

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
PARAGONIMUS CALIENSIS LITTLE, 1968 Y
PARAGONIMUS MEXICANUS MIYAZAKI & ISHII, 1968
(DIGENEA: PARAGONIMIDAE) EN COLOMBIA**

TESIS DOCTORAL

CAROLINA ANDREA LENIS VÉLEZ



DIRIGIDA POR:

ANTONIO MARCILLA DÍAZ

CARLOS MUSKUS LÓPEZ

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA I PARASITOLOGIA
FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

VALÈNCIA, 2018



**DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA
FARMACÈUTICA I PARASITOLOGIA**

FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Parasitología Humana y Animal

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
PARAGONIMUS CALIENSIS LITTLE 1968
Y *PARAGONIMUS MEXICANUS* MIYAZAKI & ISHII 1968
(DIGENEA: PARAGONIMIDAE) EN COLOMBIA**

por

CAROLINA ANDREA LENIS VÉLEZ

Directores

Dr. ANTONIO MARCILLA DÍAZ

Catedrático de Parasitología

**Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i
Parasitologia**

Facultat de Farmàcia, Universitat de València

Dr. CARLOS MUSKUS LÓPEZ

Profesor Titular

Unidad de Biología Molecular y Computacional

**Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia**

València, 2018

**DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA
FARMACÈUTICA I PARASITOLOGIA**

Los abajo firmantes Dr. ANTONIO MARCILLA DÍAZ Catedrático de Parasitología del Área de Parasitología del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia, Universitat de València y el Dr. CARLOS MUSKUS LÓLEZ, Profesor Titular y Coordinador de la Unidad de Biología Molecular y Computacional del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, por la presente:

CERTIFICAN: que Doña CAROLINA ANDREA LENIS VÉLEZ, ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral titulada “CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *PARAGONIMUS CALIENSIS* LITTLE 1968 Y *PARAGONIMUS MEXICANUS* MIYAZAKI & ISHII 1968 (DIGENEA: PARAGONIMIDAE) EN COLOMBIA” en el Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València con el fin de optar al grado de Doctor en Parasitología Humana y Animal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia a 6 de Julio dos mil dieciocho.

Fdo: Dr. A. Marcilla Díaz

Fdo: Dr. C. Muskus López

A Imelda,
mi hermosa maestra.
Por enseñarme un arte perdido,
el de narrar historias de vida y de gusanos con los trazos.

AGRADECIMIENTOS

Toda mi gratitud a mis directores, el Dr. Antonio Marcilla y el Dr. Carlos Muskus por su conocimiento, dedicación y apoyo incondicional. A mi maestra, Imelda Vélez quien me mostró el maravilloso mundo de los trematodos. Al Dr. Iván Darío Vélez, director del PECET, por creer en este proyecto, por animarme a continuar en el camino de la investigación, en especial con *Paragonimus*.

A Alicia Galiano, Any Carolina Garcés, Lina Salazar y Claudia Guzmán, por su apoyo en el trabajo de laboratorio y campo, y en especial por su amistad. A Didier Tirado MsC, por su apoyo en laboratorio. A Juan Manuel Obando (TAyRA), María del Socorro Erazo (Pichindé), quienes compartieron tiempo y conocimientos en campo. A Davis Travis, Abelardo (La Casita del Bosque), Francisco Javier Oliveros (Fundación zarigüeya), por su ejemplo.

A mi madre Ana Ligia, mi padre Cristian, a mi hermano Juan, mis amores. A Antoni Marín, Cerati y Pink Floyd, por alegrar mi vida. A Andrés Arias “tiki-tiki” y a Claudia Molina por su hermoso ser, por el respeto a la vida y a la biología.

Al maestro Luis García-Prieto, curador de la Colección Nacional de Helmintos de la UNAM por proporcionar material bibliográfico. A Rafael Vivero MSc, PhD., Unidad Entomología Médica, PECET y Freddy Ruiz-López, MSc, PhD. Coordinador Grupo de Entomología, PECET por sus valiosos aportes.

A la Universitat de Valencia, Beca Jóvenes Investigadores 2014. Al Servicio de Microscopía, Servicios Centrales de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE), de la Universitat de València.

“No sólo no hubiéramos sido nada sin ustedes, sino con toda la gente que estuvo a nuestro alrededor desde el comienzo; algunos siguen hasta hoy ¡Gracias totales!”

RESUMEN

La paragonimiasis es una enfermedad pulmonar granulomatosa inflamatoria crónica causada por trematodos del género *Paragonimus*. En América Latina, *P. mexicanus* Miyazaki & Ishii 1968 es la única especie confirmada que causa infecciones humanas. *Paragonimus caliensis* Little 1968, es una especie poco común a menudo considerada *sinónima junior* de *P. mexicanus*. Recientemente, el estudio molecular y morfológico de dos tipos de metacercarias de *Paragonimus* en Costa Rica proporcionó la evidencia de que *P. caliensis* es una especie separada de *P. mexicanus*.

En el presente estudio se utilizaron herramientas moleculares, filogenéticas y morfológicas para caracterizar cuatro poblaciones de *Paragonimus* en Colombia, ubicadas en Medellín y Valle de Pérdidas en el departamento de Antioquia, Pichinde en el departamento del Valle del Cauca (localidad tipo de *P. caliensis*) y Leticia en el departamento del Amazonas. Los análisis moleculares y filogenéticos realizados utilizando el marcador nuclear ribosomal ITS2 confirman la validez de *P. caliensis*. Así mismo, *P. caliensis* de la localidad tipo corresponde con las poblaciones de Medellín y Costa Rica. Los ejemplares de Leticia y Valle de Pérdidas corresponden a *P. mexicanus*. Los caracteres morfológicos que permiten diferenciar a *P. caliensis* de *P. mexicanus* son: el tamaño de las gónadas y sus posiciones relativas en el cuerpo, y la presencia de pared del quiste en las metacercarias de *P. caliensis*. Además, la revisión taxonómica de cada especie sugiere diferencias a nivel de subespecie: al menos tres morfotipos y cuatro haplotipos del ITS2 en *P. caliensis*, y once morfotipos y seis haplotipos del ITS2 en *P. mexicanus* están presentes en América Latina.

Paragonimus mexicanus y *P. caliensis* son simpátricas en la biorregión del Pacífico colombiano, donde fueron reportados cinco focos de paragonimiasis humana. En el presente estudio se presenta evidencia de *P. caliensis* en el foco humano de Valle de Pérdidas. La semejanza en el tamaño de los huevos de *P. mexicanus* y *P. caliensis* no permite realizar un diagnóstico específico, por lo tanto, es necesario determinar la presencia de ambas especies en comunidades humanas e implementar un diagnóstico molecular para establecer el papel de *P. caliensis* en la paragonimiasis humana.

RESUM

La paragonimiasi és una malaltia pulmonar granulomatosa inflamatòria crònica causada per trematodes del gènere *Paragonimus*. A Amèrica Llatina, *P. mexicanus* Miyazaki & Ishii 1968 és l'única espècie confirmada que causa infeccions humanes. *Paragonimus caliensis* Little 1968, és una espècie poc comuna sovint considerada sinònima junior de *P. mexicanus*. Recentment, l'estudi molecular i morfològic de dos tipus de metacercàries de *Paragonimus* a Costa Rica va proporcionar la evidència que *P. caliensis* és una espècie separada de *P. mexicanus*.

En el present estudi s'han utilitzat eines moleculars, filogenètiques i morfològiques per tal de caracteritzar quatre poblacions de *Paragonimus* a Colòmbia, ubicades a Medellín i Valle de Pérdidas al departament de Antioquia, Pichinde al departament del Valle del Cauca (localitat tipus de *P. caliensis*) i Leticia al departament de l'Amazones. Les anàlisis moleculars i filogenètiques realitzades emprant el marcador nuclear ribosomal ITS2 confirmen la validesa de *P. caliensis*. Així mateix, *P. caliensis* de la localitat tipus correspon amb les poblacions de Medellín y Costa Rica. Els exemplars de Leticia i Valle de Pérdidas corresponen a *P. mexicanus*. Els trets morfològics que permeten diferenciar a *P. caliensis* de *P. mexicanus* són: la grandària de les gònades i les seves posicions relatives en el cos i la presència de paret del quist en les metacercàries de *P. caliensis*. A més, la revisió taxonòmica de cada espècie suggereix diferències a nivell de subespècie: almenys tres morfotipus i quatre haplotipus del ITS2 en *P. caliensis* i onze morfotipus i sis haplotipus del ITS2 en *P. mexicanus* estan presents a Amèrica Llatina.

Paragonimus mexicanus i *P. caliensis* són simpàtriques dins la biorregió del Pacífic colombià, on van ser reportats cinc focus de paragonimiasi humana. En el present estudi es presenta evidència de *P. caliensis* en el focus humà de Valle de Pérdidas. La semblança en la grandària dels ous de *P. mexicanus* i *P. caliensis* no permet realitzar un diagnòstic específic, per tant, és necessari determinar la presència d'ambdues espècies en comunitats humanes i implementar un diagnòstic molecular per establir el paper de *P. caliensis* en la paragonimiasi humana.

ABSTRACT

Paragonimiasis is a subacute to chronic inflammatory granulomatous lung disease caused by the genus *Paragonimus*. In Latin America *P. mexicanus* Miyazaki & Ishii 1968 is the only confirmed species to cause human infections. *Paragonimus caliensis* Little 1968 is an uncommon species often regarded as a synonym of *P. mexicanus*. Recently, the study of two types of *Paragonimus* metacercariae from Costa Rica has provided new molecular and morphological evidence that *P. caliensis* is a separate species from *P. mexicanus*.

In the present study molecular, phylogenetic and morphological tools have been used to characterize four populations of *Paragonimus* in Colombia, located at Medellin and Valle de Pérdidas, departament of Antioquia, Pichinde, departament of Valle del Cauca (type locality of *P. caliensis*) and Leticia, departament of Amazonas. Molecular and phylogenetic analyses using nuclear ribosomal ITS2 confirmed that *P. caliensis* from the type locality is the same species from Medellin and Costa Rica, and the specimens from Leticia and Valle de Pérdidas corresponds to *P. mexicanus*. The main morphological differences between *P. caliensis* and *P. mexicanus* corresponded to the size of gonads and their relative positions in the body, and the presence of cyst wall in *P. caliensis* metacercariae. The taxonomy review suggest at least three morphotypes and four haplotypes in *P. caliensis*, and eleven morphotypes and six haplotypes in *P. mexicanus*. These also suggest genetic as well as geographical separation of both species in Latin America.

Paragonimus mexicanus and *P. caliensis* are sympatric in the Colombian pacific bioregion, where five foci of human paragonimiasis were reported. In this study we present evidence of the presence of *P. caliensis* in the Valle de Pérdidas human focus. The similarity in the eggs size of *P. mexicanus* and *P. caliensis* does not allow a specific diagnosis, and therefore it is necessary to determine the biogeographic distribution ranges of both species and to implement molecular techniques to establish the role of *P. caliensis* in human paragonimiasis in Colombia.

Listado de abreviaturas

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal
- ADNmt: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
- CCH: Colección Colombiana de Helmintos
- CDC: Centro para el control y prevención de enfermedades EE. UU.
- CO1: Gen mitocondrial de citocromo oxidasa subunidad I
- ITS2: Segundo espaciador interno transcrito del ADN ribosomal
- IUCN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
- K2P: Kimura dos parámetros
- 28S: Subunidad 28S del ADN ribosomal
- MEB: Microscopía electrónica de barrido
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PECET: Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales,
Universidad de Antioquia, Colombia
- SCSIE: Servicios Centrales de Soporte a la Investigación
Experimental, Universitat de Valencia, España
- TB: Tuberculosis
- UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- USNM Helm. Coll: Colección de Helmintos del Museo de Historia
Natural del Instituto Smithsonian, EE. UU

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ASPECTOS TAXONÓMICOS DEL GÉNERO <i>PARAGONIMUS</i>	3
1.2. ESTUDIOS TAXONÓMICOS DE <i>PARAGONIMUS</i> EN LATINOAMÉRICA	8
1.2.1. Especies descritas por microscopía óptica.....	9
1.2.2. Estudios moleculares	14
1.3. CICLO DE VIDA DE <i>PARAGONIMUS</i>	16
1.4. PARAGONIMIASIS.....	18
1.4.1. Epidemiología de la enfermedad	18
1.4.2. Clínica de la enfermedad	18
1.4.3. Diagnóstico y tratamiento	22
1.5. <i>PARAGONIMUS</i> Y PARAGONIMIASIS EN COLOMBIA	26
1.5.1. Paragonimiasis en Colombia	27
1.5.2. <i>Paragonimus</i> en Colombia	32
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. JUSTIFICACIÓN.....	39
2.2. OBJETIVO GENERAL	40
2.2.1. Objetivos específicos.....	40
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS	43
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO	44
3.3. MÉTODOS	47
3.3.1. Hospedadores intermediarios	47
3.3.2. Hospedadores definitivos	51
3.3.3. Caracterización morfológica	57
3.3.4. Caracterización molecular	61
4. RESULTADOS	65
4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	67
4.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	75
4.3. <i>PARAGONIMUS CALIENSIS</i>	78
4.3.1. Caracterización morfológica de metacercarias	78
4.3.2. Caracterización morfológica de adultos	83
4.3.3. Caracterización molecular	86
4.3.4. Distribución geográfica	89
4.4. <i>PARAGONIMUS MEXICANUS</i>	91
4.4.1. Caracterización morfológica de adultos	91
4.4.2. Caracterización molecular	96
4.4.3. Distribución geográfica	101

5. DISCUSIÓN	105
5.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	107
5.1.1. Metacercarias	107
5.1.2. Adultos	110
5.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	114
5.3. REVISIÓN TAXONÓMICA	116
5.3.1. <i>Paragonimus caliensis</i>	116
5.3.2. <i>Paragonimus mexicanus</i>	117
5.4. PREVALENCIAS DE INFECCIÓN	122
5.5. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	122
5.6. DIAGNÓSTICO	124
6. CONCLUSIONES.....	127
7. BIBLIOGRAFÍA.....	131

1. Introducción

1.1. Aspectos taxonómicos del género Paragonimus

Paragonimus Braun, 1899 constituye un grupo de parásitos (Trematoda: Digenea) rico en especies, que se distribuye en los trópicos de Asia, África y América, y se extienden hasta las regiones templadas de América del Norte y Asia oriental (Blair *et al.*, 2016). Al menos 50 especies de *Paragonimus* han sido descritas desde 1878, con *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) Braun, 1899 como la especie tipo¹ y *P. kerberti* Bayssade-Dufour, Chermette, Šundić & Radujković, 2015, como la última en ser publicada.

En la última década, la taxonomía² del género *Paragonimus* ha sido reevaluada en base a la unificación de criterios morfológicos y moleculares. Los estudios morfológicos caracterizan poblaciones a nivel de especie (especies³ y morfotipos⁴), mientras que los estudios moleculares caracterizan las poblaciones a nivel de especies, subespecies⁵ y recientemente en complejos de especies⁶ (Blair *et al.*, 2016, 2005; Hernández-Chea *et al.*, 2017; López-Caballero *et al.*, 2013; Thanh *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, las especies de *Paragonimus* se identifican mediante el estudio morfológico de parásitos adultos y metacercarias. Estos se

¹ Especie tipo: especie nominal que es el tipo porta nombre de un género o subgénero nominal (ICZN, 1999).

² Taxonomía: teoría y práctica de clasificar organismos (ICZN, 1999).

³ Especie: (1) Categoría inmediatamente inferior al nivel género; la categoría básica de la clasificación zoológica. (2) Taxón de la categoría de especie (ICZN, 1999).

⁴ Morfotipo: indica la presencia de variaciones intraespecífica, es decir, entre organismos de la misma especie (Aguilera y Silva, 1997).

⁵ Subespecie: (1) Categoría de nivel especie por debajo de especie. (2) Taxón de la categoría de subespecie (ICZN, 1999).

⁶ Complejo de especies: en *Paragonimus* se refiere a un “clado” que puede incluir representantes de especies crípticas, polimórficas y/o taxones sometidos a especiación (Blair *et al.*, 2016).

evalúan por microscopía óptica y en algunos casos mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Por medio de microscopía óptica se describe la anatomía interna (sistema digestivo, sistema reproductor y sistema excretor) y externa del parásito (ventosas y tipo de metacercaria: presencia/ausencia de pared quística, tamaño del cuerpo, tamaño del quiste), mientras que por MEB se describen estructuras en la superficie del parásito, como forma de las espinas, tipos de papilas tegumentarias y patrones de papilas acetabulares (Hernández-Chea *et al.*, 2017; Komalamisra *et al.*, 2005; López-Caballero *et al.*, 2013).

Actualmente, los caracteres morfológicos de importancia taxonómica son: sistema reproductor en ejemplares adultos y tipo de metacercaria (Doanh *et al.*, 2013). Sin embargo, la identificación a nivel de especie se dificulta por la gran variación morfológica de las gónadas (ovario y testículos) (Tongu, 2001). Por lo tanto, algunas especies de *Paragonimus* son discernibles solo mediante la combinación de análisis morfológicos y moleculares, para los que se han documentado escenarios como: (a) *especies diferentes* morfológicamente muy semejantes, y (b) *ejemplares de una misma especie* morfológicamente muy variables. Como ejemplo del escenario a): *P. vietnamensis* es morfológicamente similar a *P. harinasutai*, *P. microrchis* y *P. skrjabini*, en las etapas metacercarias y adultas, sin embargo, los análisis filogenéticos demostraron que *P. vietnamensis* es genéticamente distinta de cualquier otra especie de *Paragonimus* conocida (Doanh *et al.*, 2013). Como ejemplo del escenario b): *P. bangkokensis* y *P. harinasutai* son muy diferentes a nivel morfológico en las etapas de metacercaria y adulto, pero difícilmente pueden distinguirse en filogenias moleculares (Blair *et al.*, 2016; Doanh *et al.*, 2012).

En el contexto anterior, los estudios de taxonomía molecular de *Paragonimus* se han enfocado en el análisis de los genes nucleares (Subunidad 28S del ADNr; Segundo espaciador interno transcrito ribosomal - ITS2 del ADNr) y mitocondriales (gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa mitocondrial - CO1 del ADNmt), especialmente en los genes CO1 e ITS2.

En *Paragonimus* el marcador molecular ITS2 del ADNr ha demostrado ser útil para evaluar la variación interespecífica, en otras palabras, para clasificación a nivel de especie. Por su parte, el ADNmt evoluciona mucho más rápido que el ADNr nuclear, de esta forma en *Paragonimus* el marcador molecular CO1 del ADNmt permite evaluar relaciones entre poblaciones de una misma especie y subespecies (Doanh *et al.*, 2013).

El ADN ribosomal contiene la información para el ARN que conforma los ribosomas, por lo que es información que se transcribe, pero no se traduce. El ADNr se presenta en repeticiones en tándem, y está formado por tres subunidades altamente conservadas (18S rADN, 5.8S rADN y 28S del ADNr), separadas por dos espaciadores con elevadas tasas de sustitución (ITS1 e ITS2). Estas repeticiones en tándem se encuentran conservadas a lo largo de todo un genoma y evolucionan concertadamente, lo que se atribuye a eventos recombinatorios como entrecruzamiento desigual y conversión génica. Estas secuencias, por la baja tasa de sustitución que presentan, son útiles en el planteamiento de hipótesis de relaciones filogenéticas de taxa con tiempos de divergencia muy antiguos (Hillis y Dixon, 1991; Rentarúa, 2000). Por su parte el genoma mitocondrial, permite trazar historias filogeográficas y de estructura poblacional genética estrechamente relacionada al linaje, porque son de herencia uniparental y no

recombinan; también nos permiten inferir cambios demográficos y de dispersión entre especies (Di Rienzo y Wilson, 1990; Rentarúa, 2000).

Como resultado de la combinación de análisis morfológicos y moleculares, en especial del marcador molecular ITS2, las 50 especies de *Paragonimus* descritas por taxonomía clásica, actualmente se clasifican en 10 especies y/o complejos de especies, presentando amplios rangos de distribución geográfica, pero delimitados a sus continentes de origen (Figura 1). Los principales esfuerzos en sistemática molecular⁷ del género se han realizado en Asia, donde *P. vietnamensis* y *P. macrorchis* son reconocidas como especies independientes, mientras que *P. heterotremus*, *P. ohirai*, *P. skrjabini* y *P. westermanni* son reconocidas como complejos de especies (Blair *et al.*, 2016; Sanpool *et al.*, 2015). En África solo *P. africanus* ha sido caracterizado tanto a nivel morfológico (Voelker y Vogel, 1965), como molecular (Friant *et al.*, 2015; Nkouawa *et al.*, 2009), mientras que *P. uterobilateralis* (Voelker y Sachs, 1985; Voelker y Vogel, 1965), *P. kerberti* y *P. gondwanensis* solo cuentan con descripciones morfológicas (Bayssade-Dufour *et al.*, 2015, 2014).

En América se reconocen a *P. kellicotti* y *P. mexicanus* como especies independientes, y aunque se cuenta con numerosos estudios morfológicos de *P. kellicotti* (Blair *et al.*, 1999), las caracterizaciones de tipo molecular son relativamente pocas (Fischer *et al.*, 2011). Por su parte, *P. mexicanus* cuenta con descripciones detalladas de larvas y adultos, estudios de microscopía electrónica de barrido y de taxonomía molecular. *Paragonimus napensis*, *P. amazonicus* y *P. inca* descritas en

⁷ La Sistemática molecular (filogenética molecular) es la que utiliza fundamentalmente la información de las secuencias de los ácidos nucleicos ADN o ARN para inferir relaciones de parentesco entre los organismos.

Suramérica, son las especies menos estudiadas y solo presentan sus descripciones originales (Tongu, 2001). Recientemente, *P. caliensis* fue propuesta como válida en base a estudios morfológicos y moleculares de metacercarias de Costa Rica (Hernández-Chea *et al.*, 2017).

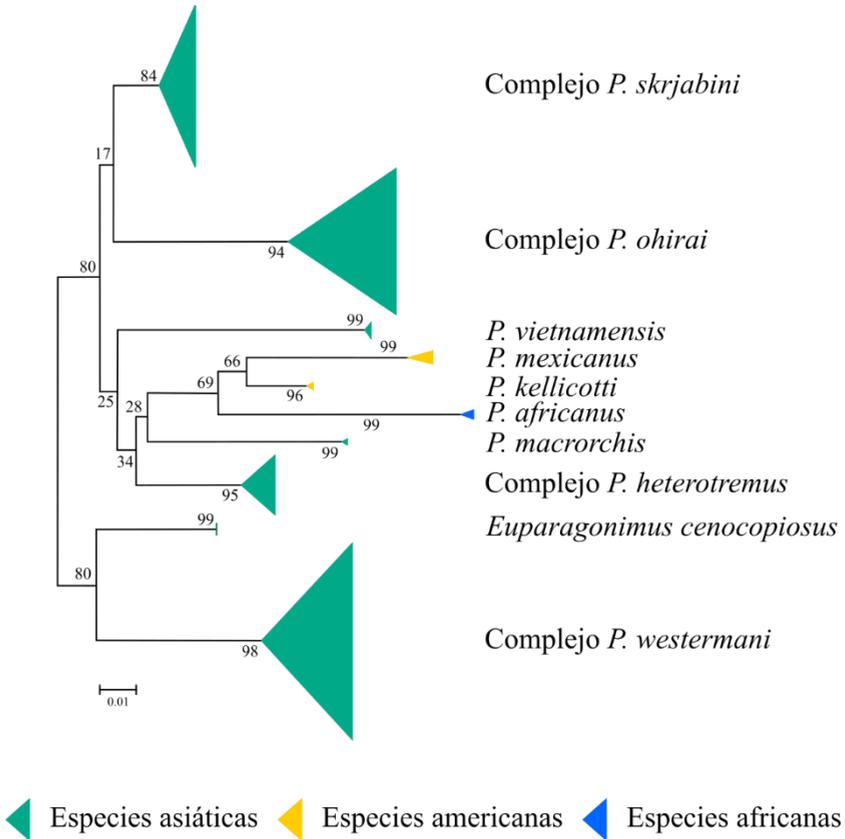


Figura 1. Relaciones filogenéticas de las especies y complejos de especies de *Paragonimus* inferidas del marcador ribosomal ITS2. El complejo *P. skrjabini* incluye las subespecies: *P. miyazaki*, *P. proliferus* y *P. skrjabini*; el complejo *P. ohirai* incluye las subespecies: *P. bangkokensis*, *P. harinasutai*, *P. microrchis* y *P. ohirai*; el complejo *P. heterotremus* incluye las subespecies: *P. heterotremus* y *P. pseudoheterotremus*; el complejo *P. westermani* incluye las subespecies: *P. siamensis* y *P. westermani*. Modificado de Blair *et al.* (2016).

1.2. Estudios taxonómicos de Paragonimus en Latinoamérica

En Latinoamérica se han descrito once especies de *Paragonimus*; ocho de estas fueron nombradas como especies nuevas (Diesing, 1850; Little, 1968; Miyazaki *et al.*, 1973, 1969; Miyazaki e Ishii, 1968; Voelker y Arzube, 1979), y tres especies no fueron nombradas debido a su similitud con especies previamente descritas (Little, 1968; Noya *et al.*, 1992; Vélez *et al.*, 2003).

Los estudios morfológicos de *Paragonimus* en Latinoamérica se iniciaron en 1850 con la descripción de *P. rudis* en Brasil (syn. *Distomon rudis*) (Diesing, 1850). Los estudios moleculares se implementaron en 2003 para evaluar las relaciones filogenéticas entre especies de *Paragonimus* americanas y asiáticas (Iwagami *et al.*, 2003). Desde entonces la caracterización de las especies de *Paragonimus* en Centro y Suramérica se apoya en criterios morfológicos y moleculares (Hernández-Chea *et al.*, 2017; Iwagami *et al.*, 2003; López-Caballero *et al.*, 2013; Vargas-Arzola *et al.*, 2014), y desde 2017 como método diagnóstico en humanos (Calvopiña *et al.*, 2017).

Con la implementación de estudios moleculares en Latinoamérica, actualmente se reconocen dos especies de *Paragonimus* (*P. mexicanus* y posiblemente *P. caliensis*); las cuales cuentan con 117 secuencias de ADN depositadas en GenBank. A continuación, se presentan las especies descritas en Centro y Suramérica con su estatus taxonómico actual (validez de cada especie y sinonimia). Posterior a esta, se reseñan los estudios moleculares realizados hasta la fecha.

1.2.1. Especies descritas por microscopía óptica

Paragonimus rudis (Diesing, 1850) Stiles & Hassall, 1900 fue descrita como *Distoma rude* Diesing, 1850 en *Pteronura brasiliensis* en Mato Grosso, Brasil (Figura 2a). Ubicada en el género *Paragonimus* por Stiles y Hassall (1900). Reportada en Guatemala (Figura 2h) por Caballero y Caballero (1946). Sugerida como *species inquirenda*⁸ (Brenes *et al.*, 1984). Actualmente *P. rudis* se considera *nomen nudum*⁹ debido a que su descripción original no es la adecuada, los ejemplares tipo están mal conservados y no permiten una evaluación morfológica clara (Hernández-Chea *et al.*, 2017).

Paragonimus caliensis Little, 1968 fue descrita en *Didelphis marsupialis* y *Phillander oposum* en Pichindé, Colombia (Figura 2b). Sugerida como especie “B”¹⁰ por Miyazaki e Ishii (1968). Con reportes en Perú, Panamá y Costa Rica (Brenes *et al.*, 1984). Fue sugerida como variante morfológica de *P. mexicanus* (Tongu, 2001; Vélez *et al.*, 2009). También propuesta como especie válida en base a estudios morfológicos y moleculares de metacercarias de Costa Rica (Hernández-Chea *et al.*, 2017).

⁸ Una *species inquirenda* es una locución latina que significa que una especie es de identidad dudosa y que necesita una investigación más profunda (ITZN, 2009).

⁹ Un *nomen nudum* es un término latino referido a un nombre que, si se publicó antes de 1931, no se ajusta al Artículo 12; o, si se publicó después de 1930, no se ajusta al Artículo 13. Un *nomen nudum* no está disponible y por tanto el mismo nombre puede llegar a hacerse disponible más tarde para el mismo concepto u otro distinto; en tal caso, tomaría autoría y fecha [Arts. 50, 21] de este acto de establecimiento y no de una publicación previa como *nomen nudum* (ITZN, 2009).

¹⁰ Miyazaki e Ishii, (1968) describen dos especies de *Paragonimus* en México, la especie “A” fue descrita como *P. mexicanus*, mientras que la especie “B” fue similar a la nueva especie descrita por Little (1968) en Colombia (en Miyazaki e Ishii, 1968 y López-Caballero, 2009).

Paragonimus aff. mexicanus: hallada en *Leopardus wiedii* en Putumayo, Colombia (Figura 2c), fue descrita por Little (1968) como nueva especie, pero no fue nombrada debido a su semejanza morfológica con la especie africana *P. uterobilateralis*.

Paragonimus mexicanus Miyazaki & Ishii, 1968 fue descrita en *Didelphis marsupialis* en Colima, México (Figura 2d). Con reportes en Guatemala, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú. Las especies *Paragonimus peruvianus* Miyazaki, Ibañez & Miranda, 1969 (Miyazaki, 1979); *Paragonimus* sp. “*emberarum*” de Colombia (Vélez *et al.*, 2009, 2003) (Figura 2j); *Paragonimus* sp. de Venezuela (Díaz *et al.*, 2010; Noya *et al.*, 1992) y *Paragonimus inca* (Tongu, 2001) se consideran sinónimas *junior*¹¹ de *P. mexicanus* con base en criterios morfológicos. *Paragonimus ecuadoriensis* Voelker & Arzube, 1979 fue confirmada como *sinónima junior* de *P. mexicanus* en base a criterios moleculares (Iwagami *et al.*, 2003; López-Caballero *et al.*, 2013). Se han identificado cinco variantes morfológicas en México (Figura 2i) (López-Caballero *et al.*, 2013; CCH.116).

Paragonimus amazonicus Miyazaki, Grados & Uyema, 1973 fue descrita en *Philander opossum* y *Chironectes minimus* en Huánuco, Perú. Sugerida *sinónima junior* de *P. mexicanus* (Tongu, 2001). Su descripción tipo no incluye los estadios evolutivos del parásito (Noya *et al.*, 1992).

Paragonimus peruvianus Miyazaki, Ibañez & Miranda, 1969 fue descrita en *Hypolobocera chilensis* (antes *Pseudothelphusa chilensis*) y *Felis catus* de ejemplares procedentes de Cajamarca, Perú (Figura 2e).

¹¹ ***Sinónimo***: cada uno de dos o más nombres de la misma categoría usados para indicar el mismo taxón taxonómico. El nombre más antiguo es denominado *sinónimo senior*, y el más reciente denominado *sinónimo junior*.

Considerado *sinónima junior* de *Paragonimus mexicanus* (Miyazaki, 1979).

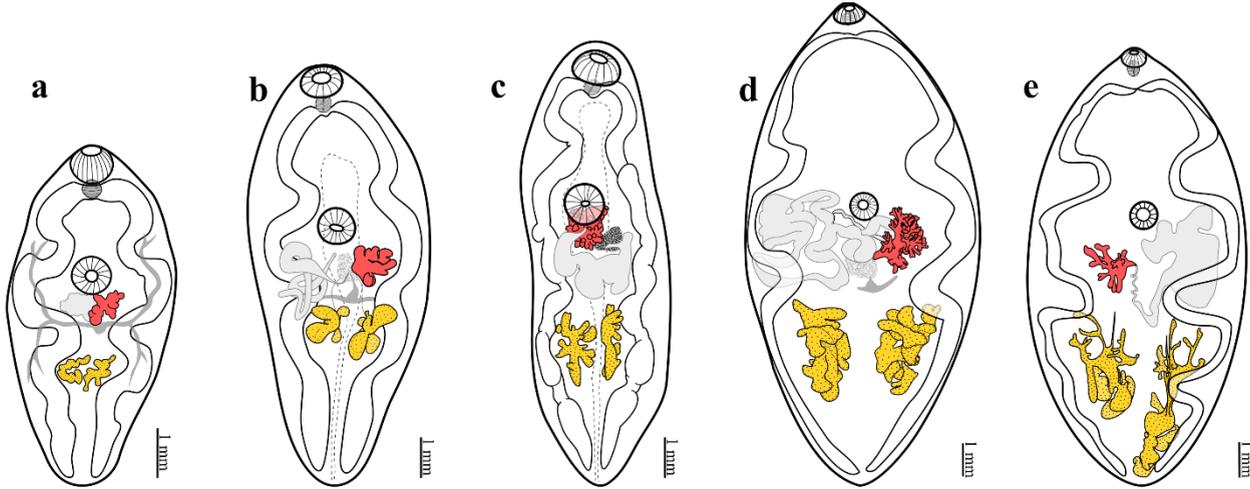
Paragonimus inca Miyazaki, Mazabel, Grados & Uyema, 1975 fue descrita en Tingo María, Perú. Sugerida como *sinónima junior* de *P. mexicanus* por Lamothe-Argumedo (1985). Posible *Paragonimus* sp. descrita por Little (1968) en Putumayo, Colombia. Su descripción no incluye los estadios evolutivos del parásito (Noya *et al.*, 1992).

