

8525

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
Escuela de Biología

**INFLUENCIA DE LA EDAD DE *Vaginulus plebeius*  
EN LA INFECCION NATURAL CON *Angiostrongylus costaricensis***

**Marta Elena Conejo Viquez**

Memoria de Práctica Dirigida para optar al grado de  
LICENCIADA EN BIOLOGIA

CIUDAD UNIVERSITARIA "RODRIGO FACIO"  
1985

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela de Biología

INFLUENCIA DE LA EDAD DE *Vaginulus plebeius*  
EN LA INFECCION NATURAL CON *Angiostrongylus costaricensis*

Marta Elena Conejo Viquez

Memoria de Práctica Dirigida para optar al grado de  
LICENCIADA EN BIOLOGIA

CIUDAD UNIVERSITARIA "RODRIGO FACIO"

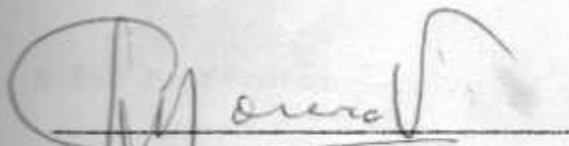
1985

LA EDAD DE Vaginulus plebeius  
RAL CON Angiostrongylus costaricensis

Marta Elena Conejo Viquez

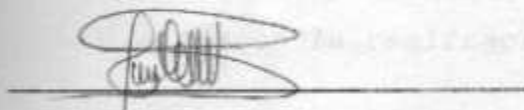
MEMORIA DE PRACTICA DIRIGIDA

Presentada a la Escuela de Biología como requisito parcial  
para optar al grado de LICENCIADA EN BIOLOGIA



Prof. Pedro Morera  
Universidad de Costa Rica

Director de Práctica



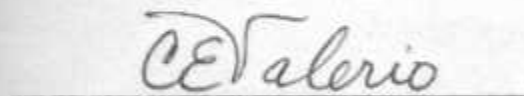
Prof. Hernán Camacho  
Universidad de Costa Rica

Co-Director de Práctica



Prof. Carlos Villalobos  
Universidad de Costa Rica

Miembro del Tribunal



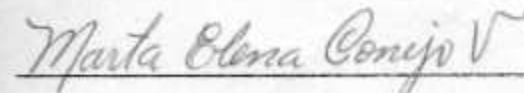
Prof. Carlos Valerio  
Universidad de Costa Rica

Miembro del Tribunal



Prof. María Isabel Morales  
Universidad de Costa Rica

Sub-Directora de Escuela



Marta E. Conejo V.

Sustentante

## AGRADECIMIENTO

### A los Profesores

Pedro Morera y Hernán Camacho, Director y Co-Director del trabajo, por sus valiosos consejos y ayuda en la realización del mismo.

### A los Profesores

Carlos Villalobos y Carlos Valerio, Miembros del Tribunal, por sus valiosas observaciones durante la preparación del manuscrito.

### A la Profesora

Damaris Granados, por su colaboración en el análisis estadístico de los datos.

## CONTENIDO

|                        |    |
|------------------------|----|
| INTRODUCCION           | 1  |
| MATERIALES Y METODOS   | 2  |
| Experimento de campo   | 12 |
| Trabajo de laboratorio | 1  |
| RESULTADOS             | 24 |
| Estadística            | 19 |

## Dedicatoria

|              |    |
|--------------|----|
| DISCUSION    | 2  |
| CONCLUSIONES | 25 |

## INDICE DE FIGURAS

|          |    |
|----------|----|
| FIGURA 1 | 26 |
| FIGURA 2 | 27 |
| FIGURA 3 | 28 |
| FIGURA 4 | 29 |
| FIGURA 5 | 30 |
| FIGURA 6 | 31 |
| FIGURA 7 | 32 |
| FIGURA 8 | 33 |

*A mis padres*

## CONTENIDO

### INTRODUCCION

Página

|                              |    |
|------------------------------|----|
| INTRODUCCION .....           | 1  |
| MATERIAL Y METODOS .....     | 12 |
| Trabajo de campo .....       | 12 |
| Trabajo de laboratorio ..... | 13 |
| RESULTADOS .....             | 18 |
| Estudio histológico .....    | 19 |
| DISCUSION .....              | 29 |
| BIBLIOGRAFIA .....           | 35 |

### Indice de Figuras:

|                |    |
|----------------|----|
| Figura 1 ..... | 24 |
| Figura 2 ..... | 25 |
| Figura 3 ..... | 25 |
| Figura 4 ..... | 26 |
| Figura 5 ..... | 26 |
| Figura 6 ..... | 27 |
| Figura 7 ..... | 27 |
| Figura 8 ..... | 28 |

## INTRODUCCION

Angiostrongylus costaricensis Morera y Céspedes, 1971a (Nematoda: Angiostrongylidae) (= Morerastrongylus costaricensis (Chabaud, 1972)), es el agente etiológico de la angiostrongiliasis abdominal (Morera y Céspedes, 1971b). Esta parasitosis que afecta principalmente a los niños, se observa con creciente frecuencia en los hospitales y centros de salud de Costa Rica (Morera, 1984). Además, la enfermedad se ha encontrado desde México hasta el sur de Brasil (Zambrano, 1973; Zavala et al., 1974; Sauerbrey, 1977; Agostini et al., 1983), y en algunos países en donde no se han encontrado casos humanos, se ha podido demostrar la presencia del parásito en sus huéspedes naturales u otros animales (Tesh et al., 1973; Ubelaker y Hall, 1979; Malek, 1981; Sly et al., 1982; Morera et al., 1983).

Los parásitos adultos, al igual que en su huésped natural, se localizan en las arterias mesentéricas, especialmente en las de la región ileo-cecal. Aquí, las hembras ovipositan y los huevecillos son arrastrados por la corriente sanguínea hacia la pared intestinal en donde quedan atrapados en los vasos de menor calibre y embrionan. Estos huevecillos, junto con los productos de excreción y secreción del parásito, son los que causan una reacción inflamatoria que generalmente es de tipo granulomatoso con gran infiltración eosinofílica. Además, los parásitos adultos que están en las arterias pueden causar excoriaciones del endotelio, que a su vez provocan la

formación de coágulos que luego se organizan en trombos. Cuando éstos son oclusivos, la anoxia que se deriva es la responsable de la necrosis y de las perforaciones y peritonitis que se presentan en algunos casos.

Generalmente los pacientes con esta enfermedad se quejan de dolor localizado en la fosa iliaca derecha o flanco del mismo lado. Casi siempre hay fiebre y el leucograma muestra leucocitosis y eosinofilia elevadas (Robles et al., 1968; Loria y Lobo, 1980).

Además de las lesiones intestinales, se han observado localizaciones ectópicas en el hígado (Morera et al., 1982) y en el testículo (Ruiz y Morera, 1983).

A pesar de que se han descrito 19 especies del género Angiostrongylus (Morera, 1984), sólo Angiostrongylus cantonensis y A. costaricensis se han encontrado causando enfermedad en el hombre. La primera especie produce una meningo-encefalitis que en algunos casos puede ser fatal. Esta enfermedad se había encontrado solamente en países de la Cuenca Oriental del Pacífico, las islas Hawaii y el Pacífico Sur. Aunque se había buscado (Alicata, 1967), no fue sino hasta 1980 que A. cantonensis se encontró en el Continente Americano (Aguiar et al., 1981).

Angiostrongylus costaricensis fue descrita utilizando tres especímenes (dos machos y una hembra) obtenidos de un intestino humano fijado en formalina, que había sido resecado por presentar un engrosamiento de la pared que semejaba un tumor maligno (Morera y Céspedes, 1971). Con anterioridad, se habían estudiado varios casos similares (Morera, 1967; Céspedes et al., 1967) pero solamente

se habían observado los cortes de los parásitos o sus huevecillos.

A. costaricensis es un nemátodo con la extremidad caudal curvada ventralmente; la extremidad cefálica es redondeada y tiene una abertura oral provista de tres pequeños labios. La cutícula es transparente, fina, excepto hacia los extremos en donde es más gruesa y finamente estriada. El poro excretor está situado ligeramente hacia atrás de la unión esófago-intestinal. El anillo nervioso está por delante de la mitad del esófago.

