

ARTÍCULO INVITADO

REVISIÓN

Una visión de la biología tropical a través del microscopio electrónico

Francisco Hernández-Chavarría

Facultad de Microbiología y Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica; hchavarr@cariari.ucr.ac.cr

Recibido 30-VII-2002. Corregido 22-VIII-2002. Aceptado 06-IX-2002.

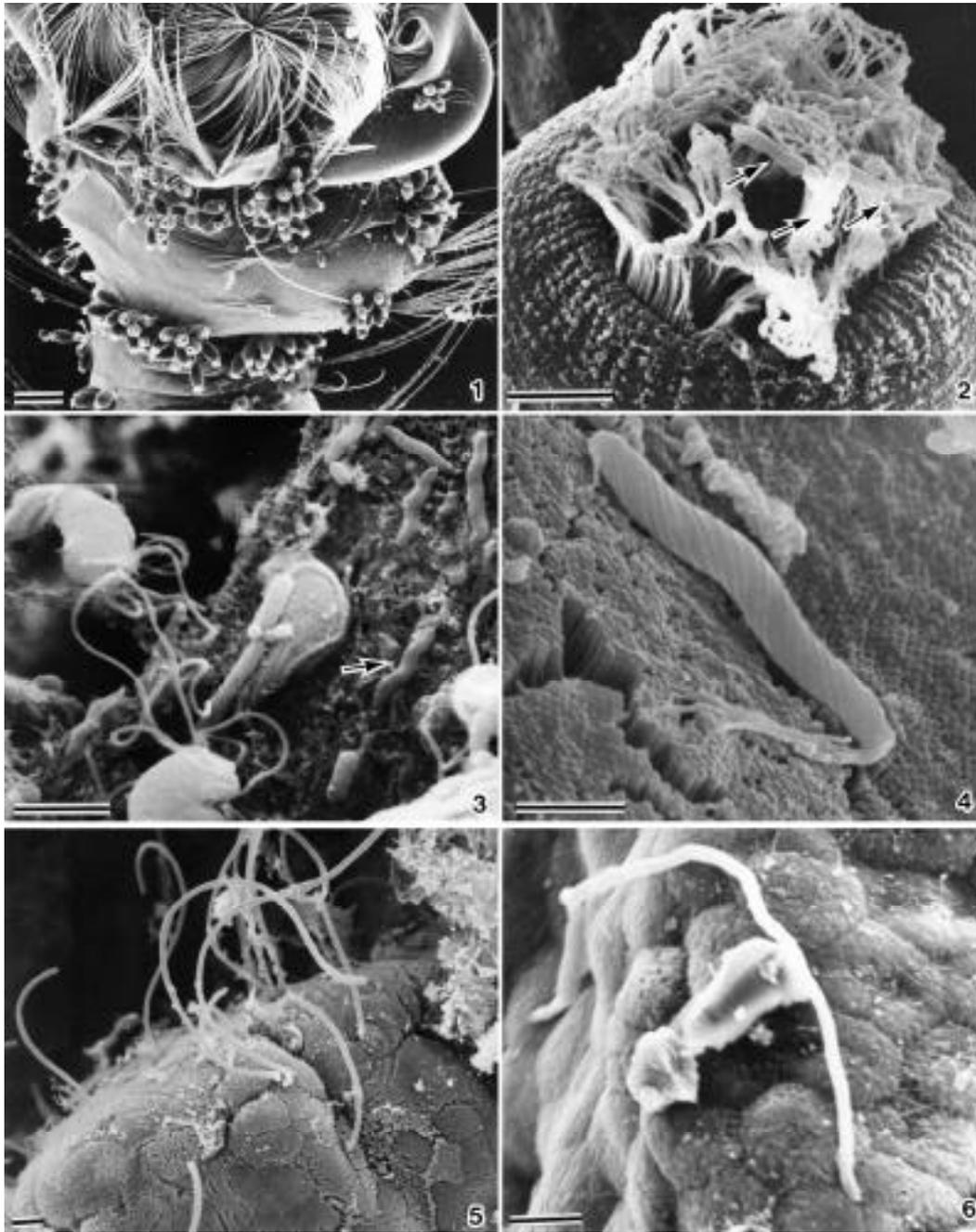
Abstract: The first electron microscope in Costa Rica was a donation from the government of Japan through its International Cooperation Agency (JICA) in 1974. This donation made possible the consolidation of what was to become the University of Costa Rica's Electron Microscope Unit (UME). Within three years the first scientific papers were published, dealing with ultrastructural aspects of "Corn's rayado fino virus" and rotavirus, viral agent of human diarrhea. Subsequent papers out of the UME were published for the most part in the Journal of Tropical Biology, totaling at least 50 in that journal alone by the year 2000. With the recent acquisition of Energy Dispersive Spectrometer to coupled in transmission electron microscope and scanning electron microscope to X ray analysis, the data acquisition of the UME has been greatly enhanced, making possible to analyze both structure and elemental chemical composition in a specimen. Other applications of this new technology include studies of environmental pollution with heavy metals, such as comparative analysis of residues on leaves from urban areas and those on leaves from primary forest.

Key words: Electron microscopy, ultrastructure, diarrheal viruses, plant viruses, bacteria, X ray analysis.

La banda ecuatorial del planeta ubicada entre los trópicos de cáncer y capricornio presenta los nichos ecológicos más ricos y complejos, con la mayor diversidad de formas de vida animal y vegetal, muchas de las cuales aún no se han descrito científicamente. Costa Rica representa un ejemplo de esa riqueza biológica tropical, pues al constituir un puente entre las dos masas continentales americanas ha sido un punto de convergencia de muchas especies. Así, con un territorio relativamente pequeño, que representa tan solo el 0.001% de la extensión mundial, se concentra una enorme biodiversidad (Rodríguez Ramírez y Hernández Benavides 1998). Sin embargo, se han realizado estudios ultraestructurales en muy pocas de las especies silvestres de esa vasta diversidad.

Si al lado de ese amplio panorama que representa la biodiversidad del trópico, se incluyeran estudios sobre la microbiota asociada a muchas de las especies mayores, incluyendo la

flora microbiana indígena propia de cada organismo y las relaciones ecológicas, ya sea parasitarias, mutualistas o simplemente comensales, nos percatamos de que el trabajo pendiente es aún mayor. Por ejemplo, en una muestra de agua de charco pueden existir infinidad de relaciones ecológicas como la mostrada en la Fig. 1, donde se observa una larva de *Culex* parasitada por vorticelas. Aún en el vórtice de los cilios de este protozoo podemos encontrar bacterias, posiblemente a punto de ser devoradas (Fig. 2). De esta forma, si en el análisis microscópico de nuestra biodiversidad incluyéramos observaciones a mayores aumentos, podríamos detectar las relaciones existentes con agentes más pequeños como bacterias y virus, muchos de los cuales no se han clasificado aún y se desconoce su potencial patogénico. La Fig. 3 muestra las comunidades microbianas que colonizan el intestino murino. Cuando se tomó esa fotografía a principios de la década de



Figuras 1-6. Micrografías electrónicas de rastreo (Microscopios electrónicos de rastreo HS 2R y S-570). Figs. 1. Larva de *Culex* colonizada por Vorticellas, que aparecen en racimos adosadas al cuerpo (Barra = 0.1mm). Fig. 2. Corresponde a una ampliación del extremo ciliado de una vorticela en la cual aparecen algunas bacterias bacilares adosadas a los cilios (Flechas), la barra equivale a 5 mm. Figs. 3-4. Íleon murino mostrando una serie de organismos, entre los cuales aparecen protozoarios flagelados (Hexamita), bacterias cocoides, bacilares y algunas curvas, como la señalada con la flecha (Barra = 5 mm). Fig. 4. Muestra una de esas bacterias curvadas sobre las microvellosidades del intestino; lo más relevante de la morfología de esta bacteria es su aspecto curvado y la presencia de fibras periplásmicas que le dan un aspecto de tornillo (Barra = 1 mm). Fig. 5. Sección de íleon de ratón, mostrando un conglomerado de bacterias filamentosas enclavadas en la mucosa (Barra = 5 mm). Fig. 6 muestra una bacteria similar, pero en intestino de un niño desnutrido (Barra = 5 mm).

