



## ESTUDIO MORFOLOGICO E HISTOQUIMICO DEL TRACTO DIGESTIVO Y PANCREAS DE LARVAS PREMETAMORFICAS DE *Hyla pulchella cordovae*, SOMETIDAS A DIFERENTES DIETAS

Miriam Carranza de Martin, Hugo Gimenez<sup>1</sup> y Sofía Parisi de Fabro<sup>2</sup>

(\*) Cátedra de Morfología Animal. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Av. Vélez Sarsfield 299. 5000 - Córdoba

**RESUMEN.** En larvas premetamórficas de *Hyla pulchella cordovae* se estudió el efecto de diferentes dietas y el ayuno sobre el tubo digestivo y el páncreas. Los renacuajos distribuidos en tres grupos de 15 individuos cada uno fueron sometidos por un período de 22 días a uno de los siguientes tratamientos: a) animales alimentados con espinaca hervida (control); b) larvas mantenidas con gelatina (sin azúcar y sin sabor) y c) renacuajos sometidos a ayuno. Las muestras de la región gástrica y páncreas se procesaron mediante técnicas histoquímicas para microscopía óptica. Paralelamente, se realizó un segundo experimento con el mismo diseño para determinar los índices de consumo, egestión y material retenido en el tubo digestivo de los grupos alimentados. Los lotes de ejemplares mantenidos con gelatina y sometidos a ayuno, presentaron un tubo digestivo de menor longitud y un páncreas más pequeño que los controles. En el grupo alimentado con gelatina, el porcentaje de material retenido en el tubo digestivo fue superior que en el lote control. Las glándulas gástricas presentaron mayor altura celular en las larvas mantenidas en ayuno y en los alimentados con gelatina, se identificó material de secreción PAS positivo en el lumen. Las células acinares del páncreas mostraron signos de vacuolización en los animales que recibieron alimento. Estos hallazgos, sugieren que los diferentes tipos de dietas y la condición de ayuno, influirían en la morfología y capacidad funcional de las estructuras digestivas en esta etapa de desarrollo.

**ABSTRACT.** Morphological and histochemical study of the digestive tract and pancreas in premetamorphic larvae of *Hyla pulchella cordovae*, under different nutritional conditions. Effects of different diets and starvation condition on digestive tube and pancreas during premetamorphic stages of *Hyla pulchella cordovae* larvae were studied. Animals fed with boiled spinach (control), larvae fed with artificial jelly and tadpoles no fed (fasting) were the nutritional condition of experimental groups. Gut length, body, gut and pancreas weight were determined. Inside, in the feeding groups, rates of consumption, egestion and retained matter in gut were recorded. Likewise, histological features of both gastric region and exocrine pancreas were analyzed.

1- Ex-Cátedra de Histología y Embriología Animal. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.

2- Cátedra II de Histología, Embriología y Genética. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Both, specimens fed with gelatine and no fed showed a minor digestive tube length and less size pancreas respect to the control. Retained matter percentage in gut was largest in tadpoles fed with gelatine, while the greatest cellular height of gastric gland was found in the larvae not fed. In lumen of this gland a PAS positive secretion material was observed in animals fed with jelly. Pancreas acinar cells showed vacuolization signs in feeding groups. The results suggest that the different diets and starvation could affect both the morphology and activity of digestive structures in the premetamorphic stages.

## INTRODUCCION

La mayoría de las larvas de anfibios anuros son organismos micrófagos o herbívoros (Fox, 1983; Dauça y Hourdry, 1985). Generalmente, su dieta natural está constituida por diversos tipos de microorganismos, tejidos vegetales y detritos orgánicos, aunque algunas especies presentan un tipo de alimentación más selectiva. Se ha señalado que las larvas con una alimentación herbívora poseen a menudo, un tubo digestivo de mayor longitud y más voluminoso que los renacuajos carnívoros (Altig y Kelly, 1974). Estas variaciones han sido relacionadas con el tipo de alimento consumido (Noble 1954; Altig y Kelly, *op. cit.*; Altig *et al.*, 1975; Villée *et al.*, 1987).