El macho mide de 17,4 a 22,2 mm (19,9 mm). El testículo se inicia ligeramente hacia atrás de la unión esófago-intestinal. Las espículas son delgadas, estriadas e iguales y miden de 0,318 a 0,330 mm. El gubernáculo está formado por dos ramas que se juntan antes de su terminación en la cloaca. La bolsa copulatrix es simétrica y medianamente desarrollada; Los rayos ventrales están juntos excepto en su extremidad distal en donde se puede observar que el ventro-lateral es ligeramente más largo que el ventro-ventral. Los rayos laterales emergen de un tronco común, separados de los ventrales; El externo-dorsal nace cerca del tronco lateral y el dorsal es corto y bifurcado. La cloaca tiene forma de media luna, con la convexidad hacia la extremidad caudal.

La hembra mide de 28,2 a 42,0 mm (32,8 mm). El esófago es ligeramente más grande que en el macho. La extremidad caudal es cónica. El ano está localizado a 0,060 mm del extremo de la cola y la vulva a 0,240-0,290 mm de la misma. En especímenes vivos los tubos uterinos se pueden observar formando una espiral alrededor del

intestino que es de un color oscuro.

Después de la descripción de la especie se encontraron los huéspedes intermediario (Morera y Ash, 1970) y definitivo (Morera, 1970). En 1973 (Morera) se dilucidó el ciclo de vida del parásito y se hizo una redesccripción de la especie. Este trabajo demostró que en el huésped definitivo (Sigmodon hispidus) los parásitos adultos viven dentro de las arterias mesentéricas, especialmente aquellas de la región ileo-cecal. Aquí, las hembras ovipositan y los huevecillos son arrastrados hacia la pared intestinal en donde se atascan en los vasos de menor diámetro; en el tejido, los huevecillos embrionan y en un período de 4 días se forma una larva de primer estadio (L<sub>1</sub>) que reptá hasta alcanzar la luz intestinal. Estas larvas son eliminadas diariamente en la materia fecal de la rata infectada y si las heces se mantienen húmedas, pueden permanecer viables hasta por 8 días (Arroyo y Morera, 1978).

Los estudios realizados hasta el momento demuestran que en Costa Rica el huésped intermedio más importante es la babosa Vaginulus plebeius (Mollusca: Veronicellidae). Estos moluscos se han encontrado infectados en sitios desde el nivel del mar (Parrita) hasta más de 2000 m de altura (Moravia de Chirripó). La prevalencia de la infección varía entre 28 y 75%, habiéndose obtenido un promedio de 50,0% en un estudio realizado en 6.025 babosas provenientes de 20 comunidades de Costa Rica (Morera, 1985).

Una babosa sana se infecta al ingerir materia fecal de una rata infectada; cuando esto sucede, las larvas

migran del intestino del molusco hacia los tejidos fibromusculares del pie y del manto, cerca de la superficie del cuerpo. Una vez alcanzados estos sitios, las  $L_1$  se inmovilizan y se llenan de gránulos y entre el tercero y cuarto día se produce la primera muda. Cuando está madura, la  $L_2$  mide un promedio de 0,370 mm y es granulosa e inmóvil. La segunda muda se produce entre el décimo-primer y décimotercer día. Al principio la  $L_3$  conserva algunos gránulos, pero conforme progresa su maduración los va perdiendo y alrededor del décimootavo día, época en la cual se ha transformado en la forma infectante para el mamífero, su cuerpo está libre de gránulos, pudiendo observarse con claridad los órganos internos. Estas larvas pueden vivir por períodos largos de tiempo (hasta un año) dentro del molusco.

Cuando las  $L_3$  son liberadas (por digestión natural o artificial) muestran movimientos activos ondulatorios; miden un promedio de 0,472 mm. El esófago mide 0,164 mm; el anillo nervioso está situado a 0,064 mm de la extremidad cefálica y el ano a 0,032 mm de la punta de la cola. El primordio genital se localiza a 0,164 mm de la extremidad caudal. En medio húmedo y a temperatura ambiente, estas larvas conservan su viabilidad hasta por 72 horas.

Una rata sana se infecta al ingerir una babosa o alimentos contaminados con  $L_3$  eliminadas en la baba del molusco; en el primer caso, la digestión se realiza en el estómago del roedor y las larvas liberadas descienden por el intestino y penetran la pared del mismo a nivel del ileon. La penetración se produce en unas dos a tres horas. Alcanzada la pared intestinal, las larvas se intro-

ducen en los vasos linfáticos y desde allí se distribuyen en el sistema linfático mesentérico. Se las puede encontrar incluso en los senos linfáticos y de la médula de los ganglios. La tercera muda ocurre entre el segundo y el tercer día. En las  $L_4$  se puede observar diferenciación sexual ya que los machos presentan un abultamiento de la extremidad caudal que eventualmente dará lugar a la formación de la bolsa copulatriz.

La cuarta y última muda se produce entre el sétimo y el décimo día; una vez que ésta se ha completado, los juveniles que miden unos 2 mm, rompen la pared del vaso linfático en donde están ubicados, reptan por el tejido conjuntivo laxo del mesenterio y eventualmente penetran en una ateriola, su habitat definitivo.

El período prepatente es de 24 días y la madurez somática de los vermes se alcanza alrededor de 40 días después de la infección.

Los estudios realizados en Costa Rica han demostrado infección natural en nueve especies de roedores, a saber: Sigmodon hispidus, Rattus rattus, Rattus norvegicus, Liomys salvini, Tylomys watsoni, Proechimys semispinosus, Peromyscus nudipes, Oryzomys albigularis y Oryzomys caliginosus (Morera, 1984). Además, otras tres especies, Iygodontomys microtinus, Liomys adpersus y Oryzomys fulvescens fueron encontradas naturalmente infectadas en Panamá (Tesh et al., 1973). También un pizote (Nasua narica bullata) proveniente de la región de San Carlos se encontró con infección natural (Monge et al., 1978). Recientemente el parásito se encontró en marmosetas (Saguinus mystax) capturadas en la región de Iquitos,

Perú (Sly et al., 1982).

A pesar de que por lo menos dos especies de caracoles (Camacho, 1979) y varios ejemplares de una planaria (Geoplana sp.) se han observado naturalmente infectados, como ya se dijo, los estudios realizados en Costa Rica demuestran que la babosa Vaginulus plebeius es el huésped intermediario más importante.

Los veronicélidos son animales fácilmente reconocibles, caracterizándose por la ausencia total de concha. La mayor parte del cuerpo está cubierta por el manto; en la parte medio ventral se encuentra el pie. Este último está separado del manto por los surcos pedales. En la parte anterior se encuentran dos pares de tentáculos; los inferiores, más pequeños, son bifurcados y tienen función táctil y olfatoria; los superiores son retráctiles y en la parte distal están los ojos. El ano está situado posteriormente, en el surco pedal derecho. El poro genital masculino se localiza junto a la base del tentáculo inferior derecho y el femenino hacia la parte media del hiponoto del mismo lado. El conducto deferente se une a la espermateca por medio de un conducto de unión y se prolonga hasta el pene por dentro del tegumento, a lo largo del surco pedal derecho. La respiración es exclusivamente cutánea (Thomé, 1975).

La oviposición se realiza en masas de alrededor de 30 huevos que salen y se mantienen unidos por una membrana mucosa; son ovalados y están provistos de una gruesa membrana elástica. Al momento de la oviposición son claros y miden unos 4 mm; conforme avanza el desarrollo, se van oscureciendo y aumentan ligeramente de tamaño.

En condiciones ideales la eclosión ocurre en 24 días, pero este período puede variar dependiendo de la temperatura y humedad del ambiente. En suelos saturados por ejemplo, la eclosión ocurre a los 28 días. Los pequeños moluscos comienzan a alimentarse poco tiempo después de la eclosión. Coto (1983) encontró que en Diplosolenodes occidentale el ciclo dura alrededor de seis meses.

La posición filogenética de la familia Veronicellidae es muy discutida. Se admite que junto con las familias Onchiidae y Rathousiidae constituyen el orden Soleolifera. Este orden ha sido colocado antes de los Basommatophora, entre los Euthyneura, o como orden primitivo de los Pulmonata con el nombre de Systellommatophora. También ha sido considerado dentro de los Opisthobranchia (Thomé, 1975). Sin embargo, el hecho de que sus sistemas reproductor, nervioso y digestivo sean básicamente de pulmonados y su éxito en adaptarse a la tierra (respiración cutánea) sugieren una mayor relación estructural con este grupo (Solem, 1978).

La misma confusión se presenta con respecto a los géneros y especies dentro de la familia. Se admite que en Centroamérica existen cinco especies de veronicélidos (K. Andrews, com. personal) pero no se han establecido criterios claros para su identificación.