1980 fue muy conspicua la presencia de bacterias curvadas como la señalada en esa figura, e ilustrada a mayor aumento en la Fig. 4 (Hernández *et al.* 1985). Actualmente se sabe que ese agente es *Helicobacter muridarum*, descrito por Lee *et al.* (1992). Ese ejemplo nos conduce al comentario de la portada del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey's, que corresponde a un frotis de contenido de rumen bovino, cuya descripción indica que posiblemente ninguna de las bacterias que aparecen allí se han descrito científicamente y que por lo tanto, no son mencionadas en dicho manual (Holt *et al.* 1994). Siguiendo ese mismo razonamiento, podemos cuestionarnos el papel desempeñado por algunas bacterias filamentosas, como las fotografiadas en muestras del extremo terminal de íleon murino (Fig. 5), y que también se han visualizado en el intestino de otros animales (Abrams 1977); cabe destacar que si bien las hemos encontrado en el íleon de niños desnutridos (Fig. 6), desconocemos el efecto que puedan estar causando en estos hospederos debilitados.

La rica microbiota y macrobiota del trópico, puede ser responsable de la variada patología tropical. En cuanto a la variedad de agentes infecciosos tropicales, los virus transmitidos por artrópodos constituyen un magnífico ejemplo de las denominadas enfermedades emergentes, que cada día adquieren mayor importancia (Fauci 2001); así, en la década de 1930 se conocían solo 6 arbovirus: Fiebre amarilla, Enfermedad de Louping, Lengua Azul, Fiebre porcina africana, Enfermedad ovina de Nairobi y Estomatitis vesicular (Reeves 2001). Actualmente la lista de arbovirus descritos supera los 534 virus (Gubler 2001). Sin embargo, cuando analizamos la epidemiología de las enfermedades infecciosas en el trópico, debemos considerar a la pobreza como uno de los factores determinantes co-responsables de esas patologías; pues desafortunadamente, esa banda tropical del planeta no solo alberga a más de la mitad de la población mundial, sino que la habitan las poblaciones humanas con mayor pobreza y subdesarrollo.

Ante la necesidad de comprender las más íntimas relaciones existentes entre los diversos

organismos tropicales, se torna imperativa su observación al microscopio electrónico; pues, éste abre insondables oportunidades a nuestro apetito de conocimiento.

En Costa Rica la historia de la microscopía electrónica y sus aportes al estudio de la biología del trópico, se inicia con un convenio con el gobierno de Japón en 1974, mediante el cual se donó el primer microscopio electrónico al país y con él se inició la observación de un mundo miles de veces más pequeño que el poder de resolución de nuestros ojos.

El principio de la Microscopía Electrónica en Costa Rica: Esta historia indirectamente está ligada a un artículo publicado en la Revista de Biología Tropical, en el que Morena y Céspedes (1970) describieron un nuevo parásito, el *Angiostrongylus costarricensis* (Nematoda: Metastrongyloidea). Ese evento histórico se complementa con los hechos ocurridos luego de la conferencia inaugural de un congreso médico; en la cual, los autores resaltaron los hallazgos e importancia médica de dicho parásito. La información resultó tan interesante al presidente de Costa Rica de ese entonces (José Figueres Ferrer 1970-1974), quien participaba en la ceremonia de apertura del Congreso, que ofreció la ayuda necesaria para continuar la investigación. Ante tal ofrecimiento fue solicitado un microscopio electrónico y con ello se iniciaron las gestiones para buscar la ayuda internacional que permitiera conseguir tal equipo. El proceso concluyó con el convenio antes mencionado y la donación que hiciera el gobierno de Japón del primer microscopio electrónico que llegó a Costa Rica (Hitachi HU 12 A); además, se donó el equipo accesorio adicional y vinieron dos expertos japoneses (Yoshimichi Kozuka y Takahisa Fukuoka). Todo esto condujo a la creación de la Unidad de Microscopía Electrónica en 1974, que en el 2002 fue transformada en el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas. El convenio cooperativo permitió la visita de una serie adicional de expertos japoneses en microscopía electrónica, entre los cuales resalta la figura de Hiroshi Akahori, jefe del departamento de diseño de microscopía electrónica

de la compañía Hitachi entre 1966 y 1973 (Hernández 1987). La misión de los expertos japoneses se centraba en el entrenamiento de los científicos costarricenses en las técnicas de microscopía electrónica, lo cual se concretó con una serie de cursos de entrenamiento.

Los convenios cooperativos se mantuvieron por un lapso de 14 años lo que cimentó las bases de la microscopía electrónica en Costa Rica. Unos años más tarde, los expertos costarricenses impartían a su vez cursos de capacitación a científicos latinoamericanos becados por el gobierno de Japón, mediante la Agencia Internacional de Cooperación del gobierno de Japón "JICA" (Freer 1999).

Los primeros virus vistos en Costa Rica: Retornando a los orígenes de esta historia, el primer artículo publicado en la Revista de Biología Tropical, en el que se utilizó la microscopía electrónica como herramienta fundamental, apareció en el volumen 25, en éste trabajo, Rodrigo Gámez y los japoneses Fukuoka y Kozuka (1977) describieron la purificación y ultraestructura del virus del rayado fino del maíz. Ese mismo año se publicó en Costa Rica la descripción de la primera epidemia de diarrea causada por rotavirus (Fig. 7) (Hernández *et al.* 1977); se comparó la prevalencia de ese virus con la de otros agentes infecciosos relacionados con las diarreas infantiles (Mata *et al.* 1977); y se documentó el hallazgo de rotavirus en niños con desnutrición severa (Hernández *et al.* 1977b). Adicionalmente, el Hospital Infantil de México publicó el libro "Las enfermedades diarreicas en el niño" en el cual se incluyó un capítulo sobre virus, que contenía parte de los datos generados en el país (Mata *et al.* 1977b).