Paragonimus ecuadoriensis Voelker & Arzube, 1979 fue descrita en *Nasua nasua* en la zona costera de Ecuador (Figura 2f-g). *Sinónima junior* de *P. mexicanus* por estudios morfológicos (Lamothe-Argumedo, 1985) y moleculares (Iwagami *et al.*, 2003; López-Caballero *et al.*, 2013).

Paragonimus napensis Amunarriz, 1991 fue descrita a partir de metacercarias enquistadas en *Trichodactylus emarginatus* (antes *Zilchiopsis emarginata*) recolectados en el Río Napo, en la Amazonía ecuatoriana. Su descripción no incluye los estadios evolutivos del parásito (Vélez *et al.*, 2003).

Paragonimus aff. mexicanus: recolectada de *Didelphis marsupialis* en el estado de Sucre, Venezuela, no fue determinada por sus similitudes morfológicas con *P. mexicanus* y *P. caliensis* (Noya *et al.*, 1992). Posteriormente fue determinada como *P. mexicanus* (Díaz *et al.*, 2010).

Paragonimus aff. mexicanus: parásito de humanos en Valle de Pérdidas, Colombia (Figura 2j), y propuesta como nueva especie (*Paragonimus emberarum* en USNM Helminth Collection) por Vélez *et al.* (2003), fue reexaminada a nivel morfológico y determinada como *P. mexicanus* (Vélez *et al.*, 2009).



Paragonimus rudis
 Holotipo
Pteronura brasiliensis
 Mato Grosso, Brasil



Paragonimus caliensis
 Holotipo
Didelphis marsupialis
 Pichindé, Colombia



Paragonimus n. sp.
 Holotipo
Leopardus wiedii
 Putumayo, Colombia



Paragonimus mexicanus
 Holotipo
Didelphis marsupialis
 Colima, México



Paragonimus peruvianus
 Holotipo
Felis catus
 Cajamarca, Perú



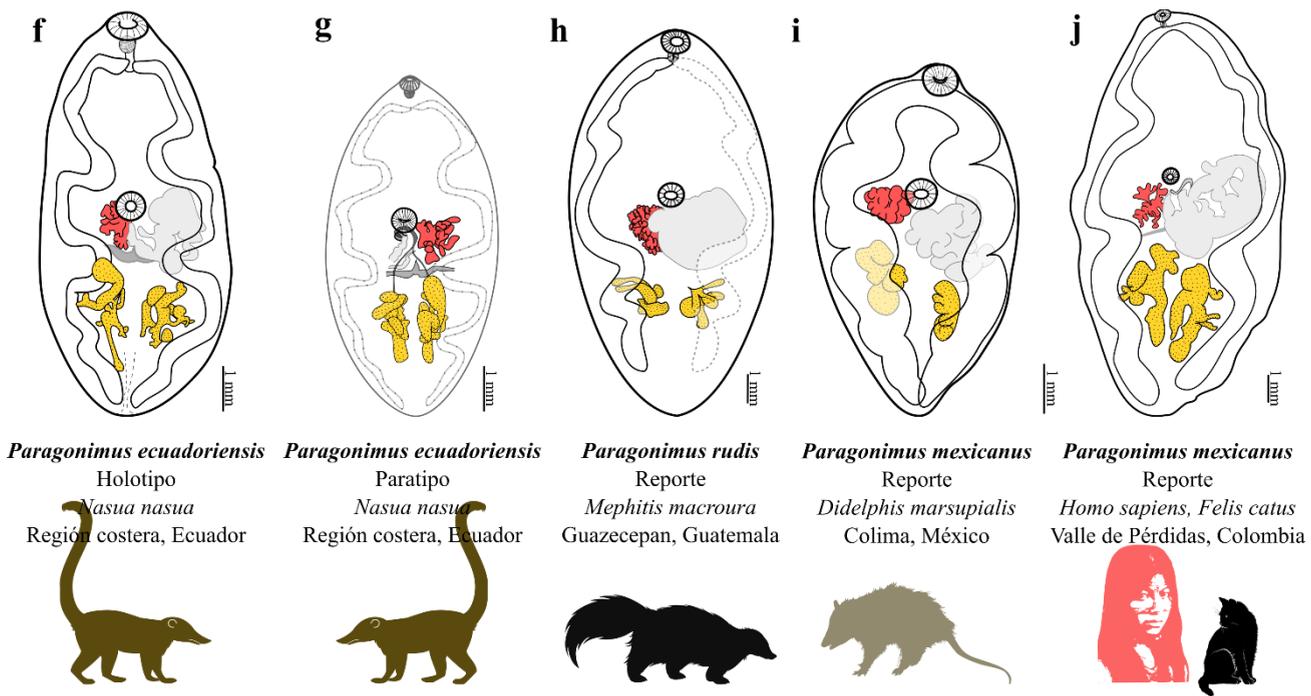


Figura 2. Especies de *Paragonimus* descritas y reportadas en Latinoamérica. Incluye hospedadores tipo y localidad. Nótese la variación en la forma de los ovarios (color rosado) y los testículos (color amarillo).

1.2.2. Estudios moleculares

Los reportes clínicos, silvestres y taxonómicos de *Paragonimus* spp. en Latinoamérica, revelan que el parásito se extiende desde el norte de México hasta el sur de Brasil (Figura 3) (Brenes *et al.*, 1984; Calvopiña *et al.*, 2014; López-Caballero *et al.*, 2013; Meira y Alvares, 1995; Noya *et al.*, 1992; Tongu, 2001; Vélez *et al.*, 2000). Sumado a esto, los estudios moleculares han confirmado dos especies: *P. mexicanus* y *P. caliensis*.

Para *P. mexicanus* la caracterización de las regiones ITS2 del ADNr y CO1 del ADNmt de ejemplares recolectados en Ecuador y Guatemala, y sugirieron diferencias a nivel de subespecies o menores (Iwagami *et al.*, 2003). Estudios posteriores añadieron datos moleculares (ITS2 y CO1) de focos endémicos de *P. mexicanus* localizados en los estados de Colima (localidad tipo de *P. mexicanus*), Veracruz y Chiapas, México (López-Caballero *et al.*, 2013), y en las provincias de Limón y Puntarenas en Costa Rica (Hernández-Chea *et al.*, 2017). Las poblaciones de *P. mexicanus* de Orellana (GenBank: AB968080), Esmeraldas (GenBank: AF538945), Pichincha (GenBank: LC149729 y Pedernales (Calvopiña *et al.*, 2017) en Ecuador, cuentan con secuencias del ITS2.

El estudio de López-Caballero *et al.* (2013) sugiere a *P. mexicanus* como un complejo de especies (Blair *et al.*, 2016). *Paragonimus caliensis* fue propuesta como especie válida, con base en nuevos datos moleculares del 28S, ITS2 y CO1 de metacercarias (Hernández-Chea *et al.*, 2017). Las poblaciones de *Paragonimus* presentes en Colombia, Panamá, Perú y Venezuela, solo cuentan con datos morfológicos.

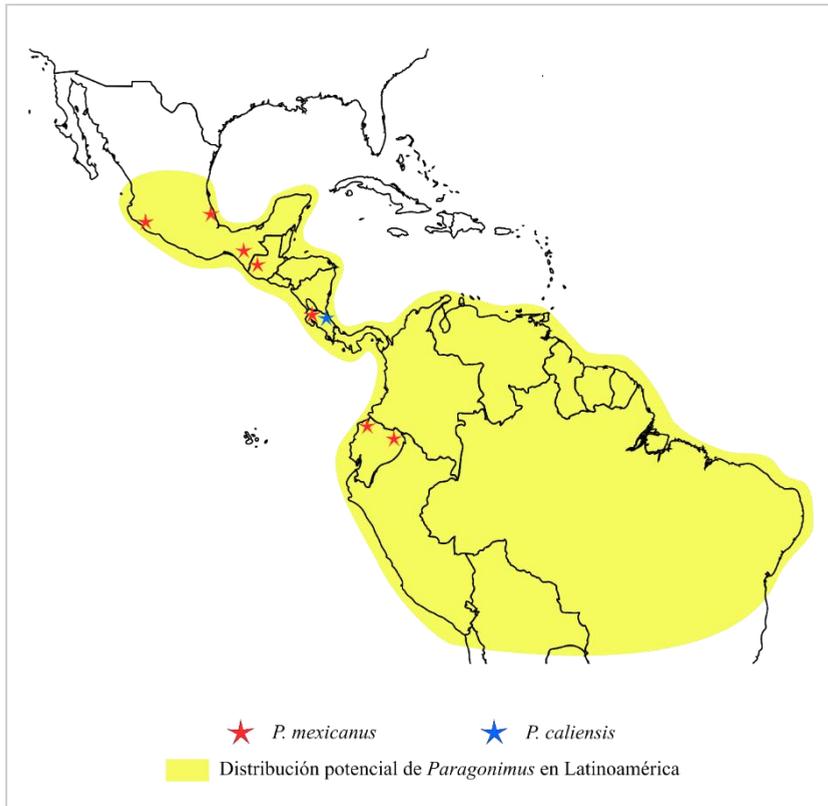


Figura 3. Distribución de *Paragonimus* spp. en Latinoamérica, según los reportes clínicos, silvestres y taxonómicos. Los sitios señalados corresponden a las especies caracterizadas a nivel molecular (Calvopiña *et al.*, 2017; Hernández-Chea *et al.*, 2017; Iwagami *et al.*, 2000; López-Caballero *et al.*, 2013).

1.3. Ciclo de vida de *Paragonimus*

Hospedadores: Todas las especies de *Paragonimus* realizan su ciclo de vida en tres hospedadores (Figura 4). Un molusco dulceacuícola (primer hospedador intermediario), un crustáceo (segundo hospedador intermediario), y un mamífero (hospedador definitivo). En el molusco el parásito lleva a cabo su reproducción asexual, en el crustáceo alcanza la forma infectiva para el mamífero, y en este último alcanza la madurez sexual, que se manifiesta con la producción de huevos.

Fases de desarrollo: *Paragonimus* presentan siete fases de desarrollo: adulto, huevo, miracidio, esporoquiste, redia, cercaria y metacercaria. Tres fases son infectivas para sus hospedadores; el miracidio infecta moluscos, la cercaria infecta crustáceos, y la metacercaria infecta mamíferos. A continuación, se presenta el ciclo biológico de *Paragonimus* en Latinoamérica (Figura 4):

- 1 Paragonimiasis pulmonar. Los parásitos adultos y hermafroditas forman cápsulas en los pulmones de mamíferos, expulsando huevos y desechos de su metabolismo.
- 2 Los huevos son expulsados a través del esputo y de las heces. En el huevo que alcanza el medio acuático se desarrolla un miracidio.
- 3 El miracidio eclosiona e infecta un caracol de agua dulce del género *Aroapyrgus*.
- 4 En el interior del caracol se produce la reproducción asexual del trematodo. El miracidio se transforma en esporoquiste. El esporoquiste produce redias. Las redias producen cercarias.
- 5 Las cercarias abandonan el caracol e infectan cangrejos y camarones de río.
- 6 Las cercarias invaden tejidos, principalmente el sistema digestivo, allí se transforman en metacercarias.
- 7 Los mamíferos se infectan al consumir crustáceos parasitados. Las metacercarias migran desde el sistema digestivo hasta los pulmones en donde alcanzan la madurez sexual, que se manifiesta con la producción de huevos.

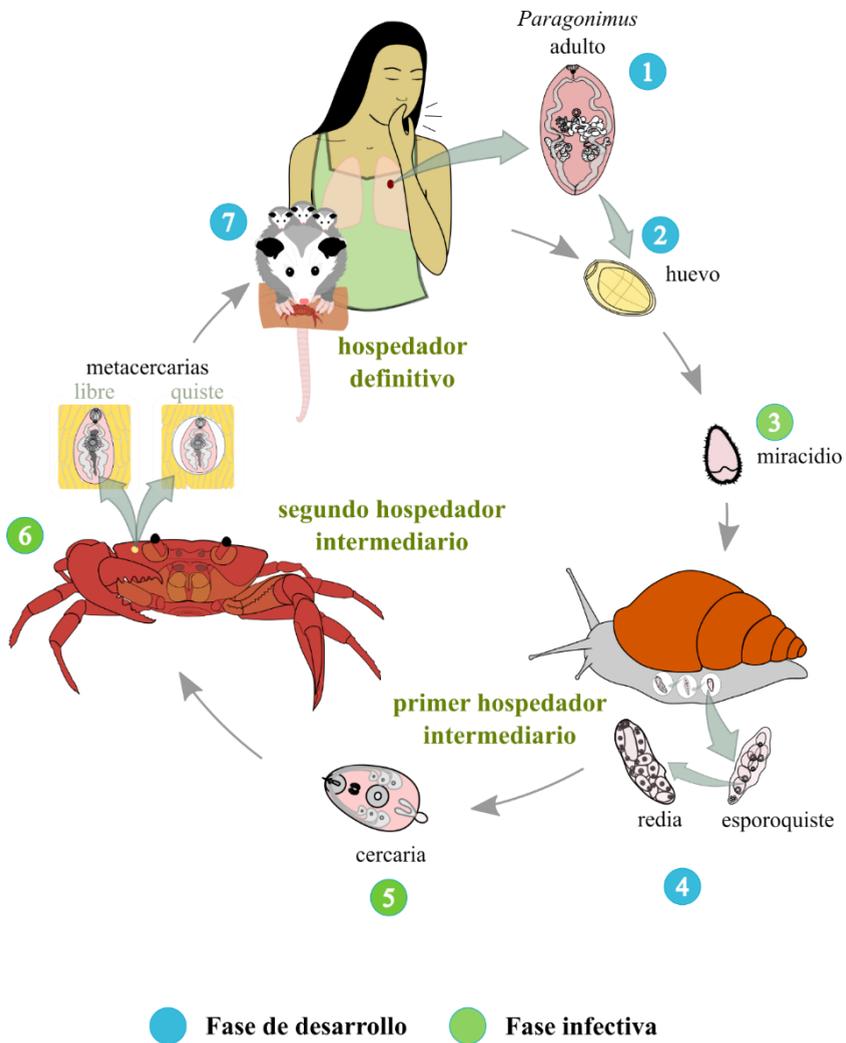


Figura 4. Ciclo biológico de *Paragonimus* spp. en Latinoamérica.

1.4. Paragonimiasis

1.4.1. Epidemiología de la enfermedad

La paragonimiasis es una enfermedad parasitaria que por lo regular afecta el parénquima pulmonar de diversos animales y de humanos, consumidores de cangrejos de agua dulce. A esta zoonosis también se le conoce como distomatosis pulmonar, hemoptisis parasitaria o hemoptisis endémica (Ruiz, 2014). *Paragonimus westermani*, *P. skrjabini*, *P. heterotremus* (Asia), *P. uterobilateralis*, *P. africanus* (África), *P. kellicotti* (Norteamérica) y *P. mexicanus* (Centro y Suramérica), han sido reportadas como parásitas de humanos, considerándose que existen 290 millones de personas en riesgo, y 23 millones de personas afectadas (Blair *et al.*, 2016; Kong *et al.*, 2015).

1.4.2. Clínica de la enfermedad

Muchos pacientes con paragonimiasis son asintomáticos o tienen la enfermedad subclínica, y no son conscientes de la infección, mientras que otros presentan síntomas de leves a moderados durante muchos años, antes de recibir atención médica. Aunque la enfermedad puede ser leve en muchos pacientes, es una causa importante de morbilidad en muchas partes del mundo y puede llegar a ser fatal (Boé y Schwarz, 2007).

La **fase aguda** de la enfermedad se inicia tras la ingestión de metacercarias y su migración hacia el espacio pleural, y dura entre 2 y 15 días. A menudo los pacientes son asintomáticos al principio del proceso de infección, o pueden tener la enfermedad subclínica. Se han documentado síntomas como dolor abdominal, fiebre y diarrea como posibles manifestaciones tempranas de la infección, y son más comunes en pacientes con alta carga parasitaria. Fiebre, dolor de pecho,

fatiga y urticaria pueden seguir a estos síntomas. La fiebre se produce sólo entre el 10 y 20% de los pacientes al principio del proceso de la enfermedad. La eosinofilia acompaña a estos hallazgos clínicos. Las manifestaciones iniciales de la migración gastrointestinal son inespecíficas, por lo tanto el diagnóstico no suele ser posible en esta etapa (Procop, 2009).

La **fase crónica** o pleuropulmonar de la paragonimiasis se produce cuando los parásitos migran a su destino final en el parénquima pulmonar, donde forman una capsula quística, se aparean y eliminan los huevos fértiles. Esta migración puede causar bronquiectasias, neumonía intersticial, hemorragia transitoria, o bronconeumonía de diversos grados. Los parásitos pueden localizarse en el parénquima pulmonar, la pleura o en ambos lugares, es decir localización pleuropulmonar. Los huevos fértiles son eliminados en las secreciones respiratorias vía bronquial por expectoración, y si son deglutidos llegan al medio ambiente por las heces.

Las manifestaciones clínicas de la paragonimiasis están directamente relacionadas con el proceso patológico asociado a la etapa crónica de la infección (Figura 5). Estas dependen de la localización del quiste parasitario, el número de quistes producidos y de las secuelas asociadas. Dichas manifestaciones clínicas son similares a las de la tuberculosis como tos, disnea, pérdida de peso, febrícula, dolor de espalda llegando hasta la hemoptisis. Los hallazgos radiológicos pueden ser normales hasta en el 20% de los casos, en el resto se observan imágenes compatibles con infiltrados, cavernas, fibrosis, efusión pleural y nódulos (Abdul-Hadi *et al.*, 2008).

- Adinamia
- Astenia
- Derrame pleural
- Disnea
- Dolor abdominal
- Dolor de cabeza
- Eosinofilia
- Fiebre con o sin sudor nocturno
- Fiebre y malestar general
- Hemoptisis
- Neumotórax
- Nódulos cutáneos migratorios
- Tos

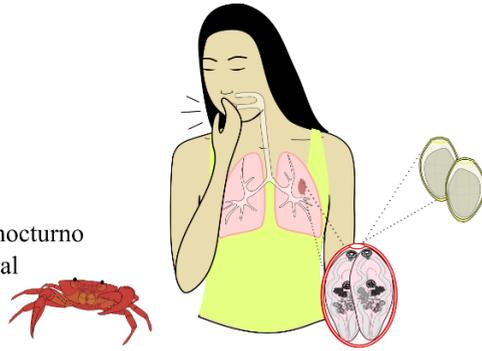


Figura 5. Manifestaciones clínicas de la paragonimiasis pulmonar.

La patología también está relacionada con migraciones ectópicas al cerebro, corazón, hígado, peritoneo y zonas subcutáneas (Figura 6). Desafortunadamente, la localización cerebral es el sitio primario de la paragonimiasis ectópica. La paragonimiasis cerebral presenta dos tipos de manifestaciones, una minoría de los pacientes presenta signos y síntomas de una meningitis o meningoencefalitis debido a la migración del parásito, mientras que la mayoría de los pacientes tienen una lesión expansiva que ocupa espacio en el cerebro. Los pacientes con paragonimiasis cerebral tienen un pronóstico mucho peor que los pacientes con enfermedad pleuropulmonar. Los signos y síntomas dependen de las áreas del cerebro involucradas; son comunes el dolor de cabeza, vómitos y convulsiones. Se ha documentado que cerca del 70% los pacientes presentan cambios de personalidad y disminución de la función cognitiva, y que el 15% llega al estado de coma (Procop, 2009). La muerte se produce a través de una hernia causada por el aumento de la presión intracraneal. En Colombia y Costa Rica se ha reportado casos de paragonimiasis (Brenes *et al.*, 1982; Buitrago *et al.*, 1981), así como de otras localizaciones ectópicas como pericardio (Saborio *et al.*, 1995).

- **Paragonimiasis pulmonar**
- ① La infección ocurre al ingerir crustáceos crudos o mal cocidos.
- ② Una vez el parásito llega al sistema digestivo migra desde el intestino a los pulmones a través del diafragma.
- ③ En los pulmones, los parásitos adultos y hermafroditas forman cápsulas, expulsando huevos y desechos de su metabolismo.
- ④ Los huevos son expulsados al medio por expectoración.
- ⑤ Los huevos son expulsados al medio con la materia fecal.
- **Paragonimiasis extrapulmonar**
- **C** Paragonimiasis cerebral: los signos y síntomas dependen de las áreas del cerebro involucradas.
- **S** Paragonimiasis subcutánea: se manifiesta como edemas migratorios o nódulos subcutáneos que contienen gusanos inmaduros

- ➡ Migración pleuro-pulmonar
- ➡ Migración ectópica
- ➡ Expulsión de huevos

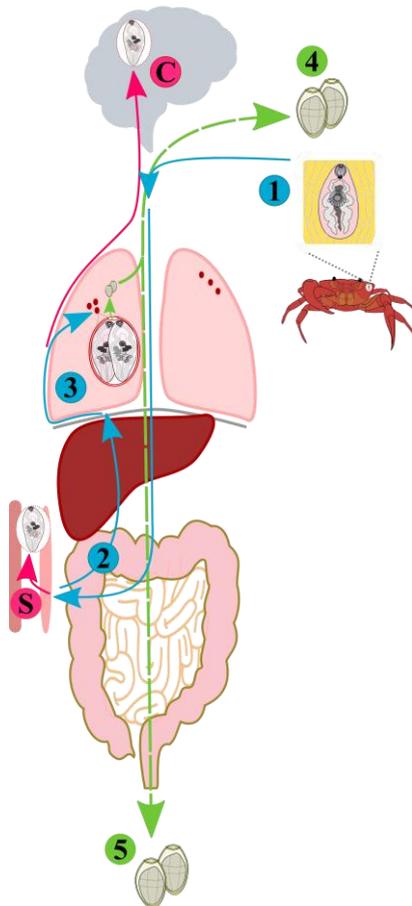


Figura 6. Migración de *Paragonimus* spp. en el humano.

1.4.3. Diagnóstico y tratamiento

1.4.3.1. Métodos parasitológicos

Los exámenes microscópicos de muestras de esputo y heces pueden revelar la presencia de huevos de *Paragonimus* sp. Desafortunadamente, el examen microscópico es poco sensible ya que los huevos son expulsados de forma intermitente en la etapa crónica, cuando los parásitos son adultos. El examen de una sola muestra de esputo tiene una sensibilidad de entre el 30 y 40%. La sensibilidad de un examen de heces es del 11 al 15%, siendo inferior a la de esputo (Procop, 2009). Se recomienda la técnica de concentración Formol-Éter, debido a una sensibilidad relativamente baja de la técnica de Kato-Katz. El examen de muestras múltiples aumenta la sensibilidad del diagnóstico (Kong *et al.*, 2015).

En general los hallazgos de laboratorio, aunque inespecíficos, a menudo sugieren una infección causada por helmintos, apoyando así el diagnóstico presuntivo de paragonimiasis con base en datos clínicos, epidemiológicos y radiológicos. La eosinofilia, el aumento de IgE, y en algunos casos el hallazgo de cristales de Charcot-Leyden en heces, dan lugar a la búsqueda de helmintos parásitos mediante exámenes adicionales y estudios serológicos (Procop, 2009).

1.4.3.2. Métodos inmunológicos

Dado que el examen microscópico para la detección de huevos de *Paragonimus* es un método poco sensible, se han desarrollado distintas pruebas serológicas que varían entre sí respecto a su sensibilidad (>95%) y especificidad. En Estados Unidos se utiliza una prueba inmunodiagnóstica de tipo *immunoblot*, desarrollada por el CDC en 1988 (Slemenda *et al.*, 1998). Esta prueba detecta anticuerpos dirigidos

contra un antígeno de 8 kDa de *P. westermani*, con una sensibilidad del 96% y especificidad del 99%. La detección de anticuerpos contra *P. westermani* ha ayudado a los médicos a distinguir paragonimiasis de la tuberculosis, principalmente en inmigrantes asiáticos. Aunque la prueba del CDC es menos sensible para la detección de otras especies de *Paragonimus*, es utilizada para confirmar el diagnóstico (Díaz, 2013).

En Centro y Suramérica se ha utilizado la prueba intradérmica (IDR) en estudios de focos, o como coadyuvante en el diagnóstico diferencial de (Alvarado *et al.*, 2004; Ulate *et al.*, 2015; Vélez *et al.*, 2000). La IDR se prepara con antígeno somático de *P. mexicanus* (Sawada *et al.*, 1968), y se aplican 0.01-0.02 mL de antígeno y 0.01 mL de solución salina estéril como control. El resultado se considera positivo cuando se forman pápulas mayores a 10 mm de diámetro 15 min después de su aplicación, y no se forma ninguna reacción contra el control negativo. La prueba intradérmica resulta ser de suma utilidad para diagnosticar la paragonimiasis de una manera fácil, económica y rápida. Sin embargo, tiene la desventaja de que no determina una infección actual; eso significa, que un individuo puede reaccionar positivamente por un largo período de tiempo, aún después de haberse recuperado de la infección. Otra desventaja de esta técnica es que pueden ocurrir también reacciones cruzadas con otros helmintos (Alvarado *et al.*, 2004; Ulate *et al.*, 2015).

Algunos resultados de la IDR han sido confirmados con otros métodos, como contrainmunolectroforesis (Cornejo *et al.*, 1994), e incluso con la prueba *immunoblot* del CDC (Brenes *et al.*, 1985). Aunque los estudios por ELISA e *immunoblot* son limitados para *P. mexicanus*, dos estudios serológicos mostraron patrones de reconocimiento antigénico diferentes en sueros positivos para *Paragonimus* sp. (Gómez *et al.*,

2010; Sawada *et al.*, 1968). Mientras que otros autores han propuesto el diagnóstico serológico con antígenos de excreción-secreción (ESP) de parásitos adultos (Cornejo *et al.*, 1999; Toledo *et al.*, 2011; Wongkham *et al.*, 2005). Estos estudios aún requieren de la identificación de proteínas específicas del parásito.

1.4.3.3. Tratamiento y prevención

El praziquantel (25 mg/kg tres veces al día durante 3 días) es el fármaco de elección para tratamiento de paragonimiasis pulmonar. El praziquantel a una dosis de 25 mg / kg durante 14 días es efectivo en el tratamiento de la paragonimiasis cerebral activa temprana. Sus efectos adversos incluyen dolor de cabeza, mareos, trastornos gastrointestinales y borrosidad de la visión, aunque leve y transitoria. Los pacientes que presentan reacciones alérgicas después del tratamiento con praziquantel pueden tratarse con triclabendazol. El triclabendazol (5 mg / kg durante 3 días, o 10 mg / kg por día) es igual de efectivo contra las paragonimiasis sin efectos secundarios. Para lesiones que no se resuelven con quimioterapia, como lesiones severamente adheridas en la cavidad pleural y/o torácica o paragonimiasis cerebral calcificada crónica, se recomienda la extirpación quirúrgica.

En general, el pronóstico de paragonimiasis varía de regular a bueno, a excepción de la paragonimiasis cerebral crónica calcificada. Después de un tratamiento exitoso, los síntomas disminuyen gradualmente entre 2-6 meses. Los niveles séricos elevados de anticuerpos específicos contra *Paragonimus* vuelven a valores negativos entre 6 meses y 4 años. La eosinofilia se normaliza gradualmente durante un período de 2 a 6 meses después del tratamiento. Sin embargo, la adhesión pleural severa a menudo necesita decorticación. Los déficits neurológicos persisten en la mayoría de los casos con afectación cerebral (Ruiz, 2014).

Al igual que otras helmintiasis de transmisión alimentaria, la única prevención efectiva es evitar el consumo de alimentos contaminados con metacercarias de *Paragonimus*. En las zonas rurales de América, y en especial en comunidades indígenas que consumen cangrejos de agua dulce como fuente de proteínas, es importante implementar programas de educación sanitaria sobre la transmisión de la paragonimiasis, en especial con la intervención de funcionarios locales de salud.

1.5. *Paragonimus* y *paragonimiasis* en Colombia

En Colombia, los primeros registros de *Paragonimus* spp. y paragonimiasis humana datan de 1968 y 1981, respectivamente. Desde entonces, se han detectado 16 focos endémicos, reportándose hasta 33 casos humanos, y describiéndose tres especies en base a criterios morfológicos. Como resumen *Paragonimus* spp. está presente en 29 localidades y 8 departamentos de Colombia, correspondiéndose a las regiones naturales Andina, Pacífica y Amazónica (Figura 7).

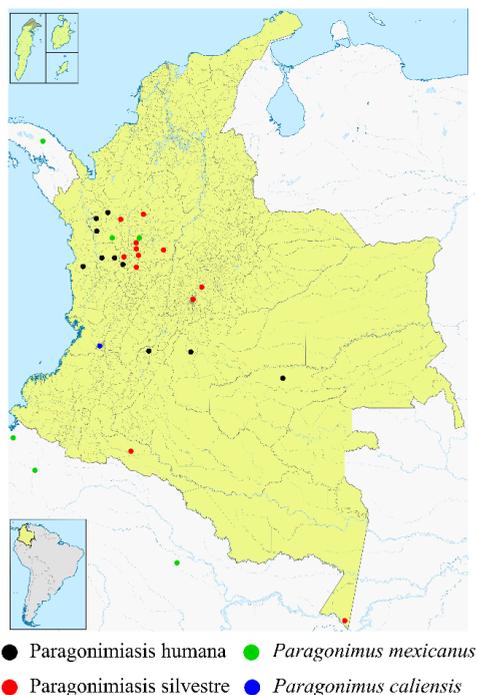


Figura 7. Distribución de *Paragonimus* spp. en Colombia. Incluye los registros clínicos y silvestres del parásito en los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Huila (Región Andina), Chocó, Valle del Cauca (Región Pacífica), Amazonas, Meta y Putumayo (Región Amazónica). Mapa de Colombia modificado de creativecommons.org.

1.5.1. Paragonimiasis en Colombia

En Colombia la paragonimiasis no está considerada dentro de las principales causas de patología pulmonar, primero porque no es de obligatorio registro en el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA), y segundo, por su difícil diagnóstico, ya que presenta sintomatología similar a tuberculosis (TB). Por lo tanto, los casos de paragonimiasis son poco detectados o son diagnosticados después de varios exámenes e investigaciones médicas para TB, incrementando así el coste en los sistemas de salud. Como se ha comentado, existen reportes de 33 casos de paragonimiasis en pacientes provenientes de los departamentos del Guaviare, Huila, Meta, Antioquia y Chocó. En la Tabla 1 se muestra un resumen de la información disponible sobre los casos de paragonimiasis reportados entre 1981 y 2013, que incluye etología de la enfermedad, métodos de diagnóstico y tratamiento empleados.

El primer caso de paragonimiasis humana en Colombia fue reportado en un agricultor de 40 años, natural de San Antonio de Tena (Cundinamarca) y residente en Mesetas, departamento del Meta. La enfermedad tuvo una evolución de 4 años; después de diversos exámenes y tratamientos para TB sin mejoría, fue remitido al Hospital Regional de Villavicencio, donde se le realizó una toracotomía con el diagnóstico clínico de absceso hepático drenado a bronquio inferior derecho y cor-pulmonale crónico, con el hallazgo de masa quística subdiafragmática adherida al hígado, que se continuaba y adhería a la base pulmonar derecha. El estudio histopatológico de tejido pulmonar diagnosticó paragonimiasis pulmonar (Buitrago *et al.*, 1981).

El segundo caso reportado, fue de un agricultor natural de Apie, Huila, tratado previamente para TB y bronquitis crónica. Tras un año de

evolución de hemoptisis fue remitido al Hospital Santa Clara, Bogotá, donde fue diagnosticado y tratado (Gómez *et al.*, 1984).