Coto (1983) al estudiar las posibilidades de control de estos moluscos por constituir una plaga agrícola, se refiere a la especie Diplosolenodes occidentale. En ausencia de trabajos taxonómicos sobre nuestros veronicélidos, resulta difícil saber con cual o cuales se está trabajando. Sin embargo, el nombre Vaginulus plebeius

se usa en el presente estudio, debido a que los primeros ejemplares encontrados con infección natural (Morera y Ash, 1970) y los usados en la dilucidación del ciclo (Morera, 1973), fueron clasificados como tal por el Prof. L. Forcart (P. Morera, com. personal). Finalmente, en un reciente SEMINARIO CENTROAMERICANO SOBRE LA BABOSA DEL FRIJOL (El Zamorano, Honduras; abril, 1985) se llegó a la conclusión de que solamente con base en la morfología externa de las cinco especies presentes en la región, no es posible su identificación. Existe entonces la posibilidad de que en el ciclo de Angiostrongylus costaricensis esté involucrada más de una de estas especies.

Los estudios realizados demuestran que hay mucha variación en el número de larvas que puede haber en cada molusco. Sería de esperar que las babosas de mayor peso, y por lo tanto de mayor edad, tuvieran más larvas por haber tenido más oportunidades de ingerir materia fecal de ratas infectadas. Sin embargo, se han observado muchos ejemplares de poco peso con gran número de larvas (miles), y babosas muy grandes con pocas. Este fenómeno podría deberse a un mecanismo de defensa desarrollado como consecuencia de la infección (resistencia adquirida).

Varios estudios realizados con otros moluscos han demostrado la existencia de dicho mecanismo. Se ha demostrado por ejemplo, que organismos vivos o simplemente moléculas complejas, introducidos natural o experimentalmente en un molusco, provocan un rápido incremento de algunas células de origen hemolinfático que se conocen con el nombre de amebocitos y que tienen capacidad fagocítica (Malek y Cheng, 1974). Se sabe que estas células juegan un papel importante en la defensa de algunos pul-

monados contra larvas de tremátodos (Brown, 1978). Cuando los amebocitos se enfrentan a sustancias o partículas extrañas de gran tamaño, por ejemplo larvas de helmintos que no pueden ser fagocitadas, se produce un fenómeno de encapsulación que tiene por objeto aislar al parásito de los tejidos del huésped.

Lie et al. (1975, 1976) y Lie y Heyneman (1976a, 1976b, 1976c) encontraron masas de amebocitos rodeando los esporocistos de Echinostoma lindoense 30 horas después de la inoculación de los miracidios en Biomphalaria glabrata. Posteriormente se observó encapsulación y destrucción de los parásitos.

En otros casos la formación de una cápsula no destruye al parásito pero sirve para aislarlo con lo cual se protege al huésped de un daño mayor, como en el caso de las larvas de Angiostrongylus cantonensis que permanecen encapsuladas pero vivas en los tejidos del caracol africano Achatina fulica (Malek y Cheng, 1974).

Si bien se ha descrito la existencia de una respuesta humoral en los moluscos, no se ha logrado obtener la evidencia química de que se formen moléculas similares a las de las inmunoglobulinas de los vertebrados. Michelson (1964) demostró que la infección con Schistosoma mansoni en Biomphalaria glabrata provoca la formación de una sustancia que inmoviliza los miracidios. Sin embargo, esta "sustancia inmovilizadora" se puede extraer de caracoles sanos aunque en menor cantidad que de aquéllos infectados. Otra evidencia de la existencia de factores aparentemente innatos, es la muerte de formas parasitarias dentro de caracoles en ausencia de reacciones celulares, como

en el caso de Trichobilharzia elvae en Lymnaea spp. (Brown, 1978).

El presente trabajo se propuso establecer si existe asociación entre la intensidad de la infección por Angiostrongylus costaricensis y el peso de los moluscos infectados con este parásito. También se discute la posibilidad del desarrollo de un mecanismo de resistencia que explique este fenómeno.

## MATERIAL Y METODOS

### Trabajo de campo

En un estudio previo se estableció que en la zona de Bijagua de Upala las babosas son muy abundantes durante todo el año. Esta es una zona ganadera en donde además se cultivan granos, especialmente frijoles (Phaseolus vulgaris), planta por la que tienen especial atracción estos moluscos (Coto, 1983).

Bijagua de Upala pertenece a una zona de bosque húmedo premontano transición a basal.

Para recoger el material de estudio, se seleccionó una zona en donde poco tiempo antes existió una extensa plantación de frijoles. Las colectas se hicieron en el área en donde habían sido abandonados en capas gruesas los restos de las plantas y de las vainas de los frijoles, después del proceso de "aporreio".

Los moluscos se recogieron después de las 9:30 de la noche, hora en que empiezan a mostrar gran actividad; durante el día se refugian debajo de la paja.

Para la búsqueda de las babosas se usaron lámparas de acetileno (carburas) que producen una luz muy intensa. Todos los ejemplares observados sobre la tierra, la paja u otros vegetales, fueron recogidos con pinzas sin dientes

y colocados temporalmente en bolsas plásticas.

Se hizo un total de cuatro visitas durante los meses de marzo, junio, agosto y setiembre; en cada colecta participaron dos personas y se hicieron durante dos noches seguidas, tres horas cada noche.

Después de cada sesión de trabajo, todos los moluscos recogidos se pasaron a baldes plásticos de 30 cm de diámetro por 25 cm de alto, en el fondo de los cuales se depositó vegetación fresca. Los recipientes se taparon con cedazo plástico de malla fina, cuidadosamente ajustado con una cinta de hule para evitar la fuga de las babosas. En esta forma fueron transportadas al laboratorio.

#### Trabajo de laboratorio

Antes de proceder a su estudio, las babosas se mantuvieron en terrarios y se alimentaron con lechuga. Los terrarios se hicieron con cajas plásticas de 35 cm de largo por 22 cm de ancho y 16 cm de alto. En la parte central de la tapa se perforó un agujero de 20x10 cm y se cubrió con cedazo de malla fina, para permitir la respiración y evitar la fuga de los moluscos. En el fondo de la caja se colocó una capa de 5 cm de tierra húmeda. Sobre todo al inicio de la permanencia de cada grupo de babosas en el laboratorio, fue necesario limpiar periódicamente el cedazo ya que el exceso de baba producida durante la actividad nocturna puede obstruir completamente la entrada de aire; la actividad de los moluscos disminuye después de un tiempo de estar en cautiverio. Debido a

que una acumulación grande de baba puede ser tóxica, fue necesario cambiar cada ocho días la tierra. Se colocó un máximo de 75 ejemplares por terrario. Ya que se ha demostrado que algunas larvas salen con la secreción mucosa del molusco (Morera, 1984), éstos se mantuvieron un máximo de tres semanas en el laboratorio.

Para su examen, cada babosa fue limpiada y pesada en una balanza de torsión. La limpieza se realizó colocando la babosa en una caja de petrí tapada, con lo cual después de unos minutos de movimientos del animal se elimina la tierra que estaba adherida. El intentar limpiarlas por otro método hace que la babosa se contraiga y excrete una gran cantidad de baba, con lo cual no sólo se pierde peso sino que posiblemente se eliminarían algunas larvas.

Después de pesadas se colocaron sobre una lámina de corcho cubierta con papel; con un bisturí se hizo un corte a lo largo del dorso con el objeto de extraer y eliminar la masa visceral. Los tejidos fibro-musculares del pie y del manto se colocaron en una licuadora y se agregaron 100 ml de jugo gástrico artificial que contenía 4 g de pepsina, 7 ml de ácido clorhídrico concentrado y 1000 ml de agua destilada. Se puso en marcha la licuadora a máxima velocidad durante unos 90 segundos, hasta que no se observaron pedazos grandes de tejido.

El contenido del frasco de la licuadora se trasladó a un frasco erlenmeyer de 250 ml; las paredes y las aspas de la licuadora se lavaron con la misma solución y el producto del lavado se agregó al frasco. Los frascos se taparon con parafilm y se colocaron en la estufa a 37°C durante tres horas.