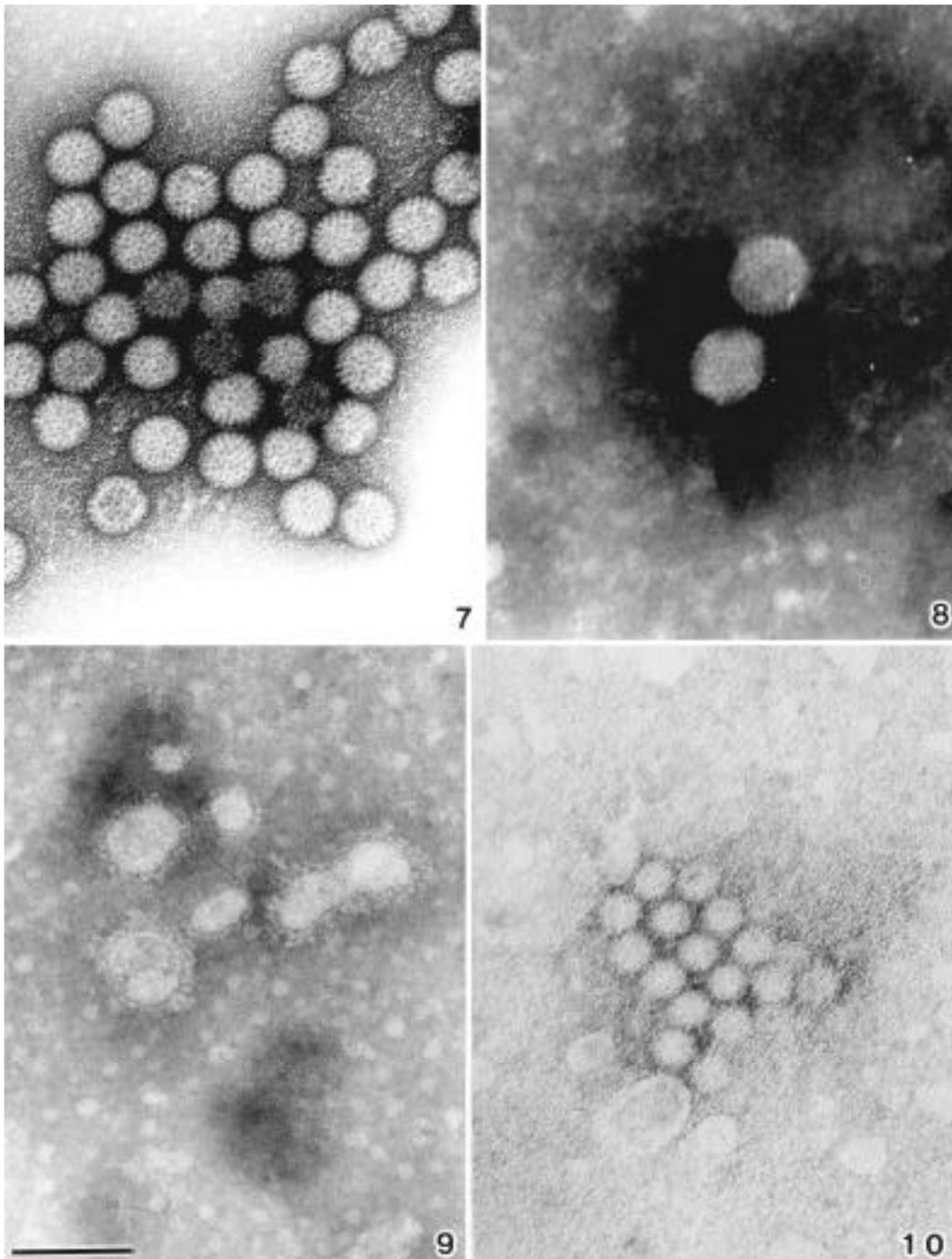
La relevancia de la investigación de rotavirus en Costa Rica se centra en que ese agente fue descrito solo cuatro años antes (Bishop *et al.* 1973, Flewett *et al.* 1973) y que los estudios realizados en Costa Rica confirmaron que en el trópico también se presentaba el patrón epidemiológico descrito en Estados Unidos e Inglaterra, según el cual este virus provocaba brotes epidémicos durante los meses más fríos del año (Hernández *et al.* 1977a). Para esa época,

la única herramienta diagnóstica utilizada en la investigación de los virus de las diarreas era la microscopía electrónica; lo cual llevó a la descripción de toda una gama de virus relacionados con esta patología, que revolucionó el conocimiento sobre la etiología de las diarreas.

La observación de las heces diarreicas al microscopio electrónico condujo al hallazgo de otros virus, entre los que sobresalen por su alta prevalencia los adenovirus entéricos (Fig. 8) y los coronavirus (Fig. 9), que también fueron visualizados en Costa Rica, tanto en humanos como en terneros (Hernández *et al.* 1985, 1987). Adicionalmente, mediante microscopía electrónica se describió el primer brote de gastroenteritis hemorrágica aguda canina debida a parvovirus, agente que se ilustra en la Fig. 10 (Hernández *et al.* 1983).

Si bien los trabajos que evaluaron sistemáticamente la etiología de las diarreas y que definieron a los rotavirus como el agente más importante, concluyeron a inicios de la década de 1980 (Mata *et al.* 1983), recientemente se retomó el tema, y se corroboró que ese panorama epidemiológico continuaba presentándose; cabe destacar el hallazgo de la importancia de los coronavirus en el brote epidémico de diarrea de fin de año (González *et al.* 1997). Para concluir el tema de los rotavirus podemos señalar que la primera descripción hecha en Costa Rica sobre la ultraestructura de este agente, fue publicada en la Revista de Biología Tropical en 1986 (Hernández y Akahori 1986a); trabajo que sería complementado con otras publicaciones (Hernández y Akahori 1986b, Hernández *et al.* 1990, Hosaka *et al.* 1991).

Unidad de Microscopía Electrónica: En 1984 se realizó - como parte de la celebración del vigésimo aniversario de la Unidad de Microscopía Electrónica- el primer simposio de microscopía electrónica en Costa Rica. Como parte de dicho evento, algunos de los trabajos presentados fueron publicados en la Revista de Biología Tropical, lo que incluyó los artículos correspondientes a la descripción de los primeros agentes virales visualizados en Costa Rica: "Virus del rayado fino del maíz" (León y Gámez 1986, Pereira y León 1986) y rotavirus



Figs. 7-10. Micrografías electrónicas de transmisión (Microscopio electrónico HU-12 A), correspondientes a muestras de heces contrastadas mediante tinción negativa. Fig. 7-9 Representan respectivamente a rotavirus, adenovirus y coronavirus fotografiados en muestras de heces de niños con diarrea. (Barra = 5 mm). Fig. 10. Preparación de heces de un perro cachorro con gastroenteritis hemorrágica debida a parvovirus.

(Hernández y Akahori 1986). Además, apareció un artículo sobre virus de orquídeas en el cual se describe una infección doble, causada por una raza del virus del mosaico del tabaco que afecta a orquídeas y el virus del mosaico del *Cymbidium* (Velazco *et al.* 1986). Lo relevante de este artículo fue la visualización simultánea de ambos agentes virales en las mismas células infectadas, tal como se muestra en la Fig. 11. Ese volumen de la revista acogió trabajos sobre ultraestructura en botánica (Vasquez *et al.* 1986), cáncer gástrico (Tuk y Corrales 1986), ultraestructura de los nódulos de Ranvier de camarón (Gunter y Howell-Aguilar 1986), *Campylobacter* (Hernández *et al.*

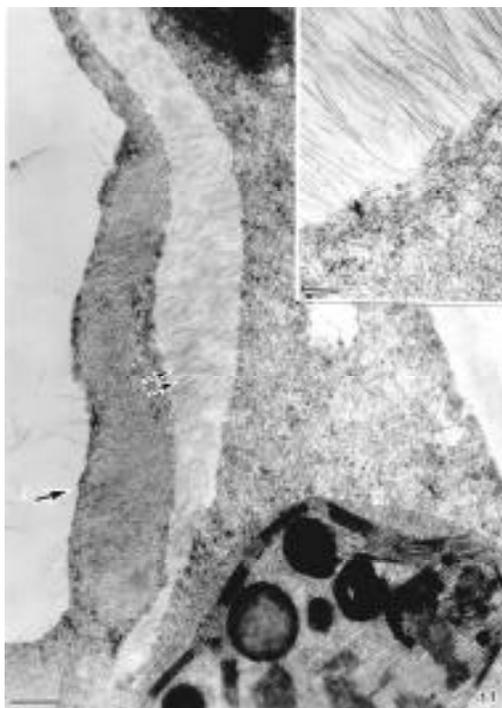


Fig. 11. Micrografía electrónica de transmisión (HU 12 A) de un corte ultrafino de una hoja de un híbrido de *Cymbidium* (orquídea) infectado simultáneamente por dos virus, que aparecen en sendas inclusiones intracitoplasmáticas en una misma célula. Las dos flechas pequeñas señalan la inclusión de un virus rígido (Mosaico del tabaco, raza de orquídeas) y la flecha más grande indica la inclusión más electrodensa, correspondiente a un virus flexuoso (Mosaico del *Cymbidium*) (Barra = 500 nm). Ambas inclusiones se muestran a mayor aumento en el recuadro superior de la imagen (Barra = 100 nm).