En 1986, se comprobó la presencia de *Paragonimus* adultos en el pulmón de un hombre de 38 años no identificado, fallecido por laceración cerebral secundaria a herida por proyectil de arma de fuego. No se pudieron obtener datos concernientes a la procedencia del mismo, sintomatología y probables tratamientos (Restrepo, 1986). El cuarto caso fue de un paciente del Guaviare con compromiso pulmonar, cerebral y pélvico (Buitrago *et al.*, 1998).

El primer foco humano de paragonimiasis se detectó en Valle de Pérdidas, una reserva indígena Emberá localizada en el parque de las Orquídeas, municipio de Urrao, Antioquia, a partir de una mujer Emberá infectada con el parásito. Posteriormente se encontraron 23 casos en los municipios de Murindó y Vigía del Fuerte, en Antioquia, y en Quibdó, Carmen de Atrato y Alto Baudó, en el departamento del Chocó (Vélez *et al.*, 2000). En 2001, se dió a conocer el caso de un soldado que consumía cangrejos crudos en la región de Piedras Blancas, entre Andes y Chocó, al cual le extirparon cinco nódulos pulmonares con *Paragonimus* (Vélez *et al.*, 2000).

Los últimos reportes provienen de casos aislados en comunidades indígenas. Un joven de 18 años, indígena, residente en la zona rural del departamento de Chocó, que refería tos y hemoptisis de un año de evolución y alteraciones neurológicas y hepáticas, fue remitido al Hospital San Vicente de Paúl, Medellín. Tras el hallazgo de tejidos nodulares en pulmón por tomografía de tórax se sugirieron tuberculosis, nocardiosis, actinomicosis o paragonimiasis como posibles diagnósticos diferenciales. Se le realizó entonces un lavado bronco

alveolar y tinción de Ziehl-Neelsen, a partir de la cual se detectaron huevos de *Paragonimus* (Uriza *et al.*, 2011).

En 2013 se reportó el caso de una niña 7 años, perteneciente a la etnia Emberá Katio, residente en Carmen de Atrato, Chocó, que fue hospitalizada con diagnósticos de tuberculosis pulmonar, desnutrición crónica y parasitosis intestinal. En los análisis de muestras coprológicas y de esputo se detectaron huevos de *Paragonimus*. En ese mismo año se reportó el caso de una niña indígena de 2 años, natural y residente en un asentamiento ubicado a nueve horas de la cabecera municipal de Dabeiba, Antioquia (Morales *et al.*, 2013), con síndrome de dificultad respiratoria grave, que fue tratada para TB y remitida a un centro de recuperación nutricional. Dos meses después fue remitida al hospital por un cuadro clínico de cuatro días de evolución, consistente en fiebre, palidez y dificultad respiratoria, disminución del murmullo vesicular en ambos campos pulmonares y crepitaciones bibasales. Después de varios exámenes para TB resistente, se evaluó para paragonimiasis con resultado positivo para huevos de este parásito y de cristales de Charcot-Leyden (Morales *et al.*, 2013). El último caso reportado proviene de una mujer de 40 años, indígena de la reserva de Buena Vista, en Chocó, la cual presentó síntomas de TB. Los estudios radiológicos y la evaluación directa de lavado bronco-alveolar permitió el rápido diagnóstico de la paragonimiasis pulmonar (Ramírez *et al.*, 2013).

En la actualidad se presume a *P. mexicanus* como el agente causal de la paragonimiasis en Colombia (Vélez *et al.*, 2009). El hallazgo de focos silvestres de *Paragonimus* en zonas urbanas y rurales de Colombia ha evidenciado el riesgo de adquirir la infección, dada la eventual manipulación y consumo de cangrejos (Arias *et al.*, 2011; Casas *et al.*, 2008; Phillips, 2016; Uruburu *et al.*, 2008), más aún si se conoce que poblaciones indígenas tienen el hábito de consumir estos hospedadores

intermediarios, y viven en lugares apartados en donde la TB es frecuente, y el diagnóstico de la paragonimiasis no es una prioridad.

Edad y género	Localidad	Factor de riesgo	Presentación	Método diagnóstico	Tratamiento	Estudio
Campesino 40 años masculino	Mesetas (Meta)	Consumo de cangrejos	Neumopatía crónica con tos hemoptoica y hemoptisis. Lesiones pleuro-pulmonares y hepáticas	Quirúrgico e histopatológico.	El paciente falleció	Buitrago <i>et al.</i> (1981)
29 años masculino	Apie (Huila)	Desconocido	Hemoptisis, adinamia y fiebre.	Radiológico. Citología de lavado bronco-alveolar.	Praziquantel y Metronidazol	Gómez <i>et al.</i> (1984)
38 años masculino	desconocido	Desconocido	Quiste pulmonar	Hallazgo accidental durante necropsia		Restrepo (1986)
28 años masculino	San José del Guaviare (Guaviare)	Consumo de cangrejos	Tos, hemoptisis, dolor abdominal, fiebre, eosinofilia y malestar	Toracotomía y patología (patología quirúrgica de pulmón)	Praziquantel	Buitrago <i>et al.</i> (1981)
Comunidades Emberá 24 pacientes (13 hombres y 11 mujeres)	Alto Baudó, Carmen de Atrato, Vigía del Fuerte (Chocó), Murindó, Urrao (Antioquia).	Consumo de cangrejos	Tos, hemoptisis, dolor torácico, disnea	Coprológico. Prueba intradérmica. Radiológico.	Praziquantel	Vélez <i>et al.</i> (2000)
Soldado 21 años masculino	Piedras Blancas, entre Andes (Antioquia) y Chocó.	Consumo de cangrejos	Fiebre, disnea, tos y hemoptisis	Broncoscopia negativa. Toracotomía y patología (patología quirúrgica de pulmón)	N/A	Vélez <i>et al.</i> (2000)
Indígena 18 años masculino	Chocó	Consumo de cangrejos	Tos y hemoptisis	Citología de lavado bronco-alveolar		Uriza <i>et al.</i> (2011)
Indígena 7 años femenino	Carmen de Atrato (Chocó)	Desconocido	Tos, hemoptisis, dolor pleurítico, fiebre intermitente, cefalea ocasional, astenia y adinamia	Coprológico	Praziquantel	Morales <i>et al.</i> (2013)
Indígena 2 años femenino	Dabeiba (Antioquia)	Desconocido	Síndrome de dificultad respiratorio grave	Coprológico	Triclabendazol	Morales <i>et al.</i> (2013)
Indígena 40 años femenino	Buena Vista (Chocó)	Consumo de cangrejos	Tos y hemoptisis	Citología de lavado bronco-alveolar	Praziquantel	Ramírez <i>et al.</i> (2013)

Tabla 1. Características de pacientes con Paragonimiasis en Colombia entre los años 1981 y 2013. Incluye: etiología de la enfermedad, métodos de diagnóstico y tratamientos empleados.

1.5.2. Paragonimus en Colombia

El estudio de focos endémicos de *Paragonimus* spp. en Colombia ha permitido caracterizar diferentes fases del parásito, así como sus hospedadores intermediarios y definitivos (Arias *et al.*, 2011; Casas *et al.*, 2008; Little, 1968; Malek y Little, 1971; Phillips, 2016; Uruburu *et al.*, 2008; Vélez *et al.*, 2003).

En relación con su primer hospedador intermediario, *Paragonimus* spp. han mostrado especificidad por los moluscos del género *Aroapyrgus* (Hydrobiidae), abundantes en los ecosistemas acuáticos colombianos (Casas *et al.*, 2008; Vélez *et al.*, 2003). Como segundos hospedadores intermediarios se han reportado cangrejos de agua dulce nativos, pertenecientes a la familia Pseudothelphusidae (*Strengeria*, *Strengeriana*, *Hypolobocera* y *Neostrengeria*). Recientemente, *Paragonimus* sp. fue reportado en el cangrejo de río *Procambarus clarkii* (Cambaridae), una especie invasora, originaria de Norteamérica (Phillips, 2016). Entre los hospedadores definitivos se encuentran felinos, marsupiales y humanos. En la Tabla 2 se recopila los hospedadores silvestres reportados en Colombia.

Paragonimus caliensis Little, 1968 fue descrita en *Strengeria* sp., *Didelphis marsupialis* y *Philander oposum* recolectados en el corregimiento de Pichindé, zona rural del Valle del Cauca. Little (1968), realizó el estudio morfológico de adultos, huevos y metacercarias, detallando la forma de las gónadas (lobulaciones de ovarios y testículos), y las espinas tegumentarias de los ejemplares adultos; la textura y grosor de la cubierta de los huevos; el sistema excretor, la coloración del parénquima y la presencia de una pared quística delgada en las metacercarias.

Especies de <i>Paragonimus</i>	Hospedadores	Localidad	Autor
	<i>Aroapyrgus colombiensis</i> ^M	Pichindé (Valle del Cauca)	Malek y Little (1971)
<i>P. caliensis</i>	<i>Strengeria</i> sp. ^C		
	<i>Philander opossum</i> ^D	Pichindé (Valle del Cauca)	Little (1968)
	<i>Didelphis marsupialis</i> ^D		
<i>Paragonimus</i> sp.	<i>Leopardus weidii</i> ^D	Putumayo	Little (1968)
<i>Paragonimus</i> sp.	<i>Leopardus pardalis</i> ^D	Desconocido, entre Valle del Cauca y Chocó	Little (1968)
<i>Paragonimus</i> sp.	<i>Puma yagouaroundi</i> ^D	Pichindé (Valle del Cauca)	Little (1968)
<i>P. mexicanus</i> *	<i>Aroapyrgus</i> sp. ^M		
	<i>Hypolobocera bouvieri monticola</i> ^C		
	<i>Hypolobocera emberarum</i> ^C	Urrao (Antioquia)	Vélez <i>et al.</i> (2003)
	<i>Strengeria</i> sp. ^C		Este estudio
	<i>Homo sapiens</i>		
	<i>Felis catus</i> ^D †		
<i>Paragonimus</i> sp.	<i>Hypolobocera bouvieri</i> ^C	Cañasgordas; Envigado; Girardota (Antioquia)	Uruburu <i>et al.</i> (2008)
<i>Paragonimus</i> sp.	<i>Strengeriana fuhrmanni</i> ^C	Ciudad Bolívar; Caramanta; Fredonia (Antioquia)	Uruburu <i>et al.</i> (2008)
<i>Paragonimus</i> sp.	<i>Strengeriana bolivarenses</i> ^C	Hispania (Antioquia)	Uruburu <i>et al.</i> (2008)
<i>Paragonimus</i> sp.	<i>Strengeriana</i> sp. ^C	San Luis (Antioquia)	Uruburu <i>et al.</i> (2008)
<i>P. mexicanus</i>	<i>Aroapyrgus colombiensis</i> ^M		
	<i>Hypolobocera bouvieri</i> ^C	Medellín (Antioquia)	Casas <i>et al.</i> (2008)
	<i>Didelphis marsupialis</i> ^D		presente estudio
<i>Paragonimus</i> sp.	<i>Aroapyrgus colombiensis</i> ^M		
	<i>Hypolobocera bouvieri</i> ^C	Caldas (Antioquia)	Arias <i>et al.</i> (2011)
<i>Paragonimus</i> sp.	<i>Procambarus clarkii</i> ^C	Santa Fe de Bogotá (Cundinamarca)	Phillips (2016)
<i>Paragonimus</i> sp.	<i>Neostrengeria macopa</i> ^C	Gachancipá (Cundinamarca)	Phillips (2016)
<i>Paragonimus</i> sp.	<i>Tayassu pecari</i> ^D	Leticia, Amazonas	presente estudio

Tabla 2. Hospedadores intermediarios y definitivos de *Paragonimus* spp. en Colombia (* foco humano; † infección experimental; ^Mmolusco; ^Ccrustáceo, ^Dmamífero)

Little (1968) describe una segunda especie, recolectada en *Leopardus wiedii* (antes *Felis wiedii*) en el departamento de Putumayo. Esta fue nombrada como *Paragonimus* sp. por su semejanza a la especie africana *P. uterobilateralis*. Su descripción incluye detalles de la forma de las gónadas y forma de las espinas tegumentarias de ejemplares adultos. Los ejemplares tipo fueron depositados en la Colección de Helminthos del Museo de Historia Natural del Instituto Smithsonian, EE. UU. (USNM Helminth Collection Nos. 70987 y 70988).

El hallazgo de focos humanos de paragonimiasis en cinco comunidades indígenas Emberá, motivó el estudio del foco de Valle de Pérdidas, Urrao, Antioquia, con la descripción del ciclo de vida del parásito bajo condiciones experimentales. El agente causal fue sugerido como nueva especie, pero fue nombrada *Paragonimus* sp. debido a los conflictos taxonómicos entre las especies de *Paragonimus* descritas en Latinoamérica (Vélez *et al.*, 2003; Vélez y Velásquez, 2002). Los ejemplares tipo fueron depositados en la Colecciones de Helminthos de Estados Unidos (USNM Helm. Coll. Nos. 1385453 y 1385454 como *Paragonimus emberarum*), y Colombia (Colección Colombiana de Helminthos, CCH.116); cuatro ejemplares fueron fijados y almacenados para estudios moleculares (alcohol 96° a -80°C; PECET, Universidad de Antioquia, Colombia).

Los conflictos taxonómicos de las especies de *Paragonimus* spp. descritas en Latinoamérica se debían principalmente a la variación morfológica observada en las gónadas de los adultos de *P. mexicanus* (Tongu, 2001; Vélez *et al.*, 2003). El reconocimiento de esta variación sugirió a *P. mexicanus* como la única especie presente en Latinoamérica (*P. peruvianus* *P. ecuadoriensis* *P. amazonicus*, *P. inca* y *P. caliensis* como *sinónimos junior*) (Tongu, 2001). Basados en la premisa de la variación morfológica, los ejemplares de Valle de Pérdidas depositados

en la CCH fueron reexaminados e identificados como *P. mexicanus* (Lenis, 2006; Vélez *et al.*, 2009).

En 2008 se evaluó la presencia de metacercarias en cangrejos de agua dulce en 13 municipios de Antioquia, encontrando nueve focos silvestres de *Paragonimus*, uno de estos en Medellín (Uruburu *et al.*, 2008). Esta población fue el primer foco urbano de *Paragonimus* sp. registrado en Colombia. Por su importancia a nivel epidemiológico, los hospedadores silvestres fueron identificados, y los parásitos adultos obtenidos de *Didelphis marsupialis* determinados como *P. mexicanus* (Figura 2, en Casas *et al.*, 2008). Cinco de estos ejemplares adultos fueron almacenados para posteriores estudios morfológicos y moleculares (Casas *et al.*, 2008) en el PECET y depositados en la Colección Colombiana de Helminfos (CCH.116).

En 2016, como parte de esta tesis doctoral, se recolectaron ejemplares de *Paragonimus* sp. en focos silvestres de Leticia, Amazonas y Pichindé, Valle del Cauca (localidad tipo de *P. caliensis*). También se obtuvieron parásitos preservados de las investigaciones de Valle de Pérdidas (Vélez *et al.*, 2003) y Medellín (Casas *et al.*, 2008), depositados en la Colección Colombiana de Helminfos (CCH.116).

2. Objetivos

2.1. Justificación

Actualmente se considera que las especies de *Paragonimus* descritas en Latinoamérica son variantes morfológicas de *P. mexicanus*, siendo este el único agente causal de la paragonimiasis. Sin embargo, nuevos datos morfológicos y moleculares obtenidos a partir de metacercarias de *Paragonimus* en Costa Rica, sugieren que *P. caliensis* es una especie válida (Hernández-Chea *et al.*, 2017). Para corroborar la validez de *P. caliensis* es necesario obtener datos morfológicos y moleculares de ejemplares de su localidad tipo en Pichindé, Valle del Cauca. Estos datos serán útiles para redefinir los rasgos que distinguen a *P. mexicanus* de *P. caliensis* (si se comprueba su validez), dadas las similitudes en la morfología interna de los parásitos adultos y las metacercarias no enquistadas.

El reconocimiento de *P. mexicanus* y posiblemente *P. caliensis* como especies independientes, y el amplio registro de casos humanos y focos silvestres del parásito en las regiones de los Andina, Pacífica y Amazónica, plantea preguntas sobre la diversidad, la distribución geográfica y el estatus taxonómico de los agentes etiológicos de la paragonimiasis humana y animal en Colombia.

Para la presente tesis doctoral, se han obtenido muestras de *Paragonimus* spp. de los trabajos originales de Valle de Pérdidas (Vélez *et al.*, 2003), Medellín (Casas *et al.*, 2008), y se recolectaron ejemplares en los departamentos de Antioquia, Valle del Cauca y Amazonas, con el propósito de caracterizarlas a nivel morfológico y molecular.

2.2. Objetivo general

Determinar el estatus taxonómico de las poblaciones de *Paragonimus* spp. de Urrao y Medellín (Antioquia), Pichindé (Valle del Cauca) y Leticia (Amazonas), Colombia, mediante análisis morfológicos de metacercarias y adultos, y mediante la secuenciación y análisis del marcador molecular ITS2 del ADNr nuclear.

2.2.1. Objetivos específicos

1. Realizar una revisión morfológica de las poblaciones de *Paragonimus* spp. descritas en Urrao (Antioquia) y Medellín (Antioquia), y realizar la descripción morfológica de los ejemplares obtenidos en Pichindé (Valle del Cauca) y Leticia (Amazonas).
2. Evaluar la variación morfológica de las especies de *Paragonimus* presentes en Latinoamérica, mediante el análisis de ejemplares adultos descritos previamente y obtenidas en el presente estudio.
3. Comparar la variación genética de las poblaciones de *Paragonimus* spp. de Colombia con las poblaciones descritas en Centro y Suramérica, mediante el análisis del segundo espaciador interno transcrito del DNA ribosomal (ITS2).
4. Evaluar las relaciones filogenéticas entre las especies de *Paragonimus* de Colombia con las especies/complejos de especies que conforman el género *Paragonimus*.
5. Crear un mapa de distribución morfológico, geográfico y genético del ITS2 de las especies de *Paragonimus* en Latinoamérica.

3. Materiales y métodos

3.1. Consideraciones éticas

Para la obtención de *Paragonimus* spp. adultos y metacercarias se capturaron hospedadores intermediarios y definitivos en estado silvestre. Las capturas se realizaron en doce salidas de campo entre septiembre de 2014 y noviembre de 2016, siguiendo las normativas para la experimentación animal, las cuales se rigen por el “Permiso Marco de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial”, de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales de Colombia (ANLA), y por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales (CEEA) de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Las consideraciones éticas del CEEA para el presente estudio fueron las siguientes:

- Los hospedadores capturados y/o mantenidos en laboratorio permanecieron en condiciones ambientales (aire, temperatura, humedad e iluminación) y sanitarias (lugar y densidad de alojamiento, calidad de la comida) controladas.
- Los métodos de eutanasia y/o disposición final de los animales vivos o muertos fueron avalados por el CEEA.
- Los hospedadores capturados hembras y con crías fueron liberados.
- La presencia de *Paragonimus* sp. en los mamíferos capturados se confirmó mediante métodos alternativos, para evitar así su sacrificio. Como métodos alternativos se realizaron análisis coprológicos de marsupiales, se examinaron marsupiales que fallecieron a causa de atropellamientos y se examinaron pecaríes cazados para consumo por pobladores locales.

3.2. *Material biológico*

Para la presente investigación se han procesado y analizado un total de 62 ejemplares de *Paragonimus* sp., los cuales proceden de cuatro localidades colombianas (Figura 8; Tabla 3). Los ejemplares adultos de Urrao y Medellín fueron obtenidos de la Colección Colombiana de Helmintos, registrada en el Instituto Alexander von Humboldt, y depositada en el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Antioquia -PECET. Los ejemplares de *Paragonimus* sp. de las localidades de Medellín (metacercarias), Pichindé (metacercarias) y Amazonas (adultos) fueron recuperados de sus hospedadores silvestres en el presente estudio, y procesados para análisis morfológicos y moleculares.

La obtención de parásitos fue realizada en el PECET, Medellín, Colombia, en zona rural de Pichindé, y en el Laboratorio de Salud Pública de Leticia, Amazonas, Colombia. La caracterización morfológica y molecular fue realizada en el PECET y en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universitat de Valencia, España.



- Valle de Pérdidas, Antioquia
- Medellín, Antioquia
- Pichindé, Valle del Cauca
- Leticia, Amazonas

Figura 8. Mapa político de Colombia. Se muestra la procedencia y distribución de los ejemplares de *Paragonimus* spp. analizados en el presente estudio. Los ejemplares fueron recolectados en la Región Andina (Medellín), la Región Pacífica (Valle de Pérdidas y Pichindé) y la Región Amazónica (Leticia).

Especie	Hospedador	Localidad (Procedencia, municipio, departamento)	Ambiente	Tratamiento			Fuentes	
				MIC	MEB	MOL	CCH.116	Autores
<i>P. mexicanus</i> (n=12)	Homo sapiens / <i>Felis catus</i> *	Valle de Pérdidas, Urrao, Antioquia 6°32'3"N; 76°20'99"W	S	8	-	4	83	Vélez <i>et al.</i> , (2003)
<i>P. caliensis</i> (n=5)	<i>Didelphis marsupialis</i>	Quebrada la Puerta, Medellín, Antioquia 6°17'08.9"N; 75°36'38.8"W	U	3	-	2	107	Casas <i>et al.</i> , (2008)
<i>P. caliensis</i> (n=26)	<i>Hypoboscera bouvieri</i>	Quebrada la Puerta, Medellín, Antioquia 6°17'08.9"N; 75°36'38.8"W	U	7	15	4	-	Este estudio
<i>P. caliensis</i> (n=8)	<i>Strengeria</i> sp.	Río Pichindé, Pichindé, Valle del Cauca 3°26'02.1"N; 76°37'00.1"W	R	7	-	8	-	Este estudio
<i>P. mexicanus</i> (n=18)	<i>Tayassu pecari</i>	Kilómetro 18, Leticia, Amazonas 69°57'10"O; 04°12'13"S	S	10	4	4	152	Este estudio

Tabla 3. Ejemplares de *Paragonimus* spp. analizados en el presente estudio. Se indica: total de ejemplares de cada especie de *Paragonimus* (n); hospedador; localidad; ambiente del que provienen los hospedadores, S= selvático, R= rural, U= urbano; procedencia (localidad); número de ejemplares en cada tratamiento, MIC= microscopía óptica, MEB= Microscopía electrónica de barrido, MOL= análisis molecular; y CCH.116 = número de lote en Colección Colombiana de Helminthos. Los ejemplares de *P. caliensis* de Pichindé analizados por morfología, fueron también procesados para estudios moleculares. *Ejemplares adultos obtenidos de infección experimental de *Felis catus*, procedentes de metacercarias recolectadas en el foco humano de Valle de Pérdidas.

3.3. Métodos

3.3.1. Hospedadores intermediarios

3.3.1.1. Recolecta de cangrejos

Los cangrejos fueron recolectados manualmente, mediante la búsqueda de cuevas, remoción de piedras y hojarasca en afluentes de agua pequeños y quebradas. Los cangrejos se ubicaron en recipientes plásticos de forma individual, ya que son territoriales y se lastiman entre sí. Cada recipiente contenía agua (entre 2cm – 3cm de altura) y hojarasca de la zona. Los ejemplares recolectados se mantuvieron en lugar fresco, evitando el sol directo mientras se trasladaban al laboratorio. No se recolectaron cangrejos hembra en estado de gravidez. Para el mantenimiento de los cangrejos se realizó recambio con agua declorinada cada 8 horas, y se les alimentó con comida para peces. Los cangrejos recolectados fueron transportados vivos al laboratorio del PECET, donde fueron procesados para la búsqueda de metacercarias de *Paragonimus*.

3.3.1.2. Búsqueda de metacercarias

Los cangrejos instalados individualmente en acuarios del PECET, fueron procesados para la búsqueda de metacercarias. Los cangrejos se sacrificaron mediante choque térmico (4°C por 5 min), e inmediatamente se separaron el cefalotórax y el sistema digestivo, y ubicaron en placas de Petri con solución salina (0,6%). Los tejidos se separaron finamente con bisturí y se examinaron cuidadosamente con un estereomicroscopio para la búsqueda de metacercarias, con recambios continuos de solución salina. Se examinó el sistema digestivo, la musculatura y los libros pulmonares. Las metacercarias obtenidas fueron inmediatamente observadas al microscopio óptico,

medidas y fotografiadas. Posteriormente las metacercarias recuperadas fueron contadas y procesadas para estudios morfológicos (preservados en 70% de etanol para microscopía óptica, y en 2,5% de glutaraldehído para microscopía electrónica de barrido) y análisis moleculares (etanol al 100%).

En el presente estudio se recolectaron 40 cangrejos de muestreos realizados en Medellín, Pichindé y Leticia, Colombia (Figura 9; Tabla 4). Se determinaron dos especies de cangrejos en base a la morfología del caparazón y los gonópodos, siguiendo la clave taxonómica de Campos (2014): *Valdivia serrata* (n=13) e *Hypolobocera bouvieri* (n=17); en localidades de Amazonas y Medellín, respectivamente. Los cangrejos recolectados en Pichindé como *Strengeria* sp. (n=10) fueron determinados hasta género. Se aislaron 204 metacercarias de *H. bouvieri* (n= 193) y *Strengeria* sp., (n= 11) en las localidades de Medellín y Pichindé, respectivamente. Estas fueron encontradas en hepatopáncreas y porción final del intestino, pero no en músculos ni libros pulmonares de los hospedadores. Se aislaron dos tipos de metacercarias, la mayoría libres y muy activas en los tejidos del hospedador, las cuales se nombraron como “metacercarias no enquistadas” (81.6 %). Las demás estaban rodeadas por una membrana delgada, que rompían fácilmente y de forma espontánea, estas se nombraron como “metacercarias enquistadas” (8.4 %). Los ejemplares de Leticia (*V. serrata*) fueron negativos para metacercarias de trematodos, pero positivos para helmintos de la clase Turbellaria (*Temnocephala* sp.).

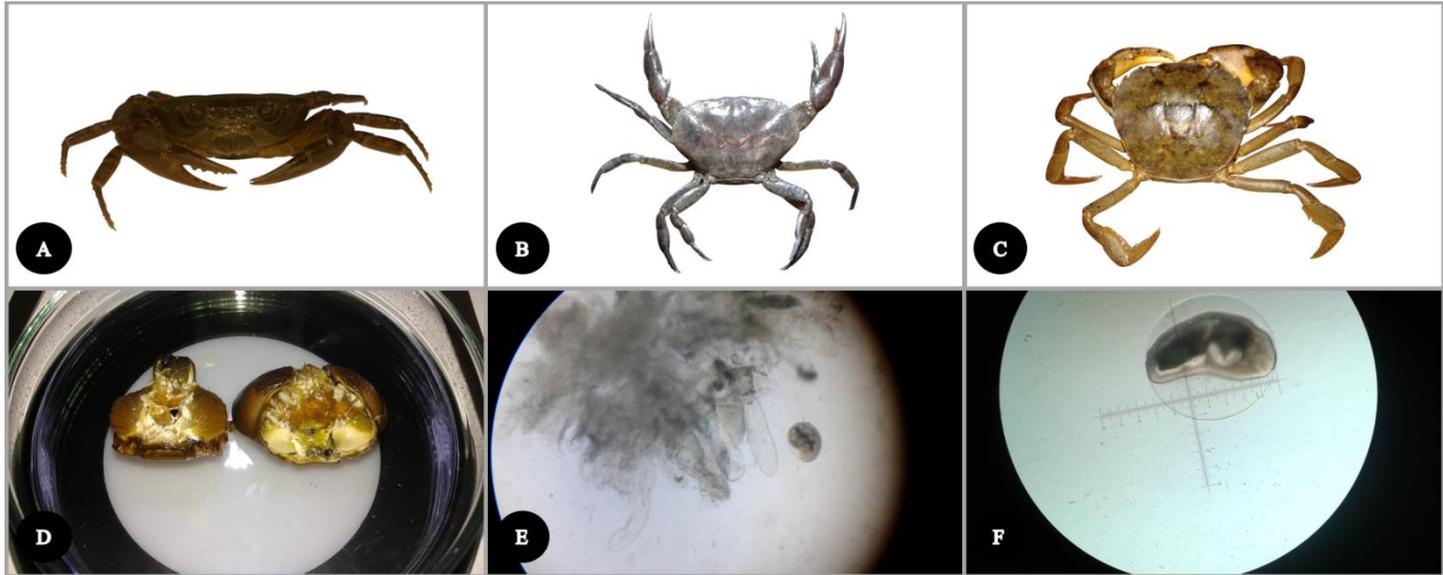


Figura 9. Búsqueda de metacercarias de *Paragonimus* sp. en cangrejos. (A) *Hypolobocera bouvieri*. (B) *Strengeria* sp. (C) *Valdivia serrata*. (D) Examen de órganos internos de cangrejos. (E) Metacercaria de *Paragonimus* sp. en hepatopáncreas. (F) Estudio morfológico de las metacercarias.

Localidad	Especie (Familia)	Prevalencia (cangrejos infectados/ cangrejos examinados) *100	Tipo de metacercaria	Tratamiento		
				MIC	MEB	MOL
Antioquia Quebrada La Puerta (Medellín)	<i>Hypolobocera bouvieri</i> (Pseudothelphusidae)	5/17 (29.41 %)	179 (93.3 %) No enquistadas	14	13	3
			14 (6.7 %) Enquistadas	5	2	2
Valle del Cauca Río Pichindé (Pichindé, Cali)	<i>Strengeria</i> sp. (Pseudothelphusidae)	2/10 (20 %)	8 (72.7 %) No enquistadas	7	-	2
			3 (27.3 %) Enquistadas	3	-	3
Amazonas Kilómetro 1 Kilómetro 11 (Leticia)	<i>Valdivia serrata</i> (Trichodactylidae)	0/5 0/8	- -	- -	- -	- -

Tabla 4. Metacercarias de *Paragonimus* sp. recolectadas en el presente estudio. Hospedador intermediario, prevalencia y tipo de metacercaria encontrada (con quiste o sin pared del quiste). Tratamientos sufridos (MIC: microscopio óptico; MEB: microscopio electrónico de barrido; MOL: estudio molecular)

3.3.2.. Hospedadores definitivos

3.3.2.1. Captura de mamíferos

Para la captura de marsupiales se utilizaron trampas Tomahawk y cebo (mantequilla de cacahuete, plátanos maduros y sardinas). Los marsupiales capturados en zonas de bosque fueron sacrificados mediante anestesia (Ketamina/Xilacina, ketamina a 30 mg/Kg y Xilacina a 0,5 mg/Kg), y sobredosis de pentobarbital sódico (Eutanex a 1mL por cada 5 Kg de peso). Los marsupiales capturados en zonas urbanas y cercanas a cabeceras municipales fueron examinados por métodos copro-parasitológicos; técnica de sedimentación de Lumberas, modificada de Salazar (2014). Los ejemplares negativos para huevos del parásito y/o con cría fueron liberados según los protocolos del CEEA. Por último, se analizaron marsupiales que fallecieron a causa de atropellamientos en el barrio Robledo de Medellín, y que fueron reportados por D. Juan Manuel Obando MSc, Universidad Nacional del Colombia, a través de la aplicación TAYRA (Transporte, Animales y Registro de Atropellamientos) de Aburrá Natural, Colombia.

Los pecaríes analizados en el presente estudio se encontraban migrando en manada de aproximadamente 200 individuos (com. per. cazadores), en dirección Loreto Yaco a Puerto Nariño (kilómetro 18), en el municipio de Leticia (Amazonas). Siete ejemplares fueron cazados por residentes locales para el consumo de carne y uso tradicional de su piel.

3.3.2.2. Búsqueda de adultos

Para la búsqueda de ejemplares adultos de *Paragonimus* se analizaron en total 26 mamíferos (Figura 10; Tabla 5) de las especies *Didelphis marsupialis* (n=18), *Philander opossum* (n=1) (Didelphidae) y *Tayassu*

pecari (n=7) (Tayassuidae). Se obtuvieron 10 marsupiales por captura con trampa Tomahawk, 9 marsupiales por atropellamiento en carretera (TAyRA), y 7 pecaríes por caza de habitantes de la zona para consumo tradicional de su carne. De diez marsupiales capturados con trampa, tres se recolectaron en Leticia (dos fueron sacrificados en campo y una fue liberada por tener crías en el marsupio), cuatro en Robledo, Medellín (tres negativos para huevos de *Paragonimus* y una hembra positiva para huevos de *Paragonimus* con crías en el marsupio fueron liberados), tres en Pichindé (todos fueron negativos para huevos de *Paragonimus* y liberados). Los marsupiales notificados por TAYRA, que presentaban tórax completo, fueron inmediatamente recogidos, trasladados al laboratorio del PECET, y examinados para la presencia de parásitos en pulmón. Todos fueron negativos para *Paragonimus*.