Después de la digestión, el contenido de cada frasco se colocó en un aparato de Baermann, según la técnica descrita por Wallace y Rosen (1969), y se dejó durante toda la noche para la sedimentación de las larvas. Al día siguiente, aproximadamente 5 ml del fondo del embudo se colocaron en una caja de petri de 5 cm de diámetro. Para facilitar el conteo de las larvas, en las cajas de petri usadas para tal fin se hizo un cuadrículado con un lápiz de punta de diamante; cada cuadrado tenía 5 mm de lado. La búsqueda y el conteo de larvas se hizo observando cada cuadrado en el microscopio estereoscópico con 24 aumentos. A pesar de que las larvas generalmente son móviles, su actividad consiste en movimientos de contracción y extensión, no de traslación, por lo que no existe el problema de contar la misma larva dos veces.

Con el propósito de analizar los datos se hicieron cuatro categorías de peso, las cuales se identificaron con números romanos. Dentro de cada una de estas categorías se incluyeron las babosas negativas (grupo 0), y las positivas distribuidas en grupos de acuerdo al siguiente criterio: grupo 1, babosas infectadas con 1 a 10  $L_3$ ; grupo 2, con 11 a 50  $L_3$ ; grupo 3, con 51 a 100  $L_3$  y grupo 4, con más de 100 larvas infectantes.

Para establecer si había asociación entre el peso de los moluscos y el grado de infección de los mismos, los datos se analizaron mediante la fórmula de chi cuadrado.

Para una mejor apreciación de los resultados, se hicieron dos nuevos grupos: en el grupo A se colocaron las babosas con infecciones de 1 a 50  $L_3$  y en el grupo

B aquéllas con más de 50 larvas.

En los casos en que se encontró larvas, se montaron algunas en un porta-objetos y se inmovilizaron agregando una gota de lugol; para su identificación, se hizo un estudio microscópico de estos preparados. Al azar se tomaron grupos de larvas de algunas de las babosas infectadas y se inocularon en ratas Sigmodon hispidus por medio de una sonda gástrica. El hallazgo de los parásitos adultos después de transcurrido el período prepatente, confirmó el diagnóstico morfológico.

Para estudiar los cambios histológicos que se pueden producir en las babosas infectadas, a un grupo de 15 ejemplares adultos, nacidos en el laboratorio, se les dió como alimento durante cuatro días, pequeños pedazos de lechuga cubiertos con una capa de materia fecal de ratas infectadas. Veinte días después de la última dosis se repitió la operación durante nueve días; esto último se hizo también con un grupo de moluscos que no habían sido infectados anteriormente. Dos babosas de cada grupo fueron sacrificadas a los 5, 12 y 54 días después de la última infección. Para ésto, las babosas fueron narcotizadas colocándolas en una solución de nicotina y luego fijadas en formalina al 10%. Tres babosas sanas se prepararon por el mismo procedimiento para usarlas como control. Las muestras para el estudio histológico se tomaron de los tercios anterior, medio y posterior. Los tejidos fueron incluidos en parafina y se hicieron cortes de seis micras, los cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina, PAS e impregnación argéntica de Laidlaw.

Para identificar los cortes histológicos se les

dió los siguientes números: 1-tm-85, 3-tm-85 y 5-tm-85 para las babosas infectadas una sola vez y sacrificadas a los 5, 12 y 54 días respectivamente después de la infección. A los cortes de las babosas sacrificadas al mismo tiempo pero con dos infecciones se les dió los números 2-tm-85, 4-tm-85 y 6-tm-85 respectivamente. Con 7-tm-85 se identificaron las babosas no infectadas utilizadas como control.

## RESULTADOS

Se examinaron un total de 856 babosas de las cuatro colectas realizadas. El análisis de los datos mostró que la media aritmética del peso de las mismas fue de 1,87 g con una desviación estándar de 1,04.

Se encontraron larvas infectantes de Angiostrongylus costaricensis en 593 babosas (69,3%); de éstas, 269 (45,4%) tenían entre 1 y 10 larvas (grupo 1); 124 (20,9%) entre 11 y 50 (grupo 2); 79 (13,3%) entre 51 y 100 (grupo 3) y 121 (20,4%) más de 100 larvas (grupo 4).

El Cuadro 1 muestra la relación entre el grado de infección y el peso de las babosas. La agrupación por peso se hizo con base en el valor de la media aritmética (1,87). Así, en la categoría II están los moluscos cuyo peso varió entre 1,4 y 2,4 g, es decir, 1,87 más/menos 0,52 (DS/2). La categoría III la constituyen las babosas que pesaron entre el valor del límite máximo de las de la categoría II más el valor de DS. Las categorías I y IV están formadas por las babosas cuyo peso está por debajo y por encima de las categorías anteriores respectivamente.

Debido a que las larvas infectantes se pueden eliminar con la baba del molusco y por lo tanto pueden constituir una fuente de infección para el mamífero, el número de larvas que tiene cada babosa es muy importante desde el punto de vista epidemiológico. En el Cuadro 2 se agrupa-

ron las babosas que tenían menos de 50  $L_3$  (Grupo A: grupos 1 y 2 del Cuadro 1) y las que tenían más de 50  $L_3$  (Grupo B: grupos 3 y 4 del Cuadro 1).

En la figura 1 se puede observar la relación entre los porcentajes de babosas correspondientes a los grupos A y B distribuidas por categorías de peso; también se observan los porcentajes de babosas infectadas y del total, distribuidas por categorías de peso.

### Estudio histológico

En la mayoría de los tremátodos y céstodos que emplean moluscos como huéspedes intermediarios, las formas larvales se localizan en las vísceras, generalmente el hepato-páncreas y el pericardio. En el caso de Angiostrongylus costaricensis ya se había observado que las  $L_1$  migran a los tejidos del tegumento, en donde se inmovilizan y sufren dos mudas que las transforman en larvas infectantes de tercer estadio.

En las babosas del grupo control (7-tm-85), el tegumento está constituido por un tejido fibro-muscular tapizado en la parte externa por un epitelio cilíndrico simple, relativamente bajo. En el epitelio del pie se observan gran cantidad de células caliciformes que se colorean fuertemente con el PAS. Hacia la parte interna, el tegumento rodea la cavidad celomática; en esta zona la disposición de las fibras es más densa; la impregnación argéntica demuestra que las fibras reticulares son muy abundantes y tienen una disposición circular. En el manto se observan gran cantidad de acinos glandu-

lares mucosos provistos de conductos excretores recubiertos de un epitelio cúbico bajo simple; estos conductos excretores se abren en la superficie del molusco. El estroma está constituido por fibras conectivas junto con las cuales están las fibras musculares. La impregnación argéntica de Laidlaw demuestra que las fibras del tejido conectivo, son todas reticulares. Ambos tipos de fibras tienen disposición longitudinal y radial, excepto hacia la cavidad celomática, en donde se disponen circularmente. Entre este tejido fibro-muscular, se observan numerosos filetes nerviosos, algunas veces en relación con grupos de células ganglionares.

En las babosas infectadas, no se observó alteración de las estructuras descritas anteriormente, pero sí cambios importantes en los tejidos alrededor de las larvas.

1-tm-85: Las larvas, que cinco días después de la infección ya han realizado la primera muda, están rodeadas por grandes masas de amebocitos (Fig. 2). La coloración de Laidlaw no mostró aumento de las fibras reticulares alrededor de las masas celulares o en su interior.

3-tm-85: Doce días después de la infección las larvas están transformándose en  $L_3$ , pero éstas todavía son inmaduras. Las masas de amebocitos alrededor de las larvas son iguales a las que se observan en 1-tm-85, pero se nota un ligero aumento de las fibras reticulares alrededor de las mismas.

5-tm-85: Las larvas están rodeadas de una cápsula de la cual forman parte pocos amebocitos. En este caso las fibras reticulares son más abundantes y se pueden observar clara-

mente con la técnica de Laidlaw (Fig. 7). Esto sucede 54 días después de la infección.

2-tm-85: En estos cortes se observan  $L_3$  de la primera infección y  $L_2$  de la segunda. Estas últimas se observan rodeadas de grandes masas de amebocitos y algunas presentan signos de degeneración (Fig. 3). Las  $L_3$  se ven rodeadas de cápsulas bien definidas (Fig. 4).

4-tm-85: Los cambios observados en estos cortes son similares a los que se ven en 2-tm-85, pero las  $L_3$  de la segunda infección muestran masas de amebocitos a su alrededor (Fig. 5). En cambio, las  $L_3$  de la primera infección no muestran esta reacción (Fig. 6).

6-tm-85: En estos cortes se observan larvas completamente rodeadas por una cápsula, la cual está formada principalmente por fibras reticulares. En algunos sitios se observan larvas degeneradas (de la segunda infección) rodeadas de masas de amebocitos; estas células están más laxamente dispuestas que aquéllas observadas en los preparados 1-tm-85 y 2-tm-85 (Fig. 8).

Tesis  
8525  
#313176  
e.1

CUADRO I

DISTRIBUCION DE LAS BABOSAS POR CATEGORIAS DE PESO  
EN RELACION AL NUMERO DE LARVAS.

| GRADO DE<br>INFECCION    | CATEGORIAS DE PESO EN GRAMOS |                 |                  |                 | TOTALES    |
|--------------------------|------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------|
|                          | I<br>0,4 - 1,3               | II<br>1,4 - 2,4 | III<br>2,5 - 3,5 | IV<br>3,6 - 6,0 |            |
| Negativos                | 131 (49,8)                   | 77 (29,3)       | 45 (17,1)        | 10 (3,8)        | 263 (30,7) |
| Grupo 1                  | 86 (32,0)                    | 79 (29,4)       | 71 (26,4)        | 33 (12,3)       | 269 (45,4) |
| Grupo 2                  | 48 (38,7)                    | 38 (30,6)       | 25 (20,2)        | 13 (10,5)       | 124 (20,9) |
| Grupo 3                  | 18 (22,8)                    | 38 (48,1)       | 18 (22,8)        | 5 (6,3)         | 79 (13,3)  |
| Grupo 4                  | 37 (30,6)                    | 60 (49,6)       | 18 (14,9)        | 6 (5,0)         | 121 (20,4) |
| Sub-total<br>(positivos) | 189 (59,0)                   | 215 (73,6)      | 132 (74,1)       | 57 (85,1)       | 593 (69,3) |
| TOTALES                  | 320 (37,4)                   | 292 (34,1)      | 177 (20,7)       | 67 (7,8)        | 856        |

Grupo 1 = de 1 a 10 L<sub>3</sub>      Grupo 3 = de 51 a 100 L<sub>3</sub>  
 Grupo 2 = de 11 a 50 L<sub>3</sub>      Grupo 4 = más de 100 L<sub>3</sub>

## CUADRO 2

DISTRIBUCION DE LAS BABOSAS POR CATEGORIAS DE PESO  
EN RELACION AL GRADO DE INFECCION

| GRADO DE<br>INFECCION    | CATEGORIAS DE PESO EN GRAMOS |                 |                  |                 |
|--------------------------|------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|
|                          | I<br>0,4 - 1,3               | II<br>1,4 - 2,4 | III<br>2,5 - 3,5 | IV<br>3,6 - 6,0 |
| Negativas                | 131 (49,8)                   | 77 (29,3)       | 45 (17,1)        | 10 (3,8)        |
| A                        | 134 (70,9)                   | 117 (54,4)      | 96 (72,7)        | 46 (80,7)       |
| B                        | 55 (29,1)                    | 98 (45,6)       | 36 (27,3)        | 11 (19,3)       |
| Sub-total<br>(positivas) | 189 (59,0)                   | 215 (73,6)      | 132 (74,1)       | 57 (85,1)       |
| TOTALES                  | 320 (37,4)                   | 292 (34,1)      | 177 (20,7)       | 67 (7,8)        |
|                          |                              |                 |                  | 856             |

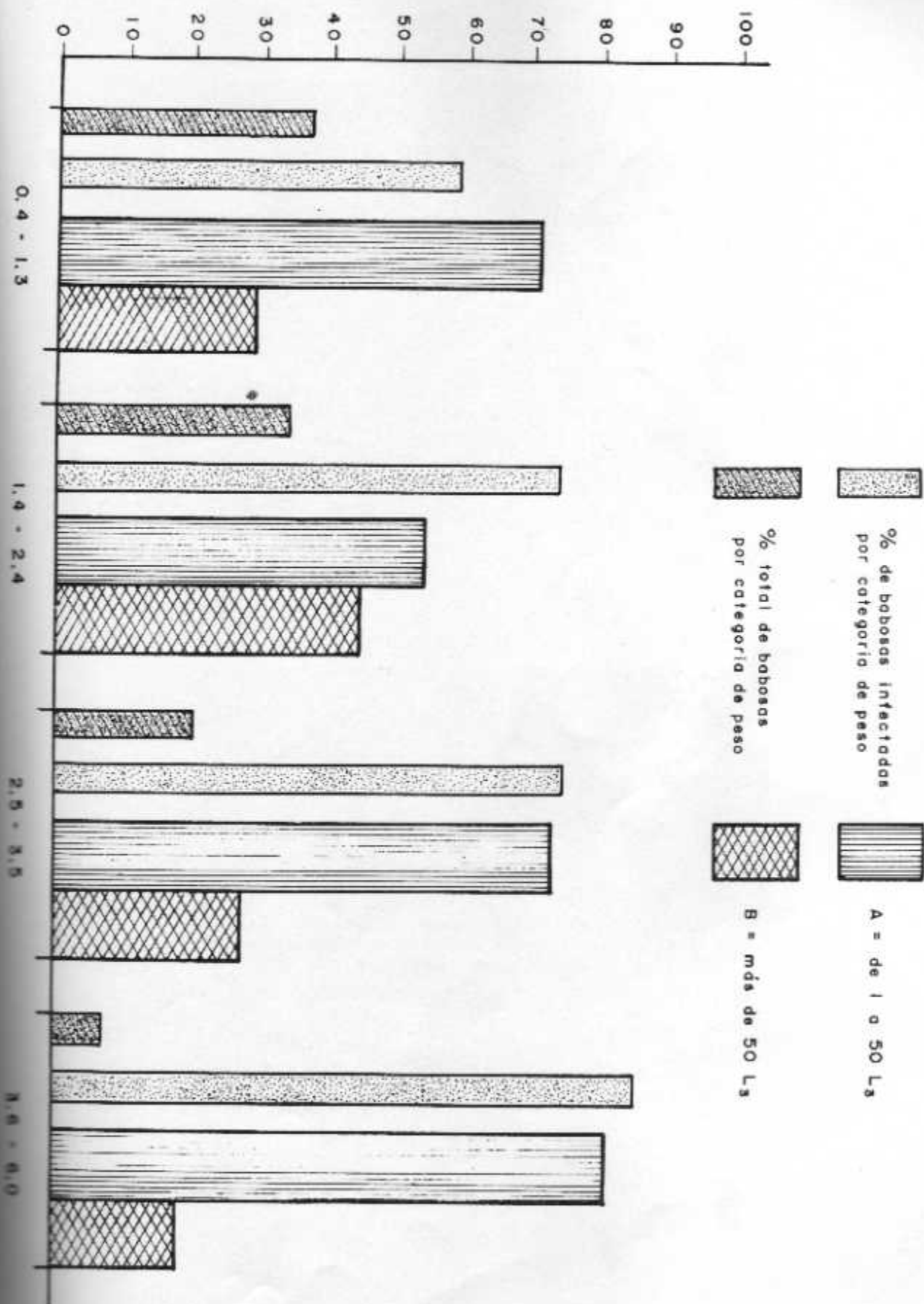
Grupo A = de 1 a 50 L<sub>3</sub>

Grupo B = más de 50 L<sub>3</sub>

Figura 1.

Porcentaje total de babosas, babosas infectadas, babosas con 1 a 50  $L_3$ , y babosas con más de 50  $L_3$ , distribuidas por categoría de peso.

# PORCENTAJE DE INFECCION



## Figura 2.

Lámina 3-tm-85. Larva inmadura de tercer estadio rodeada por una masa de amebocitos, localizada cerca de la superficie del pie. Obsérvese la presencia de tres acinos glandulares mucosos, muy cerca del epitelio.

## Figura 3.

Lámina 2-tm-85. Varios cortes de larvas de segundo estadio en una babosa reinfectada. En la sección longitudinal se puede observar signos de degeneración. La masa de amebocitos es más grande que la observada en la figura anterior.

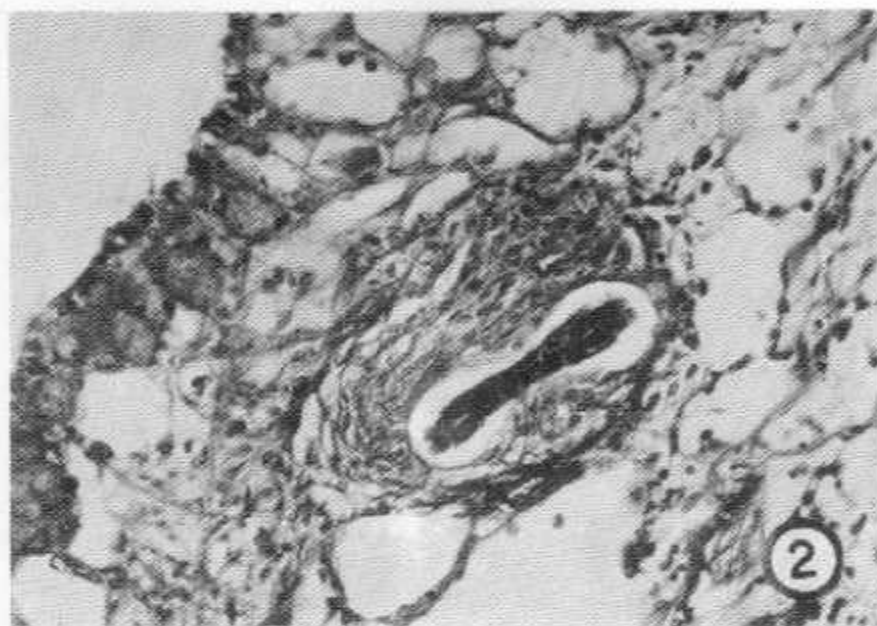


Figura 4.

Lámina 2-tm-85. En el campo microscópico se observan dos reacciones diferentes: hacia la izquierda larvas de tercer estadio de la primera infección alrededor de las cuales se está formando una cápsula y quedan muy pocos amebocitos. A la derecha, se observan dos masas de amebocitos en relación con sendas larvas; obsérvese la cantidad de amebocitos alrededor de las mismas.

Figura 5.

Lámina 4-tm-85. Cortes transversales de larvas inmaduras de tercer estadio de la segunda infección, rodeadas por una masa compacta de amebocitos,

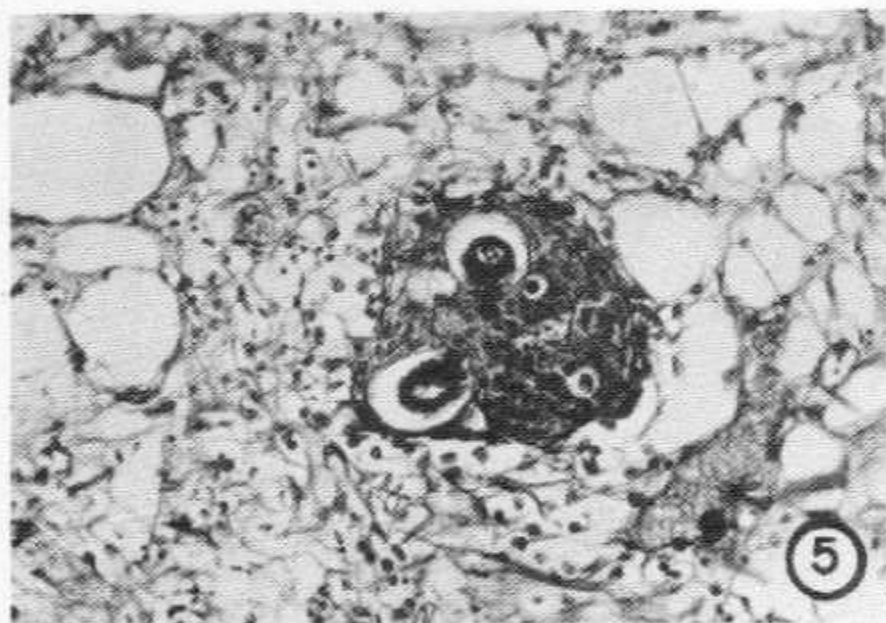


Figura 6.

En la misma lámina de la figura anterior, obsérvense dos larvas de tercer estadio de la primera infección rodeadas únicamente por la cápsula; los amebocitos han sido reemplazados por fibras reticulares.

Figura 7.

Lámina 5-tm-85. Larva de tercer estadio en una babosa con una sola infección; con la impregnación argéntica se puede ver la cápsula de fibras reticulares. Las larvas están muy cerca de la superficie, a la par de un conducto excretor de baba.

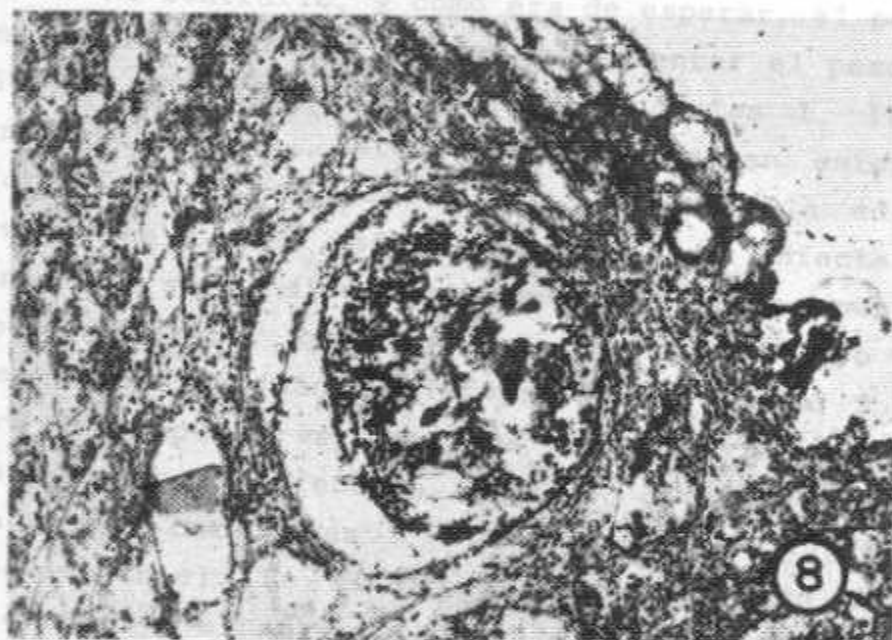


Figura 8.

Lámina 6-tm-85. Masas de amebocitos rodeando restos de larvas de la segunda infección. Obsérvese que se ha iniciado la formación de una cápsula.

## DISCUSIÓN

Como se puede observar en las cuadros 1 y 2, el porcentaje de habos infectados (69,3%) es muy alto. En los mismos cuadros y en la figura 1 se puede ver que el número de individuos disminuye al aumentar el peso. Al contrario, se puede esperar que el porcentaje de individuos infectados sea mayor en los individuos más pesados.



Si y el más bajo (19,3%) en la categoría (VI).

Era de esperar que las habos de la categoría I tuvieran el más bajo porcentaje de infección (19,0%) y también que la mayoría fueran infecciones leves (menos de 10 L<sub>3</sub>); este hecho se podría explicar porque los individuos más jóvenes han tenido menos oportunidades de infectarse. Sin embargo, llama la atención el hecho de que al aumentar el peso de los individuos se presenta la alta prevalencia de infección.

## DISCUSION

Como se puede observar en los cuadros 1 y 2, el porcentaje de babosas infectadas (69,3%) es sumamente alto. En los mismos cuadros y en la figura 1 se puede ver que el número de individuos disminuye al aumentar el peso. Al contrario, y como era de esperar, el porcentaje de moluscos infectados aumenta al aumentar el peso: 59,0%, 73,6%, 74,5% y 85,1% para las categorías I, II, III y IV respectivamente. Estos datos indicarían entonces que conforme aumenta el peso y por lo tanto la edad, cada individuo ha tenido más oportunidades de infectarse. Sin embargo, si se considera el número de larvas por babosa, se puede observar que las de mayor tamaño son las que tienen menor cantidad de larvas. En el cuadro 2 y en la figura 1 se puede ver que los más altos porcentajes de babosas con poca infección (grupo A, con menos de 50  $L_3$ ) están en las categorías I, III y IV (70,9%, 72,7% y 80,7% respectivamente). En el grupo B (babosas con más de 50  $L_3$ ) se observa el mayor porcentaje (45,6%) en la categoría II y el más bajo (19,3%) en la categoría IV.

Era de esperar que las babosas de la categoría I tuvieran el más bajo porcentaje de infección (59,0%) y también que la mayoría tuvieran infecciones leves (menos de 10  $L_3$ ); este hecho se podría explicar porque siendo babosas pequeñas y por lo tanto más jóvenes, han tenido menos oportunidades de infectarse. Sin embargo, llama la atención el hecho de que si bien entre las babosas más viejas se presenta la más alta prevalencia de infección

(85,1%), el porcentaje de individuos con más de 50  $L_3$  es el más bajo de todos, (19,3%). Este mismo fenómeno se observa si se comparan las categorías II y III.

El análisis estadístico de estos datos demuestra que estas diferencias no son producto del azar ( $P < 0,01$ ). Por lo tanto este fenómeno se podría explicar si se admite que estos moluscos son capaces de desarrollar un mecanismo de defensa contra la infección por el parásito.

Las observaciones realizadas mediante el estudio histológico podrían servirnos para explicar, por lo menos en parte, el fenómeno observado mediante el conteo de las larvas en cada babosa. En los moluscos que se infectaron una sola vez, se produce una rápida y abundante proliferación de amebocitos alrededor de las larvas; éstas sin embargo, no presentan evidencia de agresión y llegan a su maduración ( $L_3$ ) normalmente (Fig. 2). Con el tiempo, los amebocitos desaparecen y las larvas se observan en una cavidad rodeada por una cápsula constituida principalmente por fibras reticulares (Fig. 7). La ausencia de reacción celular en los tejidos vecinos parecería indicar que se ha logrado un equilibrio en la relación huésped-parásito. Es probable entonces que la salida de las larvas infectantes con la baba del molusco sea un fenómeno accidental y mecánico; en el tegumento hay gran cantidad de acinos glandulares mucosos; debido a que las larvas se localizan cerca de la superficie externa del molusco, a menudo están en estrecho contacto con estas glándulas o sus conductos excretores; existe entonces la posibilidad de que las contracciones musculares puedan producir ruptura de las cápsulas y liberación de las larvas a través de los

conductos excretores de la baba. Este fenómeno ha sido ampliamente comprobado y probablemente constituye el mecanismo por el cual se infecta el hombre (Morera, 1984).

En las babosas re infectadas, las larvas de la segunda infección provocan también la acumulación de amebocitos a su alrededor, aparentemente en mayor cantidad; en este caso se observan signos de degeneración del parásito (Fig. 3). En las babosas estudiadas 54 días después de la segunda infección este fenómeno es más evidente, observándose la persistencia de los amebocitos aunque más laxamente dispuestos (Fig. 8) . En los mismos cortes , y muchas veces en contigüidad, se pueden ver larvas con morfología normal, rodeadas de la cápsula fibrosa descrita anteriormente (Figs.6 y 7). Estas últimas serían  $L_3$  de la primera infección que lograron madurar normalmente pues no se había desarrollado todavía ningún mecanismo de defensa.

Estas observaciones podrían explicar la aparición de resistencia como consecuencia del primer contacto con el parásito. De acuerdo a esta hipótesis, el orden de los acontecimientos se podría describir así: cuando una babosa sana se infecta, muy poco tiempo después, los parásitos son rodeados por masas de amebocitos (mecanismo de defensa natural); posteriormente hay proliferación de fibras reticulares, las cuales van sustituyendo a las células y logran aislar el parásito de los tejidos del huésped; en esta forma se establece un equilibrio en la relación huésped-parásito. Sin embargo, cuando este equilibrio se ha establecido y se produce una segunda infección, los amebocitos que ya "han aprendido" a agredir al parásito (mecanismo de defensa adquirido), lo atacan violentamente llegando eventualmente a impedir su maduración.

El hallazgo de pocas larvas en las babosas de mayor tamaño podría explicarse entonces por este mecanismo. Por un lado, las larvas de la primera infección que lograron madurar, se irían eliminando mecánicamente como ya se explicó; luego, los mecanismos de defensa adquiridos impedirían, por lo menos en parte, el establecimiento de larvas de infecciones posteriores.

El origen y el estímulo que provocan la formación de masas de amebocitos alrededor de un cuerpo extraño, se ha tratado de explicar de varias maneras. Lie *et al.*, (1975) y Kinoti (1971) describieron un órgano productor de amebocitos en Biomphalaria glabrata y Bulinus spp. respectivamente. Este "órgano" estaría localizado en el pericardio, hacia la superficie interna del tegumento. Sin embargo, en Lymnaea stagnalis no se observó una estructura similar, habiéndose encontrado amebocitos aislados o en pequeños grupos en todos los tejidos del cuerpo (Brown, 1978). En las babosas no infectadas e infectadas que estudiamos, tampoco pudimos observar ninguna estructura similar en el sitio señalado ni en ningún otro lugar. Se podría pensar que en estos moluscos existen elementos similares a las células reticulares de los vertebrados, que siendo muy "jóvenes" desde el punto de vista ontogénico, tienen capacidad para seguir diversas líneas de desarrollo, dando origen a estirpes celulares tan diferentes como todas las células sanguíneas, diversos macrófagos y fibroblastos, de acuerdo a las necesidades. Estas células, en los vertebrados forman parte del sistema retículo-endotelial y constituyen, junto con las fibras reticulares, el estroma de los órganos linfáticos y la médula ósea. Si un citotipo equivalente existe en los moluscos y está distribuido en los tejidos del animal, se podría explicar

entonces su rápida diferenciación (en amebocitos) y proliferación. Del mismo modo se explicaría la formación de las fibras reticulares que van a constituir la cápsula alrededor de los parásitos. Es más, podríamos pensar que después de una primera infección, algunas de estas células podrían adquirir la "información para atacar" al parásito en una segunda invasión.

La rápida aparición de masas de amebocitos alrededor de larvas de parásitos es explicada por Cheng (1966) por la existencia de un estímulo que pone en marcha este mecanismo; este estímulo sería, en el caso de Angiostrongylus cantonensis, un líquido que se libera en el tejido alrededor de la larva al producirse las mudas. Sin embargo, está bien establecido que en Angiostrongylus cantonensis (Mackerras y Sanders, 1955) y en Angiostrongylus costaricensis (Morera, 1973), las cubiertas de la primera y segunda mudas se retienen mientras la larva no sea liberada de los tejidos del huésped; nosotros pensamos entonces que siendo las larvas elementos vivos, aunque su metabolismo sea muy bajo (por razones de economía), siempre llevan a cabo funciones vitales y por lo tanto debe haber algún tipo de intercambio con el exterior (huésped), sobre todo durante la fase de transformación de  $L_1$  a  $L_3$ . Los productos de excreción/secreción podrían ser entonces el factor que estimula la multiplicación de los amebocitos y la formación de cápsulas; sin embargo, no tenemos pruebas que confirmen esta hipótesis. Varios autores han observado este mismo fenómeno en los tejidos de moluscos infectados con los tres tipos de helmintos, a saber: tremátodos (Lie et al., 1975; Lie y Heyneman, 1976a, 1976b, 1976c), céstodos (Rifkin y Cheng, 1968) y nemátodos (Cheng, 1966); si bien se puede decir que esta es una reacción de defensa,

su mecanismo no es bien conocido.

A pesar de que en los moluscos no se han encontrado mecanismos de inmunidad humoral como los conocidos en los vertebrados (formación de inmunoglobulinas), si se han encontrado algunas sustancias que tienen acción contra elementos extraños. En algunos caracoles se han identificado hemaglutininas capaces de actuar sobre los eritrocitos de algunos roedores, y se ha observado un incremento de éstas y otras proteínas en moluscos infectados; sin embargo, no se ha establecido si estas sustancias pueden actuar de alguna manera en la defensa del animal (Malek y Cheng, 1974; Michelson, 1964). Los mecanismos de defensa humorales en los moluscos son menos conocidos (o son más limitados) que los celulares; solamente hay un punto que está bien claro: no se ha podido identificar una molécula igual o similar a una inmunoglobulina. No debemos esperar sin embargo, que las sustancias que podrían jugar algún papel en los mecanismos de defensa humoral de estos invertebrados, deban tener la misma estructura química y actuar en la misma forma que los anticuerpos.

No sabemos si en el fenómeno de resistencia que observamos en las babosas infectadas con Angiostrongylus costaricensis podría haber intervenido algún factor humoral, pero las observaciones parecen indicar que los mecanismos celulares tienen un papel preponderante en la resistencia de las mismas.