1986), escamas de serpientes costarricenses (Arroyo y Cerdas 1986), y *Toxoplasma* (Chinchilla *et al.* 1986). Se incluyó además un artículo sobre la adaptación de una nueva técnica para el estudio ultraestructural de superficies tisulares al microscopio electrónico de transmisión, tal como se muestra en las Figs. 12 y 13, que corresponden a la superficie de duodeno murino (Hernández *et al.* 1986).

Diez años más tarde, para la conmemoración del trigésimo aniversario de la Unidad de Microscopía Electrónica, se publicó un suplemento de la Revista de Biología Tropical que incluyó 22 artículos de los cuales siete versaron sobre agricultura y producción forestal, cuatro sobre bacteriología y virología, otros cuatro sobre zoología, dos sobre biomedicina y finalmente cuatro notas relacionadas con el diseño de nuevas técnicas en microscopía electrónica.

El cuadro 1 ilustra la diversidad de campos en que -mediante artículos publicados en esta revista-la microscopía electrónica ha hecho aportes a la biología del trópico, lo que incluye estudios de científicos extranjeros, como Segovia-Salinas *et al.* 1993 y Cárdenas-Reygadas y Barrera-Escorcía 1998.

Nuevas perspectivas: En el ámbito mundial, durante las últimas cinco décadas, la microscopía electrónica ha propiciado avances importantes en biomedicina, especialmente en el campo de las enfermedades virales, tal como se resume en el cuadro 2. Cabe destacar que sólo unos diez años antes de las primeras observaciones de virus al microscopio electrónico, no se comprendía muy bien el significado biológico de los virus, como evidencia el comentario de Reeves (2001), quien señaló -chistosamente- que un virus en la década de 1940 se describía como algo que “*usted no puede verlo, olerlo, tocarlo o cultivarlo, pero eso lo puede matar a usted*”.

El perfeccionamiento de las técnicas para la observación de virus condujo al diagnóstico rápido de algunas enfermedades virales, lo cual fue particularmente importante en el diagnóstico diferencial de viruela, especialmente en el estudio de posibles brotes de esta enfermedad en Europa en la década de 1960 (Cruickshank *et al.* 1966).

CUADRO 1

Publicaciones relacionadas con microscopia electrónica, RBT1977 a 2002

Tema (N°)	Referencias
Anélidos (1)	Capa <i>et al.</i> 2001
Aves (1)	Monge-Nájera y Hernández 1994
Bacterias (5)	Hernández y Monge-Nájera 1994, Hernández y Rodríguez 1991, Hernández <i>et al.</i> 1986, Hernández <i>et al.</i> 1994, Sánchez <i>et al.</i> 1994.
Biomedicina (3)	Hernández y Akahori 1983, Moreira-Carmona <i>et al.</i> 1994, Rivera <i>et al.</i> 1994.
Crustáceos (4)	Breedy 1995, Alfaro 1994, Gunther y Howell-Aguilar 1986, Watling y Breedy 1988.
Fitoplancton (3)	Chow <i>et al.</i> 1994, Cortés Altamirano y Nuñez Pasten 2000, Hernández-Becerril 2000.
Helmintos (2)	López-Chaves 1994, Segovia-Salinas <i>et al.</i> 1993.
Hongos (4)	Salas y Hernández 1997, Córdoba-Cedeño <i>et al.</i> 1994, Gómez y Kisimova-Horovitz 1998, Piepenbring 2001.
Insectos (5)	Macaya-Lizano <i>et al.</i> 1998, Monge-Nájera <i>et al.</i> 1998, Sierra <i>et al.</i> 2000, Pfannes y Baier 2002, Eberhard 2002.
Mamíferos (9)	Hernández y Kozuka 1981, Juárez-Mosqueda <i>et al.</i> 1994, Malavasi <i>et al.</i> 1981, Pashov-Nicheva y Matamoros Hidalgo 1994, Sancho y Ureña 1987, Ureña y Malavasi 1980, Ureña y Malavasi 1981, Ureña y Malavasi 1978, Ureña <i>et al.</i> 1987.
Moluscos (3)	Arrieche 1999, Camacho-García y Ortea 2000, Pérez y López 2002
Protozoos (5)	Chinchilla <i>et al.</i> 1986, Chinchilla <i>et al.</i> 1987, Ureña 1988, Hernández <i>et al.</i> 1993, Morales-Ramírez <i>et al.</i> 2001.
Peces (2)	Cárdenas-Reygadas y Barrera-Escorcía 1998, Rodríguez 1999.
Plantas (15)	Flores <i>et al.</i> 1994, Flores <i>et al.</i> 1994, Flores <i>et al.</i> 1977, Gutiérrez-Herrera <i>et al.</i> 1994, Montiel 1979, Moreira y Arnáez 1994, Ramírez y Flores 1994, Sáenz <i>et al.</i> 1983, Sánchez-Chacón <i>et al.</i> 1994, Gómez y Gómez-Laurito 1998, Araújo-Neto y Bergemann-Aguilar 1999, Gaglianone 2000, Castillo y Guenni 2001, Imhof 2001, Brighigna <i>et al.</i> 2002.
Reptiles (4)	Acuña 1987, Acuña 1989, Arroyo y Cerdas 1986, Acuña-Mesén <i>et al.</i> 2001.
Técnicas en microscopia electrónica (6)	Hernández <i>et al.</i> 1986, Hernández <i>et al.</i> 1991, Hernández <i>et al.</i> 1994, Hernández 1994, Mazo y Hernández 1994, Macaya-Lizano <i>et al.</i> 1998.
Virus (6)	Gámez <i>et al.</i> 1977, Hernández y Akahori 1986, Hernández <i>et al.</i> 1994, León y Gámez 1986, Rivera y Pereira 1994, Hernández <i>et al.</i> 2002