Diversos estudios se han efectuado sobre diferentes tipos de dietas, para evaluar el impacto de la actividad predatora de los renacuajos en el ambiente y sus relaciones de competitividad interespecífica (Steinwascher y Travis, 1983; Nathan y Janes, 1972; Jensen, 1967).

También, el modelo de la metamorfosis de anfibios se ha utilizado para determinar la influencia de distintas condiciones nutricionales en el crecimiento y desarrollo de las larvas (Kaltembach, 1981).

En este sentido, sólo se conocen algunas relaciones morfológicas y funcionales entre la estructura del aparato digestivo de estos organismos y los distintos tipos de dieta y el ayuno, durante el período larval y en los primeros días de vida juvenil (Martín, 1991). Existen datos que indican que proporciones diferentes de lípidos, glúcidos y proteínas en la dieta, altera-

rían la actividad de las células absortivas del intestino, durante la metamorfosis de anfibios (L'estage, 1976).

En este trabajo hemos determinado los índices de consumo, egestión y porcentaje de material retenido en renacuajos premetamórficos de *Hyla pulchella cordovae*, sometidos a una de las siguientes dietas: a) espinaca hervida; b) gelatina con bajo contenido de carbohidratos, sin lípidos; c) ayuno. Con el propósito de evaluar el efecto de esta alimentación y el ayuno, en estos ejemplares se analizaron además, las variaciones morfológicas e histoquímicas producidas sobre el tubo digestivo, región gástrica y páncreas, así como en el crecimiento y desarrollo larval.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron larvas de *H. pulchella cordovae* recogidas en arroyos del Valle de Punilla (Córdoba, Argentina). Los renacuajos de estadios premetamórficos (V) fueron seleccionados de acuerdo a la tabla de Martín *et al.*, (1985), acondicionados en bandejas de vidrio a temperatura ambiente ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y alimentados con espinaca hervida.

Previo al inicio del tratamiento, los animales fueron ayunados durante 4 días para producir la evacuación del tubo digestivo. Luego de registrar los pesos corporales, se determinaron los estadios del desarrollo (V) y se formaron dos grupos experimentales que fueron sometidos a las siguientes condiciones nutricionales por un período de 22 días: Grupo A: formado por tres

lotes de 15 individuos cada uno, distribuyéndose a los ejemplares en grupos de 5 por recipiente: 1) animales cuya alimentación consistió en espinaca hervida *ad libitum*, (lote control). 2) individuos alimentados en forma similar al lote 1, pero con gelatina hidratada (ingredientes por cada 100 g de producto hidratado: proteínas: 1,36g; hidratos de carbono: 0,76g; sin lípidos ni fibras: 8,4 calorías, (proveedor Fleischmann S.A. Munro, Pcia de Bs.As.). 3) Renacuajos mantenidos en ayuno.

Grupo B: Este grupo experimental se constituyó con el mismo diseño del grupo A, para estimar el consumo de materia orgánica seca en los lotes de renacuajos alimentados. Para ello, diariamente se registró: el peso corporal de las larvas, la cantidad de alimento húmedo ofrecido, del no consumido y de heces frescas.

La determinación de la materia seca contenida en el alimento ofrecido se efectuó mediante la preparación de raciones individuales y por duplicado. Cada recipiente del par, con gelatina hidratada o espinaca hervida, se pesaba y una de las raciones era ofrecida. La porción homóloga se secaba en estufa hasta obtener después de varias ponderaciones un valor del peso seco constante, el cual fue considerado para los cálculos de materia seca.

En forma similar se procedió con el alimento no consumido, que se retiró diariamente de las bandejas, se escurrió y secó en estufa.

Para estimar la cantidad de materia seca en las heces, se procedió diariamente a filtrar el agua de las bandejas con las deyecciones de cinco ejemplares, mediante mallas de nylon de trama fina, cuyo peso y tamaño eran conocidos. Cada filtro con las heces se pesó y llevó a estufa hasta que se estabilizó el peso.