La veterinaria Dña. Juliana Jaramillo, del PECET, acompañó el sacrificio de los pecaríes y evaluó la presencia de quistes pulmonares. Los pulmones que presentaron masas quísticas fueron remitidos al laboratorio de Salud Pública de Leticia para su análisis. La trematóloga Dra. Imelda Vélez, PECET, acompañó la evaluación de los pulmones y la recuperación de los *Paragonimus* adultos (n=18). Estos se fijaron para estudios morfológicos y moleculares (en etanol al 70% para microscopía; glutaraldehído al 2.5% para estudios en microscopía electrónica de barrido; y etanol al 96% para estudios moleculares).

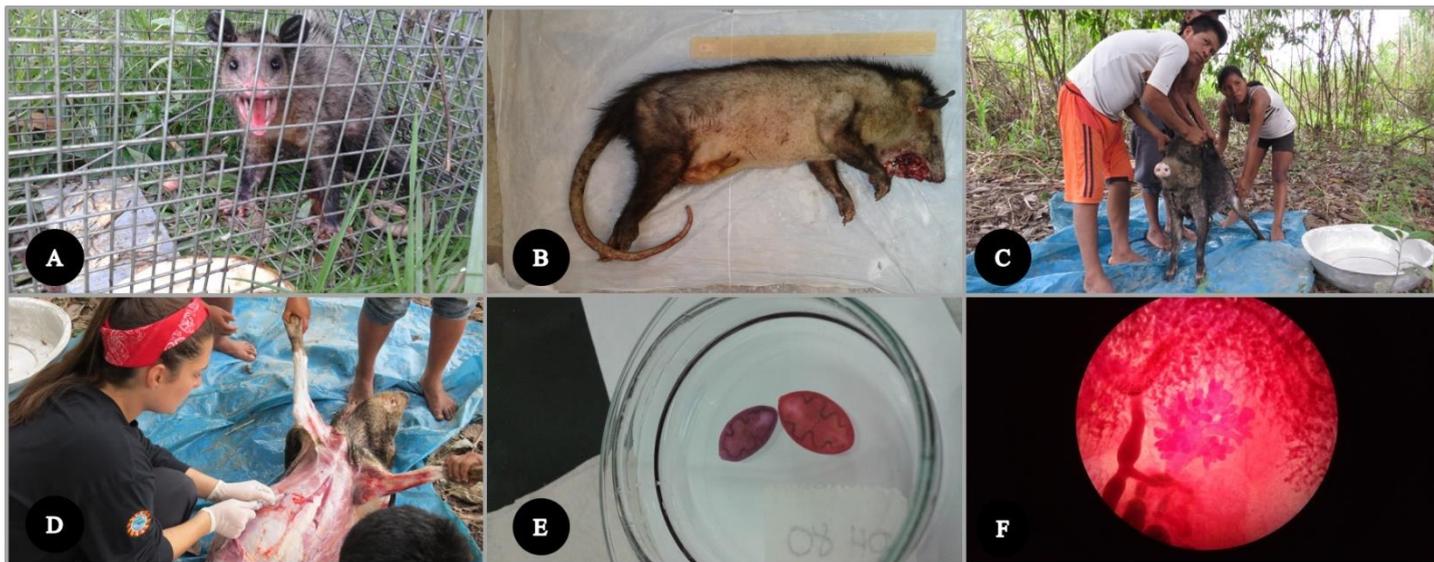


Figura 10. Búsqueda de adultos de *Paragonimus* sp. en hospedadores definitivos. (A) *Didelphis marsupialis* capturada en Pichindé. (B) *D. marsupialis* atropellada y notificada por TAYRA en Medellín. (C-D) *Tayassu pecari* cazado por pobladores en Leticia. (E-F) *Paragonimus* sp. adultos obtenidos de pulmones de *T. pecari* y procesados para su estudio morfológico

Localidad	Hospedador (número de ejemplares recolectados, especie y género)	Prevalencia	Método de captura			Tratamiento del hospedador		
		mamíferos infectados/ mamíferos examinados (*100)	Trampa	TAyRA (Autopsia)	Caza	Coprología	Liberación	Sacrificio/ Autopsia
Antioquia Barrio Robledo (Medellín)	<i>D. marsupialis</i> (4 ♀; 7 ♂)	1/11 (9,09 %)	4	7	-	4	4	7
	<i>D. marsupialis</i> (2 ♂)	0/2	-	2	-	-	-	2
Valle del Cauca Río Pichindé (Pichindé)	<i>D. marsupialis</i> (1 ♀; 2 ♂)	0/3	3	-	-	3	3	-
Amazonas Kilómetro 18 (Leticia)	<i>D. marsupialis</i> (2 ♂)	0/2	2	-	-	-	-	2
	<i>P. opossum</i> (1 ♀)	0/1	1	-	-	1	1	-
	<i>T. pecari</i> (1 ♀; 6 ♂)	1/7 (14,2 %)	-	-	7	-	-	7
Total	26 mamíferos recolectados	7,69%	10	9	7	8	8	18

Tabla 5. Ejemplares adultos de *Paragonimus* sp. recolectados en el presente estudio. Hospedadores analizados, prevalencia, método de captura y tratamiento de los hospedadores.

3.3.2.3. Búsqueda de huevos

Para confirmar la presencia de ejemplares de *Paragonimus* sp. adultos en marsupiales, se utilizó la técnica de sedimentación de Lumbreras (Maco Flores *et al.*, 2002), modificada de Salazar (2014), la cual es utilizada en el PECET para el diagnóstico de paragonimiasis humana (Figura 11). A continuación, se describen los pasos de esta técnica:

1. Para cada marsupial se tomaron 2 g de heces y se diluyeron en 100 mL de agua corriente, homogeneizando bien la muestra.
2. La muestra homogeneizada se pasó a través de un tamiz (malla de 250 μm) y un embudo a un vaso de precipitados de 500 mL.
3. Se ajustó la cantidad de agua hasta alcanzar un volumen de 300 mL; se dejó reposar 30 min.
4. El sobrenadante se descartó, y se adicionó agua corriente hasta completar de nuevo 300 mL, de dejó reposar 15 min.
5. El paso número 5 se repitió 4-5 veces hasta que el agua del sobrenadante se observó clara.
6. Después del último lavado, el precipitado fue vaciado en una placa de Petri, y se adicionaron 5 mL de agua destilada para la búsqueda de huevos de *Paragonimus* sp. al estereomicroscopio.
7. Para el análisis morfológico de los huevos de *Paragonimus* sp., se realizaron montajes en fresco. Los huevos fueron medidos, fotografiados y fijados con formalina al 10% para estudios morfológicos. Los marsupiales negativos para huevos de *Paragonimus* sp., fueron liberados en las zonas donde fueron capturados.

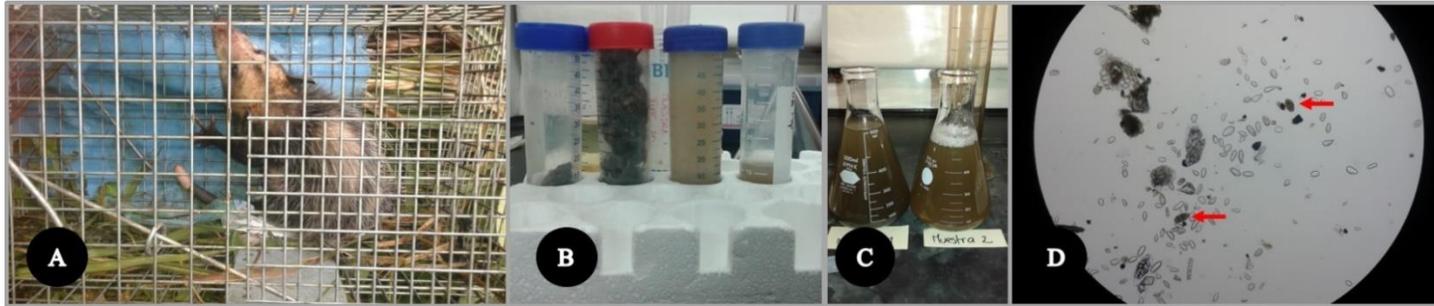


Figura 11. Búsqueda de huevos de *Paragonimus* sp. en marsupiales. (A) *Didelphis marsupialis* hembra con crías en el marsupio. (B) Muestra de heces de hospedador definitivo. (C) Técnica de sedimentación de Lumbreras. (D) Huevos de *Paragonimus* sp.

3.3.3. Caracterización morfológica

3.3.3.1. Montaje de placas permanentes

Los trematodos adultos recuperados de *T. pecari* en Leticia Amazonas, fueron procesados como placas permanentes para estudios morfológicos de la siguiente forma:

- Cada ejemplar fue aplanado delicadamente entre dos portaobjetos y fijados en etanol al 70%.
- Una vez fijados etanol al 70%, fueron hidratados en secuencias graduales de alcohol (70%, 50%, 30%, 10%) y transferidos a agua.
- Se aplicaron los colorantes carmín bórax (n= 3), y carmín de Meyer (n=5) acuosos. El exceso de colorante se eliminó con agua y ácido clorhídrico (1%).
- Tras la coloración, cada parásito fue deshidratado en secuencias de alcoholes (10%, 20%, 35%, 70%, 80%, 90%, 100%).
- Para el aclarado, los parásitos fueron transferidos desde alcohol (100%) a una secuencia alcohol/salicilato de metilo en proporción (4/1, 3/2, 2/3, 1/4) y salicilato de metilo (100%).
- Finalmente, cada ejemplar fue transferido de salicilato de metilo (100%), a una mezcla de salicilato de metilo/bálsamo de Canadá (50/50), y finalmente en bálsamo de Canadá como montaje permanente.
- Los preparados se depositaron en la Colección Colombiana de Helmintos (CCH.116).

3.3.3.2. Microscopía óptica

Para la caracterización morfológica de ejemplares adultos y metacercarias de *Paragonimus* se empleó un microscopio Nikon Alphaphot YS-2, con reglilla graduada y cámara lúcida incorporada (PECET). Los datos se expresan en el siguiente orden: L: largo; A: ancho; mínimo-máximo (promedio \pm desviación estándar). Las ilustraciones fueron editadas en el programa Inkscape 0.92 (Inkscape.Ink)

Para la identificación de los trematodos adultos (Figura 12), se evaluaron los siguientes aspectos:

- Tamaño (largo por ancho) del cuerpo, ventosas, faringe, ovario, testículos y huevos.
- Forma del ovario, testículos y huevos.
- Relación de tamaño: largo del ovario/largo de los testículos.
- Agrupación entre el cuerpo central del ovario y de los testículos, y sus prolongaciones o lóbulos (compactos y distendidos).
- El grado de lobulación del ovario y de los testículos (cuerpo central con lóbulos en 1°, 2° o 3°)
- La forma de los lóbulos del ovario (digitiforme, globular, coralino y dendrítico)
- La forma de los lóbulos de los testículos (redondeados, globulares, como astas cortas, como astas largas).

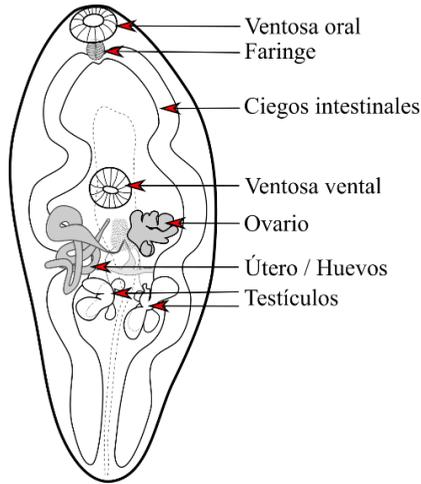


Figura 12. Anatomía interna del ejemplar tipo de *Paragonimus caliensis*. Caracteres morfológicos evaluados en el presente estudio (modificado de Little, 1968).

Para la descripción de las metacercarias de *Paragonimus* sp. (Figura 13) se evaluaron los siguientes aspectos:

- Color del parénquima, presencia/ausencia de pared quística y forma de la metacercaria dentro del quiste.
- Tamaño (largo por ancho) del cuerpo, las ventosas y quiste.

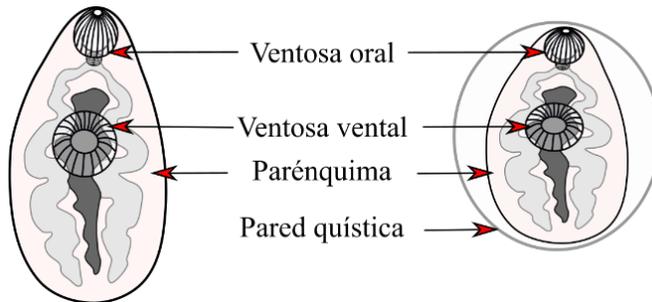


Figura 13. Anatomía interna de las metacercarias de *Paragonimus* sp. Caracteres morfológicos evaluados en el presente estudio.

3.3.3.3. Microscopía electrónica de barrido

Las metacercarias almacenadas en glutaraldehído al 2.5% fueron procesadas y examinadas en el microscopio electrónico de barrido Hitachi S-4800, en el Servicio de Microscopía, Servicios Centrales de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE), de la Universitat de València. Estas fueron deshidratadas en secuencias de alcoholes (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, 90%, 100%), secadas hasta punto crítico con CO₂ y recubiertas con una mezcla de oro y paladio. Se examinaron las siguientes estructuras (Figura 14) de la superficie tegumentaria de las metacercarias:

- Forma y distribución de espinas.
- Tipo de papilas: domo grande (LP) y domo pequeño (SP).
- Número de papilas internas (IP), medias (MP) y externas (OP) en la región de la ventosa ventral.

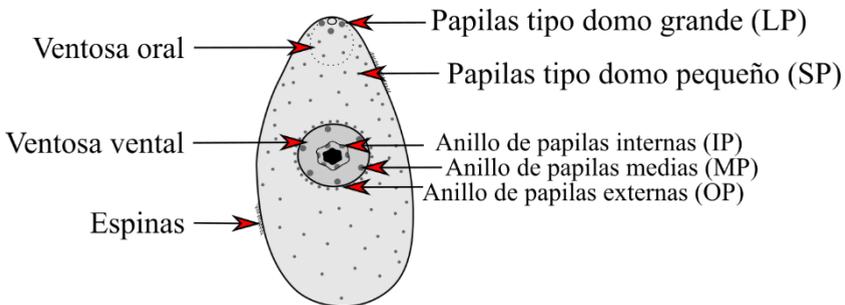


Figura 14. Estructuras presentes en la superficie de las metacercarias de *Paragonimus* sp. y analizadas por microscopía electrónica de barrido en el presente estudio. Las IP/MP corresponden a papilas LP; las OP corresponden a papilas tipo SP.

3.3.4. Caracterización molecular

3.3.4.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de fragmentos de tejido de parásitos adultos y metacercarias completas. Para la extracción de ADN se usaron las técnicas Fenol/cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989) para los ejemplares de Medellín y Pichindé; y el kit comercial ZR Genomic (DNA™-Tissue MiniPrep, Zymo Research) siguiendo el protocolo del fabricante, para los ejemplares de Urrao y Amazonas. La verificación de la extracción de ADN y se comprobó mediante gel de agarosa de 2 % con una tinción de GelRed (Biotium).

3.3.4.2. Amplificación y secuenciación

Para la amplificación del segundo espaciador interno transcrito ribosomal (ITS2) del ADN nuclear se utilizaron los cebadores utilizados por Iwagami *et al.* (2000), cuyas secuencias son ITS-F (5'-CGGTGGATCACTCGGCTCGT-3') e ITS-R (5'CCTGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGC-3'). Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo con el protocolo sugerido por López-Caballero *et al.* (2013), modificado; estas se realizaron con 2 µL del DNA extraído en reacciones de 25 µL, usando concentraciones finales de cada reactivo de la siguiente manera: [2.5 µL de 10x tampón de PCR , 2.5 µL de 2 mM de mezcla de dNTPs (200 µM cada uno), 1.0 µL de cada cebador (10 pmol/µL), 1.0 µL de MgCl₂ (50 mM), 2 µL de DNA, 0.125 µL de Taq DNA polimerasa 500 U (5 U/µL), y agua libre de nucleasas hasta alcanzar 25 µL de reacción de PCR]. Los ciclos de PCR se realización bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial (94°C, 1 min) seguido de 40 ciclos [desnaturalización (95°C, 30 s), alineamiento (50°C, 1 min), y extensión (72°C, 1 min)], y un paso de extensión final (72°C, 5 min).

Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos con Bromuro de Etidio. Las secuencias de Medellín fueron purificadas con el kit de purificación QIAquick (Qiagen Inc.), y secuenciadas en SCSIE, Universitat de València, en un sistema ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), usando un BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Los productos de PCR de las localidades de Urao, Pichindé y Leticia fueron purificados y secuenciados en la empresa MACROGEN (South Korea).

3.3.4.3. Análisis de las secuencias

Los cromatogramas de las secuencias se editaron usando el programa BioEdit (v7.0.5) (Hall, 1999). Para determinar los porcentajes de identidad de estas secuencias, se utilizó la herramienta BLASTn en la base de datos GenBank. Los alineamientos múltiples se realizaron en Clustal Omega (EMBL-EBI 2017; Thompson *et al.*, 1997). De 20 secuencias de ITS2 obtenidas en el presente estudio, ocho corresponden a *P. mexicanus* y doce corresponden a *P. caliensis*. Los datos moleculares por localidad y número de acceso en GenBank se presentan en la Tabla 6.

3.3.4.4. Análisis filogenéticos

Para la caracterización molecular se identificaron los haplotipos de ITS2 de *P. mexicanus* y de *P. caliensis* de secuencias de Colombia (presente estudio) y de Latinoamérica disponibles en la base de datos del GenBank (Tabla 7). Las posiciones variables de cada haplotipo del ITS2 y las distancias genéticas entre los haplotipos fueron calculadas en MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

El árbol filogenético fue inferido usando el software MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016), con el método de Máxima Verosimilitud a partir del modelo de sustitución de nucleótidos Kimura 2-parámetros (K2P) (Kimura, 1980) con un *bootstrap* de 1000 réplicas. Se tomó como grupo externo a *P. westermanni*. Finalmente, se presenta la distribución geográfica actual y potencial de *P. mexicanus* y *P. caliensis* en Latinoamérica con base haplotipos de ITS2 y los datos disponibles en la literatura (Tablas 6 y 7).

Especie	Localidad	Estadio	Hospedador	ITS2 GenBank	Fuente de material
<i>P. mexicanus</i>	Urrao	A	<i>F. catus</i>	KY950522	Vélez <i>et al.</i> , (2003)
<i>P. mexicanus</i>	Urrao	A	<i>F. catus</i>	KY950523	Vélez <i>et al.</i> , (2003)
<i>P. mexicanus</i>	Urrao	A	<i>F. catus</i>	KY950524	Vélez <i>et al.</i> , (2003)
<i>P. mexicanus</i>	Urrao	A	<i>F. catus</i>	KY950525	Vélez <i>et al.</i> , (2003)
<i>P. mexicanus</i>	Amazonas	A	<i>T. pecari</i>	KY021191	presente estudio
<i>P. mexicanus</i>	Amazonas	A	<i>T. pecari</i>	KY021192	presente estudio
<i>P. mexicanus</i>	Amazonas	A	<i>T. pecari</i>	KY021193	presente estudio
<i>P. mexicanus</i>	Amazonas	A	<i>T. pecari</i>	KY021194	presente estudio
<i>P. caliensis</i>	Medellín	A	<i>D. marsupialis</i>	KY950531	Casas <i>et al.</i> , (2008)
<i>P. caliensis</i>	Medellín	A	<i>D. marsupialis</i>	KY950532	Casas <i>et al.</i> , (2008)
<i>P. caliensis</i>	Medellín	M ^Q	<i>H. bouvieri</i>	KX512827	presente estudio
<i>P. caliensis</i>	Medellín	M ^{NQ}	<i>H. bouvieri</i>	KX512828	presente estudio
<i>P. caliensis</i>	Medellín	M ^{NQ}	<i>H. bouvieri</i>	KX512829	presente estudio
<i>P. caliensis</i>	Medellín	M ^{NQ}	<i>H. bouvieri</i>	KX512830	presente estudio
<i>P. caliensis</i>	Medellín	M ^Q	<i>H. bouvieri</i>	KX512831	presente estudio
<i>P. caliensis</i>	Pichindé	M ^{NQ}	<i>Strengeria</i> sp.	KY950526	presente estudio
<i>P. caliensis</i>	Pichindé	M ^{NQ}	<i>Strengeria</i> sp.	KY950527	presente estudio
<i>P. caliensis</i>	Pichindé	M ^Q	<i>Strengeria</i> sp.	KY950528	presente estudio
<i>P. caliensis</i>	Pichindé	M ^Q	<i>Strengeria</i> sp.	KY950529	presente estudio
<i>P. caliensis</i>	Pichindé	M ^Q	<i>Strengeria</i> sp.	KY950530	presente estudio

Tabla 6. Ejemplares de *Paragonimus* spp. secuenciados en el presente estudio. Incluye: especie, localidad, estado de desarrollo del parásito, número de acceso en GenBank y fuente de material biológico. A: ejemplares adultos; M^Q: metacercaria enquistada; M^{NQ}: metacercaria no enquistada.

Especie	Localidad	ITS2 GenBank
<i>P. africanus</i>	Bulutu/Camerún	AB298779
<i>P. africanus</i>	Nigeria	KR780065
<i>P. bangkokensis</i>	Surat Thani/Tailandia	AB248091
<i>P. caliensis</i>	Alajuela/Costa Rica	KX379703
<i>P. caliensis</i>	Alajuela/Costa Rica	KX379704
<i>P. caliensis</i>	Alajuela/Costa Rica	KX379705
<i>P. caliensis</i>	Alajuela/Costa Rica	KX379706
<i>P. caliensis</i>	Limón/Costa Rica	KX379702
<i>P. caliensis</i>	Puntarenas/Costa Rica	KX379712
<i>P. harinasutai</i>	Saraburi/Tailandia	AB354219
<i>P. heterotremus</i>	Manipur/India	AB308377
<i>P. heterotremus</i>	Da Krong Nature Reserve/Vietnam	LC025643
<i>P. kellicotti</i>	Estados Unidos	AF159606
<i>P. kellicotti</i>	Missouri/Estados Unidos	HQ900670
<i>P. macrorchis</i>	Khammouane/República Democrática Popular Lao	JX286650
<i>P. macrorchis</i>	Khammouane/República Democrática Popular Lao	KP784352
<i>P. mexicanus</i>	Orellana, Nuevo Rocafuerte/Ecuador	AB968080
<i>P. mexicanus</i>	Esmeraldas, La Concordia/Ecuador	AF159607
<i>P. mexicanus</i>	Esmeraldas/Ecuador	AF538945
<i>P. mexicanus</i>	Santa Rosa/Guatemala	AF538946
<i>P. mexicanus</i>	Chiapas/México	KC562247
<i>P. mexicanus</i>	Colima/México	KC562260
<i>P. mexicanus</i>	Colima/México	KC562264
<i>P. mexicanus</i>	Colima/México	KC562270
<i>P. mexicanus</i>	Veracruz/México	KC562275
<i>P. mexicanus</i>	Veracruz/México	KC562277
<i>P. mexicanus</i>	Limón/Costa Rica	KX379697
<i>P. mexicanus</i>	Puntarenas/Costa Rica	KX379709
<i>P. mexicanus</i>	Puntarenas/Costa Rica	KX379710
<i>P. mexicanus</i>	Pichincha/Ecuador	LC149729
<i>P. mexicanus</i>	Pedernales/Ecuador	LC317061
<i>P. microrchis</i>	Yunnan/China	HM627201
<i>P. miyazakii</i>	Wakayama/Japón	AB629937
<i>P. ohirai</i>	Miyazaki/Japón	AB713406
<i>P. proliferus</i>	Quang Binh/Vietnam	AB663672
<i>P. pseudoheterotremus</i>	Kanchanaburi/Tailandia	EF014340
<i>P. siamensis</i>	Prachin Buri/Tailandia	AB354222
<i>P. skrjabini</i>	Manipur/India	AB325516
<i>P. vietnamensis</i>	Yenbai/Vietnam	AB270690
<i>P. vietnamensis</i>	Yenbai/Vietnam	AB270694
<i>P. westermani</i>	Assam/India	JN656200
<i>P. westermani</i>	Haenam/Korea del Sur	AF333278

Tabla 7. Secuencias de ITS2 de *Paragonimus* spp. usadas para los análisis filogenéticos. Especies, orígenes geográficos y número de acceso en GenBank de secuencias de ADN previamente publicadas.

4. Resultados

En la presente tesis doctoral se han aplicado técnicas morfológicas y moleculares para identificar cuatro poblaciones de *Paragonimus* localizadas en cuatro puntos distantes de Colombia. Como resultado, dos especies de *Paragonimus* han sido identificadas, la primera como *P. caliensis* en las localidades de Pichindé (Valle del Cauca) y Medellín (Antioquia), y la segunda como *P. mexicanus* en las localidades de Urrao (Antioquia) y Leticia (Amazonas).

En este capítulo se describen los aspectos de importancia taxonómica tanto morfológicos como moleculares, que permiten la diferenciación a nivel de especie de *P. caliensis* y *P. mexicanus*. Posteriormente, se detallan para cada especie, los resultados morfológicos, moleculares, filogenéticos, así como de distribución actual y potencial.

4.1. Caracterización morfológica

Para evaluar los rasgos morfológicos específicos que permiten la diferenciación de *P. caliensis* y *P. mexicanus*, se analizaron los estadios de desarrollo metacercaria, huevo y adulto recolectados por Little (1968), Vélez *et al.* (2003) y Casas *et al.* (2008), y en el presente estudio. Estos son los hallazgos:

Metacercarias: las metacercarias de *P. caliensis* y de *P. mexicanus* ya reportadas en la literatura (Casas *et al.*, 2008; Hernández-Chea *et al.*, 2017; Little, 1968; Vélez *et al.*, 2003) y en el presente estudio, no se diferencian en el tamaño del cuerpo y de las ventosas, ni por el patrón de papilas en la región acetabular. El carácter de importancia taxonómica es la presencia de membrana del quiste en *P. caliensis* (Figura 15a) y la ausencia de membrana del quiste en *P. mexicanus* (Figura 16a). Cabe destacar que las metacercarias de *P. caliensis* se encuentran en su mayoría no enquistadas en el hospedador.

Huevos: *P. caliensis* y *P. mexicanus* no se diferencian en el rango de tamaño de los huevos (Figs. 15c-d, 16b-d). Sin embargo, se observan tres morfotipos de huevos, estos varían en la amplitud de la zona media (ancho de los huevos). *Paragonimus caliensis* presenta dos morfotipos de huevos: ovalados (Figura 15c) y redondeados (Figura 15d); mientras que *P. mexicanus* presenta tres morfotipos de huevos: alargado (Figura 16b), ovalados (Figura 16c) y redondeados (Figura 16d).

Adultos: se analizaron dos rasgos, *tamaño de las gonadas y forma de las gónadas*. Ambos rasgos fueron informativos a nivel taxonómico.

El *tamaño de las gónadas*, y en concreto, la relación entre el largo del ovario y el largo de los testículos, permite diferenciar a *P. caliensis* de *P. mexicanus*. En *P. caliensis* los testículos son de tamaño semejante o más pequeños que el ovario (Figura 15d-f; relación largo Ov/Te 1.15-1.36), mientras que en *P. mexicanus* los testículos son de tamaño semejante o más largos que el ovario (Figura 16e-h; relación largo Ov/Te: rango 0.41-1.04 en ejemplares de Cajamarca, Perú (Ibañez *et al.*, 1974); Ov/Te rango: 0.55-0.72 para ejemplares de Leticia, Colombia; Ov/Te rango: 0.52-0.57 para ejemplares de Valle de Pérdidas, Colombia).

La *forma de las gónadas* permite identificar variantes morfológicas a nivel intraespecífico. Se identificaron tres variantes morfológicas de *P. caliensis*, dos en Colombia y una en Guatemala (Figura 15e-g), y once variantes morfológicas de *P. mexicanus*, cinco en México y seis en Suramérica (Figura 16e-k). Las variantes fueron clasificadas en base a los morfotipos de ovarios y testículos, y nombradas a partir de los ejemplares tipo (tipo nomenclatural) y localización geográfica (Tabla 8). Se incluyen ilustraciones tipo y de ejemplares descritos ya en la

literatura (solo dos variantes de México con ilustraciones completas) y del presente estudio.

Especie	Ovario				Testículos				Figura
	OvM	ACL	GL	FL	TeM	ACL	GL	FL	
	(OvM: morfotipo; ACL: agrupación cuerpo central y lóbulos; GL: grado de lobulación; FL: forma de los lóbulos)				(TeM: morfotipo; ACL: agrupación cuerpo central y lóbulos; GL: grado de lobulación; FL: terminación de los lóbulos)				
<i>P. caliensis</i>									
<i>caliensis</i>	OvM1	compacto	1°	digitiformes	TeM1	distendido	1°	redondeados	15e
<i>medellinensis</i>	OvM2	distendido	1°	globulares	TeM2	Compacto leve	1°	globulares	15f
<i>guatemalensis</i>	OvM3	compacto	1°	coralinos	TeM1	distendido	1°	redondeados	15g
<i>P. mexicanus</i>									
<i>mexicanus A*</i>	OvM1	distendido	3°	coralinos	TeM1	distendidos	2°	redondeados	16e
<i>Colima C[‡]</i>	OvM2	compacto	1°	globulares amplios	TeM2	compactos	1°	redondeados	16f
<i>putumayense</i>	OvM3	compacto	1°	globulares pequeños	TeM3	distendidos	2°	astas cortas verticales	16g
<i>peruvianus</i>	OvM4	distendido	2°	dendríticos	TeM4	distendidos	3°	astas largas verticales	16h
<i>ecuadoriensis</i>	OvM5	distendido	2°	digitiformes	TeM5	distendidos	¥1° y 2°	redondeados	16i
<i>emberarum</i>	OvM6	distendido	2°	coralinos	TeM5	distendidos	¥1° y 2°	redondeados	16j
<i>leticiana</i>	OvM1	distendido	3°	coralinos	TeM3	distendidos	2°	astas medianas horizontales	16k
<i>amazonicus</i>	OvM7	distendido	2°	globulares pequeños	TeM5	distendidos	¥1° y 2°	redondeados	16l

Tabla 8. Variantes morfológicas de *P. caliensis* y *P. mexicanus* en base a la morfología del ovario y los testículos. *variante tipo de *P. mexicanus*, como especie “A” en Miyazaki e Ishii (1968) de Colima, México. ‡ Variante “Colima C” de *P. mexicanus*; ejemplar donado a la CCH.116 por Dra. Virginia León Règagnon (UNAM). ¥ grado de lobulación predominante.