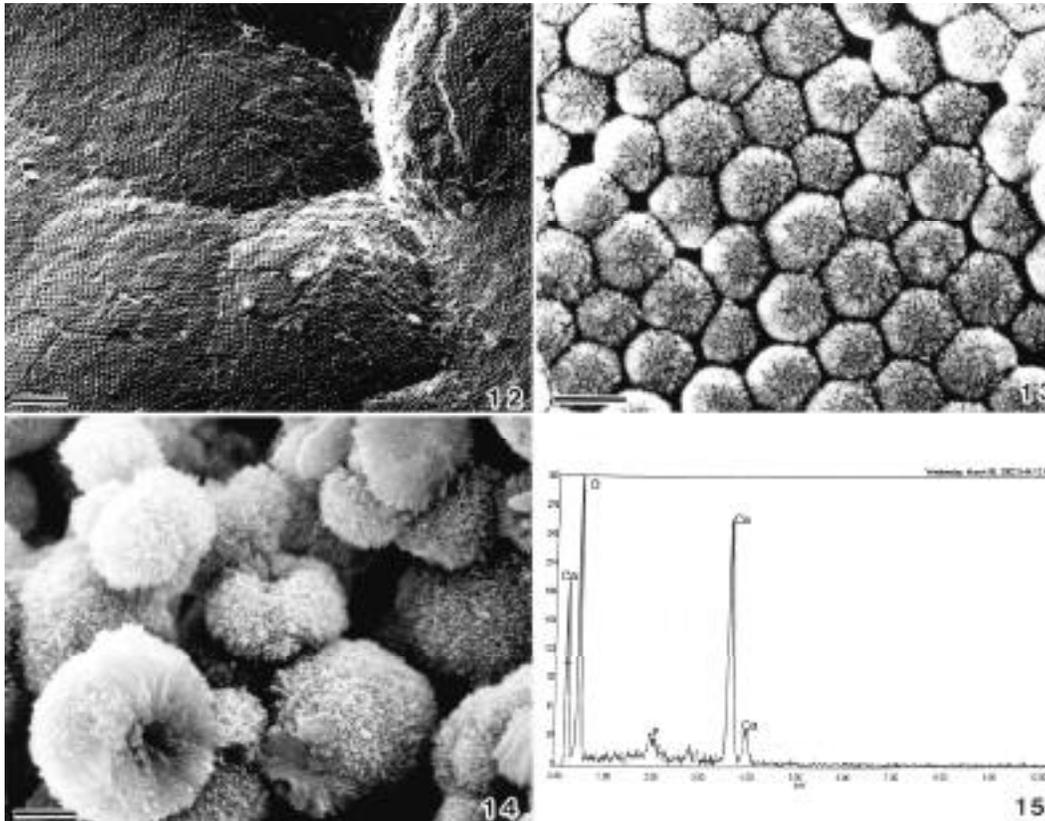


Fig. 12-13. Micrografías electrónicas de transmisión (HU 121 A), de réplicas de platino-carbón de la superficie de ileon murino. La figura 12 corresponde a una vista panorámica en la cual se aprecian los extremos apicales de los enterocitos cuya superficie aparece adornada por las microvellosidades (Barra = 1 mm). En la figura 13 se aprecian esas microvellosidades a mayor aumento (Barra = 100 nm).

Figura 14. Micrografía electrónica de rastreo (S 570) de un cálculo urinario: Se aprecian las estructuras esferoides de superficie irregular similares a las microcolonias de nanobacterias (Barra = 100 nm).

Figura 15. Patrón de dispersión de rayos X del cálculo de la figura 14; como se indica los elementos que predominan son calcio, fósforo y oxígeno, lo cual corresponde a la composición más frecuente encontrada en litiasis urinarias. Este análisis químico elemental es realizado mediante una sonda de rayos X acoplada a un microscopio electrónico, lo cual permite cuantificar los elementos presentes en el área de la muestra irradiada, lo que se concreta en fracciones de segundo.

Ahora, a inicios del siglo XXI las nuevas expectativas parecen apuntar hacia un nuevo agente infeccioso relacionado con la etiología de los cálculos renales (Çiftçioglu *et al.* 1998, Kajander *et al.* 2001). Esta vez se trata de una curiosa bacteria, cuyo tamaño la sitúa en el ámbito de dimensiones de los virus, lo que la hace “un agente filtrable”, término que previamente era exclusivo de los virus. Otra particularidad de este nuevo agente se centra en su

glicocalix que incorpora iones de calcio, por lo cual sus colonias constituyen concreciones calcáreas estructuralmente similares a los cálculos urinarios a partir de los cuales se aísla la mencionada bacteria. En la Fig. 14 se muestra una sección de un cálculo renal analizado al microscopio electrónico de rastreo y la gráfica de la Fig. 15 corresponde al patrón de dispersión de rayos X que demuestra que químicamente, esa estructura es una concreción

CUADRO 2

Cronología de los principales aportes de la microscopía electrónica en enfermedades infecciosas en el ámbito mundial

Década	Aporte
1950	Observación de los primeros virus al microscopio electrónico mediante sombreado con metales pesados.
1960	Diseño de la técnica de tinción negativa que permitió el diagnóstico rápido de viruela y la visualización del antígeno Australia. Se inició el estudio ultraestructural de los virus.
1970	Descubrimiento de los virus de las diarreas: Rotavirus, adenovirus entéricos, astrovirus, calicivirus, coronavirus y una serie de agentes con diámetros de unos 27 nm, entre los que originalmente se citó a los agentes de Norwalk, Hawai, Montgomery, hoy clasificados en la fam. Caliciviridae.
1980	El redescubrimiento de <i>Cryptosporidium</i> llevó a su estudio ultraestructural confirmando su localización intracelular, lo que inicialmente se había cuestionado. También se estudió la histopatología asociada a <i>Helicobacter pylori</i> .
1990	El descubrimiento de los microsporidios como agentes causales de diarrea en pacientes inmunosupresos llevó al empleo de la microscopía electrónica como herramienta para su diagnóstico y clasificación taxonómica.
2000	El hallazgo de Nanobacterias plantea estudios sobre posibles nuevos agentes infecciosos en procesos en los cuales no se sospechaba una etiología infecciosa, como pueden ser las litiasis renales.

calcárea. La confirmación de que esta bacteria sea la responsable directa de las litiasis renales, significaría que esta patología es de etiología infecciosa y por lo tanto, su patrón epidemiológico y prevención sufrirían un cambio importante. Nuevamente, la microscopía electrónica podría ser la herramienta pionera en tal investigación. Al mismo tiempo, las técnicas de análisis químico elemental empleando sondas de rayos X acopladas a los microscopios electrónicos brindan una posibilidad más para conocer otros aspectos ultraestructurales de la biología, como puede ser el depósito de metales pesados en tejidos. Una posible aplicación de esta tecnología en el trópico, es el estudio de superficies foliares buscando depósitos de elementos pesados como evidencia de contaminación ambiental, estudio ya iniciado en Costa Rica.

Durante estos primeros cincuenta años la Revista de Biología Tropical ha sido un foro internacional dedicado a la publicación de trabajos relacionados con la biología del trópico, que ha acogido artículos de autores de las más diversas regiones del planeta y entre sus páginas se han publicado más de 50 artículos con énfasis en aspectos ultraestructurales. Sí, co-

mo citábamos al inicio de esta revisión, la enorme diversidad tropical incluye un sinnúmero de especies aún no descritas científicamente, cabe entonces la pregunta de ¿en cuántos de esos organismos habrán detalles ultraestructurales con importancia significativa para su caracterización taxonómica?, o bien, ¿en cuántos de ellos, los análisis de su flora microbiana podrían llevar a respuestas sobre sus relaciones ecológicas?, que en algunos casos podrían explicar hasta la desaparición de algunas especies debido a problemas infecciosos secundarios a un entorno biológico cambiante, a veces por acción antropogénica.

RESUMEN

El primer microscopio electrónico que hubo en Costa Rica fue donado por el Gobierno de Japón, mediante su Agencia de Cooperación Internacional ("JICA" por sus siglas del Inglés) en 1974. Con ese equipo se consolidó la Unidad de Microscopía Electrónica (UME) de la Universidad de Costa Rica. Tres años más tarde se publicaron los primeros artículos científicos relacionados con aspectos ultraestructurales del Virus del rayado fino del maíz y rotavirus, el agente de la diarrea infantil. Subsecuentes

trabajos de la UME fueron publicados en la Revista de Biología Tropical, totalizando al menos 50 artículos solo en esta revista para el año 2000. La reciente adquisición de espectrómetros de dispersión energética para el análisis de rayos X, acoplados a los microscopios electrónicos de transmisión y de rastreo, aumentan la capacidad de análisis de la UME, haciendo posible el análisis ultraestructural y químico elemental de un espécimen. Entre las aplicaciones de esta metodología está la evaluación de la contaminación ambiental con metales pesados; como estudios comparativos de residuos sobre hojas de árboles en zonas urbanas y en bosques primarios.

REFERENCIAS

- Abrams, G.D. 1977. Microbial effects on mucosal structure and function. *Amer. J. Clin. Nutr.* 30: 1880-1886.
- Acuña M., R.A. 1987. Comparación de la ultraestructura de la cáscara del huevo de la tortuga *Rhinoclemmys pulcherrima* con la de los huevos de otros reptiles. *Rev. Biol. Trop.* 35: 41-48.
- Acuña M., R.A. 1989. Ultraestructura de la cáscara del huevo de la tortuga *Pseudemys scripta* (Testudines: Emydidae). *Rev. Biol. Trop.* 37: 193-200.
- Acuña-Mesén, R., S. Segura-Solís, L. Alvarado & W. Sachsse. 2001. Ultraestructura de la cáscara de huevos eclosionados y no eclosionados de *Kinosternon angustipons* (Testudinata: Kinosternidae). *Rev. Biol. Trop.* 49: 1121-1130.
- Alfaro, J. 1994. Ultraestructura de la glándula androgénica, espermatogénesis y oogénesis de camarones marinos (Decapoda: Penaeidae). *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 121-129.
- Araújo Neto, J.C. & I. Bergemann Aguiar. 1999. Desarrollo ontogénico de plántulas de *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae). *Rev. Biol. Trop.* 47: 785-790.
- Arrieche, D. 1999. Ultrastructure of the optic gland of the squid *Sepiotheutis sepioidea* (Cephalopoda: Loliginidae). *Rev. Biol. Trop.* 47: 831-842.
- Arroyo, G.O., & L. Cerdas. 1986. Microestructura de las escamas dorsales de nueve especies de serpientes (Viperidae) costarricenses. *Rev. Biol. Trop.* 34: 123-126.
- Bishop, R.F., G.P. Davidson, I.H. Holmes & B.J. Ruck. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2: 1281.
- Breedy, O. 1995. Isópodos (Crustacea: Peracarida) de un arrecife caribeño en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 43: 219.
- Brighigna, L., A. Papini, S. Mosti, A. Cornia, P. Bocchini & G. Galletti. 2002. The use of tropical bromeliads (*Tillandsia* spp.) for monitoring atmospheric pollution in the town of Florence, Italy. *Rev. Biol. Trop.* 50: 577-584.
- Camacho-García, Y. & J. Ortea. 2000. A new species of *Trapania* (Nudibranchia: Goniodorididae) from the Pacific coast of Central America. *Rev. Biol. Trop.* 48: 317-322.
- Capa, M., G. San Martín & E. López. 2001. Syllinae (Syllidae: Polychaeta) del Parque Nacional de Coiba, Panamá. *Rev. Biol. Trop.* 49: 103-115.
- Cárdenas-Reygadas, R. & H. Barrera-Escorcía. 1998. Histología y ultraestructura del testículo del charal *Chirostoma jordani* (Osteichthyes: Atherinidae). *Rev. Biol. Trop.* 46: 943.
- Castillo, R. & O. Guenni. 2001. Latencia en semillas de *Stylosanthes hamata* (Leguminosae) y su relación con la morfología de la cubierta seminal. *Rev. Biol. Trop.* 49: 287-299.
- Chinchilla, M., E. Portilla & O.M. Guerrero. 1986. Rat macrophage activity against *Toxoplasma gondii* studied by electron microscopy. *Rev. Biol. Trop.* 34: 83-88.
- Chinchilla, M., E. Portilla, O.M. Guerrero & R. Marín. 1987. Presencia de quistes en *Triticomonas muris*. *Rev. Biol. Trop.* 35: 21-24.
- Chow, N., G. Umaña & F. Hernández. 1994. Comparación del fitoplancton en dos bahías del Embalse de Arenal (Costa Rica) empleando el microscopio electrónico. *Rev. Biol. Trop.* 42: 333-338.
- Çiftçioglu N, M. Björklund, K. Kurikoski, K. Bergström, & O. Kajander. 1998. Nanobacteria: An infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int.* 56: 1893-1898.
- Córdoba-Cedeño H.D., R. Ehandi-Zürcher & G. Salas-Bonilla. 1994. Estudio de penetración de *Aspergillus parasiticus* al cariósido de *Zea mays*. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 51-58.
- Cortés Altamirano, R. & A. Nuñez Pasten. 2000. Distribución y abundancia anual de *Ceratiium dens* (Peridinales: Ceratiaceae) en el golfo de California, México. *Rev. Biol. Trop.* 48: 305-311.

- Cruickshank, J.G., H.S. Bedson & D.H. Watson. 1966. Electron microscopy in the rapid diagnosis of smallpox. *Lancet*. 2: 527-530.
- Eberhard, W.G. 2002. The function of female resistance behavior: Intromission by male coercion vs. female cooperation in sepsid flies (Diptera: Sepsidae). *Rev. Biol. Trop.* 50: 485-505.
- Fauci, A.S. 2001. Infectious diseases: Considerations for the 21st Century. *Clin. Infec. Dis.* 32: 675-685.
- Flewett, T.H., A.S. Bryden & H. Davies. 1973. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*. 2: 1497.
- Flores, E.M. & A.M. Espinoza. 1977. Ultraestructura foliar de *Vigna unguiculata* L. *Rev. Biol. Trop.* 25: 159-169.
- Flores, D., C. Ramírez & J.J. Galindo. 1994. Ultrastructure of cocoa fruits (*Theobroma cacao*) of cultivars with contrasting susceptibility to *Moniliophthora roreri*. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 29-37.
- Flores, D., J.J. Galindo & C. Ramírez. 1994. Preinfection process in cocoa fruits by *Moniliophthora roreri*. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 39-49.
- Freer, E. 1999. El proyecto Unidad de Microscopía Electrónica: Sinopsis de la cooperación entre el gobierno del Japón y la Universidad de Costa Rica. Monografía, Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica, 68 p.
- Gaglianone, M.C. 2000. Behavior on flowers, structures associated to pollen transport and nesting biology of *Perditomorpha brunerii* and *Cephalurgus anomalus* (Hymenoptera: Colletidae, Andrenidae). *Rev. Biol. Trop.* 48: 89-99.
- Gámez, R., T. Fukuoka & Y. Kozuka 1977. Purification of isometric particles from maize plants infected with rayado fino virus. *Rev. Biol. Trop.* 25: 151-158.
- Gómez P., L.D. & J. Gómez-Laurito. 1998. Historia natural y presencia de la "planta insectívora" *Drosera capillaris* (Droseraceae) en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 46: 1033-1037.
- Gómez P., L.D. & L. Kisimova-Horovitz. 1998. Basidiomicetes de Costa Rica. Nuevas especies de *Exobasidium* (Exobasidiaceae) y registros de Cryptobasidiales. *Rev. Biol. Trop.* 46: 1081-1093.
- González, P., A. Sánchez, P. Rivera, C. Jiménez & F. Hernández. 1997. Rotavirus and coronavirus outbreak: Etiology of annual diarrhea in Costa Rican children. *Rev. Biol. Trop.* 45: 989-991.
- Gubbler, D.J. 2001. Human arbovirus infections worldwide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951: 13-24.
- Gunther, N.J. & A.L. Howell-Aguilar. 1986. Ultraestructura de los nudos de Ranvier en fibras nerviosas mielinizadas del camarón *Penaeus*. *Rev. Biol. Trop.* 34: 115-122.
- Gutiérrez-Herrera, J.R., I.M. Carpio-Malavassi & L.M. Alpizar. 1994. Utilización de desechos agroindustriales fibrosos en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 65-71.
- Hernández-Becerril, D.U. 2000. Morfología y taxonomía de algunas especies de diatomeas del género *Coscinodiscus* de las costas del Pacífico mexicano. *Rev. Biol. Trop.* 48: 7-18.
- Hernández, F., L. Mata, C. Lizano & E. Mohs. 1977a. Prevalencia de rotavirus y descripción de una epidemia de diarrea por este agente en Costa Rica. *Acta Med. Cost.* 20: 297-304.
- Hernández, F., L. Mata, M.E. López & C. Lizano. 1977b. Rotavirus en niños con desnutrición severa. *Bol. Hosp. Infant. Mex.* 36: 993 -1000.
- Hernández, F. & L. Mata. 1978. La etiología viral de las diarreas y la microscopía electrónica. *Rev. Méd. Hosp. Nal. Niños.* 13: 33-44.
- Hernández, F. & Y. Kozuka. 1981. Cambios post mortem en mucosa intestinal y tejido pulmonar de *Mus musculus*, observados al microscopio electrónico de barrido. *Rev. Biol. Trop.* 29: 265-272.
- Hernández, F., E. Avalos, J. Malavassi, E. Sancho & A. Berrocal. 1984. Primera descripción de un brote de gastroenteritis hemorrágica aguda canina en Costa Rica. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 26: 27-38.
- Hernández, F. & H. Akahori. 1983. Análisis ultraestructural de membranas de glóbulos grasos lácteos de calostro y leche humana. *Rev. Biol. Trop.* 31: 245-250.
- Hernández, F., P. Rivera & M.L. Herrera. 1985. *Campylobacter fetus* spp *jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, bacterias helicoidales y coronavirus en intestino murino. *Rev. Biol. Trop.* 33: 143-146.
- Hernández, F. & H. Akahori. 1986a. Ultraestructura de rotavirus. *Rev. Biol. Trop.* 34: 89-98.
- Hernández, F. & A. Hiroshi. 1986b. Ultrastructure of outer layer of calf rotavirus. *J. Electron Microsc.* 37: 45 - 46.
- Hernández, F., H. Akahori & F. Brenes. 1986c. Soportes de vidrio recubiertos con Poli-L Lisina para analizar

