómago) manifestado por una disminución paulatina de la ocurrencia de las vesículas eosinofílicas en intestino posterior (Halver & Hardy, 2002).

En larvas de *R. quelen*, dentro del período estudiado, se observó un incremento gradual en la longitud de los pliegues intestinales hasta 15 dpe. Sin embargo, posteriormente se produjo un rápido incremento en la longitud de los mismos. Kowalska *et al.* (2006) efectuaron un ensayo de co-alimentación en larvas de *S. lucioperca* con nauplios de *Artemia* y ración comercial y observaron pliegues intestinales superiores en larvas que recibieron solamente *Artemia* por una semana, comparado con las que fueron co-alimentadas por dos o tres semanas. Los autores opinan que un aumento en el tamaño de los pliegues intestinales provocó un aumento en el tamaño de la superficie del aparato digestivo y, en consecuencia, mayor exposición y absorción de nutrientes.

Se sugiere que las mucosustancias presentes en intestino poseen un rol en los mecanismos de digestión y asimilación de los nutrientes, además de proteger a la mucosa intestinal (Grau *et al.*, 1992; Domeneghini *et al.*, 1998). Ostaszewska (2005) reporta un aumento considerable en el número de células mucosas en el intestino de *S. lucioperca* luego de 20 dpe, las que fueron más numerosas en intestino posterior que en anterior. Concordando con este autor, en el presente trabajo el número de células mucosas en intestino de larvas de *R. quelen* se incrementó hacia el final de la experiencia, siendo mayor en intestino posterior que en anterior. Bagole *et al.* (1997) y Yang *et al.* (2010)

obtuvieron resultados similares en larvas de *Pleuronectes ferruginea* y *P. fulvidraco*, respectivamente. Según Domeneghini *et al.* (1998) y Shi *et al.* (2007) las mucinas en el intestino posterior, principalmente las ácidas, facilitarían la defecación. Kowalska *et al.* (2006) observaron que en larvas de *S. lucioperca* co-alimentadas con *Artemia* por una semana y dieta comercial durante todo el período experimental, el crecimiento fue menor y el número de células mucosas fue el más alto al compararlas con los grupos que recibieron un mayor período de co-alimentación. Los autores sugieren que el aumento de las mucinas en estos individuos es un esfuerzo fisiológico para mejorar la digestibilidad y absorción del alimento.

En el presente estudio se pudo constatar que el desarrollo del sistema digestivo de larvas de *R. quelen* alcanza las características de juveniles entre 12 y 15 dpe. Las observaciones histológicas demostraron que los patrones de desarrollo fueron similares a otros teleósteos.

REFERENCIAS

- Bagole, C.J., H.M. Murray, G.P. Goff & G.M. Wright. 1997. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemistry study. *J. Fish Biol.*, 51: 120-134.
- Baskerville-Bridges, B. & L.J. Kling. 2000. Development and evaluation of micro particulate diets for early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. *Aquacult. Nutr.*, 6: 171-182.
- Boglione, C., M. Giganti, C. Selmo & S. Cataudella. 2003. Morphoecology in larval fin-fish. A new candidate species for aquaculture, *Diplodus puntazzo* (Sparidae). *Aquacult. Int.*, 11: 17-41.
- Boiani, L., M. Bessonart, N. Berois & M. Salhi. 2003. Desarrollo morfológico e histología del digestivo de larvas de bagre negro, *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae). *Bol. Soc. Zool. Urug.*, 14: 17-28.
- Caballero, M.J., M.S. Izquierdo, E. Kjorsvik, D. Montero, J. Socorro, J.A. Fernández & G. Rosenlund. 2003. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture*, 225: 325-340.
- Cao, X.J. & W.M. Wang. 2009. Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. *Anat. Histol. Embryol.*, 38: 254-261.
- Cahu, C.L. & J.L. Zambonino-Infante. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200: 161-180.
- Civera-Cerecedo, R., C.A. Alvarez-González & F.J. Moyano-López. 2004. Nutrición y alimentación de