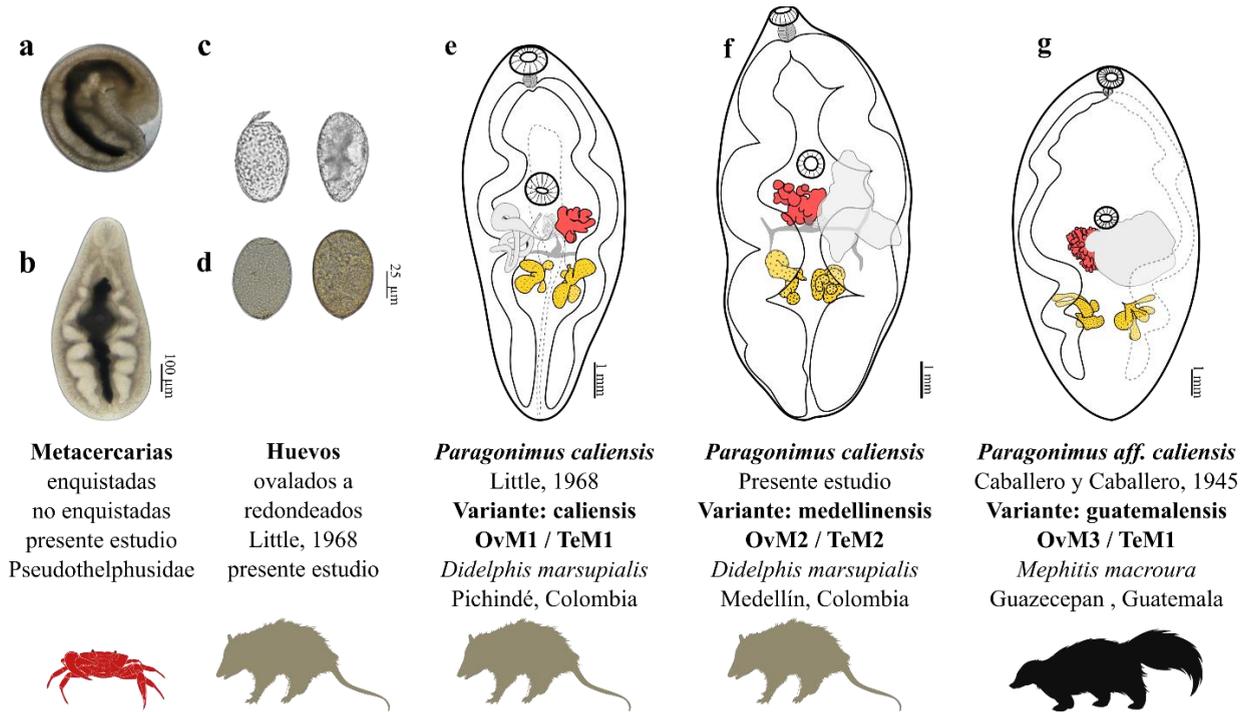
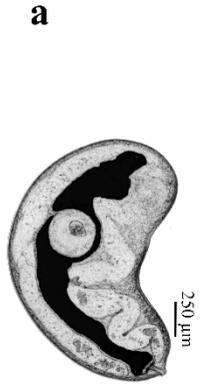
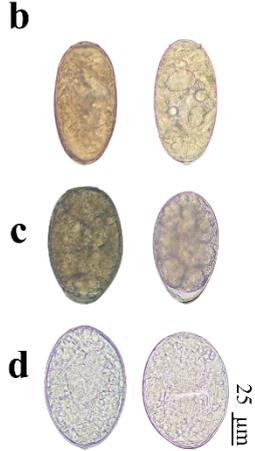


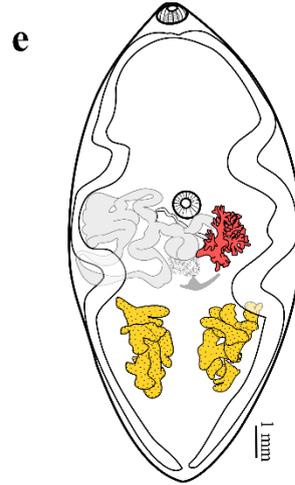
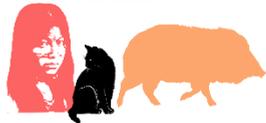
Figura 15. Caracterización morfológica de *Paragonimus caliensis*, variantes morfológicas, localidad y hospedador. (a) metacercaria enquistada y (b) metacercaria no enquistada; (c) huevos ovalados (Figs. 32 y 33 en Little (1968)) y (d) huevos redondeados. (e-f) variantes morfológicas en base a la forma del ovario (de color rosa) y de los testículos (de color amarillo). Ovario de tamaño semejante o más grande que los testículos.



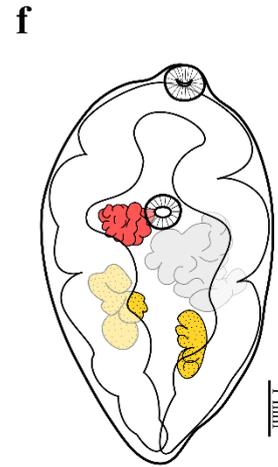
Metacercarias
no enquistadas
Lenis (2006)
Pseudothelphusidae



Huevos
alargados, ovalados y
redondeados
Homo sapiens / *Felis catus*
Tayassu pecari
Colombia

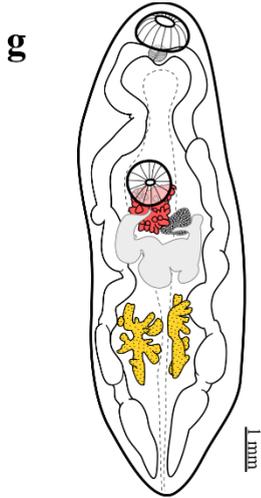


Paragonimus mexicanus
Miyazaki & Ishii, 1968
Variante: mexicanus
OvM1 / TeM1
Didelphis marsupialis
Colima, México



Paragonimus mexicanus
León-Règagnon (CCH.116.147)
Variante: C
OvM2 / TeM2
Didelphis marsupialis
Colima, México





Paragonimus aff. mexicanus

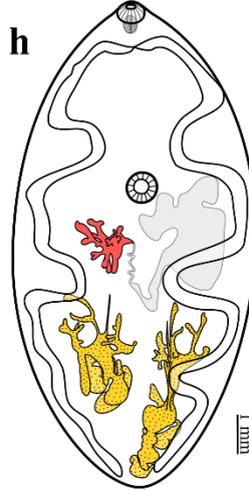
Little, 1968

Variante: putumayense

OvM3 / TeM3

Leopardus wiedii

Putumayo, Colombia



Paragonimus mexicanus

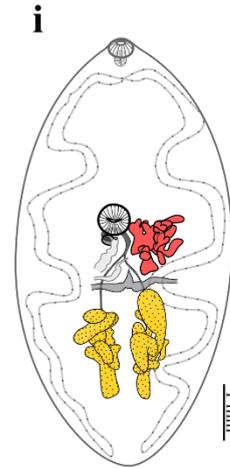
Miyazaki, Ibañez & Miranda, 1969

Variante: peruvianus

OvM4 / TeM4

Felis catus

Cajamarca, Perú



Paragonimus mexicanus

Voelker & Arzube, 1979

Variante: ecuatoriensis

OvM5 / TeM5

Nasua nasua

Region costera, Ecuador



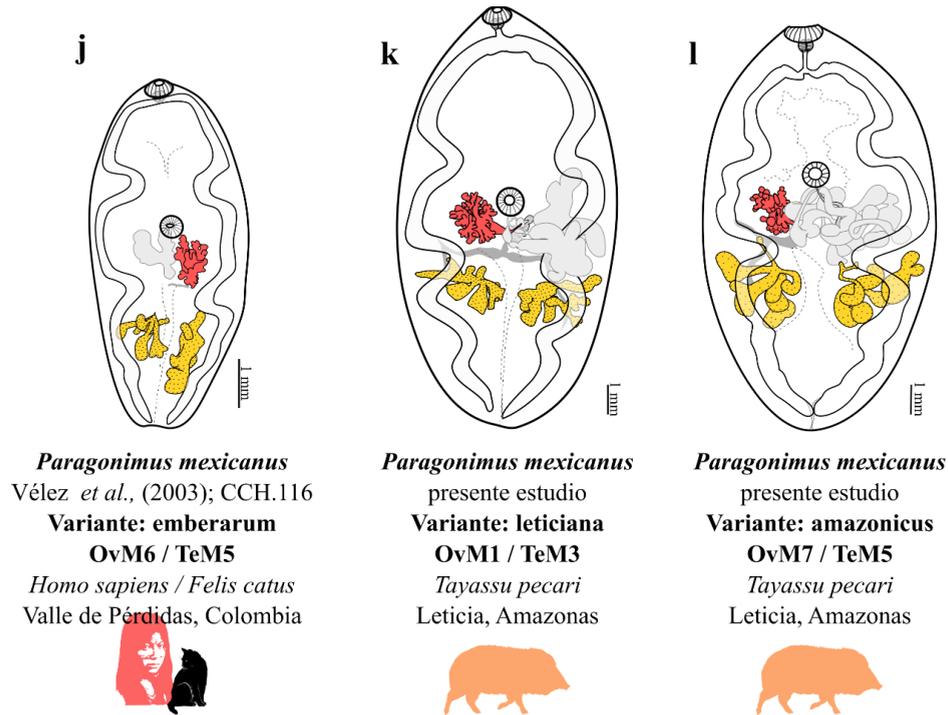


Figura 16. Caracterización morfológica de *Paragonimus mexicanus*; variantes morfológicas, localidad y hospedador. (a) metacercaria no enquistada; (b) huevos alargados; (c) huevos ovalados; (d) huevos redondeados. (e-k) Variantes morfológicas en base a la forma del ovario (de color rosa) y de los testículos (de color amarillo). Ovario de tamaño semejante o más pequeño que los testículos.

4.2. Caracterización molecular

El árbol filogenético inferido del análisis de máxima verosimilitud (K2P + G) de las secuencias de ITS2 de las especies y complejos de especies que componen el género *Paragonimus* (Figura 17), muestra tres grupos de *Paragonimus* correspondientes a sus lugares de origen en África, América y Asia, para un total de seis especies y cuatro complejos de especies. El grupo de América incluye tres especies: *P. kellicotti*, *P. mexicanus* y *P. caliensis*.

Las distancias genéticas basadas en las secuencias de ITS2 entre las especies y complejos de especies de *Paragonimus* varían entre 5.7% (*P. heterotremus* y *P. skrjabini*) y 14% (*P. africanus* y *P. westermani*) (Tabla 9). Las distancias intraespecíficas varían desde 0.37 (*P. kelliotti* y *P. macrorchis*) a 5.56% (complejo *P. ohirai*) (Figura 17).

Las distancias genéticas interespecíficas de *P. mexicanus* varían entre 7.4% (*P. kellicotti*) y 12.9% (*P. vietnamensis*). Las distancias genéticas interespecíficas de *P. caliensis* varían entre 8.5% (*P. heterotremus*) y 12% (*P. westermani*). Para las secuencias ITS2 de *P. caliensis* y *P. mexicanus* se identificaron 38 sitios variables (38/290) con una distancia genética del 10.6%.

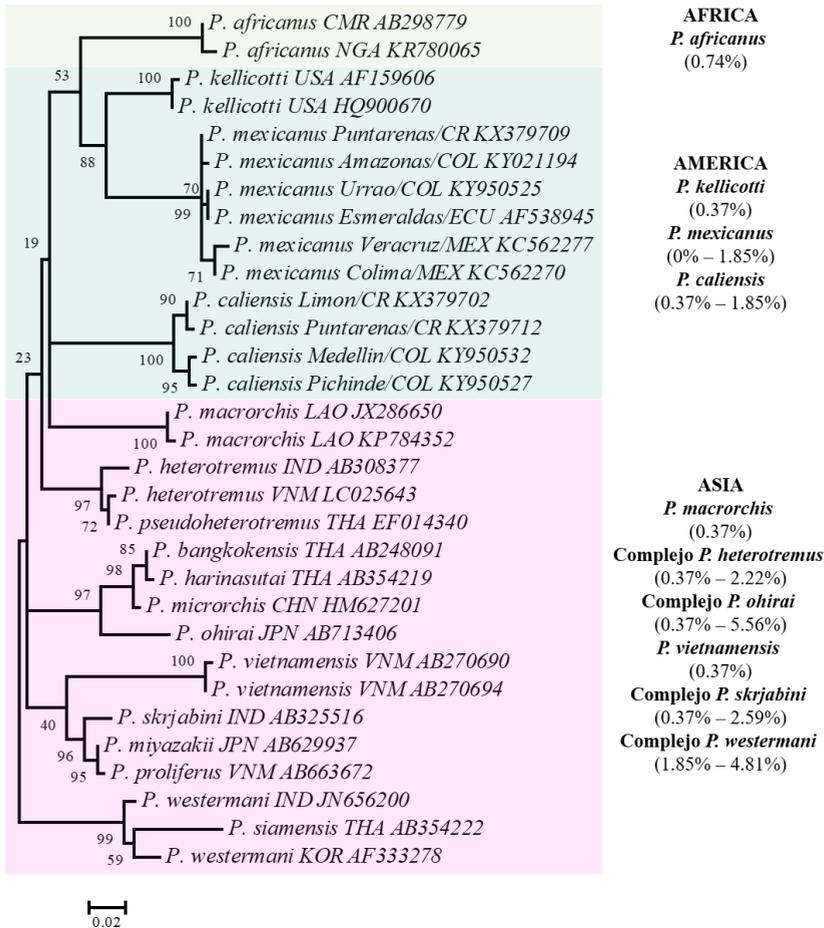


Figura 17. Árbol filogenético inferido del análisis de máxima verosimilitud (K2P +G) del ITS2 de la especies de *Paragonimus* de América, África y Asia disponibles en GenBank. Los valores de *bootstrap* (1000 réplicas) se muestran en cada nodo. Las distancias genéticas intraespecíficas se muestran entre paréntesis. Las secuencias de ITS2 se muestran con nombre de la especie, número de acceso y localidad (Colombia = COL; Costa Rica = CRI; Ecuador = ECU; Guatemala = GTM; México = MEX; Estados Unidos de América = USA; Camerún = CMR; Nigeria = NGA; República Popular China = CHN; India = IND; Japón = JPN; República Popular de Laos = LAO; Korea del Sur = KOR; Tailandia = THA; Vietnam = VNM).

Especie/complejo de especies	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>P. africanus</i>	(2)	-									
2 <i>P. caliensis</i>	(4)	11.6									
3 <i>P. heterotremus</i>	(3)	10.0	8.5								
4 <i>P. kellicotti</i>	(2)	10.2	11.0	8.6							
5 <i>P. macrorchis</i>	(2)	10.2	9.5	7.8	11.1						
6 <i>P. mexicanus</i>	(6)	10.6	10.6	8.8	7.4	11.1					
7 <i>P. ohirai</i>	(4)	12.4	11.2	9.6	10.9	11.0	11.1				
8 <i>P. skrjabini</i>	(3)	10.6	9.5	5.7	9.6	8.0	10.1	8.2			
9 <i>P. vietnamensis</i>	(2)	12.8	9.9	7.8	12.6	11.5	12.9	10.3	7.6		
10 <i>P. westermanni</i>	(3)	14.0	12.0	10.9	12.0	12.9	11.4	12.3	9.6	12.8	-

Tabla 9. Estimación de divergencia evolutiva entre las especies de *Paragonimus*, en base a las secuencias del segundo espaciador interno (ITS2) del ADNr. Datos en porcentaje. El número de secuencias estudiadas se muestra entre paréntesis.

4.3. *Paragonimus caliensis*

4.3.1. Caracterización morfológica de metacercarias

4.3.1.1. Microscopía óptica

El estudio microscópico de las metacercarias obtenidas (n=204), reveló dos formas metacercariales: enquistadas (17/204; 8.4%) y no enquistadas (187/204; 91.6%) (Figura 18).

Todas las metacercarias presentaron parénquima de color rosado con gránulos rojizos. Los datos morfológicos y morfométricos (Tabla 10) fueron compatibles con las metacercarias descritas por Little (1968), como *P. caliensis*, los cuales fueron posteriormente confirmados por el análisis molecular de secuencias de ITS2. No se encontraron diferencias morfológicas entre las metacercarias encontradas por localidad, hospedador y tipo de metacercaria (sin pared quística y con pared quística). Las metacercarias enquistadas, presentaron quistes esféricos con pared delgada; en su interior las metacercarias exhibían forma de “C/U”, sin ocupar toda la cavidad del quiste (Figura 18).

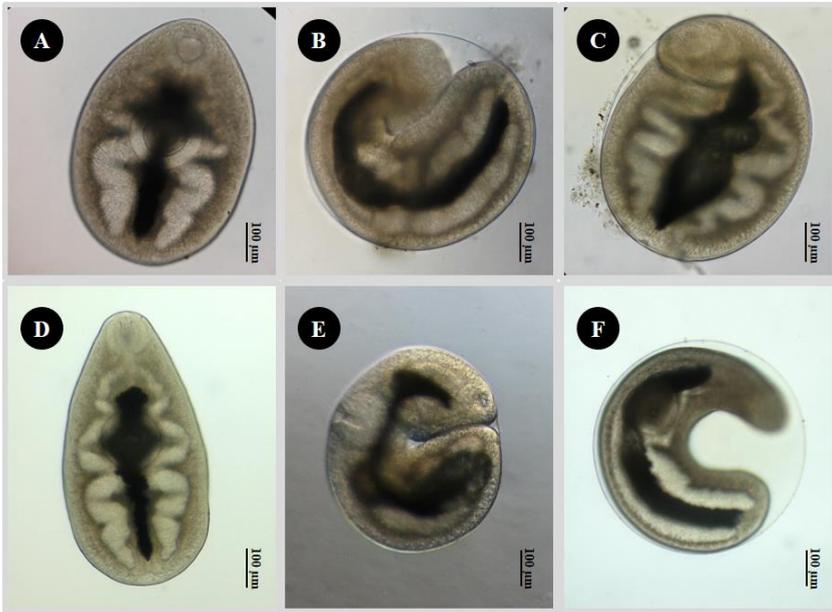


Figura 18. Metacercarias de *Paragonimus caliensis*. (A-C) metacercarias recuperadas de *Hypolobocera bouvieri* en Medellín; (A) no enquistada, (B-C) enquistadas. (D-F) metacercarias recuperadas de *Strengeria* sp. en Pichindé; (D) no enquistada, (E-F) enquistadas.

Medidas(μm)	Medellín		Pichindé		Pichindé
	(n=14; presente estudio)		(n=7; presente estudio)		Original en Little (1968)
	AVG	STD	AVG	STD	AVG
Cuerpo L/A	681/465	77-35	826/405	99/60	850-1050/400-550
Ventosa oral L/A	111/117	16-17	122/118	17/5	100-150 diámetro
Ventosa ventral L/A	166/174	29-23	175/188	25/18	150-200 diámetro
Tamaño del quiste L/A	571-631/502-611	-	696-710	-	-

Tabla 10. Datos morfométricos de metacercarias de *Paragonimus caliensis* de Medellín y Pichindé (localidad tipo). L: largo; A: ancho. AVG: media. STD: desviación estándar.

4.3.1.2. Microscopía electrónica de barrido

El análisis mediante MEB se realizó en metacercarias de *P. caliensis* recuperadas de *H. bouvieri* (13 no enquistadas y 2 enquistadas) de Medellín (Figura 19). Las metacercarias presentaron espinas tegumentarias en forma de bayoneta, con forma y disposición uniforme. Se identificaron dos tipos de papilas en la superficie del tegumento: papilas tipo domo grande (LP) y papilas tipo domo pequeño (SP). Las papilas LP se localizaron sobre las ventosas (oral y ventral), mientras que las papilas SP se localizaron en la superficie del cuerpo (ventral y dorsal). En la región de la ventosa ventral se observaron tres anillos papilares: un anillo de papilas internas (IP); un anillo de papilas medias (MP); y un anillo de papilas externas (OP). Los IP y el MP correspondían al tipo LP, y se ubicaron sobre la superficie interna y medial de la ventosa ventral, respectivamente. El OP correspondía al tipo SP y se ubicó alrededor de la ventosa ventral. Las metacercarias de *P. caliensis* mostraron un patrón de papilas en la región acetabular de 6 IP, 6 MP y 20-30 OP.

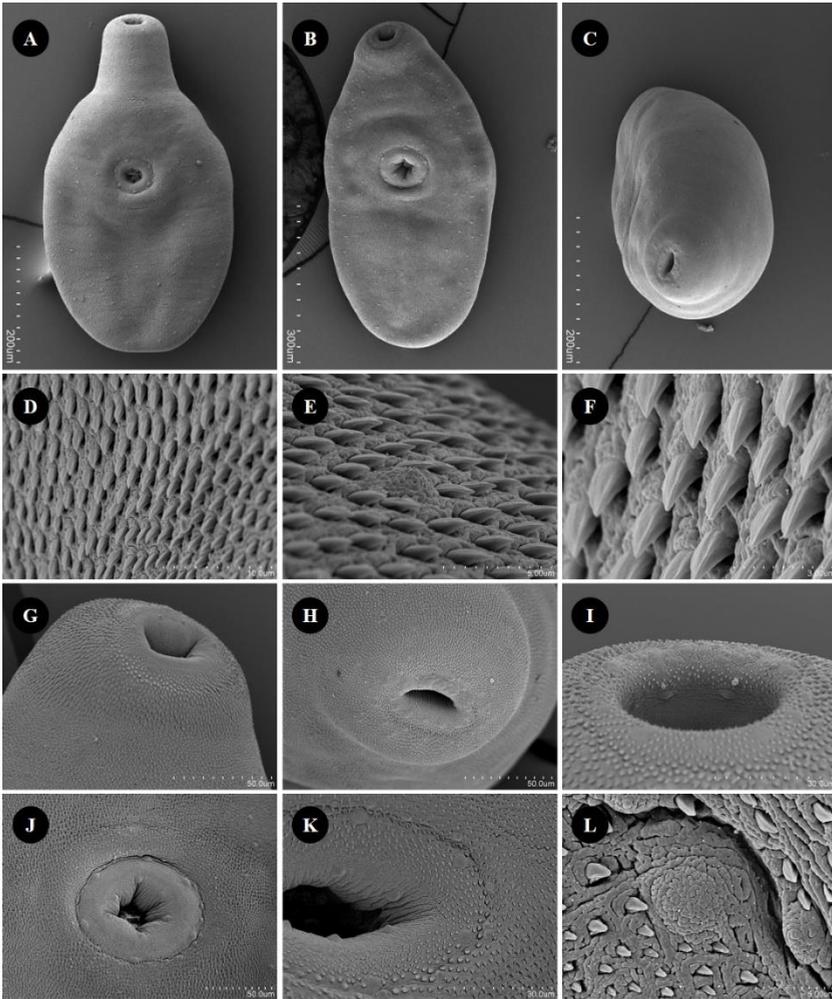


Figura 19. Metacercarias de *Paragonimus caliensis* analizadas por microscopía electrónica de barrido. (A-B) Vista ventral. (C) Vista anterior. (D-F) Espinas tegumentarias en forma de bayoneta y con distribución uniforme. (G-I) Ventosa oral con papilas tipo SP y LP. (J-L) Anillos papilares (6 IP, 6 MP y 20-30) en la región de la ventosa ventral; OP alrededor y externas a la ventosa; MP en la zona media de la ventosa; IP al interior de la ventosa.

4.3.2. Caracterización morfológica de adultos

Paragonimus caliensis recolectados por Casas *et al.* (2008) en *D. marsupialis*, y reexaminados en el presente estudio se caracterizan por poseer los siguientes rasgos morfológicas en el ovario, los testículos y los huevos (Figura 20; Tabla 11):

- El ovario es grande con relación al tamaño de los testículos y compacto, con un cuerpo central y lobulado. Se observan dos morfotipos en el grado de lobulaciones: OvM1 (compacto, lóbulos en 1° y de terminación digitiforme) y OvM2 (distendido, lóbulos en 1° y de terminación globular).
- Los testículos son más pequeños que el ovario (relación largo ovario/largo testículos 1.15-1.36; en Tabla 11). Se observan dos morfotipos en el grado de lobulaciones: TeM1 (compacto, lóbulos en 1° y de terminación redondeada) y TeM2 (compacto, lóbulos en 1° y de terminación redondeada/globular).
- Los huevos son ovalados a redondeados. Presentan opérculo pequeño y una membrana externa delgada que es ligeramente más gruesa en el extremo abopercular. Su rango de tamaño es: 70-95.9 μm (82.1 ± 5.2) de largo por 44-68.7 μm (55.1 ± 5.2) de ancho.

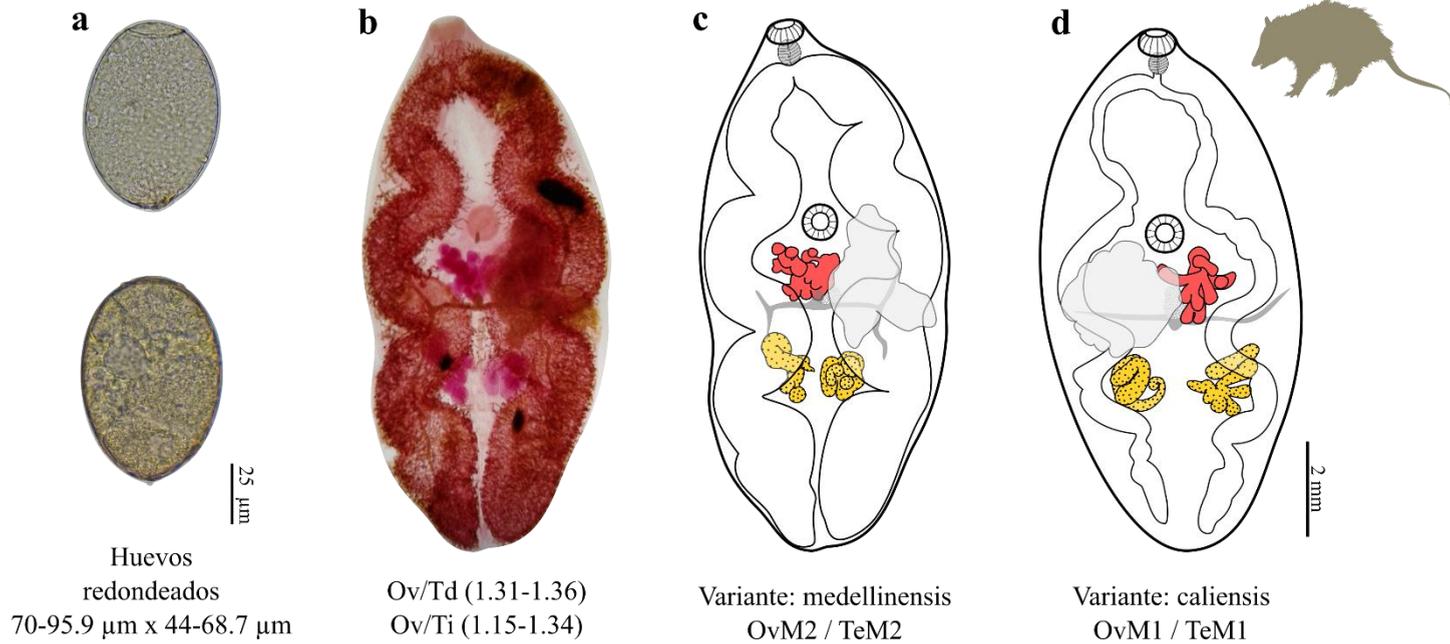


Figura 20. *Paragonimus caliensis* recuperados de *Didelphis marsupialis* (Casas *et al.*, 2008), y reexaminados en el presente estudio. (a) Huevos de muestras frescas. (b) Adulto en preparación permanente, tinción con Carmín de Meyer, vista ventral. Relación largo ovario/Largo testículos: **Ov**: ovario; **Td**: testículo derecho; **Ti**: testículo izquierdo. (c-d) Variantes morfológicas de *P. caliensis* en Medellín.

<i>Paragonimus caliensis</i>			
Caracteres morfológicos		Medellín	Pichindé
		Presente estudio	Little (1968)
Longitud total / Ancho máximo		10.2–11 mm (10.6 ± 0.4) / 4.9–5.1 mm (5 ± 0.1)	7.5–13.3 mm (10.3) / 4.2–6.4 mm (5.2)
Ventosa oral	L/A	438.6–478.3 μm (459.7 ± 20.1) / 709.5–757.3 μm (736.1 ± 24.4)	600–1050 μm (760) / 700–1200 μm (990)
Faringe	L/A	414.5–446.4 μm (430.5 ± 22.5) / 637.8–733.4 μm (690.9 ± 48.7)	N/A
Acetábulo	L/A	733.4–797.9 μm (762.7 ± 32.2) / 637.8–733.4 μm (690.9 ± 48.7)	750 – 1050 μm (910) / 800 – 1050 μm (960)
Ovario	L/A	438.5–661.7 μm (563.4 ± 114) / 414.5–605.9 μm (534.1 ± 104.2)	800 – 1800 μm (1240) / 600 – 1500 μm (1000)
Testículo derecho	L/A	334.8–486.3 μm (433.1 ± 85.2) / 330.5–438.5 μm (403.9 ± 53.19)	N/A
Testículo izquierdo	L/A	326.9–574 μm (435.8 ± 126.1) / 366.7–478.3 μm (438.5 ± 62.3)	N/A
Huevos (montaje permanente)	L/A	70–86 μm (75.6 ± 6.2) / 44–56 μm (50 ± 5.7)	N/A
Huevos (muestras frescas)	L/A	82.8–95.9 μm (88.6 ± 4.2) / 54.5–68.7 μm (60.2 ± 4.7)	70 – 92 μm (78) / 38 – 54 μm (45)
Variantes morfológicas		caliensis / medellinensis	caliensis
Largo ovario/Largo Testículos		Ov/Td (1.31-1.36); Ov/Ti (1.15-1.34)	N/A
Forma de los huevos		Ovalados a redondeados	Ovalados a redondeados

Tabla 11. Datos morfológicos de ejemplares de *Paragonimus caliensis* de Medellín (Casas *et al.*, 2008) y Pichindé (Little, 1968), reexaminados en presente estudio. (Medidas: L: largo, A: ancho; mínimo-máximo en mm (promedio ± desviación estándar). **OvM1:** ovario lobulado no sublobulado. Relación largo ovario/Largo testículos: **Ov:** ovario; **Td:** testículo derecho; **Ti:** testículo izquierdo)

4.3.3. Caracterización molecular

Las secuencias de *P. caliensis* obtenidas de Medellín y Pichindé presentaron la misma composición nucleotídica (T= 29.9 %, C= 23.5 %, A=18.1 % y G=28.5 %) con 2/281 sitios variables (99.3% de similitud). Las secuencias de *P. caliensis* de Colombia presentaron 7/281 sitios variables (97.5% de similitud) con las secuencias de *P. caliensis* de Costa Rica previamente reportadas (Hernández-Chea *et al.*, 2017). En análisis de las posiciones variables del ITS2 se identificaron 4 haplotipos de *P. caliensis*, dos en Costa Rica y dos en Colombia (códigos: *Pc*-H1, *Pc*-H2, *Pc*-H3, *Pc*-H4; en Tabla 12). La secuencia de la muestra de Limón, Costa Rica (*Pc*-H1) fue usada como referencia; seis sustituciones fueron transiciones (posiciones 75, 110, 111, 132, 218 y 256) y una sustitución fue una transversión (posición 186) en el alineamiento del ITS2. Todos los haplotipos fueron recuperados de hospedadores silvestres. Las distancias genéticas entre los haplotipos de ITS2 de *P. caliensis* oscilaron entre 0.0% al 2.16% (Tabla 13).

El haplotipo *Pc*-H1 de *P. caliensis* se encuentra en la localidad de Limón, Costa Rica, y el haplotipo *Pc*-H2 en las localidades de Alajuela y Puntarenas, en Costa Rica. Las secuencias de Medellín corresponden a los haplotipos *Pc*-H3 y *Pc*-H4 (Longitud 281; 48% AT). Las secuencias de Pichindé corresponden al haplotipo *Pc*-H4 (Longitud 281; 48% AT). Para el análisis filogenético del ITS2 de *P. caliensis* se utilizaron 18 secuencias de aislados de diferentes orígenes geográficos (Tablas 6 y 7). En árbol filogenético inferido del análisis de máxima verosimilitud basado en el modelo K2P del ITS2 muestra dos grupos y cuatro haplotipos de *P. caliensis*, correspondientes a sus lugares de origen en Costa Rica y Colombia (Figura 21).

ITS2 de <i>Paragonimus caliensis</i>												
Haplotipo	Origen geográfico	Hospedador	GenBank	longitud pb	%AT	posiciones variables nucleotídicas						
						75	110	111	132	186	218	256
1 (<i>Pc-H1</i>)	Limón/Costa Rica	Pseudothelphusidae sp.	KX379702	278	48.6	G	T	A	G	T	A	A
2 (<i>Pc-H2</i>)	Alajuela/Costa Rica	Pseudothelphusidae sp.	KX379704	280	48.6	.	.	G
2 (<i>Pc-H2</i>)	Puntarenas/Costa Rica	Pseudothelphusidae sp.	KX379712	280	48.6	.	.	G
3 (<i>Pc-H3</i>)	Medellín/Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>	KY950532	281	48	A	C	.	.	G	G	G
4 (<i>Pc-H4</i>)	Medellín/Colombia	<i>Hypolobocera bouvieri</i>	KX512829	281	48	.	C	.	A	G	G	G
4 (<i>Pc-H4</i>)	Pichindé/Colombia	<i>Strengeria</i> sp.	KY950527	281	48	.	C	.	A	G	G	G

Tabla 12. Sitios polimórficos y cambios nucleotídicos hallados en el presente estudio del ITS2 de *Paragonimus caliensis*. Se indica para cada haplotipo la longitud de pares de bases (pb), y el porcentaje de Adenina-Tiamina (%AT). Se analizan también las secuencias disponibles en GenBank de muestras procedentes de Costa Rica.