- materiales biológicos en partículas tanto al microscopio electrónico de rastreo como al de transmisión. *Rev. Biol. Trop.* 33: 105-110.
- Hernández, F., P. Rivera, M.L. Herrera & R.M. Rodríguez. 1986d. Alteraciones morfológicas inducidas por ampicilina en *Campylobacter*. *Rev. Biol. Trop.* 34: 99-104.
- Hernández, F. 1987. Historia de la microscopía electrónica. I. Los primeros microscopios electrónicos. *Rev. Cost. Cienc. Med.* 8: 199-202.
- Hernández, F., R.M. Alvarez & M.T. Oviedo. 1987. Epi-zootiología de las diarreas bovinas en Costa Rica. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 29: 113-117.
- Hernández, F., H. Akahori, Y. Hosaka, N. Ikegami & K. Akatani. 1990. The finest ultrastructural details of the inner layer of rotavirus revealed by minimal electron doses. *J. Electron Microsc.* 39: 105-107.
- Hernández, F. & E. Coto. 1991. Aplicación del método de coagulación de plasma al estudio ultraestructural de especímenes biológicos. *Rev. Biol. Trop.* 39: 177-180.
- Hernández, F. & E. Rodríguez. 1991. The swarming phenomenon of *Clostridium tetani*. *Rev. Biol. Trop.* 43: 857.
- Hernández, F., A.P. Argüello, P. Rivera & E. Jiménez. 1993. *Balantidium coli* (Vestibuliferida: Balantididae): The persistence of an old problem. *Rev. Biol. Trop.* 41: 149.
- Hernández, F. 1994. A low cost adaptation of the t-butyl alcohol freeze-drying method. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 171-173.
- Hernández, F., H. Akahori, Y. Hosaka, K. Akaike & N. Ikegami. 1994. A rotary shadow freeze-drying replica method for the three dimensional view of virus ultrastructure. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 175-178.
- Hernández, F. & J. Monge-Nágera. 1994. Ultrastructure of the bacteria *Campylobacter* and *Helicobacter*: Implications for the phylogeny of mammal gastric bacteria. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 85-92.
- Hernández, F., P. Rivera & Y. Hosaka. 1994. Immuno-gold replica technique for ultrastructural localization of antigens. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 179-182.
- Hernández, F., E. Rodríguez, M.M. Gamboa, E. Coto & M.A. Acuña. Ultrastructural view of the bacterium *Mobiluncus mulieris*: An approach to understand some problems for its isolation. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 101-104.
- Hernández-Chavarría, F., L. Alzamora-González, & L. Herrero-Urbe. 2002. Noncytopathic hepatitis A virus induces surface alterations in LLC-MK2 cells revealed by thin sections, negative staining, and scanning electron microscopy. *Rev. Biol. Trop.* 50: 519-523.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley & S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins.
- Hosaka, Y., H. Akahori, F. Hernández, K. Akaike & N. Ikegami. 1991. Pentamer arrangement in fragments of human rotavirus inner capsids observed by low dose electron microscopy. *J. Electron Microsc.* 40: 407-410.
- Imhof, S. 2001. Subterranean structures and mycotrophy of the achlorophyllous *Dictyostega orobanchoides* (Burmanniaceae). *Rev. Biol. Trop.* 49: 239-247.
- Juárez-Mosqueda, L., L. Moreira-Carmona & O. Arroyo-Gutiérrez. 1994. Ultraestructura de la superficie articular del complejo temporomandibular en algunos roedores. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 159-167.
- Kajander, O., N. Çiftçioglu, M. Miller-Hjelle & T. Hjelle. 2001. Nanobacteria: controversial pathogens in nephrolithiasis and polycystic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10: 445-452.
- Lee, A., M.W. Philips, J.L. O'Rourke, B.J. Paster, F.E. Dewhirst, G.J. Fraser, J.G. Fox, L.I. Sly, P.J. Romaniuk, T.J. Trust & S. Kouprach. 1992. *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 27-36.
- León, P. & R. Gómez. 1986. Biología molecular del virus del rayado fino del maíz. *Rev. Biol. Trop.* 34: 111-114.
- López-Chaves, R. 1994. Differentiation with SEM of six species of *Meloidogyne* (Nemata: Heteroderidae) found in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 42: 113-120.
- Macaya-Lizano, A.V., R. Pereira & A.M. Espinoza. 1998. Comparison of two tissue preparation methods to study the internal anatomy of the Delfacid *Tagosodes orizicolus* with light and electron microscopy (SPA). *Rev. Biol. Trop.* 45: 927.
- Malavasi, J., F. Ureña & Y. Kozuka. 1981. Estudio ultraestructural del epitelio digestivo de *Taeniopoda* y *Schistocerca* (Saltatoria). *Rev. Biol. Trop.* 29: 209-226.