- larvas de peces marinos. In: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M.G. Nieto-López, D. Villarreal, U. Scholz & M. González (eds.). Avances en nutrición acuícola. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora, pp. 8-94.
- Conceição, L.E.C, M. Yúfera, P. Makridis, S. Morais & M.T. Dinis. 2009. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquacult. Res.*, 41: 613-640.
- Culling, C.F.A. 1974. Handbook of histopathological and histochemical techniques. Butterworth-Heinemann, London, 457 pp.
- Cussac, V.E., M. Matkovic & M.C. Maggese. 1985. Desarrollo embrionario de *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1840) Eigenmann y Eigenmann, 1888 (Pisces, Pimelodidae). 2. Organogénesis media, organogénesis tardía y eclosión. *Rev. Bras. Biol.*, 45: 149-160.
- Dabrowski, K. 1984. The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.*, 24: 807-833.
- De Amorim, M.P., B.V. Campos-Gomes, Y.S. Martins, Y. Sato, E. Rizzo & N. Bazzoli. 2009. Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces: Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. *Aquac. Res.*, 40: 172-180.
- Domeneghini, C., R. Pannelli-Straini & A. Veggetti. 1998. Gut glycoconjugates in *Sparus aurata* L. (Pisces, Teleostei). A comparative histochemical study in larval and adult ages. *Histol. Histopathol.*, 13: 359-372.
- Elbal, M.T., M.P. García-Hernández, M.T. Lozano & B. Agulleiro. 2004. Development of the digestive tract of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscope studies. *Aquaculture*, 234: 215-238.
- Forgati, M., C.V. Maiolino, K.L. Azevedo, A.M. Rodrigues-Galdino, A.F. Silva, J.D. Mikos, P.C.F. Carneiro, L. Donatti & F.S. Rios. 2007. Incubation temperature affecting growth of jundiá (*Rhamdia quelen*) (Teleostei, Heptapteridae) during embryonic and larval periods. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu-MG.
- Gisbert, E. & S.I. Doroshov. 2003. Histology of the developing digestive system and the effect of food deprivation in larval green sturgeon (*Acipenser medirostris*). *Aquat. Living Resour.*, 16: 77-89.
- Gisbert, E., G. Giménez, I. Fernández, Y. Kotzamanis & A. Estévez. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture*, 287: 381-387.
- Gisbert, E., R.H. Piedrahita & D.E. Conklin. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*, 232: 455-470.
- Goldstein, J., D.E. Newbury, D.C. Joy, C.E. Lyman, P. Echlin, E. Lifshin, L. Sawyer & J.R. Michael. 2003. Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. Kluwer, New York, 689 pp.
- Gordon, A.K. & T. Hecht. 2002. Histological studies on the development of the digestive system of the clownfish *Amphiprion percula* and the time of weaning. *J. Appl. Ichthyol.*, 18: 113-117.
- Govoni, J.J., G.W. Boehlert & Y. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fish.*, 16: 59-77.
- Grau, A., S. Crespo, M.C. Sarasquete & M.L. Gonzalez De Canales. 1992. The digestive tract of the amberjack *Seriola dumerili*, Risso: a light and scanning microscopic study. *J. Fish Biol.*, 41: 287-303.
- Green, B.S. & M.I. McCormick. 2001. Ontogeny of the digestive and feeding systems in the anemonefish *Amphiprion melanopus*. *Environ. Biol. Fish.*, 61: 73-83.
- Halver, J.E. & R.W. Hardy. 2002. Fish nutrition. Academic Press, San Diego, 824 pp.
- Hamza, N., M. Mhetli & P. Kestemont. 2007. Effects of weaning age and diets on ontogeny of digestive activities and structures of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 33: 121-133.
- Hernández, D.R., M. Pérez Gianeselli & H.A. Domitrovic. 2009. Morphology, histology and histochemistry studies of the digestive tract of South American catfish (*Rhamdia quelen*). *Int. J. Morphol.*, 27: 105-111.
- Jaroszewska, M. & K. Dabrowski. 2008. Morphological analysis of the functional design of the connection between the alimentary tract and the gas bladder in air-breathing lepisosteid fish. *Ann. Anat.*, 190: 383-390.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, 200: 181-201.
- Kowalska, A., Z. Zakęś & K. Demska-Zakęś. 2006. The impact of feeding on the results of rearing larval pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), with regard to the development of the digestive tract. *Electr. J. Polish Agric. Univ., Fish.*, 9: 1-10.
- Lo, M.J. & C.F. Weng. 2006. Developmental regulation of gastric pepsin and pancreatic serine protease in larvae of the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 261: 1403-1412.
- Luizi, F.S., B. Gara, R.J. Shields & N.R. Bromage. 1999. Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey. *Aquaculture*, 176: 101-116.
- Mai, K., H. Yu, H. Ma, Q. Duan, E. Gisbert, J.L. Zambonino-Infante & C.L. Cahu. 2005. A histological study on the development of the digestive system of