Distancias genéticas entre los haplotipos de <i>Paragonimus caliensis</i>					
Haplotipos	Distribución geográfica	<i>Pc-H1</i>	<i>Pc-H2</i>	<i>Pc-H3</i>	<i>Pc-H4</i>
<i>Pc-H1</i>	Mesoamérica: región Caribe (CRI)	-			
<i>Pc-H2</i>	Mesoamérica: región Pacífica (CRI)	0.36	-		
<i>Pc-H3</i>	Suramérica: región Andina (COL)	1.80	2.16	-	
<i>Pc-H4</i>	Suramérica: regiones Andina y Pacífica (COL)	1.80	2.16	0.72	-

Tabla 13. Estimación de divergencia evolutiva entre lo haplotipos de secuencias de ITS2 de *Paragonimus caliensis* y sus distribuciones geográficas. Datos en porcentaje (Colombia = COL; Costa Rica = CRI).

ITS2- *Paragonimus caliensis*

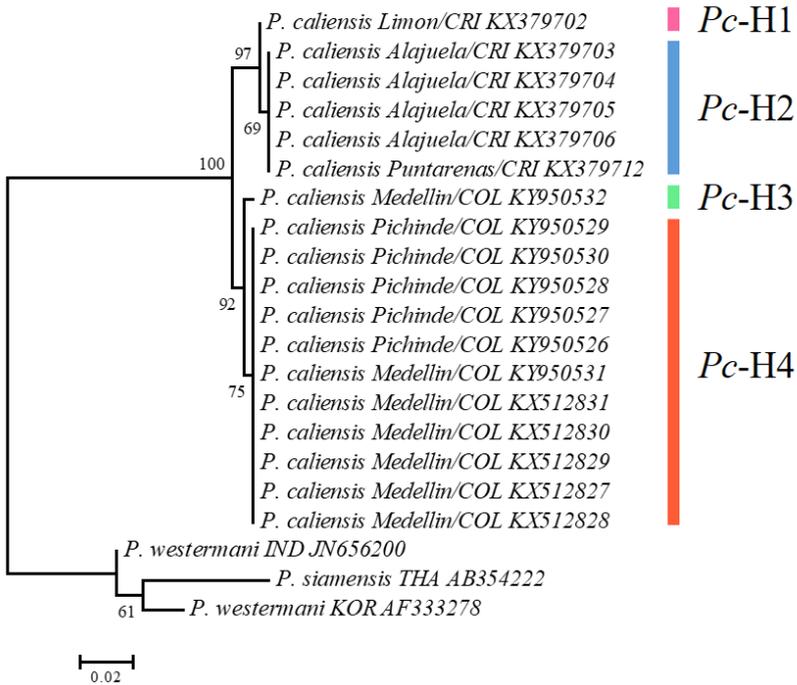


Figura 21. Árbol filogenético inferido del análisis de máxima verosimilitud (K2P) de secuencias de ITS2 de *Paragonimus caliensis*. Los valores de *bootstrap* (1000 réplicas) se muestran en cada nodo. Las secuencias de ITS2 se muestran con nombre de la especie, número de acceso y localidad (Colombia = COL; Costa Rica = CRI; India = IND; Korea del Sur = KOR; Thailandia = THA). Cada haplotipo se indica como Pc-H.

4.3.4. Distribución geográfica

El análisis filogenético de las secuencias del ITS2 confirma que *P. caliensis* actualmente presenta una distribución neotropical, que va desde el norte de Costa Rica hasta la región suroccidental de Colombia (Figura 22). Además, en todo su rango de distribución *P. caliensis* es simpátrica con *P. mexicanus*.

Los haplotipos del ITS2 de *P. caliensis* revelan un patrón de distribución biogeográfica, asociados a las cadenas montañosas de la Sierra Madre de Chiapas (Cordillera de los Andes Centroamericana) en Mesoamérica, y la Cordillera de los Andes en Suramérica.

El haplotipo 1 (*Pc*-H1) se encuentra en la localidad de Veragua, en la provincia de Limón, Costa Rica, en la región del caribe de Costa Rica. El haplotipo 2 (*Pc*-H2) se encuentra entre Alajuela y Puntarenas, Costa Rica; se distribuye desde la cordillera central en Alajuela hasta hacia la región occidental de la cordillera de Talamanca en Buenos Aires, provincia de Puntarenas, Costa Rica. Es simpátrica en Puntarenas con los haplotipos *Pm*-H3 y *Pm*-H4 del ITS2 de *P. mexicanus*. El haplotipo 3 (*Pc*-H3) se encuentra en el municipio de Medellín, Antioquia, en la cordillera Central de los Andes colombianos. El haplotipo 4 (*Pc*-H4) se encuentra entre el municipio de Medellín, Antioquia, y el corregimiento de Pichindé, en el Valle del Cauca, Colombia.

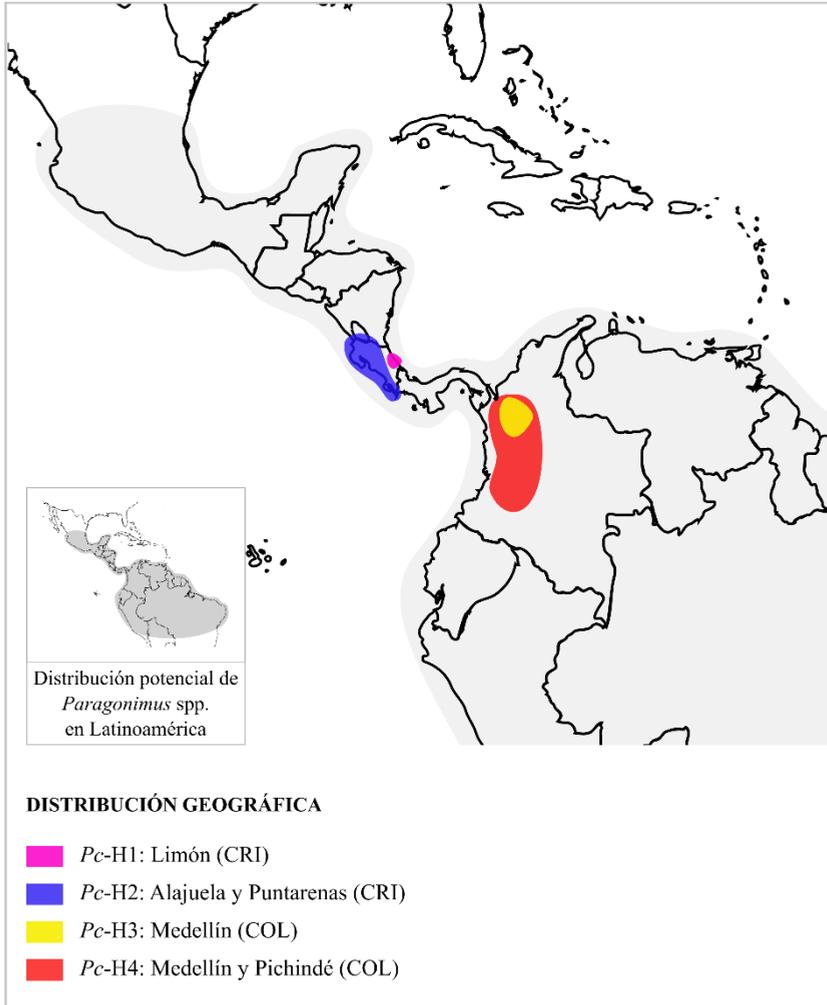


Figura 22. Distribución de *Paragonimus caliensis* en Latinoamérica en base a los haplotipos del ITS2 del ADNr. Colombia = COL; Costa Rica = CRI.

4.4. *Paragonimus mexicanus*

4.4.1. Caracterización morfológica de adultos

Paragonimus mexicanus recolectados en *T. pecari* en Leticia, Amazonas se caracterizan por poseer los siguientes rasgos morfológicos en el ovario, los testículos y los huevos (Figura 23; Tabla 14):

- El ovario es compacto a distendido, con un cuerpo central y lobulado. Se observan tres morfotipos: OvM1 (distendido, lóbulos en 3° de terminación coralino), OvM5 (distendido, lóbulos en 2° digitiformes) y OvM6 (distendido, lóbulos en 2° de terminación coralino).
- Los testículos son más largos que el ovario (relación largo ovario/largo testículos 0.55-0.72). Se observan dos morfotipos: TeM5 (distendidos, con lóbulos en 1° y 2°, principalmente en 1°, de terminación redondeada) y TeM3 (distendidos, con lóbulos en 2°, en forma de astas cortas y amplias).
- Los huevos varían en la forma, incluso si provienen de un ejemplar adulto. Estos presentan tres formas: alargados, ovalados y redondeados; presentan opérculo pequeño y una membrana externa delgada que es ligeramente más gruesa en el extremo abopercular. Su rango de tamaño es: 72-90 μm (82.9 ± 6.4 ; $n=20$) de largo por 38-60 μm (46.5 ± 5.8 ; $n=20$) de ancho.

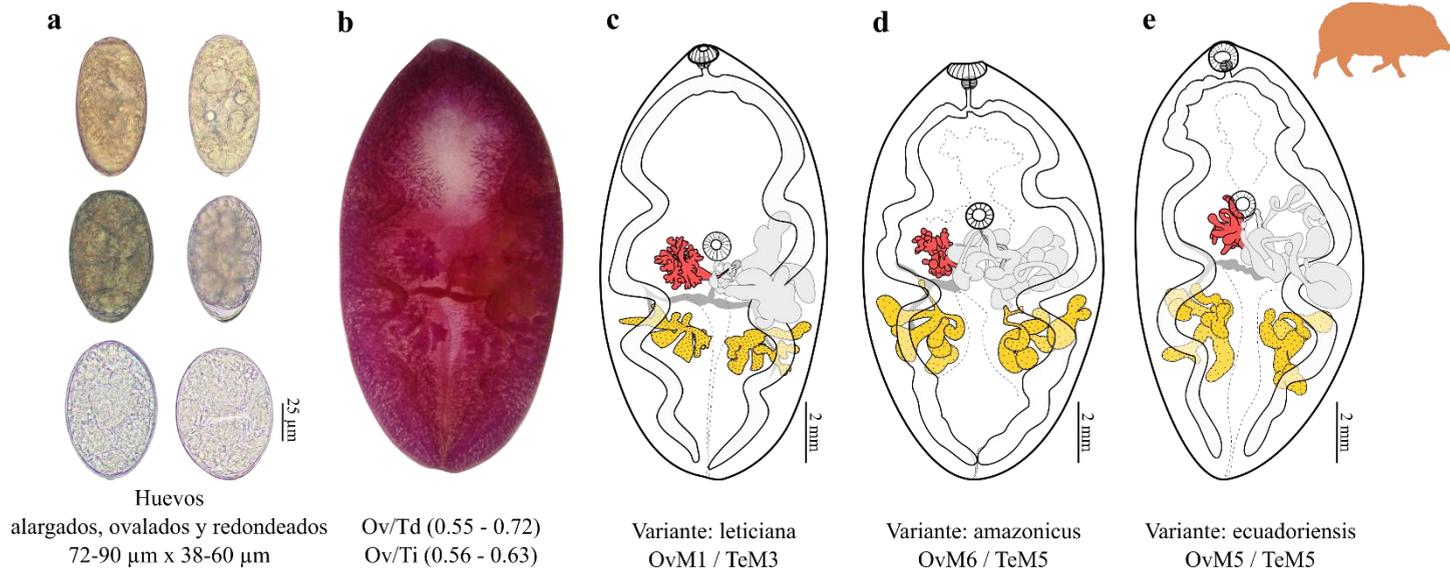


Figura 23. *Paragonimus mexicanus* recuperados de *Tayassu pecari* en Leticia, Amazonas. (a) Morfología de huevos obtenidos del mismo ejemplar adulto, se observan tres morfotipos. (b) Adulto en preparación permanente, tinción con Carmín de Meyer, vista ventral. Relación largo ovario/Largo testículos: **Ov**: ovario; **Td**: testículo derecho; **Ti**: testículo izquierdo. (c-e) Variantes morfológicas de *P. mexicanus* en Amazonas.

Los ejemplares de *Paragonimus mexicanus* de Valle de Pérdidas, Urrao, Antioquia (Lenis, 2006; Vélez *et al.*, 2009, 2003) se caracterizan por poseer los siguientes rasgos morfológicos en el ovario, los testículos, los huevos y espinas (Figura 24; Tabla 14):

- El ovario es más pequeño que los testículos, con un cuerpo central y lobulado. Se observan dos morfotipos: OvM4 (distendido, lóbulos en 2° y dendríticos) y OvM6 (distendido, lóbulos en 2° y coralino).
- Los testículos son más largos que el ovario (relación largo ovario/largo testículos 0.52-0.57). Se observan dos morfotipos: TeM4 (distendidos, lóbulos en 3° en forma de astas) y TeM5 (distendidos, lóbulos en 1° y 2°, principalmente en 1° y de terminación redondeada).
- Los huevos presentan tres formas: alargados, ovalados y redondeados. Su rango de tamaño es: 70-82 μm de largo por 50-58 μm de ancho.
- En adultos, el tegumento está densamente cubierto con un tipo de espinas de terminación anterior única y afilada (Figura 9c en Lenis, 2006).

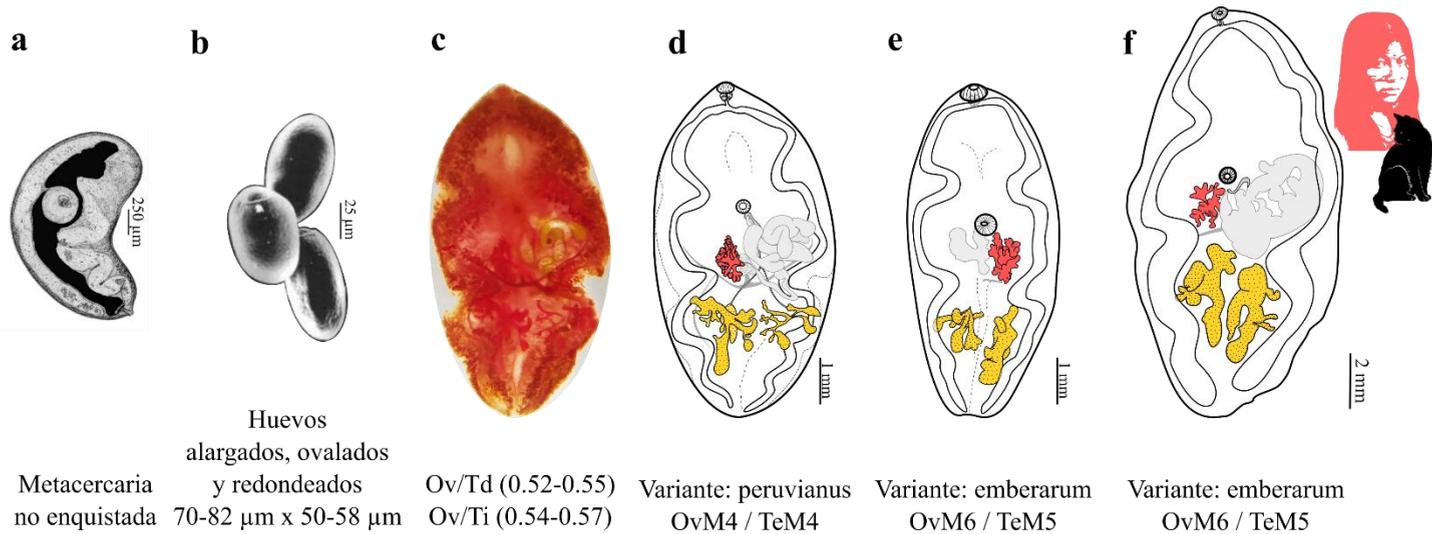


Figura 24. *Paragonimus mexicanus* recuperado de infección experimental en *Felis catus* por Vélez *et al.* (2003), y reexaminado en el presente estudio. Muestras procedentes del foco humano Emberá en Valle de Pérdidas, Colombia. (a) Metacercaria. (b) Huevos con tres morfotipos. (c) Adulto en preparación permanente, tinción con carmín borácico, vista ventral. Relación largo ovario/largo testículos: **Ov**: ovario; **Td**: testículo derecho; **Ti**: testículo izquierdo. (d-f) Variantes morfológicas de *P. mexicanus* en Valle de Pérdidas.

<i>Paragonimus mexicanus</i>			
Caracteres morfológicos	Amazonas		Valle de Pérdidas
		Presente estudio	Vélez <i>et al.</i> , (2003)
Longitud total / Ancho máximo		12.78 – 19.43 (15.20 ± 2.28) / 6.48 – 8.83 (7.66 ± 0.80)	12–16 (15) / 6.0–8.0 (7.1)
Ventosa oral	L/A	0.52 – 0.95 (0.78 ± 0.17) / 0.89 – 1.55 (1.22 ± 0.24)	0.70–0.90 (0.78) / 0.70–1.10 (0.93)
Faringe	L/A	0.36 – 0.49 (0.44 ± 0.05) / 0.35 – 0.6 (0.42 ± 0.11)	0.42–0.38 (0.42)
Ventosa ventral	L/A	0.75 – 1.07 (0.88 ± 0.10) / 0.8 – 0.91 (0.85 ± 0.05)	0.50–0.77 (0.66) / 0.50–0.80 (0.72)
Ovario	L/A	1.28 – 1.96 (1.55 ± 0.29) / 1.07 – 1.76 (1.48 ± 0.25)	0.73–0.78 / 0.89–1.13
Testículo derecho	L/A	1.79 – 3.55 (2.59 ± 0.67) / 1.43 – 3.36 (2.32 ± 0.65)	1.31–1.36 / 0.68–1.50
Testículo izquierdo	L/A	2.30 – 3.13 (2.65 ± 0.32) / 2.16 – 3.70 (2.63 ± 0.61)	1.38–1.44 / 0.78–1.57
Huevos (parásito adulto)	L/A	72-90 μm (82.9 ± 6.4; n=20) / 38-60 μm (46.5 ± 5.8; n=20)	70-82 μm / 50-58 μm
Huevos (esputo de paciente)	L/A	N/A	78-84 μm / 48-48 μm
Huevos (heces de paciente)	L/A	N/A	78-86 μm / 48-48 μm
Variantes morfológicas		<i>leticiana, amazonicus y ecuadoriensis</i>	<i>peruvianus y emberarum</i>
Largo ovario/Largo testículos		Ov/Td (0.55 – 0.72); Ov/Ti (0.56 – 0.63)	Ov/Td (0.52-0.55); Ov/Ti (0.54-0.57)
Forma de los huevos		Alargados; ovalados; redondeados	Alargados; ovalados; redondeados

Tabla 14. Datos morfológicos de *Paragonimus mexicanus* de Leticia y Valle de Pérdidas, reexaminado de Vélez *et al.* (2003), Lenis, (2006) y CCH.117, Colombia. Medidas: L: largo, A: ancho; mínimo-máximo en mm (promedio ± desviación estándar). Relación largo ovario/largo testículos: Ov: ovario; Td: testículo derecho; Ti: testículo izquierdo.

4.4.2. Caracterización molecular

Las secuencias de ITS2 de *P. mexicanus* obtenidas de Valle de Pérdidas (Urrao) y Leticia presentaron la misma composición nucleotídica (T= 28.8 %, C= 24.2 %, A=17.9 % y G=29.1 %) con 2/285 sitios variables. Las secuencias de *P. mexicanus* de Colombia presentaron 8/285 sitios variables (97.2% de similitud) con las secuencias de *P. mexicanus* previamente reportadas para Latinoamérica (Calvopiña *et al.*, 2017; Hernández-Chea *et al.*, 2017; Iwagami *et al.*, 2003; López-Caballero *et al.*, 2013).

El análisis de las posiciones variables del ITS2 ha permitido identificar 6 haplotipos de *P. mexicanus*; dos en Norteamérica, dos en Centroamérica y dos en Suramérica (códigos: *Pm*-H1, *Pm*-H2, *Pm*-H3, *Pm*-H4, *Pm*-H5, *Pm*-H6; en Tabla 15). Los cinco primeros provienen de aislados recuperados de hospedadores silvestres, mientras que el haplotipo *Pm*H6 proviene de focos humanos y pacientes humanos. Para el análisis de los haplotipos de ITS2 de *P. mexicanus*, la secuencia de Colima, México (*Pm*-H1) fue usada como referencia. Seis sustituciones fueron transiciones (posiciones 60, 110, 203, 220, 224 y 228), y dos sustituciones fueron transversiones (posiciones 47 y 163).

Los haplotipos *Pm*-H1 y *Pm*-H2 se encuentran en Norteamérica, mientras que *Pm*-H3 y *Pm*-H4 se encuentran en Centroamérica. En Colombia se encontraron dos haplotipos *Pm*-H5 y *Pm*-H6. Las secuencias de los aislados de Leticia corresponden al haplotipo *Pm*-H5 (longitud: 285; 46.67% AT) y son idénticas a las publicadas para Orellana en la región Amazónica de Ecuador (GenBank AB968080). Las secuencias de muestras de Valle de Pérdidas corresponden al haplotipo *Pm*-H6 (longitud: 285; 46.67% AT) y son idénticas a las publicadas para Esmeraldas (GenBank AF538945), Pichincha

(GenBank LC149729), y Pedernales (GenBank LC317061), en la región Occidental e Interandina de Ecuador. Las distancias genéticas entre los haplotipos de ITS2 de *P. mexicanus* oscilaron entre 0.00 y 2.11% (Tabla 16).

Para el análisis filogenético del ITS2 de *P. mexicanus* se utilizaron 22 secuencias de diferentes orígenes geográficos (Tablas 6 y 7). En árbol filogenético inferido del análisis de máxima verosimilitud (K2P) del ITS2 muestra seis haplotipos de *P. mexicanus* distribuidos entre México, Guatemala, Costa Rica, Colombia y Ecuador (Figura 25).

ITS2 de <i>Paragonimus mexicanus</i>													
Código Haplotipo	Origen geográfico	Hospedador	GenBank	longitud pb	%AT	posiciones variables nucleotídicas							
						47	60	110	163	203	220	224	228
1 (<i>Pm-H1</i>)	Colima/México	<i>Didelphis marsupialis</i>	KC562260	285	47.02	T	T	C	C	T	G	T	T
1 (<i>Pm-H1</i>)	Veracruz/México	<i>Tehuana poglayenora</i>	KC562273	285	47.02	T	T	C	C	T	G	T	T
2 (<i>Pm-H2</i>)	Colima/México	<i>Pseudothelphusa</i> aff. <i>seiferti</i>	KC562270	285	47.72	.	.	T	.	.	A	.	.
3 (<i>Pm-H3</i>)	Puntarenas/Costa Rica	<i>Pseudothelphusidae</i> sp.	KX379710	284	46.48	G	C	T	G	C	A	.	.
4 (<i>Pm-H4</i>)	Chiapas/México	<i>Raddaus tuberculatus</i>	KC562247	285	47.02	.	C	T	.	C	A	.	.
4 (<i>Pm-H4</i>)	Santa Rosa/Guatemala	<i>Pseudothelphusa cobanensis</i>	AF538946	285	47.02	.	C	T	.	C	A	.	.
4 (<i>Pm-H4</i>)	Limón/Costa Rica	<i>Pseudothelphusidae</i> sp.	KX379697	284	46.83	.	C	T	.	C	A	.	.
4 (<i>Pm-H4</i>)	Puntarenas/Costa Rica	<i>Pseudothelphusidae</i> sp.	KX379709	284	46.83	.	C	T	.	C	A	.	.
5 (<i>Pm-H5</i>)	Orellana/Ecuador	<i>Trichodactylus faxoni</i>	AB968080	285	46.67	.	C	T	.	C	A	C	.
5 (<i>Pm-H5</i>)	Leticia/Colombia	<i>Tayassu pecari</i>	KY021191	285	46.67	.	C	T	.	C	A	C	.
6 (<i>Pm-H6</i>)	Esmeraldas/Ecuador	<i>Hypobocera aequatorialis</i>	AF538945	285	46.67	.	C	T	.	C	A	.	C
6 (<i>Pm-H6</i>)	Pichincha/Ecuador	<i>Homo sapiens</i>	LC149729	285	46.67	.	C	T	.	C	A	.	C
6 (<i>Pm-H6</i>)	Pedernales/Ecuador	<i>Hypobocera guayaquilensis</i>	LC317061	285	46.67	.	C	T	.	C	A	.	C
6 (<i>Pm-H6</i>)	Urrao/Colombia	<i>Homo sapiens/Felis catus</i>	KY950522	285	46.67	.	C	T	.	C	A	.	C

Tabla 15. Sitios polimórficos y cambios nucleotídicos del ITS2 de *Paragonimus mexicanus* de diferentes ubicaciones geográficas: México, Guatemala, Costa Rica, Ecuador y Colombia. Se indica las 8 posiciones variables del ITS2, la longitud de pares de bases (pb) y el porcentaje de Adenina-Tiamina (%AT).

Distancias genéticas entre los haplotipos de ITS2 de <i>Paragonimus mexicanus</i>							
Código Haplotipo	Distribución geográfica	<i>Pm</i>-H1	<i>Pm</i>-H2	<i>Pm</i>-H3	<i>Pm</i>-H4	<i>Pm</i>-H5	<i>Pm</i>-H6
<i>Pm</i>-H1	Mesoamérica: región Pacífica y Caribe (MEX)	-					
<i>Pm</i>-H2	Mesoamérica: región Pacífica (MEX)	0.70	-				
<i>Pm</i>-H3	Mesoamérica: región Pacífica (CRI)	2.11	1.41	-			
<i>Pm</i>-H4	Mesoamérica: región Pacífica (MEX-GTM) y Caribe (CRI)	1.41	0.70	0.70	-		
<i>Pm</i>-H5	Suramérica: región Amazónica (COL-ECU)	1.76	1.06	1.06	0.35	-	
<i>Pm</i>-H6	Suramérica: región Pacífica (COL-ECU)	1.76	1.06	1.06	0.35	0.70	-

Tabla 16. Estimación de divergencia evolutiva entre lo haplotipos del ITS2 de *P. mexicanus* y sus distribuciones geográficas. Datos en porcentaje (Colombia = COL; Costa Rica = CRI; Ecuador = ECU; Guatemala = GTM; México = MEX).

ITS2- *Paragonimus mexicanus*

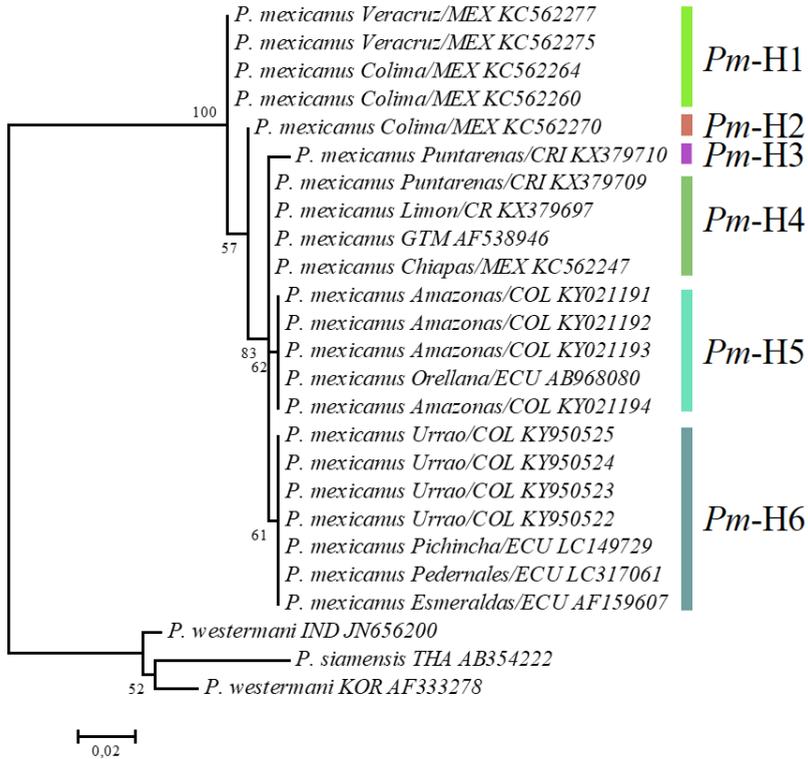


Figura 25. Árbol filogenético inferido del análisis de máxima verosimilitud (K2P) del ITS2 de *Paragonimus mexicanus*. Los valores de *bootstrap* (1000 réplicas) se muestran en cada nodo. Las secuencias de ITS2 se muestran con nombre de la especie, número de acceso y localidad (Colombia = COL; Costa Rica = CRI; Ecuador = ECU; Guatemala = GTM; México = MEX; India = IND; Korea del Sur = KOR; Tailandia = THA). Cada haplotipo se indica como *Pm-H*.

4.4.3. Distribución geográfica

El análisis filogenético del ITS2 confirma que *P. mexicanus* presenta una distribución neotropical, que va desde el norte de México hasta la región Amazónica de Ecuador y Colombia (Figura 26). Su rango de distribución es más amplio que el de *P. caliensis* (ver Figura 22).

Los haplotipos del ITS2 de *P. mexicanus* revelan un patrón de distribución biogeográfico, asociado a las cadenas montañosas de la Sierra Madre de México, Sierra Madre de Chiapas (Cordillera de los Andes Centro Americana), Cordillera de los Andes en Suramérica y la región Amazónica.

El haplotipo 1 (*Pm*-H1) de *P. mexicanus* incluye poblaciones de Colima y Veracruz, entre la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre Oriental de México. El haplotipo 2 (*Pm*-H2) es simpátrico en Colima, México con *Pm*-H1 en la Sierra Madre Occidental. El haplotipo 3 (*Pm*-H3) ocurre en la localidad de Buenos Aires, en Puntarenas, Costa Rica, específicamente en el lado occidental de la cordillera de Talamanca; es simpátrico en esta misma región con el *Pm*-H4. El haplotipo 4 (*Pm*-H4) incluye poblaciones de *P. mexicanus* de México, Guatemala y Costa Rica, en la región de la Sierra Madre de Chiapas, también llamada Andes Centroamericanos. En México, su distribución se inicia en la Sierra Madre de Chiapas y se extiende a lo largo de la zona Pacífica hasta Santa Rosa, en Guatemala, desde allí se extiende hacia la región oriental de Costa Rica en Veragua, provincia de Limón, y hacia la región occidental de la cordillera de Talamanca en Buenos Aires, provincia de Puntarenas, Costa Rica.

El haplotipo 5 (*Pm*-H5) incluye las poblaciones de *P. mexicanus* de Orellana (Ecuador) y Leticia (Colombia), desde la región oriental de los Andes Suramericanos, en Ecuador, hasta el Trapecio amazónico en

Colombia. El Trapecio amazónico se encuentra en el extremo sur del Departamento del Amazonas (Colombia), el cual constituye la parte más austral del país y limita con Brasil y Perú. El haplotipo 6 (*Pm-H6*) incluye poblaciones de Colombia y Ecuador a lo largo de la Cordillera occidental de los Andes Suramericanos. Se distribuye desde el resguardo indígena Valle de Pérdidas (Urrao, Antioquia) en la cara occidental de la Cordillera Occidental de los Andes Colombianos, y sigue a lo largo de la región Pacífica hasta Esmeraldas y Pedernales, en donde alcanza la localidad de Pichincha en la región interandina ecuatoriana.