Los índices de consumo y egestión y el porcentaje de material retenido en el tracto digestivo se obtuvieron de acuerdo a los siguientes cálculos:

Índice de consumo (IC): representa la cantidad de mg de materia seca consumida por día, por

mg de peso corporal:

$$IC = \frac{F}{T \cdot A}$$

donde F: corresponde a mg de peso seco del alimento ingerido durante todo el experimento, (sumatoria de todas las ingestas). Los valores de la ingesta diaria se obtuvieron de la diferencia entre: cantidad de alimento ofrecido y alimento no consumido; T: duración del período experimental y A: el peso promedio de la larva durante este período.

Índice de egestión (IE): representa los mg de materia seca de las heces recogidas por mg de peso corporal:

$$IE = \frac{H}{T \cdot A}$$

Donde H: corresponde a mg de peso seco de todas las heces recogidas durante el experimento (sumatoria de todas). T: duración del período experimental y A: peso promedio de la larva durante este período. La diferencia entre el IC y el IE permitió estimar la cantidad de material retenido (MRt) en el tubo digestivo. Estos datos fueron utilizados para calcular el porcentaje de material retenido que relaciona los mg de éste y del consumido, expresado en porcentaje:

$$\% MR = \frac{MRt}{ICt} \cdot 100$$

El progreso del desarrollo larval fue evaluado mediante los estadios metamórficos al final del tratamiento. Los animales del grupo A fueron pesados y sacrificados para remover el tubo digestivo completo y el páncreas. Los pesos respectivos de ambos órganos fueron registrados en una balanza Mettler (precisión 0,01 mg). La longitud del tubo digestivo considerada desde el extremo terminal del esófago hasta su desembocadura

Cuadro 1: Indices de consumo, egestión, cantidad y porcentaje de material retenido al final del período experimental, en larvas premetamórficas de *H. pulchella cordovae* sometidas a diferentes dietas.

Grupos	Indice de Consumo*	Indice de Egestión*	Material Retenido*	Porcentaje de Material Retenido
	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	(%)
Lote Control	194,82 ± 49,16	67,44 ± 43,19	127,32 ± 13,60	65,35
Lote alimentado con gelatina	55,65 ± 43,40	4,46 ± 0,68	51,11 ± 43,11	91,84

\*mg de materia seca;  $\bar{X} \pm DS$  : valores medios  $\pm$  desvío estándar.

cadura en la cloaca, se determinó sobre un papel milimetrado. La porción gástrica y el páncreas fueron fijados en Bouin e incluidas en parafina. Los cortes seriados se colorearon con hematoxilina y eosina (H-E), tricrómico de Cason, y se aplicaron los métodos del ácido periódico-Schiff (PAS), azul alcian (AB, pH 2,5) y fucsina-paraldehído. Las mediciones de diámetro de las glándulas gástricas y acinos pancreáticos, como la de las alturas celulares, se efectuó con un ocular micrométrico 6x. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante test de Student (Sokal y Rholf, 1989). Se aceptó un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Los índices de consumo y egestión en las larvas mantenidas con la dieta de gelatina, fueron menores que los del grupo control (Cuadro 1). En estos animales, la cantidad de material retenido en el tubo digestivo fue similar a la cantidad de alimento consumido, por lo que se halló un porcentaje elevado del primero en este lote.

La influencia de las dietas sobre el crecimiento de las larvas, se determinó por las variaciones en

el peso corporal. El porcentaje de incremento de éste al final del tratamiento, fue menor en los animales alimentados con gelatina (6,38 %, peso corporal al final del tratamiento: 630 mg  $\pm$  115); en los controles (88,34 %, peso corporal promedio: 1152 mg  $\pm$  187). Los animales ayunados perdieron peso corporal (-5,60 %). Al final del período experimental, las larvas alimentadas con espinaca avanzaron tres estadios (VIII), mientras que los animales ayunados y alimentados con gelatina, sólo lograron superar un estadio (VI). Las variables peso de páncreas, peso y longitud del tubo digestivo en los grupos alimentados con gelatina y sometidos a ayuno, fueron significativamente menores que en el grupo control (Cuadro 2).

La pared de la región gástrica de las larvas de *H. pulchella cordovae* estuvo formada por un epitelio de revestimiento (ER), una región glandular (RG) y una delgada túnica extraepitelial (TE) de tejido conectivo y fibras musculares lisas (Fig.1).