## BIBLIOGRAFIA

- Agostini, A.E., A. Peixoto, A.L. Caleffi. A. Dexhaimer e R.R. Camargo.
1983. Angiostrongyliase abdominal: tres casos observados no Rio Grande do Sul. R.AMRIGS, Porto Alegre. 27: 200-203.
- Aguilar P.H., P. Morera and J. Pascual.
1981. First Record of Angiostrongylus cantonensis in Cuba. Am.J.Trop.Med.Hyg. 30:961-963.
- Alicata, J.E.
1967. Absence of Angiostrongylus cantonensis among rodents in parts of Central and South America. J.Parasitol. 53:1118.
- Arroyo, R. and P. Morera.
1978. Viability of the first stage larvae of Angiostrongylus costaricensis in rat feces. J.Parasitol. 64:146.
- Brown, D.S.
1978. En Vera Fretter and J. Peake. Pulmonates. Vol. 2A Systematics, Evolution and Ecology. Academic Press. X+540pp.
- Camacho, H.
1979. Ecología y suceptibilidad de Helisoma trivolvis a la infección con Angiostrongylus costaricensis. TESIS DE GRADO. Universidad de Costa Rica. 75pp.
- Céspedes, R., J. Salas, S. Mekbel, L. Troper F. Müllner y P. Morera.
1967. Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producida por un estrongilídeo (Strongylata). Acta Medica Cost. 10:235-255.

Coto, T.D.

1983. Combate de la babosa Diplosolenodes occidentale Guilding (Soleolifera: Veronicellidae) con extractos de plantas. Tesis de Grado. Centro Regional del Atlántico. Universidad de Costa Rica.

Cheng, T.C.

1966. Perivascular leucocytosis and other types of cellular reactions in the oyster Crassostrea virginica experimentally infected with the nematode Angiostrongylus cantonensis. J. Invertebr. Pathol. 8: 52-58.

Kinoti, G.K.

1971. Observations on the infection of bulinid snails with Schistosoma mattheei II. The mechanism of resistance to infection. Parasitology. 62:161-170.

Lie, K.J., D. Heyneman and P. Yau.

1975. The origin of amebocytes in Biomphalaria glabrata. J. Parasitol. 61:574-576.

Lie, K.J. and D. Heyneman.

1976. Studies on resistance in snails. 3. Tissue reactions to Echinostoma lindoense sporocysts in sensitized and resensitized Biomphalaria glabrata. J. Parasitol. 62:51-58.

Lie, K.J., D. Heyneman and K.H. Jeong.

1976. Studies on resistance in snails. 4. Induction of ventricular capsules and changes in the amebocyte-producing organ during sensitization of Biomphalaria glabrata snails. J. Parasitol. 62: 286-291.

Lie, K.J. and D. Heyneman.

1976. Studies on resistance in snails. 5. Tissue reactions to Echinostoma lindoense in naturally resistant Biomphalaria glabrata. J. Parasitol. 62: 292-297.

- Lie, K.J. and D. Heyneman.
1976. Studies on resistance in snails. 6. Escape of Echinostoma lindoense sporocysts from encapsulation in the snails heart and subsequent loss of the host's ability to resist infection by the same parasite. J.Parasitol. 62:298-302.
- Loría-Cortés, R. and J.F. Lobo-Sanahuja.
1980. Clinical Abdominal Angiostrongylosis. A study of 116 children with intestinal eosinophilic granuloma caused by Angiostrongylus costaricensis. Am.J.Trop.Med.Hyg. 29:538-544.
- Mackerras, M.J. and D.F. Sandars.
1955. The life history of the rat lung-worm Angiostrongylus cantonensis Chen (Nematoda:Metastrongyloidea). Aus.J.Zool. 3:1-21.
- Malek, E.A. and T.C. Cheng.
1974. Medical and Economic Malacology. Academic Press, New York, VIII+398 pp.
- Malek, E.
1981. Presence of Angiostrongylus costaricensis Morera and Céspedes, 1971 in Colombia. Am.J.Trop.Med.Hyg. 30:81-83.
- Michelson, E.H.
1964. Miracidia-immobilizing substances in extracts prepared from snails infected with Schistosoma mansoni. Am.J.Trop.Med.Hyg. 13:36-42.
- Monge, E., R. Arroyo and E. Solano.
1978. A new definitive natural host of Angiostrongylus

costaricensis Morera and Céspedes, 1971. J. Parasitol. 64:34.

Morera, P.

- 1967 Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por un Strongilídeo (*Strongylata* Railliet y Henry, 1903). II. Aspecto parasitológico. (Nota Previa). Acta Medica Cost. 10:257-263.

Morera, P. y R.L. Ash.

- 1970 Investigación del huésped intermediario de Angiostrongylus costaricensis Morera y Céspedes, 1971. Bol. Chileno Parasitol. 25:135.

Morera, P.

- 1970 Investigación del huésped definitivo de Angiostrongylus costaricensis Morera y Céspedes, 1971. Bol. Chileno Parasitol. 25:133-134.

Morera, P. y R. Céspedes.

- 1971a Angiostrongylus costaricensis n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea) a new lung worm occurring in man in Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 18:173-185.

Morera, P. y R. Céspedes.

- 1971b Angiostrongilosis abdominal. Una nueva parasitosis humana. Acta Medica Cost. 14:159-173.

Morera, P.

- 1973 Life History and Redescription of Angiostrongylus costaricensis Morera and Céspedes, 1971. Am. J. Trop. Med. Hyg. 22:613-621.

Morera, P., F. Pérez, F. Mora and L. Castro.

- 1982 Visceral Larva Migrans-like Syndrome caused by

Angiostrongylus costaricensis. Am.J.Trop.Med.Hyg.  
31:67-70.

Morera, P. R. Lazo, J. Urquiza y M. Llaguno.

1983. First record of Angiostrongylus costaricensis  
Morera y Céspedes, 1971 in Ecuador. Am. J. Trop.  
Med. Hyg. 32:1460-1461.

Morera, P.

- 1984 Angiostrongyliasis Abdominal. Transmisión y posi-  
bles medidas de control. Simposio sobre CONTROL  
Y ERRADICACION DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. Costa  
Rica supp. PAHO, Washington (en prensa).

Morera, P.

- 1984 Abdominal Angiostrongyliasis. A Problem of Public  
Health. Monografía mimeografiada. Universidad  
de Costa Rica.

Rifkin, E. and T.C. Cheng.

- 1968 The origin, structure and histochemical characte-  
rization of encapsulating cysts in the Crassostrea  
virginica parasitized by the cestode Tylocephalum  
sp. J.Invertebr. Pathol. 19:65-69.

Robles, G., R. Loria, A. Robles, S. Valle y C. Cordero.

- 1968 Granuloma eosinofílico parasitario intestinal.  
Rev.Hosp.Niños. 3:67-80.

Ruiz, P. y P. Morera.

- 1983 Spermatic artery obstruction caused by Angio-  
strongylus costaricensis Morera and Céspedes,  
1971. Am.J.Trop.Med.Hyg. 32:1458-1459.

Sauerbrey, M.

- 1977 A precipiten test for the diagnosis of human abdo-

- minal angiostrongyliasis. Am.J.Trop.Med.Hyg. 26: 1156-1158.
- Sierra, E. y P. Morera.
1972. Angiostrongilosis abdominal. Primer caso humano encontrado en Honduras (Hospital Evangélico de Siguatepeque) Acta Medica Cost. 15:95-99.
- Sly, D.L., J.D. Toft, G.H. Gardiner and W.T. London.
1982. Spontaneous occurrence of Angiostrongylus costaricensis in marmosets (Saguinus mystax). Lab. Anim.Sci. 32:286-288.
- Solem, A.
1978. En Vera Fretter and J. Peake. Pulmonates. Vol. 2A. Systematics, Evolution and Ecology. Academic Press. X+540 pp.
- Tesh, R., L. Ackerman, W. Dietz and J. Williams.
1973. Angiostrongylus costaricensis in Panama. Prevalence and Pathological Changes in wild rodents infected with the parasite. Am.J.Trop.Med.Hyg. 22:348-356.
- Thomé, J.W.
1975. Os géneros da familia Veronicellidae nas Americas (Mollusca:Gastropoda). Inheringia zool. 48:1-56.
- Ubelaker, J.E. and N.M. Hall.
1979. First Report of Angiostrongylus costaricensis Morera and Céspedes, 1971 in the United States. J.Parasitol. 65:387.
- Wallace, G.D. and L. Rosen.
1969. Techniques for recovering and identifying larvae of Angiostrongylus cantonensis from molluscs. Malacologia. 7:427-438.

Zambrano, Z.

1973. Ileo-colitis pseudotumoral eosinofílica de origen parasitario. Rev. Latinoamericana de Patología. 12:43-50.

Zavala, J., W. Ramírez, A. Reyes y M. Bates.

- 1974 Angiostrongilosis costarricensis. Primeros casos mexicanos. Rev. Invest. Clin. 26:389-394.