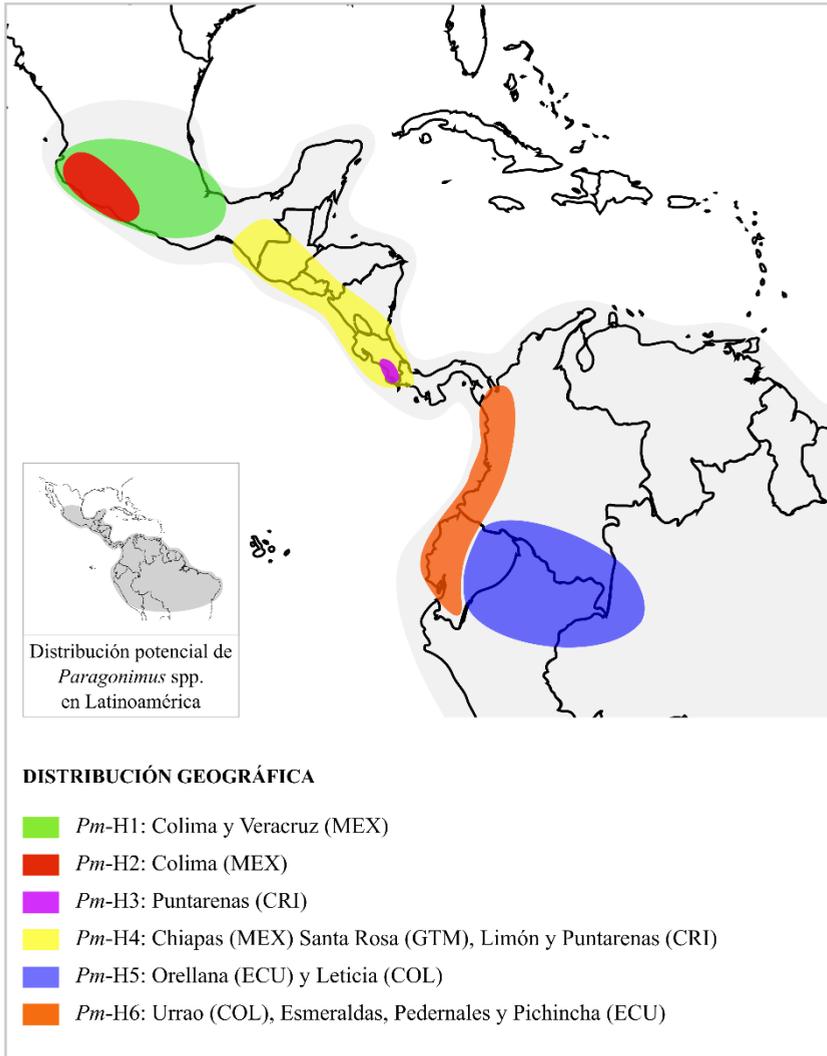


Figura 26. Distribución de *P. mexicanus* en Latinoamérica, en base a los haplotipos del ITS2 del ADNr. Colombia = COL; Costa Rica = CRI; Ecuador = ECU; Guatemala = GTM; México = MEX.

5. Discusión

La caracterización morfológica de las especies en cualquier estudio de biodiversidad es tan importante como la caracterización molecular (López-Caballero *et al.*, 2013). En consecuencia, obtuvimos datos morfológicos y moleculares de cuatro poblaciones de *Paragonimus* colombianas. Las especies identificadas corresponden a *P. mexicanus* y a *P. caliensis*, descritas en 1968 en las localidades de Colima, México y Pichindé, Colombia, respectivamente.

En principio, los datos moleculares de las poblaciones de *Paragonimus* de Valle de Pérdidas y Leticia, claramente correspondían a los de *P. mexicanus*. Mientras que los datos moleculares de los ejemplares de Medellín fueron similares a los reportados para metacercarias de *P. caliensis* de Costa Rica (Hernández-Chea *et al.*, 2017).

Para confirmar que los ejemplares de Medellín y Costa Rica corresponden a *P. caliensis*, se recolectaron ejemplares en Pichindé, en la cuenca hidrográfica donde Little (1968) recolectó los ejemplares tipo. Estos nuevos datos, permitieron confirmar la validez de *P. caliensis*, y en consecuencia, identificar los rasgos morfológicos que permiten diferenciar a *P. caliensis* de *P. mexicanus*, y evaluar la distribución geográfica de ambas especies en Colombia y Latinoamérica.

En este apartado, se discutirán los aspectos taxonómicos de *P. caliensis* y *P. mexicanus*, para seguidamente ampliar los datos ecológicos de distribución y hospedadores.

5.1. Caracterización morfológica

5.1.1. Metacercarias

Para identificar los caracteres morfológicos específicos de metacercarias de *P. caliensis* y *P. mexicanus*, se evaluaron tres aspectos: el primero corresponde al tamaño de los ejemplares (cuerpo y

ventosas), el segundo corresponde a la presencia/ausencia de pared quística, y el tercero a estructuras tegumentarias (tipo de espinas; tipo de papilas en tegumento y ventosas; patrón de papilas en la región de la ventosa ventral).

Tamaño de las metacercarias: los datos morfométricos de los ejemplares de Colombia (Medellín y Pichindé) fueron similares con los reportados previamente por Little (1968) como *P. caliensis* (Tabla 10). Las metacercarias de Colombia fueron más pequeñas que las reportadas para Costa Rica (Hernández-Chea *et al.*, 2017). Además, las metacercarias de *P. caliensis* y *P. mexicanus* de Costa Rica, fueron semejantes en tamaño, y solo diferenciables por la presencia/ausencia de pared quística, la forma de las espinas tegumentarias y los datos moleculares (Hernández-Chea *et al.*, 2017).

Sumado a lo anterior, las metacercarias de diferentes poblaciones de *P. mexicanus*, coinciden en forma y tamaño (Tabla 3 en Vélez *et al.*, 2003) con las metacercarias de *P. caliensis* reportadas por Little (1968) y Hernández-Chea *et al.* (2017). Por lo tanto, el tamaño de las metacercarias no es un carácter que permita diferenciar a *P. caliensis* de *P. mexicanus*.

Presencia/ausencia de pared quística: durante la búsqueda de *Paragonimus* en los cangrejos hospedadores, se observó que solo el 8.4% (17/240 quistes en 27 cangrejos examinados) de las metacercarias de *P. caliensis* recuperadas presentaron pared quística. La baja ocurrencia de pared quística fue informada previamente; Little (1968) recuperó pocas metacercarias enquistadas de aproximadamente 720 cangrejos examinados, y Hernández-Chea *et al.* (2017) encontraron solo en el 1.83% (11/599 quistes de *Paragonimus*) de 347 cangrejos examinados.

El análisis molecular de metacercarias enquistadas y no enquistadas de Medellín y Pichindé, confirmó que ambas formas correspondían a *P. caliensis*, y hasta la fecha no existen datos moleculares de metacercarias enquistadas de *P. mexicanus*. Por lo tanto, la presencia de pared del quiste sería un rasgo propio de *P. caliensis*, y la ausencia de pared del quiste es un rasgo compartido entre *P. caliensis* y *P. mexicanus*. De esta forma, se rebate la propuesta de Vélez *et al.* (2009) de que la presencia (como en *P. caliensis*), o ausencia (como en *P. mexicanus*) de una pared quística pueda ser un polimorfismo de *P. mexicanus*.

Por lo anterior, se concluye que la mayoría de metacercarias de *P. caliensis* se encuentran no enquistadas en el hospedador intermediario, y que el hallazgo de metacercarias sin pared quística no implica que estas correspondan a *P. mexicanus*.

Estructuras del tegumento: la forma de las espinas y el patrón de papilas en la región de la ventosa ventral parece tener relevancia taxonómica para el género *Paragonimus*. El tipo y número de papilas en ventosa ventral ha sido útil para diferenciar cinco especies de *Paragonimus* de Tailandia (*P. bangkokensis*, *P. harinasutai*, *P. heterotremus*, *P. siamensis* y *P. westermanni*) (Komalamisra *et al.*, 2005). Sin embargo, en el presente trabajo se encontró que el número de papilas en la región acetabular no permite diferenciar a *P. caliensis* de *P. mexicanus*. El patrón de papilas del tegumento en la región de la ventosa ventral de *P. caliensis* de Medellín (6 IP, 6 MP y 20-30 OP) difiere de los reportados para *P. caliensis* en Costa Rica (7 IP, 6 MP, 0 OP en el morfotipo 1; 0 IP, 6 MP, 0 OP en el morfotipo 2; Figura 2 en Hernández-Chea *et al.* (2017)), y coincide con el patrón de papilas reportado para *P. mexicanus* en Veracruz, México (6 IP, 6 MP y 22-31 OP; Tabla 3 en López-Caballero *et al.* (2013)). Por otro lado, el estudio de las papilas internas (IP) y externas (OP) en la región acetabular se

dificulta por el estado de contracción de las metacercarias, al ser fijadas para su estudio por microscopía electrónica de barrido.

Respecto a la forma de las espinas, las metacercarias de *P. caliensis* presentaron espinas en forma de bayoneta, las cuales son más delgadas y planas que las de *P. mexicanus* (espinas redondeadas, cortas y puntiagudas en Hernández-Chea *et al.*, (2017)). Sin embargo, las espinas de adultos de *P. mexicanus* de Valle de Pérdidas son delgadas y puntiagudas (Lenis, 2006). Noya *et al.* (1992) reportaron dos tipos de espinas en *Paragonimus aff. mexicanus* de Venezuela (*pointed and forked*). Por lo anterior, concluimos que la forma de las espinas genera confusión a nivel taxonómico, y, por lo tanto, no permite diferenciar a *P. caliensis* de *P. mexicanus*.

5.1.2. Adultos

Las características morfológicas del ovario y de los testículos (grado de lobulación y sus posiciones relativas en el cuerpo) de ejemplares adultos, son los criterios usados para la clasificación taxonómica de las especies de *Paragonimus* (Kong *et al.*, 2015). Y como se ha mencionado anteriormente, la clasificación se complica por la presencia de variantes morfológicas dentro de *P. mexicanus*. Por lo tanto, la caracterización morfológica de adultos de *P. caliensis* y *P. mexicanus* fue realizada bajo dos escenarios: (a) *P. caliensis* y *P. mexicanus* son especies diferentes, pero morfológicamente semejantes; y (b) los ejemplares de *P. mexicanus* y de *P. caliensis* de diferentes poblaciones son morfológicamente muy variables. Como resultado, el carácter morfológico que permitió estudiar el escenario (a) fue *el tamaño de las gónadas*, mientras que para el escenario (b) fue *la forma de las gónadas*.

Tamaño de las gónadas: al examinar el *tamaño de las gónadas* y confirmar las especies a nivel molecular, se encontraron dos rasgos únicos para cada especie: (a) largo de los testículos, y (b) relación entre el largo del ovario y el largo de los testículos.

Paragonimus caliensis presenta testículos pequeños en relación con los de *P. mexicanus*, localizados en la tercera cuarta parte del cuerpo, semejantes en tamaño o ligeramente más pequeños que el ovario (Figura 15e-g presente estudio, y Figuras 1-3 y 5-19 en Little, 1968). En *P. caliensis* el ovario es del 115% al 136% más grande que los testículos.

Paragonimus mexicanus presenta testículos extensos, que dependiendo del morfotipo y grado de madurez, pueden alcanzar la parte posterior del cuerpo. Cada uno aproximadamente del mismo tamaño o más largos que el ovario (Figura 16e-l). Los ejemplares de *P. mexicanus* de Colombia presentaron ovarios del 55% al 72% más pequeños que los testículos.

Al evaluar datos morfométricos e ilustraciones de *P. mexicanus* de diferentes autores (Ibañez *et al.*, 1974; López-Caballero *et al.*, 2013; López-Caballero, 2009; Miyazaki *et al.*, 1969; Miyazaki e Ishii, 1968; Noya *et al.*, 1992; Vélez *et al.*, 2003; Voelker y Arzube, 1979), se encontró el mismo rasgo: *testículos más largos que el ovario*. Ibañez *et al.* (1974) analizaron el desarrollo morfológico y morfométrico de 428 ejemplares de *P. peruvianus* (*sinónimo junior* de *P. mexicanus*), recuperados de infecciones experimentales; el ovario y los testículos presentaron el mismo patrón de lobulación en individuos con diferentes grados de madurez (entre 45 y 540 días de desarrollo), mientras que los datos morfométricos revelaron que al menos uno de los testículos era más largo que el ovario en todas los ejemplares analizados (Tablas 4A-

C en Ibañez *et al.* (1974)). La relación del largo ovario/largo testículos (rango: 0.41-1.04) de los ejemplares de Perú, concuerda con las registradas para *P. mexicanus* de Colombia (rango: 0.55-0.72 para ejemplares de Leticia; rango: 0.52-0.57 para ejemplares de Valle de Pérdidas; Tabla 14).

Forma de las gónadas: Cuando se evaluó la forma de las gónadas, se encontraron diferencias notables a nivel de especie. *Paragonimus mexicanus* y *P. caliensis* presentan diferentes morfotipos de ovarios (OvM) y diferentes morfotipos de testículos (TeM) (Tabla 8), y la combinación de ambos (OvM + TeM) produce una *variante morfológica*. De esta forma se encontraron tres variantes de *P. caliensis* (Figura 15), y once variantes de *P. mexicanus*, cinco de estas en México (Miyazaki e Ishii, 1968; López-Caballero *et al.*, 2013; CCH.116.147) y seis en Suramérica (Figura 16). Es precisamente la variación en la forma de las gónadas de *P. mexicanus* y *P. caliensis* la que generó confusión entre los taxónomos en Latinoamérica (Brenes *et al.*, 1980; Miyazaki, 1979; Noya *et al.*, 1992; Tongu, 2001; Vélez *et al.*, 2003; Vélez *et al.*, 2009).

Para la clasificación de las variantes de *Paragonimus* spp., solo se incluyeron ejemplares con ilustraciones/descripciones completas en la literatura. De esta forma *P. caliensis*, incluye dos variantes en Colombia (*caliensis*, y *medellinensis*) y una en Guatemala (*guatemalensis*). Los ejemplares de Costa Rica, publicados por Brenes *et al.* (1980) no pudieron ser examinados, por la baja calidad de las imágenes fotográficas.

Para *P. mexicanus*, se identificaron cinco variantes mexicanas y seis suramericanas. Las variantes de México corresponden al holotipo y un paratipo, descritos como A y B por Miyazaki e Ishii, (1968),

respectivamente. Una tercera variante para la localidad tipo fue identificada en dos ejemplares depositados en la Colección Colombiana de Helmintos (CCH.116.147 en Vélez *et al.*, 2009), y fue demonimada variante “C” de Colima. Dos variantes más fueron descritas por López-Caballero *et al.*, (2013), una en Chiapas y otra en Veracruz. En el presente estudio se incluyen las ilustraciones de las variantes A y C de *P. mexicanus*, ya que se encuentran completas en la literatura. Para Suramérica se identificaron seis variantes: *putumayense* (Little, 1968), *peruvianus* (Miyazaki *et al.*, 1969), *amazonicus* (Miyazaki *et al.*, 1973), *ecuadoriensis* (Voelker y Arzube, 1979), *emberarum* (Vélez *et al.*, 2003) y *leticiana* (descrita por primera vez en el presente estudio).

La identificación de variantes morfológicas de *P. caliensis* y *P. mexicanus* sugiere un nuevo examen morfológico de adultos de *Paragonimus* recolectados y depositados en colecciones helmintológicas en Latinoamérica (Brenes *et al.*, 1984; Miyazaki, 1972; Thatcher, 1967). Esta podría revelar nuevas variantes para ambas especies, y en consecuencia la reclasificación de ejemplares de referencia. De hecho, los ejemplares recolectados por Caballero y Caballero (1946) en Guazacapán, Guatemala (Figura 2h) e identificados como *P. rudis* (Lamothe-Argumedo *et al.*, 1997), presentan características morfológicas similares a *P. caliensis* y representan una tercera variante morfológica (*guatemalensis*) para esta especie. Este registro amplía la distribución de *P. caliensis* desde Colombia hasta Guatemala. De igual forma los ejemplares de Alajuela, recolectados por Brenes Madrigal (1956), y asignados a *P. rudis* (IBUNAM:CNHE:HE1109, 2006) podrían corresponder a *P. caliensis*, más aun cuando la presencia de esta especie fue confirmada por métodos moleculares en esta localidad (Hernández-Chea *et al.*, 2017).

5.2. Caracterización molecular

El marcador molecular ITS2 del ADNr es ampliamente utilizado para evaluar diferencias a nivel de especies en *Paragonimus* (Blair *et al.*, 2016), y al mismo tiempo, todas las poblaciones de *Paragonimus* de Suramérica caracterizadas a nivel molecular cuentan con datos de secuencias de ITS2, pero no con datos de secuencias de CO1 (Calvopiña *et al.*, 2017; Iwagami *et al.*, 2003).

La variación genética hallada entre las especies de *Paragonimus* oscila entre 5.7% y 14%, y por lo tanto, valores menores pueden corresponder a variaciones intraespecíficas. Las distancias genéticas (10.6%) y los valores de bootstrap (100%) confirman a *P. caliensis* y *P. mexicanus* como especies diferentes y como grupos monofiléticos. Además, ambas especies muestran cierto grado de diferenciación entre poblaciones cercanas y distantes (Tablas 13 y 16), en donde la variación genética entre los haplotipos de *P. caliensis* (inferior a 2.16%) y entre los haplotipos de *P. mexicanus* (inferior a 2.11%) sugiere diferencias a nivel de subespecies. Los valores anteriores son similares a los encontrados para los complejos *P. heterotremus* (0.37%-2.22%) y *P. skrjabini* (0.37%-2.59%) en Asia (Figura 17) para el marcador ITS2. Los resultados del presente estudio, concuerdan con las distancias genéticas halladas para *Paragonimus* en estudios previos (Doanh *et al.*, 2013; López-Caballero *et al.*, 2013; Sanpool *et al.*, 2015, 2013).

Además de evaluar variación genética, el marcador ITS2 permitió confirmar los datos morfológicos y de distribución de *P. caliensis* y *P. mexicanus*. Simultáneamente, los valores de variación genética del ITS2 y su eficacia para asociar correctamente individuos de un mismo taxón procedentes de localidades geográficas distantes (Figs. 1 y 17), permite su uso para indicar la existencia de complejos de especies en

Paragonimus (Blair *et al.*, 2016). De hecho, *P. mexicanus* ya fue sugerida como un complejo de especies con base en la variación del gen mitocondrial CO1 (Blair, 2016), con cuatro haplotipos en Ecuador, siete en Guatemala (Iwagami *et al.*, 2003), seis en México (López-Caballero *et al.*, 2013) y seis en Costa Rica (Hernández-Chea *et al.*, 2017). La variación genética reportada para CO1 entre poblaciones de Chiapas y Guatemala oscila entre el 1 y 1.3%, y sugiere que ambas poblaciones corresponden a un mismo taxón. La variación genética entre las poblaciones Chiapas-Guatemala respecto a las poblaciones de Veracruz (4.44% a 5.2%) y Ecuador (4.6% a 5.5%), sugiere que estas dos últimas se encuentran en procesos de especiación (López-Caballero *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en el presente estudio para ITS2, aunque menores que los reportados para CO1 por López-Caballero *et al.* (2013), también indican diferenciación filogeográfica. El presente estudio aporta nueva evidencia morfológica y molecular de que tanto *P. caliensis* como *P. mexicanus* son complejos de especies. *Paragonimus caliensis* presenta 4 haplotipos del ITS2 y tres variantes morfológicas, mientras que *P. mexicanus* presenta 6 haplotipos del ITS2 y once variantes morfológicas.

No se encontró relación directa entre los haplotipos del ITS2 de *Paragonimus* y las variantes morfológicas estudiadas. La relación está mediada por la distribución geográfica, ya que tanto haplotipos como variantes parecen estar restringidos a zonas geográficas. Como ejemplo, el haplotipo *Pm*-H6 y las variantes *peruvianus* y *emberarum* de *P. mexicanus* están restringidos a la región pacífica de Suramérica.

Consideramos que aún falta identificar haplotipos y variantes morfológicas de *P. mexicanis* y *P. caliensis*, datos que permitirán mejorar la resolución taxonómica de *Paragonimus* en Latinoamérica.

5.3. Revisión taxonómica

Precisamente, la identificación de variantes morfológicas y moleculares de *P. mexicanus* y de *P. caliensis* de Colombia, ha permitido aportar datos a la clasificación propuesta por López-Caballero *et al.* (2013), y reevaluar el estatus taxonómico de poblaciones de *Paragonimus* de Latinoamérica (ver Figuras 2, 15 y 16).

5.3.1. *Paragonimus caliensis*

Se confirma a *P. caliensis* como la segunda especie de *Paragonimus* en Latinoamérica con poblaciones en Colombia (presente estudio), Costa Rica (Hernández-Chea *et al.*, 2017) y Guatemala (Caballero y Caballero, 1946).

Paragonimus caliensis presenta tres variantes morfológicas de ejemplares adultos (*caliensis*, *medellinensis*, *guatemalensis*) y cuatro haplotipos del ITS2, dos en Costa Rica (*Pc*-H1 y *Pc*-H2) y dos en Colombia (*Pc*-H3 y *Pc*-H4). Las metacercarias de Costa Rica (Hernández-Chea *et al.*, 2017) son más grandes que las de Colombia, evidenciando variación morfológica en esta fase de desarrollo.

Paragonimus rudis fue descrito de ejemplares juveniles (Thatcher, 1993; Travassos *et al.*, 1969) y en su ilustración tipo (en Thatcher, 1993 y Figura 2a del presente estudio), el ovario y los testículos son semejantes en tamaño, por lo tanto, no es posible asociar el holotipo de *P. rudis* con *P. caliensis* o con *P. mexicanus*.

Paragonimis rudis ilustrado en Yamaguti (1971), corresponde en su morfología con *P. mexicanus*. Yamaguti realizó la siguiente nota aclaratoria “*P. mexicanus*... ¡no comparado con *P. rudis*! Esta especie aparentemente es idéntica a *P. rudis*”.

Paragonimus rudis recolectado en Guatemala por Caballero y Caballero (1946) presenta las características morfológicas (Tabla 8; Figura 15g del presente estudio; OvM3/TeM1), y morfométricas de *P. caliensis*, y por lo tanto es sugerida como *P. caliensis* variante *guatemalensis*.

Paragonimus napensis hallado en *Aroapyrgus colombiensis* y descrito a partir de metacercarias enquistadas en *Zilchiopsis ecuadoriensis* (Amunárriz, 1991), podría corresponder a *P. caliensis* por el hospedador molusco y las características de la metacercaria.

Paragonimus caliensis reportado en Cajamarca, Perú (Miyazaki y Grados, 1972), presenta las características morfológicas de *P. mexicanus* variante *emberarum* (Figura 16j), descrita para Valle de Pérdidas, Colombia.

5.3.2. *Paragonimus mexicanus*

La revisión morfológica revela que *P. mexicanus* presenta cinco variantes en México (López-Caballero *et al.*, 2013; Miyazaki e Ishii, 1968; Vélez *et al.*, 2009) y seis en Suramérica (presente estudio), mientras que los datos moleculares del ITS2 suman seis haplotipos en Guatemala y Ecuador (Iwagami *et al.*, 2003), México (López-Caballero *et al.*, 2013), Costa Rica (Hernández-Chea *et al.*, 2017), Ecuador (Calvopiña *et al.*, 2017) y Colombia. A continuación se discuten las variantes morfológicas descritas para Suramérica.

Paragonimus mexicanus variante *putumayense* descrito por Little (1968) en Putumayo, Colombia, se caracteriza por poseer un ovario compacto con lobulaciones en 1° pequeñas y testículos como astas cortas (Tabla 8; Figura 16g). Hasta la fecha es el único registro de esta variante morfológica, localizada en el rango de distribución del haplotipo *Pm*-H5 en la región Amazónica.

Paragonimus mexicanus variante *peruvianus* descrito por Miyazaki y Grados (1972) en Cajamarca, Perú (Figura 16h), es particular por la forma de los testículos, similar a las astas de un venado, largas y verticales. La variante *peruvianus* fue observada en las siguientes descripciones/localidades: el holotipo de *P. ecuadoriensis* (Voelker y Arzube, 1979; Figura 2f presente estudio) en la región costera de Ecuador; en Putumayo, Colombia (Little, 1968), y en Valle de Pérdidas, Colombia (Figura 24d presente estudio). *Paragonimus mexicanus* variante *peruvianus* coincide en su rango de distribución con el haplotipo *Pm*-H6. A la fecha, las poblaciones de *Paragonimus* de Perú, no cuentan con datos moleculares.

Paragonimus ecuadoriensis (Voelker y Arzube, 1979) descrito en la región costera de Ecuador, incluye dos variantes morfológicas: *peruvianus* (holotipo) y *ecuadoriensis* (paratipos). Por lo tanto, en el presente estudio *P. mexicanus* variante *ecuadoriensis* incluye los paratipos de *P. ecuadoriensis*, ejemplares de Venezuela (Noya *et al.*, 1992) y ejemplares de Leticia recuperados de *T. pecari* (Figura 23e). La variante *ecuadoriensis* coincide en su rango de distribución con los haplotipos *Pm*-H5 y *Pm*-H6. Hasta la fecha las poblaciones de *Paragonimus* sp. de Venezuela no cuentan con datos moleculares.

Paragonimus mexicanus recolectados en Leticia presentan las variantes morfológicas *amazonicus*, *leticiana* y *ecuadoriensis* (Tabla 8; Figura

23) y el haplotipo *Pm*-H5. Este haplotipo fue reportado en la región de Orellana, en Ecuador, por lo tanto *P. mexicanus* (*Pm*-H5) se distribuye en la región Amazónica entre Colombia, Perú y Ecuador.

Los rangos de distribución actual de los hospedadores de *P. mexicanus* (*Pm*-H5) y sus preferencias de hábitat (acuáticos), sugieren que este haplotipo está ampliamente distribuido en la Amazonía. *Trichodactylus faxoni* (Trichodactylidae) fue reportado como hospedador intermediario en Orellana, Ecuador (GenBank: AB968080), y en el presente estudio a *T. pecari* como hospedador definitivo.

Trichodactylus faxoni se distribuye en la cuenca del río Amazonas entre Brasil, Perú y Colombia, y se encuentra en la categoría Preocupación menor (LC) por La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (Cumberlidge, 2008). *Tayassu pecari* (huanganas o pecarí de labios blancos) es un ungulado silvestre neotropical de amplia distribución (norte de Argentina hasta el sur de México) (Sowls, 1997); está clasificado como especie Vulnerable (VU; A2bcde+3bcde) en todo su rango de distribución, de acuerdo con la IUCN, y las poblaciones más numerosas se encuentran en áreas protegidas (Keuroghlian *et al.*, 2015).

Se desconoce el sitio geográfico donde *T. pecari* fue parasitado con *P. mexicanus*. Los pecaríes cazados por pobladores y analizados en el presente estudio se encontraban migrando en manada, aproximadamente de 200 individuos, en dirección Loreto Yaco a Puerto Nariño (km 18), municipio de Leticia, trapezio amazónico colombiano. A nivel ecológico es importante destacar que los pecaríes conforman manadas entre 50 y 300 individuos que se desplazan grandes distancias entre la selva, estableciendo ámbitos hogareños que varían entre 50 y 2000 hectáreas. Además, individuos de una población pueden cambiar

a otra población (Keuroghlian *et al.*, 2015), ampliando así sus rangos migratorios. La dinámica migratoria de los pecaríes en la Amazonía sugiere que los parásitos asociados, incluyendo *Paragonimus*, pueden presentar amplias distribuciones geográficas. En consecuencia, el haplotipo *Pm-H5* de *P. mexicanus* puede presentar un rango de distribución geográfica mucho más amplio que el reportado en el presente estudio, entre las localidades de Orellana (Ecuador) y Leticia (Colombia). De acuerdo con lo anterior, *P. mexicanus* (*Pm-H5*) podría encontrarse a lo largo de la selva Amazónica por los corredores donde las manadas de *T. pecari* migran e intercambian individuos entre poblaciones. De hecho, *Paragonimus* sp. fue previamente reportado en este hospedador en la región amazónica oriental ecuatoriana (Calvopiña *et al.*, 2014), y en el departamento de Madre de Dios en la región sureste del Perú (Carlos *et al.*, 2008). Al comparar prevalencias de infestación y tamaño de los huevos de las poblaciones de *Paragonimus* de Madre de Dios y Leticia, encontramos que las prevalencias fueron similares 4/33 (12.12%), frente a 1/7 (14.28%) respectivamente, y los huevos de *Paragonimus* sp. de Madre de Dios son similares en forma y tamaño (huevos alargados; promedio: 93.3 μm x 49.2 μm) a los presentados para *P. mexicanus* colombianos (Figura 23 a; 72-90 μm x 38-60 μm). El presente estudio constituye el primer registro de *T. pecari* como hospedador de *P. mexicanus* en Colombia, y confirma por primera vez a nivel morfológico y molecular esta relación parásito-hospedador.

Poco se conoce sobre la relación parásito-hospedador *Paragonimus* - *T. pecari*. Se puede deducir por la dinámica migratoria, que este hospedador cumple un papel importante en dispersión de *P. mexicanus* en la Amazonía. La implementación del diagnóstico molecular (ITS2) en huevos de *Paragonimus* es importante porque serviría para realizar este tipo de investigaciones, sin necesidad de sacrificar especies vulnerables, como el *T. pecari*.

La población de *Paragonimus* de Valle de Pérdidas fue identificada previamente por estudios morfológicos como *P. mexicanus* (Lenis, 2006; Vélez *et al.*, 2009), y fue confirmada en el presente estudio en base al análisis molecular del ITS2 de los ejemplares adultos almacenados por Vélez *et al.* (2003). A nivel morfológico presenta las variantes morfológicas *peruvianus* y *emberarum* (Tabla 8; Figura 24). La variante *emberarum* es similar en la forma de los testículos a la variante *ecuadoriensis*, pero varía en la forma del ovario. A nivel molecular, estos ejemplares corresponden al haplotipo *Pm-H6*, el cual se encuentra también en las poblaciones de Esmeraldas, Pedernales y Pichincha (Ecuador). Por lo tanto, *P. mexicanus Pm-H6* se distribuye a lo largo de la región Pacífica Colombiana hasta las regiones Pacífica e interandina del Ecuador. Su distribución potencial puede incluir la zona Pacífica del Perú.

Paragonimus mexicanus Pm-H6, cobra importancia a nivel epidemiológico, debido a que es el único haplotipo confirmado en humanos a nivel molecular. En Colombia, se encuentra localizado en el Parque Nacional Natural Las Orquídeas, en el resguardo Valle de Pérdidas, habitado por la comunidad indígena Emberá Katíos. En este foco *Aroapyrgus* sp., *Hypolobocera bouvieri monticola* y *H. emberarum* actúan como hospedadores intermediarios (Vélez *et al.*, 2003), además, corresponde a uno de los cinco focos de paragonimiasis humana estudiados por Vélez *et al.* (2000), en los departamentos de Chocó y Antioquia, Colombia.

En Ecuador el haplotipo *Pm-H6*, fue detectado en un paciente residente en Puerto Quito, Pichincha, mediante diagnóstico molecular del ITS2 de huevos (tamaño de huevos en esputo: 80 μm \times 50 μm) (Calvopiña *et al.*, 2017). El trabajo de Calvopiña *et al.* (2017) constituye el primer diagnóstico molecular de la paragonimiasis en Latinoamérica, y su

aplicación a nivel clínico y veterinario será útil para evaluar el papel de *P. caliensis* y *P. mexicanus* como agentes causales de la enfermedad.

5.4. Prevalencias de infección

Respecto a la prevalencia de *Paragonimus* en los hospedadores examinados en el presente estudio, los cangrejos mostraron mayores prevalencias de infección (Tabla 4), respecto a los mamíferos (Tabla 5). Consideramos que la baja prevalencia de *Paragonimus* en *D. marsupialis*, *P. opossum* y *T. pecari* se debe a que estas especies son principalmente frugívoras u omnívoras (frutos, insectos y pequeños vertebrados) (Keuroghlian *et al.*, 2015; Astua de Moraes *et al.*, 2016; Siciliano y Waters, 2014), y que el consumo de cangrejos puede ser ocasional. De acuerdo con lo anterior, es posible que otros mamíferos que se alimentan principalmente de cangrejos, puedan tener prevalencias de infección más altas; por ejemplo, el marsupial acuático *Chironectes minimus*, el zorro cangrejero *Cerdocyon thous*, el mapache cangrejero *Procyon cancrivorus*, y la nutria *Lontra longicaudis*, presentes en algunas zonas de distribución de *Paragonimus* en Centro y Suramérica (Lucherini, 2008; Pérez-Hernández *et al.*, 2015; Reid *et al.*, 2016; Rheingantz y Trinca, 2015).

Las altas prevalencias de *Paragonimus* en los cangrejos hospedadores concuerda con los resultados de Uruburu *et al.* (2008), quienes evaluaron cangrejos como indicadores de focos endémicos de *Paragonimus* spp., ya que estos exhiben una mayor prevalencia de infección que los moluscos hospedadores.