El epitelio de revestimiento de tipo pseudoestratificado, presentó células con especializaciones en la superficie apical, semejantes a estereocilios y células glandulares con granulaciones PAS positivas. La altura promedio (58µm) no se modificó con los distintos tipos de dietas.

Cuadro 2. Peso y longitud del tubo digestivo y peso de páncreas al final del período experimental en larvas de *H. pulchella cordovae* sometidas a diferentes dietas.

Grupos	Peso del tubo digestivo <sup>1</sup>	Longitud del tubo digestivo <sup>2</sup>	Peso del páncreas <sup>1</sup>
	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
Lote Control	121,12*	183,69*	6,09*
	$\pm 26,80$	$\pm 14,70$	$\pm 0,90$
Lote alimentado con gelatina	58,46	116,15	3,24
	$\pm 18,00$	$\pm 15,70$	$\pm 1,10$
Lote sometido a ayuno	52,81	108,38	2,26
	$\pm 16,00$	$\pm 14,00$	$\pm 0,60$

$\bar{X} \pm DS$  : valores medios  $\pm$  desvío estándar; 1: valores medios expresados en mg de tejido fresco; 2: valores medios expresados en mm; \*: Los valores medios del lote control difieren significativamente ( $p < 0,0001$ ) con respecto a los grupos de larvas alimentadas con gelatina y sometidas a ayuno. No se hallaron diferencias entre estos dos últimos lotes.

La zona glandular mostró glándulas tubulares ramificadas, que se abrían hacia la luz del órgano (Fig. 1) formadas por células cúbicas piramidales, algunas de ellas intensamente acidófilas y con gránulos que se teñían de rojo con la técnica tricrómica de Cason (Fig. 2). La región apical de las células glandulares y el material de secreción contenido en el lumen, se observó con intensa reacción PAS positiva (Fig.3) y alcianofilia negativa. Sólo en los individuos ayunados, se encontraron células con gránulos citoplasmáticos que dieron reacción positiva con la fucsina-paraldehído.

Existieron variaciones en el grado de desarrollo de las glándulas entre las larvas sometidas a las diferentes dietas (Fig.1, 4 y 5). La altura de las células glandulares se modificó significativamente ( $p < 0,0001$ ) entre los grupos. La mayor altura celular se halló en los animales sometidos a ayuno (9,75  $\mu\text{m}$ ), mientras que los renacuajos alimentados con gelatina mostraron células de

menor altura (7,25  $\mu\text{m}$ ) y un mayor diámetro del lumen de la glándula (Fig.4).

No se hallaron diferencias en el tamaño de los acinos pancreáticos y de sus células secretoras, entre los diferentes lotes. No obstante, se observó una notable vacuolización de las células acinares en las larvas controles y alimentadas con gelatina.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Durante la metamorfosis los renacuajos microfagos o herbívoros cambian su tipo de alimentación y se transforman en juveniles carnívoros. Estas modificaciones que están asociadas con una completa reestructuración anatómica, histológica y funcional del tracto digestivo, han sido bien documentadas (Dauça y Hourdry, *op. cit.*; Fox, 1983; Kaltembach, *et al.* 1981; Gimenez, *et al.*, 1991).

En la etapa larval, se acepta que existe relación entre el tipo de dieta herbívora y la gran longitud