- Mata, L., E. Mohs & F. Hernández. 1977a. Los virus de las diarreas. In *Enfermedades diarreicas en el niño*. 4a. ed. pp. 105-112.
- Mata, L., C. Lizano, F. Hernández, E. Mohs, L. Herrero, M. E. Peñaranda, F. Gamboa & J. León. 1977b. Agentes infecciosos en la diarrea del niño hospitalizado en Costa Rica. *Bol. Hosp. Infant. Mex.* 36: 955-969.
- Mata, L., A. Sihmon, R. Padilla, M.M. Gamboa, G. Vargas, F. Hernández, E. Mohs & C. Lizano. 1983. Diarrheal associated with rotaviruses, enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and other agents in Costa Rican Children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 146-153.
- Manzo, L. & F. Hernández. 1994. A new conductivity staining method for tissue analysis under scanning electron microscopy. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 183-186.
- Miranda, M., M. Chaves, L. Orozco, M.A. San Román, S. Durán, G. Vargas, E. Jiménez, L. Peña, L. Rodríguez & E. Barrantes. 1998. La relación de *Helicobacter pylori* con la displasia y el cáncer gástrico en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 46: 829-832.
- Monge-Nágera, J. & F. Hernández. 1994. Spatial organization of the structural color system in the quetzal, *Pharomachrus mocino* (Aves: Trogonidae) and evolutionary implications. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 131-139.
- Monge-Nájera, J., F. Hernández, M.I. González, J. Soley, J. Araya & S. Zolla. 1998. Spatial distribution, territoriality and sound production by tropical cryptic butterflies (*Hamadryas*, Lepidoptera: Nymphalidae): implications for the "industrial melanism" debate. *Rev. Biol. Trop.* 46: 297-330.
- Montiel L., M.B. 1979. Observaciones ultraestructurales en epidermis de hidrotéridos. *Rev. Biol. Trop.* 27: 177-188.
- Morales-Ramírez, A., R. Viquez, K. Rodríguez & M. Montero. 2001. Marea roja producida por *Lingulodinium polyedrum* (Peridiniales, Dinophyceae) en Bahía Culebra, Golfo de Papagayo, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 49(Supl. 2): 19-23.
- Moreira, G.I. & E. Arnáez. 1994. Morfología de las estructuras reproductoras y germinación de nueve especies forestales nativas de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 73-82.
- Moreira-Carmona, L., A.V. Guevara-Arroyo & O. Arroyo-Gutiérrez. 1994. Análisis al microscopio electrónico de la mucosa nasal de pacientes exadictos a la cocaína. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 151-158.
- Morera, P. & R. Céspedes. 1970. *Angiostrongylus costaricensis* n sp. (Nematoda: Metastrongyloidea) a new lung worm occurring in man in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 18: 173-185.
- Pashov-Nicheva, B. & Y. Matamoros Hidalgo. 1994. Ultraestructura del testículo y epididimo del tepezcuinte, *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae). *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 141-147.
- Pérez, A.M. & A. López S.J. 2002. Morfología y distribución de *Thysanophora crinita* (Stylommatophora: Thysanophoridae) en Nicaragua. *Rev. Biol. Trop.* 50: 107-116.
- Pfannes, K.R. & A.C. Baier. 2002. "Devil's Gardens" in the Ecuadorian Amazon - Association of the allelopathic tree *Duroia hirsuta* (Rubiaceae) and its "gentle" ants. *Rev. Biol. Trop.* 50: 293-301.
- Piepenbring, M. 2001. Smut fungi (Ustilaginomycetes and Microbotryales, Basidiomycota) in Panama. *Rev. Biol. Trop.* 49: 411-428.
- Ramírez, C. & D. Flores. 1994. Structure of dinitrogen fixing nodules in *Erythrina poeppigiana*. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 15-28.
- Reeves, W.C. 2001. Partners: Serendipity in arbovirus research. *J. Vector Ecol.* 26: 1-6.
- Rivera, P.R. Monge & F. Hernández. 1994. Susceptibility of the bacterium *Vibrio cholerae* to acid pH in salad vegetables: An ultrastructural view. *Rev. Biol. Trop.* 42: 97-100.
- Rivera, C. & R. Pereira. 1994. Identificación del virus del mosaico del maíz, un rhabdovirus, en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 105-109.
- Rodríguez F.A. 1999. Ultraestructura citohematológica de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes: Salmonidae). *Rev. Biol. Trop.* 47: 1093-1097.
- Sáenz, J.A., J. Carranza & V. Sáenz-Gómez. 1983. Estudio comparativo al microscopio de luz y al microscopio electrónico de barrido de *Laternea triscapa*, *Laternea pusilla* and *Ligiella rodrigueziana*. *Rev. Biol. Trop.* 31: 327-332.
- Salas, I. & F. Hernández. 1997. Fine structure of the capsule of *Cryptococcus neoformans* (Cryptococcales: Cryptococcaceae). *Rev. Biol. Trop.* 44: 694-995.

- Sánchez-Chacón, E., I.M. Carpio-Malavasi & O. Arrollo-Gutiérrez. 1994. Ultraestructura de la madera de seis especies arbóreas de importancia comercial en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 59-64.
- Sánchez, C., F. Hernández, P. Rivera & O. Calderón. 1994. Flora indígena de cucarachas (Dictyoptera: Blattellidae y Blattellidae): Un análisis bacteriológico ultraestructural. *Rev. Biol. Trop.* 42(Supl. 2): 93-96.
- Sancho, U.H. & F. Ureña C. 1987. Ultraestructura de las células adenohipofisarias de la rata blanca sometida al efecto de una benzodiazepina en forma crónica. *Rev. Biol. Trop.* 35: 15-20.
- Segovia-Salinas, F., F. Jiménez-Guzmán, G. Carranza-Imperial, L. Galvaiz-Silva & R. Ramírez-Bon. 1993. Ultraestructura del tegumento de la metacercaria, juvenil y adulto de *Clinostomun complanatum* (Trematoda: Clinostomidae). *Rev. Biol. Trop.* 41: 219-225.
- Sierra A., D., I.D. Vélez D. & S. Uribe S. 2000. Identificación de *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) grupo *verrucarum* por medio de microscopía electrónica de sus huevos. *Rev. Biol. Trop.* 48: 615-622.
- Ureña, F., H. Akahori & A. Azofeifa. 1987. Ultraestructura del espermatozoide de rata (*Ratus norvegicus*). Aplicación de tres técnicas para Microscopía Electrónica de Transmisión. *Rev. Biol. Trop.* 35: 215-220.
- Ureña, F. 1988 Ultraestructura del núcleo mitótico en *Leishmania mexicana* spp. Reconstrucción tridimensional del huso mitótico y placas densas. *Rev. Biol. Trop.* 36: 129-138.
- Ureña, F. & J. Malavasi. 1978. Evolución de la ultraestructura del aparato de Golgi durante la meiosis y la espermiogénesis en el hamster (*Mesocricetus auratus*). *Rev. Biol. Trop.* 26: 371-384.
- Ureña, F. & J. Malavasi. 1980. Estudio ultraestructural en testículo de hamster vasectomizado (*Mesocricetus auratus*) *Rev. Biol. Trop.* 28: 41-60.
- Ureña, F. & J. Malavasi. 1981. Estudio ultraestructural en epidídimo de hamster vasectomizado (*Mesocricetus auratus*). *Rev. Biol. Trop.* 29: 237-250.
- Watling, L. & O. Breedy. 1988. A new cumacean (Crustacea) genus from beaches of Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 36: 527-534.

REFERENCIAS DE INTERNET

- Rodríguez Ramírez J. y J. Hernández Benavides. 1998. Lista Oficial de las Especies de Flora y Fauna Silvestre con Poblaciones Reducidas y en Peligro de Extinción. Ministerio del Ambiente y Energía. Sistema Nacional de Areas de Conservación. (Consultada: 18 junio, 2002. www.minae.go.cr, www.minae.go.cr/estrategia/Estudio_Pais/estudio/diversidad/diver-especies.html).