- Pseudosciaena crocea* larvae and juveniles. J. Fish Biol., 67: 1094-1106.
- Mangetti, A.J. 2006. Desenvolvimento histomorfológico do trato digestório de larvas de pintado *Pseudoplatystoma coruscans* Agassiz, 1829. 92f. Dissertação Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Universidade de São Paulo, São Paulo, 95 pp.
- Matkovic, M., V.E. Cussac, M. Cukier, G.A. Guerrero & M. Maggese. 1985. Desarrollo embrionario de *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1840) Eigenmann y Eigenmann, 1888 (Pisces, Pimelodidae). 1. Segmentación, morfogénesis y organogénesis temprana. Rev. Bras. Biol., 45: 39-50.
- Micale, V., M. Garaffo, L. Genovese, M.T. Spedicato & U. Muglia. 2006. The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common pandora *Pagellus erythrinus* L. Aquaculture, 251: 354-365.
- Mola, L., H. Bertacchi, A. Gambarelli & A. Pederzoli. 2004. Occurrence of ACTH- and enkephalin-like peptides in the developing gut of *Dicentrarchus labrax* L. Gen. Comp. Endocr., 136: 23-29.
- Moraes, S., M.J. Caballero, L.E.C. Conceição, M.S. Izquierdo & M.T. Dimis. 2006. Dietary neutral lipid level and source in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae: effect on growth, lipid metabolism and digestive capacity. Comp. Biochem. Physiol. B, 144: 57-69.
- Moraes, S., L.E.C. Conceição, I. Rønnestad, W. Koven, C. Cahu, J.L. Zambonino-Infante & M.T. Dinis. 2007. Dietary neutral lipid level and source in marine fish larvae: effects on digestive physiology and food intake. Aquaculture, 268: 106-122.
- Önal, U., C. Langdon & I. Çelik. 2008. Ontogeny of the digestive tract of larval percula clownfish, *Amphiprion percula* (Lacépède, 1802): a histological perspective. Aquacult. Res., 39: 1077-1086.
- Ostaszewska, T. 2005. Developmental changes of digestive system structures in pike-perch (*Sander lucioperca* L.). Electronic J. Ichthyol., 2: 65-78.
- Ostaszewska, T., K. Dabrowski, K. Czumińska, W. Olech & M. Olejniczak. 2005a. Rearing of pike-perch larvae using formulated diets-first success with starter feeds. Aquacult. Res., 36: 1167-1176.
- Ostaszewska, T., A. Boruta & M. Olejniczak. 2005b. The effect of dietary lipid level and composition on growth, survival, and development of the digestive system of larval sneep, *Chondrostoma nasus* (L.). Acta Ichthyol. Piscat., 35: 79-86.
- Person-Le Ruyet, J.P., J.C. Alexandre, L. Thebaud & C. Mugnier. 1993. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey? J. World Aquacult. Soc., 24: 211-224.
- Petrinec, Z., S. Nejedli, S. Kužir & A. Opačak. 2005. Mucosubstances of the digestive tract mucosa in northern pike (*Esox lucius* L.) and european catfish (*Silurus glanis* L.). Veterinarski Arhiv., 75: 317-327.
- Ribeiro, L., A. Couto, M. Olmedo, B. Álvarez-Blázquez, F. Linares & L.M.P. Valente. 2008. Digestive enzyme activity at different developmental stages of blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich, 1768). Aquacult. Res., 39: 339-346.
- Sarasquete, M.C., A. Polo & M. Yúfera. 1995. Histology and histochemistry of the development of digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. Aquaculture, 130: 79-92.
- Shi, G., J.X. Wang, X.Z. Liu & R.X. Wang. 2007. Study on histology and histochemistry of digestive tract in *Sebastiscus marmoratus*. J. Fish. China, 31: 293-302.
- Takahashi, K., N. Hatta, Y. Sugawara & R. Sato. 1978. Organogenesis and functional revelation of alimentary tract and kidney of chum salmon. Tohoku J. Agric. Res., 29: 98-103.
- Treviño, L.A., C.A. Alvarez-González, N. Perales-García, L. Arévalo-Galán, A. Uscanga-Martínez, G. Márquez-Couturier, I. Fernández & E. Gisbert. 2011. A histological study of the organogenesis of the digestive system in baysnook (*Petenia splendida* Gunther, 1862) from hatching to the juvenile stage. J. Appl. Ichthyol., 27: 73-82.
- Yang, R., C. Xie, Q. Fan, C. Gao & L. Fang. 2010. Ontogeny of the digestive tract in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. Aquaculture, 302: 112-123.
- Zambonino-Infante, J.L. & C.L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comp. Biochem. Physiol. C, 130: 477-487.
- Zimmer, G., G. Reuter & R. Schauer. 1992. Use of influenza c-virus for detection of 9-o-acetylated sialic acids on immobilized conjugates by esterase activity. Eur. J. Biochem., 204: 209-215.

Received: 4 October 2013; Accepted: 29 September 2014