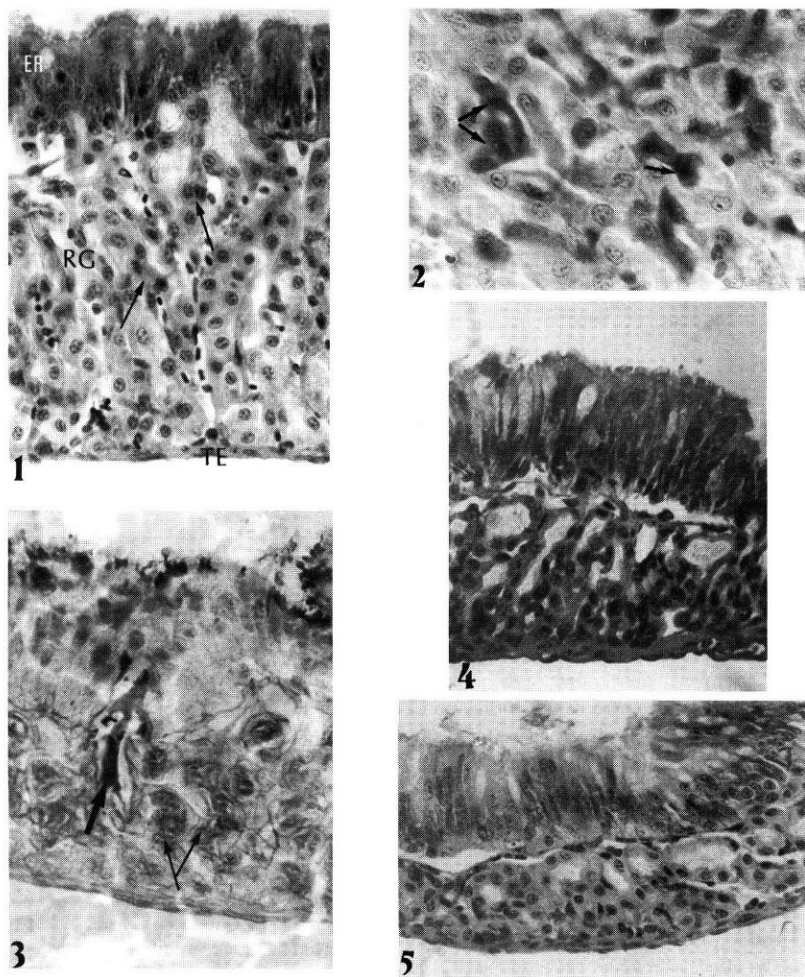


Fig. 1 a 5. 1: Control. Se observa la pared de la región gástrica. Epitelio de revestimiento (ER), región glandular (RG) y la túnica extraepitelial (TE). Células acidófilas (flechas). H-E. Aumentos: 25x; 2: Control. Detalle de la región glandular. Se señalan células acidófilas (flechas). Tricrómico de Cason. Aumentos: 100x; 3: Larvas alimentadas con gelatina. Células de la región glandular con reacción PAS positiva (flecha). PAS. Aumentos: 25x; 4: Larvas alimentaas con gelatina. Se observan glándulas tubulares con un lumen amplio. 5: larvas sometidas a ayuno. Se muestra la pared de la región gástrica. H - E. Aumentos 25x.

del tracto digestivo (Villeé, 1987). Se ha postulado que un tubo digestivo extenso permitiría un mayor tiempo de tránsito del alimento en el intestino, facilitando la digestión del material ingerido (Altig y Kelly, 1974; Noble, 1951).

Los resultados obtenidos con relación al desarrollo y crecimiento, muestran que los animales sometidos a ayuno no crecieron, ya que se produjo pérdida de biomasa. En cambio, los renacuajos mantenidos con gelatina aumentaron el peso corporal, pero a un ritmo muy lento con respecto a los controles, aún habiendo retenido un elevado porcentaje de alimento en el tubo digestivo.

También, el progreso en el desarrollo metamórfico fue más lento en los individuos ayunados y mantenidos con gelatina. El ayuno, condujo a un detenimiento en el crecimiento y además, produjo retraso en el desarrollo larval similar al observado en los animales alimentados con gelatina. Estos hallazgos confirman lo señalado por Kaltenbach (*op.cit.*) en su tabla de requerimientos nutricionales para distintas especies de larvas de anfibios.

En este sentido, no se observó en los animales alimentados con gelatina una relación directa entre el mayor porcentaje de material retenido y el peso de su tracto digestivo completo.

Cuando comparamos nuestros porcentajes de material retenido con los obtenidos por otros autores (Mohanty y Dash, 1988) en larvas alimentadas con una dieta mixta, se encontró que nuestros valores eran superiores (80 % vs. 91 %). Este mayor tiempo de tránsito de la gelatina en el interior del tubo digestivo indica una movilización lenta del contenido intestinal.

Está ampliamente documentado que el tubo digestivo (Gimenez, *op.cit.*; Fox, *op.cit.*; Dauça y Hourdry, *op.cit.*) y el páncreas (Martin, *op.cit.*; Atkinson y Little, 1972) en las larvas de anfibios, aumentan en longitud y peso durante la etapa premetamórfica, para luego acortarse y reducirse en forma notable respectivamente, antes del clímax metamórfico.

El grupo mantenido con gelatina, no mostró el patrón normal de crecimiento esperado para las estructuras digestivas estudiadas durante la etapa de tratamiento (premetamorfosis). Los ejemplares tuvieron un tubo digestivo significativamente más corto, y un páncreas más pequeño que los renacuajos alimentados con espinaca. Estos hechos podrían asociarse con una dieta deficiente o con la incapacidad de digerir y asimilar el alimento para conseguir un adecuado crecimiento y desarrollo.

La región gástrica de las larvas de anfibios es considerada como un órgano con funciones de almacenamiento más que digestivas. No obstante, al final de la metamorfosis, esta región adquiere la capacidad funcional del estómago (Fox, *op. cit.*; Pouyet, *et al.*, 1983).

En estadios próximos al clímax metamórfico, se han identificado distintos tipos celulares de acuerdo a la electrolucidez y distribución de los gránulos, en las glándulas de la región fúndica de larvas de *Xenopus laevis* (Oinuma *et al.*, 1991).

Las características morfológicas e histoquímicas de la pared de la región gástrica de larvas de *H. pulchella cordovae* mantenidas en distintas condiciones nutricionales, no habían sido descriptas hasta el momento. Nuestras observaciones, muestran la presencia de un epitelio de revestimiento constituido por células cilíndricas altas y otras bajas, entre las cuales se hallan células mucosas. Este último tipo celular posee gránulos con glicoproteínas PAS positivas, y podría ser comparable con las células mucosas superficiales descriptas para *X. laevis* (Oinuma, *et al.*, *op. cit.*).

La altura del epitelio no se modificó entre los distintos grupos. Sin embargo, la estructura y el desarrollo de las glándulas gástricas se encontró alterada con las diferentes dietas.

Las glándulas tubulares ramificadas estaban formadas por células cúbicas, algunas de las cuales se observaron muy acidófilas, semejantes al de las células parietales u oxínticas de los

mamíferos y de anfibios adultos (Oinuma, *et al.*, *op.cit.*). La altura celular de las glándulas varió significativamente entre los grupos.

En los animales ayunados se encontraron las células más altas, pero la cantidad de secreción en el interior de las glándulas fue escasa. Algunas células se destacaron por presentar gránulos teñidos con fucsina-paraldehído. Por el contrario, los individuos alimentados con gelatina, tenían células más bajas cuya zona apical mostró la presencia de material glicoproteico intensamente PAS positivo, al igual que el contenido del lumen glandular.

En los animales que recibieron alimento, también las células acinares del páncreas se observaron con signos de gran vacuolización. Sin embargo, en esta especie, el ayuno no produjo en el páncreas cambios estructurales tan evidentes como los descritos para *Bufo arenarum* en etapas postmetamórficas (Martín *et al.*, 1987; Martín, *op.cit.*).

Estos hallazgos sugieren que el consumo de gelatina y el ayuno habrían provocado modificaciones en la morfología del tracto digestivo, de acuerdo a las variaciones observadas en su longitud y peso. Posiblemente, existirían diversos factores nutricionales que se relacionarían con la longitud del tubo digestivo, además de lo señalado por Altig y Kelly (*op.cit.*). Asimismo, si bien para algunos autores la región gástrica de las larvas es un órgano embrionario e indiferenciado y contribuye únicamente con funciones de almacenamiento, el consumo de gelatina habría afectado la estructura y capacidad funcional de las células de las glándulas gástricas como a las acinares del páncreas, en las larvas de *H. pulchella cordovae*.

En síntesis, los diferentes tipos de alimentos utilizados y la condición de ayuno, influyeron en la morfología y actividad funcional de la mayor parte de los órganos digestivos larvales, durante

el desarrollo premetamórfico de *H. pulchella cordovae*.

## REFERENCIAS

- Altig, R. & P. Kelly. 1974. Indices of feeding in anuran tadpoles as indicated by gut characteristic. *Herpetologica* 30: 200-203.
- Altig, R., P. Kelly, M. Wells & J. Phillips. 1975. Digestive enzymes of seven species of anuran tadpoles. *Herpetologica* 31: 104-108.
- Atkinson, B. & G. Little. 1972. Growth and regression in tadpole pancreas during spontaneous and thyroid hormone-induced metamorphosis. *Mech. Ageing Dev.* 1: 299-312.
- Dauça, M. & J. Hourdry. 1985. Transformations in the intestinal epithelium during anuran metamorphosis (36-58). In: Eds. Balls, M. and Brownes, M. Metamorphosis. Clarendon Press, Oxford, 439 pp.
- Fox, H. 1983. The alimentary canal (119-136). In: Amphibian Morphogenesis. Humana Press, London, 301pp.
- Gimenez, H., M. Aciar y M. C. Martín. 1991. Histological and length changes of *Bufo arenarum* digestive tube, during normal and induced metamorphosis. *Rev. Bras. Biol.* 51 (1): 57-64.
- Jensen, T. 1967. Foods habits of the green frog, *Rana clamitans* before and during metamorphosis. *Copeia* 1: 214.
- Kaltembach, K. 1981. Development and conditions of physiologic stress (81-96). Ed. Rechcigl, M. Jr. In: CRC Handbook of nutritional requirements in a functional context. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kaltembach, J., C. H. Wang & M. Lipson. 1981. Histochemical study of the amphibian digestive tract during normal and thyroxine-induced metamorphosis. II. Acid phosphatase. *J. Exp. Zool.* 216: 247-259.
- L'estage, J. 1976. Etude de l'action des facteurs alimentaires sur la morphogenèse du tube digestif des larves d'Anoures. Résultats histoenzymologiques. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 101 (1): 151
- Martín, M. C. 1991. Modificaciones estructurales, ultraestructurales y bioquímicas del páncreas de



*Bufo arenarum* producidas durante las etapas metamórficas y post-metamórficas. Tesis doctoral. *Fac. Cienc. Ex., Fís. y Nat. Univ. Nac. Córdoba*. 141 p.

**Martin, M. C & H. Gimenez. 1987.** Influence of feeding on duodenum and pancreas maturation of juvenile *Bufo arenarum*. *Comun. Biol.* 5 (4): 451.

**Martin, M., A. Nuñez y M. E. Tomatis. 1985.** Metamorfosis en anfibios. I. Desarrollo metamórfico en larvas de *Bufo arenarum* Hensel (Amphibia: Anura). *Hist. Nat.* 5 (32): 289-302.

**Mohanty, S. N. & M. C. Dash. 1988.** Larval energetics of *Rana tigrina* (Daud). *Indian J. Exp. Biol.* 26: 88-91.

**Nathan, J. M. & V. G. Janes. 1972.** The role of protozoa in the nutrition of tadpoles. *Copeia* 4: 669-679.

**Noble, K. 1954.** The digestive system. (201-212).

In: The biology of Amphibia. *Dover Publ. Inc.* New York 10.

**Oinuma, T., J. Kawano & T. Sukanuma. 1991.** Glycoconjugate histochemistry of *Xenopus laevis* fundic gland with special reference to mucous neck cells during development. *Anat. Rec.* 230: 502-512.

**Pouyet, J., J. Hourdry & J. Menard. 1983.** Histological and dynamic study of the gastric region of *Discoglossus pictus* larvae, cultured with or without thyroxine. *J. Exp. Zool.* 225: 423-431.

**Sokal, R. y F. Rohlf. 1989.** Biometría. Principios y métodos en la investigación biológica. *Ed. Blume*, Madrid. 819 p.

**Steinwascher, K. & J. Travis. 1983.** Influence of food quality and quantity on early larval growth of two anurans. *Copeia* 1: 238-242.

**Villée, C., W. Walker y R. Barnes. 1987.** Nutrición Animal (147). En: *Zoología Interamericana*. México. 971 p.

**Recibido / Received /: 16 mayo 1996**

**Aceptado / Accepted /: 7 agosto 1997**