5.5. Distribución geográfica

Las descripciones clínicas y silvestres de paragonimiasis en Colombia, revelan la presencia de *Paragonimus* spp. en al menos 31 localidades a

lo largo del país (Tablas 1 y 2). *Paragonimus caliensis* se encuentra entre los departamentos de Valle del Cauca, Antioquia y Chocó, mientras que *P. mexicanus* se encuentra entre Chocó y Amazonas, a lo largo de la cordillera Occidental los Andes Colombianos.

Hasta la fecha no se ha reportado a *P. caliensis* y *P. mexicanus* en la misma localidad/hospedador en Colombia. No obstante, la coexistencia de más de una especie de *Paragonimus* en una localidad se ha reportado en poblaciones asiáticas (Doanh *et al.*, 2013, 2012), y recientemente en América; *Paragonimus caliensis* y *P. mexicanus* se encuentran en simpatria en la localidad de Veragua, Limón, Costa Rica (Hernández-Chea *et al.*, 2017). Aunque en el presente estudio no se encontraron poblaciones de *P. mexicanus* y *P. caliensis* en la misma localidad (Valle de Pérdidas y Medellín son las poblaciones más y cercanas están separadas 65 km en línea recta), se encontró evidencia de la coexistencia de ambas especies en Valle de Pérdidas, Colombia.

En la comunidad Emberá de Valle de Pérdidas se obtuvieron metacercarias con las características morfológicas de *P. caliensis* (3/88 metacercarias con pared quística; 3.4%) en un hospedador *H. emberarum* (datos no publicados por Vélez *et al.* (2003); publicado por Lenis (2006) y Vélez *et al.* (2009)). Sumado a esto, un ejemplar adulto recuperado por Vélez *et al.* (2003), corresponde con la morfología de *P. caliensis* (Figura 2B en Vélez *et al.* (2003)). Sin embargo, en el presente estudio no obtuvimos secuencias de ITS2 de *P. caliensis* para esta localidad. La presencia de *P. caliensis* en Valle de Pérdidas es coherente con su rango de distribución inferido en el presente estudio para Latinoamérica (Figura 22).

La distribución de *P. mexicanus* y *P. caliensis* en Colombia, demuestra el mantenimiento y dispersión de ambas especies a nivel silvestre y el

riesgo de adquirir la enfermedad por pobladores o comunidades debido al hábito de consumir cangrejos y langostinos de río. El reporte del cangrejo rojo americano *Procambarus clarkii* como hospedador de *Paragonimus* en Cundinamarca (Phillips, 2016) y su reciente expansión a otros departamentos como Valle del Cauca (Flórez-Brand y Espinosa-Beltrán, 2011), merece atención en la transmisión del parásito, por su potencial alimenticio, tanto en producción acuícola como en captura silvestre.

El presente estudio caracteriza por primera vez a nivel molecular cuatro poblaciones de *Paragonimus* en Colombia, y señala la importancia de identificar a nivel molecular las poblaciones previamente reportadas, para evaluar el rol de cada especie en la paragonimiasis humana.

5.6. Diagnóstico

El hábito de consumir cangrejos crudos de las comunidades indígenas, sumado al hallazgo de metacercarias con las características de *P. caliensis*, sugiere que esta especie podría también ser agente causal de la paragonimiasis humana en Valle de Pérdidas, Colombia. Como se ha comentado, actualmente el diagnóstico de paragonimiasis humana en Colombia se realiza mediante visualización directa de los huevos en heces, esputo, líquido de lavado bronco-alveolar y pleural (Morales *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2013; Salazar, 2014; Uriza *et al.*, 2011).

Aunque las técnicas anteriores permiten confirmar la enfermedad, no permiten realizar un diagnóstico específico. *Paragonimus caliensis* y *P. mexicanus* presentan huevos de tamaño y forma similar (Figs. 15c-d y 16b-d). Los huevos de ambas especies varían en la amplitud, dificultando así el diagnóstico específico de la paragonimiasis en Latinoamérica.

La implementación del diagnóstico molecular de la paragonimiasis (Calvopiña *et al.*, 2017; Doanh *et al.*, 2011) en Colombia, permitirá evaluar a *P. caliensis* como parásito de humanos, más aún, teniendo en cuenta las áreas donde *P. mexicanus* y *P. caliensis* puedan coexistir. Recalamos la importancia de tomar datos morfológicos de los huevos (tamaño y forma), y recuperar y almacenar muestras de huevos para estudios moleculares.

Para la recuperación de huevos sugerimos utilizar técnicas de sedimentación/concentración que no requieran formol ni éter, como la técnica de sedimentación de Lumbreras para muestras de heces, la técnica de concentración con hidróxido de sodio para muestras de esputo, y concentración de lavado bronco-alveolar y líquido pleural, todas estas técnicas fueron estandarizadas en el PECET para el diagnóstico de la paragonimiasis (Salazar, 2014).

En la presente investigación, aportamos datos del ITS2 de las especies de *Paragonimus* en Colombia, útiles para el diagnóstico molecular de la paragonimiasis humana y silvestre. La identificación molecular y la clarificación del estado taxonómico de las especies de *Paragonimus* en Colombia representa un avance en la capacidad de diagnosticar el parásito a nivel específico, y constituye una herramienta valiosa para futuros estudios ecológicos y epidemiológicos.

6. Conclusiones

Primera:

Los datos morfológicos de metacercarias y adultos, así como los moleculares del ITS2 analizados en este trabajo, validan a *Paragonimus caliensis* como la tercera especie de *Paragonimus* en América.

Segunda:

El carácter morfológico que permite diferenciar las metacercarias de *P. caliensis* y *P. mexicanus* es la presencia (en *P. caliensis*) y ausencia (en *P. mexicanus*) de pared quística.

Tercera:

El carácter morfológico que permite diferenciar ejemplares adultos *P. caliensis* y *P. mexicanus* es el tamaño de las gónadas (relación largo ovario / largo testículos).

Cuarta:

La variación en la forma de las gónadas permite diferenciar tres variantes morfológicas en *P. caliensis* (*caliensis*, *medellinensis* y *guatemalensis*), y seis variantes morfológicas de *P. mexicanus* en Suramérica (*putumayense*, *peruvianus*, *ecuadoriensis*, *emberarum*, *amazonicus* y *leticiana*).

Quinta:

Paragonimus caliensis se distribuye entre Colombia y Guatemala, presenta cuatro haplotipos del ITS2 del ADNr, y se caracteriza por presentar testículos cortos, compactos y lobulados, cada uno aproximadamente del mismo tamaño o más pequeños que el ovario.

Sexta:

Paragonimus mexicanus se distribuye desde México a Perú, presenta seis haplotipos del ITS2 del ADNr, y se caracteriza por presentar testículos largos, de compactos a distendidos y lobulados, cada uno aproximadamente del mismo tamaño o más largos que el ovario.

Séptima:

Se registra por primera vez a *T. pecari* como hospedador de *P. mexicanus* en Colombia. Y se confirma por primera vez a nivel morfológico y molecular esta relación parásito-hospedador.

Octava:

Los datos morfológicos y moleculares del ITS2 de ejemplares adultos confirman a *P. mexicanus* como el agente causal de la paragonimiasis humana en el resguardo indígena de Valle de Pérdidas, Urrao, Antioquia.

Novena:

La coexistencia de *Paragonimus mexicanus* y *P. caliensis* en la región occidental colombiana, en donde se localizan comunidades indígenas consumidoras de cangrejos, sugiere a *P. caliensis* como posible agente causal de la paragonimiasis humana en Colombia.

Décima:

Se propone implementar el diagnóstico molecular del ITS2 de huevos recuperados de humanos y animales para evaluar el papel de *P. mexicanus* y *P. caliensis* como agentes causales de la paragonimiasis en Colombia.

7. Bibliografía

- Abdul-Hadi, S., Díaz-Bello, Z., Zavala-Jaspe, R., Rangel-Lujano, M., Gómez, E., Figueira, I., Alarcón-Noya, B., 2008. Paragonimiasis pulmonar: Descripción de un caso. *Invest. Clin.* 49, 257–264.
- Aguilera, M., Silva, J.F., 1997. Especies y biodiversidad. *Interciencia* 22, 299–306.
- Alvarado, P.L., Pariona, L.R., Beltrán, F.M., 2004. Casos de paragonimiasis (paragonimiosis) en el Hospital Nacional Sergio E. Bernales (Lima, Perú). *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* 21, 107–110.
- Amunárriz, M., 1991. Intermediate hosts of *Paragonimus* in the eastern Amazonic region of Ecuador. *Trop. Med. Parasitol.* 42, 164–166.
- Arias, S.M., Salazar, L.M., Casas, E., Henao, A., Velásquez, L.E., 2011. *Paragonimus* sp. en cangrejos y sensibilización de la comunidad educativa hacia los ecosistemas acuáticos de La Miel y La Clara, Caldas, Antioquia. *Biomédica* 31, 209–215.
- Astua de Moraes, D., Lew, D., Costa, L.P., Pérez-Hernandez, R. 2016. *Didelphis marsupialis*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2016*: e.T40501A22176071. Downloaded on 6 July 2018. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T40501A22176071.en>.
- Bayssade-Dufour, C., Chermette, R., Šundić, D., Radujković, B.M., 2014. *Paragonimus gondwanensis* n. sp. (Digenea, Paragonimidae), parasite of mammals (humans and carnivores) in Cameroon. *Ecol. Montenegrina* 1, 256–267.
- Bayssade-Dufour, C., Chermette, R., Šundić, D., Radujković, B.M., 2015. *Paragonimus kerberti* n.sp. (Digenea, Paragonimidae), parasite of carnivores in Cameroon. *Ecol. Montenegrina* 2, 271–277.
- Blair, D., Chang, Z., Chen, M., Cui, A., Wu, B., Agatsuma, T., Iwagami, M., Corlis, D., Fu, C., Zhan, X., 2005. *Paragonimus skrjabini* Chen, 1959 (Digenea: Paragonimidae) and related species in eastern Asia: a combined molecular and morphological approach to identification and taxonomy. *Syst. Parasitol.* 60, 1–21.

- Blair, D., Nawa, Y., Mitreva, M., Doanh, P.N., 2016. Gene diversity and genetic variation in lung flukes (genus *Paragonimus*). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 110, 6–12.
- Boé, D.M., Schwarz, M.I., 2007. A 31-year-old man with chronic cough and hemoptysis. *Chest* 132, 721–726.
- Brenes, M.R., Rodríguez-Ortiz, B., Vargas, S.G., Ocampo, E.M., Ruiz, S.P.J., 1982. Cerebral hemorrhagic lesions produced by *Paragonimus mexicanus*. Report of three cases in Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 522–526.
- Brenes, R., Hangen, G., Duarte, G., 1984. Review of *Paragonimus* and Paragonimiasis in Central America and Panama. *Rev. Méd. Hosp. Nac. Niños* 19, 87–106.
- Brenes, R., Monge, E., Hangen, G., Vargas, G., Muñoz, G., 1985. Primer caso de Paragonimiasis errática humana en el litoral atlántico de Costa Rica. *Rev. Costarric. Ciencias Médicas.* 6, 88–91.
- Brenes, R.R., Zeledón, R., Rojas, G., 1980. Biological cycle and taxonomic position of a Costa Rican *Paragonimus* and the present status of *Paragonimus* from the New World. *Brenesia* 18, 353–366.
- Buitrago, B., Rodríguez, G., Gómez, P.G., Abril, A., 1981. Human paragonimiasis. First description of a Colombian case. *Biomédica* 1, 142–151.
- Buitrago, R., Mendivelson, D.E., Medina, M.I., Duran, N., Lara, J.C., Gómez, C., Velandia, F., Morón, F., 1998. Paragonimiasis pulmonar, cerebral y abdominal. Presentación de un caso de revisión de la enfermedad en Colombia. *Rev. Colomb. Neumol.* 10, 53–60.
- Caballero y Caballero, E., 1946. Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Tremátoda 11. Presencia de *Paragonimus* en reservorios naturales y descripción de un nuevo género. *Ann. Inst. Biol. Méx.* 17, 137.
- Calvopiña, M., Romero-Alvarez, D., Macias, R., Sugiyama, H., 2017. Case Report: Severe pleuropulmonary paragonimiasis caused by

- Paragonimus mexicanus* treated as tuberculosis in Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96, 97–99.
- Calvopiña, M., Romero, D., Castañeda, B., Hashiguchi, Y., Sugiyama, H., 2014. Current status of *Paragonimus* and paragonimiasis in Ecuador. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 849–855.
- Campos, M.R., 2014. Crustáceos decápodos de agua dulce de Colombia., Biblioteca. ed. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. 691p.
- Carlos, N., Tantaleán, M., Leguía, P.V.G., Alcázar, P.G., Donadi, S.R., 2008. Frequency of helminths in wild white-lipped peccaries (*Tayassu pecari* Link, 1795) from protected areas in Madre de Dios Department, Peru. *Neotrop. Helminthol.* 2, 48–53.
- Casas, E., Gómez, C., Valencia, E., Salazar, L., Velásquez, L.E., 2008. Paragonimosis in the peri-urban zone of Medellín, Antioquia. *Biomédica* 28, 396–403.
- Cornejo, M.W., Náquira, C., Espinoza, Y., Huiza, A., Sevilla, C., 1999. La Paragonimosis en Escolares del Valle de Condebamba, Cajamarca - Perú. *Parasitol. al día.* 22, 102–104.
- Cornejo, W., Tantalean, M., Huiza, A., 1994. Enzimas proteolíticas liberadas *in vitro* por adultos de *Paragonimus mexicanus*. *Rev. Per. Med. Trop.* 8, 57–61.
- Di Rienzo, A., Wilson, A.C., 1990. Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *PNAS* 88, 1–5.
- Diaz, J.H., 2013. Paragonimiasis acquired in the United States: native and nonnative species. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 493–504.
- Díaz, M.T., Marín, M.M., Gómez, M.E., Prieto, A., 2010. Presence of the lung fluke *Paragonimus mexicanus* Miyazaki & Ishii 1968 in three municipalities of Sucre State, Venezuela: morphological description of the metacercaria, adult and egg. *Saber* 22, 5–14.
- Diesing, K.M., 1850. *Distomum rude*. *Syst. Helminthum* 1, 360–361.

- Doanh, P.N., Dung, D.T., Thach, D.T.C., Horii, Y., Shinohara, A., Nawa, Y., 2011. Human paragonimiasis in Viet Nam: Epidemiological survey and identification of the responsible species by DNA sequencing of eggs in patients' sputum. *Parasitol. Int.* 60, 534–537.
- Doanh, P.N., Hien, H. Van, Nonaka, N., Horii, Y., Nawa, Y., 2012. Co-existence of *Paragonimus harinasutai* and *Paragonimus bangkokensis* metacercariae in fresh water crab hosts in central Viet Nam with special emphasis on their close phylogenetic relationship. *Parasitol. Int.* 61, 399–404.
- Doanh, P.N., Horii, Y., Nawa, Y., 2013. *Paragonimus* and Paragonimiasis in Vietnam: an update. *Korean J. Parasitol.* 51, 621–627.
- Fischer, P.U., Curtis, K.C., Marcos, L.A, Weil, G.J., 2011. Molecular characterization of the North American lung fluke *Paragonimus kellicotti* in Missouri and its development in Mongolian gerbils. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 1005–1011.
- Flórez-Brand, P.E., Espinosa-Beltrán, J.O., 2011. Presencia y dispersión del cangrejo rojo americano (*Procambarus clarkii* Girard, 1852) (Decapoda: Cambaridae) en el departamento del Valle del Cauca, Colombia. *Biota Colomb.* 12, 57–62.
- Friant, S., Brown, K., Saari, M.T., Segel, N.H., Slezak, J., Goldberg, T.L., 2015. Wildlife lung fluke (*Paragonimus africanus*) infects Nigerian red-capped mangabeys and causes respiratory disease. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 4, 329–332.
- Gómez, M., Camacho, F., Baena, J., Ojeda, P., Buitrago, B., 1984. Human paragonimiasis. Presentation of a case. *Acta Médica Colomb.* 9, 68.
- Gómez, M.E.G., Díaz-Bello, Z., Zavala-jaspe, R., Díaz, M.T., Noya, O., Alarcón de Noya, B., 2010. Inmunodiagnóstico en *Didelphis marsupialis* usando un antígeno de *Paragonimus* de Venezuela. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam.* 44, 681–688.

- Hall, T., 1999. Bioedit: a userfriendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hernández-Chea, R., Jiménez-Rocha, A.E., Castro, R., Blair, D., Dolz, G., Rica, C., 2017. Morphological and molecular characterization of the metacercaria of *Paragonimus caliensis*, as a separate species from *P. mexicanus* in Costa Rica. *Parasitol. Int.* 66, 126–133.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66, 411–453.
- Ibañez, H.N., Miranda, C.H., Fernández, V.E., Cuba, C., 1974. *Paragonimus* and Paragonimiasis in the Peruvian north. The development process of *Paragonimus peruvianus* Miyazaki, Ibañez and Miranda, 1969 in *Felis cati* L. experimentally infected domestic cat. *Rev. Peru. Biol.* 1, 31–56.
- IBUNAM:CNHE:HE1109, 2006. *Paragonimus rudis* (Diesing, 1850) Stiles y Hassall, 1900 [WWW Document]. UNIBIO Colecc. Biológicas. Univ. Nac. Autónoma México. URL <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:CNHE:HE1109>
- ICZN, 1999. Código Internacional de Nomenclatura Zoológica., 4ta ed. The International Trust for Zoological Nomenclature 1999 c/o The Natural History Museum - Cromwell Road - London SW7 5BD – UK, 156p.
- Iwagami, M., Ho, L.Y., Su, K., Lai, P.F., Fukushima, M., Nakano, M., Blair, D., Kawashima, K., T, A., 2000. Molecular phylogeographic studies on *Paragonimus westermani* in Asia. *J. Helminthol.* 74, 315–322.
- Iwagami, M., Monroy, C., Rosas, M.A., Pinto, M.R., Guevara, a G., Vieira, J.C., Agatsuma, Y., Agatsuma, T., 2003. A molecular phylogeographic study based on DNA sequences from individual metacercariae of *Paragonimus mexicanus* from Guatemala and Ecuador. *J. Helminthol.* 77, 33–38.

- Keuroghlian, A., Desbiez, A., Reyna-Hurtado, R., Altrichter, M., Beck, H., Taber, A. & Fragoso, J.M.V. 2013. *Tayassu pecari*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2013*: e.T41778A44051115. Downloaded on 6 July 2018 <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T41778A44051115.en>.
- Komalamisra, C., Bunchuen, S., Waikagul, J., Pongponratn, E., 2005. Chaetotaxy of newly excysted metacercariae among five species of Thai *Paragonimus*. *J. Trop. Med. Parasitol.* 28, 1–7.
- Kong, Y., Doanh, P.N., Nawa, Y., 2015. *Paragonimus*, in: Lihua Xiao, U.R. and Y.F. (Ed.), *Biology of Foodborne Parasites, Food Microbiology*. CRC Press, pp. 445–462.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Lamothe-Argumedo, R., García-Prieto, L., Osorio-Sarabia, Pérez-Ponce De León, G., 1997. *Catálogo de La Colección Nacional de Helmintos*, Primera. ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, México, D.F. 211p.
- Lenis, V.C.A., 2006. Revisión morfológica e identificación taxonómica de *Paragonimus* sp. de la comunidad Emberá, de Valle de Pérdidas, municipio de Urrao, Antioquia. Universidad de Antioquia. 37p.
- Little, M.D., 1968. *Paragonimus caliensis* sp. n. and Paragonimiasis in Colombia. *J. Parasitol.* 54, 738–746.
- López-Caballero, J., Ocegüera-Figueroa, A., León-Règagnon, V., 2013. Detection of multiple species of human *Paragonimus* from Mexico using morphological data and molecular barcodes. *Mol. Ecol. Resour.* 13, 1125–1136.
- López-Caballero, J.D., 2009. Estudio morfológico y molecular de *Paragonimus mexicanus* Miyazaki e Ishii, 1968 (Digenea: Paragonimiade) de Chiapas, Colima y Veracruz, México. Universidad Nacional Autónoma de México. 92p.

- Lucherini, M. 2015. *Cerdocyon thous*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2015*: e.T4248A81266293. Downloaded on 6 July 2018. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T4248A81266293.en>.
- Maco F.V., Marcos R.L., Terashima I.A., Samalvides C.F., Miranda S.E., Espinoza B.J., Gotuzzo H.E., 2002. Fas2-ELISA y la técnica de sedimentación rápida modificada por lumbreras en el diagnóstico de la infección por *Fasciola*. *Rev. Med. Hered.* 13, 49–57.
- Malek, A.E., Little, M.D., 1971. *Aroapyrgus colombiensis* n. sp. (Gastropoda: Hydrobiidae), snail intermediate host of *Paragonimus caliensis* in Colombia. *Nautilus* 85,20–26.
- Meira, J.A., Alvares, C.M.O., 1986. Sobre o *Paragonimus westermani* no Brasil. Notas sobre um trabalho antigo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 19, 193–194.
- Miyazaki, I., 1979. Identity of *Paragonimus mexicanus* Miyazaki et Ishii, 1968 and *P. peruvianus* Miyazaki, Ibanez et Miranda, 1969. *Nihon-Iji-Shinpo* 2898, 46–49.
- Miyazaki, I., 1972. Occurrence of the lung fluke, *Paragonimus peruvianus* in Panama. *Source J. Parasitol.* 58, 841–842.
- Miyazaki, I., Grados, O., 1972. Occurrence of the lung fluke, *Paragonimus caliensis*, in Peru. *Source J. Parasitol.* 58, 1210–1211.
- Miyazaki, I., Grados, O., Uyema, N., 1973. A new lung fluke found in Peru, *Paragonimus amazonicus* sp. n. (Trematoda: Trogloteamatidae). *Japanese J. Parasitol.* 22, 48–52.
- Miyazaki, I., Ibañez, N., Miranda, H., 1969. On a new lung fluke found in Peru, *Paragonimus peruvianus* sp. n. (Trematoda: Troglotrematidae). *Japanese J. Parasitol.* 18, 123–130.
- Miyazaki, I., Ishii, Y., 1968. Studies on the Mexican lung flukes, with special reference to a description of *Paragonimus mexicanus* sp. nov. (Trematoda: Troglotrematidae). *Japanese J. Parasitol.* 17, 445–453.

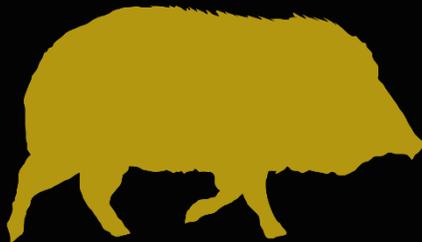
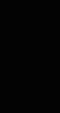
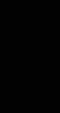
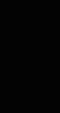
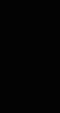
- Morales, M.O.L., Giraldo, A.N.G., Aguirre, M.C.A., Roya, P.C.L., Bustamante, G.L.A., García, M.G.M., Gomez, G.L.A., 2013. Paragonimiasis pulmonar en niños : reporte de dos casos. *IATREIA* 26, 336–345.
- Nkouawa, A., Okamoto, M., Mabou, A.K., Edinga, E., Yamasaki, H., Sako, Y., Nakao, M., Nakaya, K., Blair, D., Agatsuma, T., Enyong, P., Shibahara, T., Moyou-Somo, R., Ito, A., 2009. Paragonimiasis in Cameroon: molecular identification, serodiagnosis and clinical manifestations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 255–261.
- Noya, G.O., Alarcón de Noya, B., Tongu, Y., Yokogawa, M., Arrechdera, H., Hata, H., Kojima, S., Torres, J., Tsuji, M., 1992. Morphology of *Paragonimus* adult worms from Venezuela. *Japaneses J. Parasitol.* 41, 1–9.
- Pérez-Hernandez, R., Brito, D., Tarifa, T., Cáceres, N., Lew, D., Solari, S. 2016. *Chironectes minimus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2016*: e.T4671A22173467. Downloaded on 6 July 2018. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T4671A22173467.en>.
- Phillips, G., 2016. Presence of *Paragonimus* species within the secondary crustacean hosts in Bogotá, Colombia. Georgia State University. 44p.
- Procop, G.W., 2009. North American paragonimiasis (Caused by *Paragonimus kellicotti*) in the context of global paragonimiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 415–446.
- Ramírez, I.C., Combariza, J., Olaya, V., Villa, P., 2013. A 40-Year-old woman from a native indian community with non- Hodgkin lymphoma and hemoptysis. *Clin. Infect. Dis.* 57, 765–766.
- Reid, F., Helgen, K., González-Maya, J.F. 2016. *Procyon cancrivorus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2016*: e.T41685A45216426. Downloaded on 6 July 2018 <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T41685A45216426.en>.
- Rentaría, M., 2000. Breve revisión de los marcadores moleculares, in: Eguiarte, L., Souza, V., Aguirre, X. (Eds.), *Ecología Molecular*. SEMARNAT, INE, UNAM y CONABIO, México, 541–566 p.

- Restrepo, R., 1986. Human paragonimiasis. *Acta Médica Colomb.* 11, 278–281.
- Rheingantz, M.L., Trinca, C.S. 2015. *Lontra longicaudis*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2015*: e.T12304A21937379. Downloaded on 6 July 2018 <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T12304A21937379.en>.
- Ruiz, H.A.L., 2014. Paragonimiasis, in: Becerril, M.A. (Ed.), *Parasitología Médica*. McGraw-Hill, 156–161 p.
- Saborio, P., Lanzas, R., Arrieta, G., Arguedas, A., 1995. *Paragonimus mexicanus* pericarditis: report of two cases and review of the literature. *J Trop Med Hyg.* 98, 316–318.
- Salazar, L.M., 2014. Técnica de coprológico convencional, sedimentación de lumbreras y concentración de esputo para el diagnóstico de paragonimiasis. *Procesos misionales, pruebas diagnósticas*. PECET. Universidad de Antioquia. 3p.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York. 2028 p.
- Sanpool, O., Intapan, P.M., Thanchomnang, T., Janwan, P., Laymanivong, S., Sugiyama, H., Maleewong, W., 2015. Morphological and molecular identification of a lung fluke, *Paragonimus macrorchis* (Trematoda, Paragonimidae), found in central Lao PDR and its molecular phylogenetic status in the genus *Paragonimus*. *Parasitol. Int.* 64, 513–518.
- Sanpool, O., Intapan, P.M., Thanchomnang, T., Janwan, P., Nawa, Y., Blair, D., Maleewong, W., 2013. Molecular variation in the *Paragonimus heterotremus* complex in Thailand and Myanmar. *Korean J. Parasitol.* 51, 677–81.
- Sawada, T., Takei, K., Sato, S., Matsuyama, S., 1968. Studies on the Immunodiagnosis of Paragonimiasis: III. Intradermal skin tests with fractionated antigens. *J. Infect. Dis.* 118, 235–239.

- Siciliano, M., Waters, M., 2014. "*Philander opossum*" (On-line), *Animal Diversity Web*. Accessed July 6, 2018 at http://animaldiversity.org/accounts/Philander_opossum/
- Slemenda, S.B., Maddison, S.E., Jong, E.C., Moore, D.D., 1998. Diagnosis of paragonimiasis by immunoblot. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39, 469–472.
- Stiles, C.W., Hassall, A., 1900. Notes on parasites. 51. The lung fluke (*Paragonimus westermani*) in swine and its relation to parasitic haemoptysis in man. *Annu. Reports Bur. Anim. Ind. U.S. Dep. Agric.* 16, 560–611.
- Thanh, H. Le, Van, D.N., David, B., Donald, P.M., Hideto, K., Agatsuma, T., 2006. *Paragonimus heterotremus* Chen and Hsia (1964), in Vietnam: A molecular identification and relationships of isolates from different hosts and geographical origins. *Acta Trop.* 98, 25–33.
- Thatcher, V.E., 1993. Trematódeos Neotropicais. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Presidencia de la Republica, Ministerio de Ciencia e Tecnología. Manaus, Am Brazil, Calderaro 427p.
- Thatcher, V.E., 1967. *Paragonimus* in some wild and domestic animals of Panama. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 86, 335–336.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. Nucleic Acids Research. ClustalX Wind. interface Flex. Strateg. Mult. Seq. alignment aided by Qual. *Anal. tools.* 24, 4876–4882.
- Toledo, R., Bernal, M.D., Marcilla, A., 2011. Proteomics of foodborne trematodes. *J. Proteomics* 74, 1485–1503.
- Tongu, Y., 2001. The species of *Paragonimus* in Latin America. *Bull. Heal. Scic, Okayama Univ Med Sch.* 12, 1–5.
- Travassos, L., Texeira de Freitas, J.F., Konh, A., 1969. Trematoda do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 67, 1-886.

- Ulate, E., Rojas, G., Hernández-Chea, R., Jiménez-Rocha, A.E., Dolz, G., 2015. Diagnosis of human paragonimiasis in Costa Rica using intradermal test and immunoblot. *J. Harmon. Res. Med. Heal. Sci.* 2, 122–131.
- Uriza, C.A.J., Cuervo, V.C., Valencia, A.M., Echeverri, T.L.M., 2011. Pulmonary, neurological and hepatic compromise in paragonimiasis: case report. *Rev. Colomb. Radiol.* 22, 3357–3361.
- Uruburu, M., Granada, M., Velásquez, L.E., 2008. Partial distribution of *Paragonimus* (Digenea: Troglotrematidae) in Antioquia, due to presence of metacercariae in freshwater crabs. *Biomédica* 28, 562–568.
- Vargas-Arzola, J., Segura-Salvador, A., Reyes-Velasco, L., Díaz-Chiguer, D.L., Márquez-Navarro, A., León-Avila, G., Ibañez-Cervantes, G., Camacho, A.D., Sánchez-Manzano, R.M., Noguera-Torres, B., 2014. Detection of *Paragonimus mexicanus* (Trematoda) metacercariae in crabs from Oaxaca, Mexico. *Acta Trop.* 137, 95–98.
- Vélez, A.H., Cadavid, C., Jaramillo, V.S., Restrepo, H., Angel, M.A., Pizano, J.C., Ortega, J., Trujillo de P, J., 2000. Pulmonary paragonimiasis. Presentation of a case. *Med. U.P.B.* 19, 149–155.
- Vélez, B.I.D., Ortega, J., Hurtado, M.M.I., Salazar, A.L., Robledo, R.S.M., Jimenez, J.N., Velásquez, T.L.E., Robledo, M.S., Jimenez, J.N., Velásquez, T.L.E., 2000. Epidemiology of paragonimiasis in Colombia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 661–663.
- Vélez, I., Lenis, C., Velásquez, L.E., 2009. *Paragonimus mexicanus* (Digenea: Troglotrematidae) from Valle de Pérdidas, Urrao, Antioquia. *Rev. Ciencias, Univ. del Val.* 13, 49–56.
- Vélez, I., Velásquez, L.E., Vélez, I.D., 2003. Morphological description and life cycle of *Paragonimus* sp. (Trematoda: Troglotrematidae): causal agent of human paragonimiasis in Colombia. *J. Parasitol.* 89, 749–55.

- Vélez, I.D., Velásquez, L.E., 2002. Paragonimosis: una investigación multidisciplinaria en salud, biología y cultura en Colombia, Colección Y. Ed. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 61 p.
- Voelker, J., Arzube, M., 1979. A new lung fluke from the coastal range of Ecuador: *Paragonimus ecuadoriensis* n.sp. (Paragonimidae, Trematoda). *Tropenmed. Parasitol.* 30, 249–263.
- Voelker, J., Sachs, R., 1985. Morphology of the lung fluke *Paragonimus uterobilateralis* occurring in Gabon, West Africa. *Z. Tropenmed. Parasitol.* 36, 210–212.
- Voelker, J., Vogel, H., 1965. Two new *Paragonimus* species from West Africa: *Paragonimus africanus* and *Paragonimus uterobilateralis* (Troglotrematidae; Trematoda). *Z. Tropenmed. Parasitol.* 16, 125–148.
- Wongkham, C., Intapan, P.M., Maleewong, W., Miwa, M., 2005. Evaluation of human IgG subclass antibodies in the serodiagnosis of *Paragonimiasis heterotremus*. *Asian Pacific J. Allergy Immunol.* 23, 205–211.
- Yamaguti, S. 1971. Synopsis of the digenetic trematodes of vertebrates. Keigaku Co., Vols. I & II. Tokyo, Japan. 1074p.



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



PECET
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales