

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



Caracterización morfológica y molecular de *Paragonimus mexicanus* y *Paragonimus caliensis* en cangrejos de agua dulce de Costa Rica.

Roderico David Hernández Chea

Universidad Nacional, Heredia, Mayo de 2016

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar al grado de *Magister Scientiae*

Caracterización morfológica y molecular de *Paragonimus mexicanus* y *Paragonimus caliensis* en cangrejos de agua dulce de Costa Rica.

Roderico David Hernández Chea

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar al grado de *Magister Scientiae*

Miembros del Tribunal Examinador

Ph.D. Edgardo Moreno Robles
Representante Consejo Central de Posgrado

Dra. Sandra Estrada König
Coordinadora PCVET

Gaby Dolz, Ph.D.
Tutora

Ana Jiménez Rocha, Ph.D.
Lectora

Marco Vinicio Herrero, Ph.D.
Lector

Roderico David Hernández Chea
Sustentante

RESUMEN GENERAL

El tremátodo *Paragonimus mexicanus* es el agente etiológico de la paragonimiasis, una enfermedad zoonótica de transmisión alimentaria en Costa Rica. En nuestro país se ha reportado una segunda especie, *Paragonimus caliensis*, sin embargo, se desconoce si se trata de una especie diferente o sinónima de *P. mexicanus*. Resultados de estudios morfológicos y moleculares han reconocido hasta la fecha únicamente dos especies de *Paragonimus* presentes en el continente americano: *P. mexicanus* en Centroamérica y Suramérica, y *Paragonimus kellicotti* en Norteamérica. El presente estudio tuvo como objetivo establecer las especies de *Paragonimus* presentes en cangrejos de agua dulce mediante análisis morfológico (microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido) y análisis molecular (amplificación de las regiones 28S, ITS2 y CO1). De un total de 347 cangrejos pseudotelfúsidos recolectados en diferentes zonas de las vertientes Atlántica y Pacífica, y en el Valle Central, 44 (12.6%) individuos se determinaron como infectados con metacercarias de *Paragonimus* spp., las cuales se encontraron sobre todo en hepatopáncreas (56.7%) y en tejido muscular (43.0%). Los cangrejos pertenecieron a cinco especies, tres especies reportadas previamente como hospedadores intermediarios de *Paragonimus* spp. (*Potamocarcinus magnus* y *Ptychophallus tristani*) y tres especies no reportadas hasta la fecha (*Ptychophallus uncinatus*, *Achlidon agrestis* y *Allacanthos yawi*). Mediante microscopía de luz la metacercaria de *P. mexicanus* se mostró sin membrana o quiste, con un cuerpo de color amarillo con gránulos rojizos, mientras que las metacercarias de *P. caliensis* se encontraron recubiertas por una membrana transparente o quiste viscoso, con cuerpo de color rosado con gránulos rojizos. Mediante microscopía electrónica de barrido se determinaron morfotipos, basados en el número y la distribución de papilas en la ventosa ventral, tres para *P. mexicanus* y dos para *P. caliensis*. El análisis molecular determinó a las dos especies,

P. mexicanus y *P. caliensis*, separadas entre sí y con distanciamiento genético de las especies asiáticas. Esto representa el primer reporte de una tercera especie de *Paragonimus* presente en el continente americano. La comparación de los resultados obtenidos en el análisis morfológico y molecular indican que las dos especies *P. mexicanus* y *P. caliensis* son polimórficas. Cangrejos infectados con *P. caliensis* y *P. mexicanus* se encontraron sobre todo en zonas peri-urbanas y selváticas de Costa Rica. La confirmación de *P. caliensis* como especie separada de *P. mexicanus* dirige varios cuestionamientos sobre la ecología, diversidad biológica y epidemiología del género *Paragonimus* en Costa Rica.

En la segunda parte de este estudio se realizó la infección experimental de siete ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), las cuales fueron infectadas con metacercarias de *P. mexicanus*, extraídas de órganos y tejidos de cangrejos de agua dulce *Ptychophallus uncinatus* recolectados en el Caribe costarricense. Cuatro roedores fueron infectados por vía oral y tres por vía intraperitoneal. En uno de los roedores infectados por vía intraperitoneal se pudo detectar la presencia de huevos en heces a los cinco meses post-infección. Cinco de siete roedores desarrollaron formas inmaduras (3) y adultas (2), los gusanos adultos extraídos de ratas infectadas por vía intraperitoneal presentaron desarrollo de gónadas, demostrándose así, que es posible producir gusanos adultos de *P. mexicanus* en ratas Wistar. Aunque la tasa de recuperación de gusanos fue muy baja (2.29%), se demostró la susceptibilidad de estos roedores hacia este parásito. Se recomienda el uso de la rata Wistar como modelo animal para infecciones experimentales en futuras investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme salud, bienestar y la oportunidad para seguir creciendo profesionalmente y personalmente.

Al DAAD, Servicio Alemán de Intercambio Académico, por brindarme la oportunidad para continuar con mis estudios profesionales. Gracias por el apoyo incondicional y atención brindada durante 29 meses de estudio.

A mi tutora, Dra. Gaby Dolz por dedicarme su tiempo, asesoría, por abrirme las puertas de su laboratorio, por todo su esmero, pasión y apoyo incondicional para la realización de este estudio, gracias por sus consejos.

A mi lectora Dra. Ana E. Jiménez por brindarme su colaboración, dedicarme su tiempo, asesoría, por abrirme las puertas de su laboratorio y apoyo incondicional para el desarrollo de este proyecto de investigación, gracias por sus consejos.

A mi lector Dr. Marco Vinicio Herrero por guiarme y brindarme su asesoría y colaboración e invertir su tiempo para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Dr. Ingo Wehrtmann por su colaboración incondicional en giras y en la toma de muestras, por transmitirme todo su conocimiento, por dedicar su tiempo, entusiasmo, paciencia, dedicación y pasión, gracias por inducirme a la rama científica de la carcinología.

A la Dra. Ruth Castro por brindarme su colaboración, dedicarme su tiempo, asesoría y apoyo incondicional para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la Lic. Fresia Villalobos y Lic. Raquel Romero, por el esmero en la recolección de muestras y apoyo incondicional brindado durante el trabajo de campo. Por invertir tiempo y energía para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Paron Dekumyoy, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Tailandia. Por su gentileza, amabilidad, asesoría y proporcionar los controles para la realización de la técnica de PCR.

Al Dr. David Blair, Centre for Tropical Biodiversity and Climate Change, James Cook University, Australia. Por su paciencia, asesoría y consejos, gracias por facilitarme información para la realización de este proyecto.

Al Lic. Randall Rubí por brindarme su colaboración, dedicarme su tiempo, y apoyo para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Señor Jorge Hernández del laboratorio de Parasitología, UNA, por su paciencia y valiosa colaboración.

A Nineth Mendoza, Alicia Ramírez y Rocío González por su amistad incondicional y apoyo durante el desarrollo del proyecto, además por ser mi familia durante mi estancia en Costa Rica.

Al Dr. Alejandro Hun, por su colaboración y tiempo, gracias por apoyarme y brindarme consejos.

Al Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, PCVET por su colaboración constante.

A todas las personas e instituciones que colaboraron durante el trabajo de campo para la recolección de las muestras (Lic. Jorge Picado, ICE Buenos Aires, Reserva ecológica de Veragua, Don Rafael Cabraca en la Reserva Indígena de Talamanca, Don Carlos Salazar del Ranario Bijagua, Upala y Lic. Jesús Alfaro de la Universidad Nacional), agradezco infinitamente la inversión de tiempo, entusiasmo y por hacer del trabajo de campo una actividad amena y exitosa.

DEDICATORIA

A mis padres:

Roberto Hernández y Reina Chea por guiarme por el mejor camino, por brindarme valores, apoyo incondicional, consejos, amor y por ser mi fuente de inspiración cada día.

A mis hermanos:

Renato, Roberto y Estuardo por su apoyo incondicional, consejos, amistad y amor, gracias por inspirarme a ser mejor persona y mejor profesional.

A mi fiel amigo:

Nano por su desinteresada convivencia, amor y amistad.

ÍNDICE

Resumen general	iv
Agradecimientos	vi
Dedicatoria	viii
Índice de cuadros	xi
Índice de figuras	xii
Introducción general	xv
Referencias bibliográficas	xxxii

Artículo I

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	4
2. Materiales y métodos	
2.1 Diseño de estudio	6
2.2 Áreas de estudio	6
2.3 Recolecta de cangrejos	7
2.4 Determinación de especies de cangrejos y extracción de metacercarias	8
2.5 Análisis Estadístico	9
2.6 Identificación morfológica de <i>Paragonimus</i> spp.	
2.6.1 Microscopía de luz	9
2.6.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés)	9
2.7 Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación	9
2.8 Análisis de secuencias y construcción de árboles filogenéticos	11
2.9 Georeferenciación de los sitios de estudio	12
3. Resultados	
3.1 Especies de cangrejos y porcentajes de infección	12
3.2 Morfología de las metacercarias por microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés).	16
3.3 Análisis Molecular y filogenético	22

3.4 Sitios de muestreo con cangrejos positivos y negativos a <i>Paragonimus</i> spp.	26
4. Discusión	33
5. Conclusiones	39
6. Recomendaciones	40
7. Referencias Bibliográficas	41
Artículo II	
Resumen	45
Abstract	46
1. Introducción	47
2. Metodología	
2.1 Recolecta, procesamiento de decápodos y extracción de metacercarias	48
2.2 Infección experimental en ratas Wistar	49
2.3 Tinción y Microscopía electrónica de barrido	49
3. Resultados	
3.1 Morfología del gusano adulto de <i>Paragonimus mexicanus</i>	50
3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM) de <i>P. mexicanus</i>	54
4. Discusión	56
5. Conclusiones	59
6. Recomendaciones	60
7. Referencias bibliográficas	61
Discusión General	63
Conclusiones Generales	72
Recomendaciones Generales	74

ÍNDICE DE CUADROS

Artículo I

Cuadro 1.	7
Sitios de recolección de cangrejos de agua dulce en quebradas de Costa Rica.	
Cuadro 2.	10
Cebadores utilizados para las regiones CO1, ITS2 y 28S.	
Cuadro 3.	14
Especies de cangrejos, porcentajes de infección en cangrejos machos por sitio de muestreo y distribución de metacercarias de <i>Paragonimus</i> spp. en órganos y tejidos de los cangrejos.	
Cuadro 4.	15
Porcentajes de infección en cangrejos hembras por sitio de muestreo y distribución de metacercarias de <i>Paragonimus</i> spp. en órganos y tejidos de los cangrejos.	
Cuadro 5.	16
Resultados de análisis estadístico con prueba de chi-cuadrado según las diferencias estadísticas entre los sitios de muestreo y porcentajes de infección de cangrejos positivos a <i>Paragonimus</i> spp.	
Cuadro 6.	17
Mediciones morfométricas de 20 metacercarias de <i>P. mexicanus</i> y 4 metacercarias de <i>P. caliensis</i> . Se obtuvo promedio (\bar{X}) y desviación estándar (σ) para cada medición.	
Cuadro 7.	19
Descripción morfológica de metacercarias por SEM según el número de papilas en la ventosa ventral y sitio de recolecta de los decápodos.	

Cuadro 8.	25
Comparación de morfotipos de metacercarias con especie de <i>Paragonimus</i> , según microscopia electrónica y análisis molecular con cada región amplificada.	

Artículo II

Cuadro 1.	54
Infeción experimental con ratas Wistar infectadas con metacercarias de <i>Paragonimus mexicanus</i> . Porcentaje de recuperación de gusanos adultos en diferentes periodos de sacrificio de las ratas.	

ÍNDICE DE FIGURAS

Artículo I

Figura 1.	18
(A) Metacercaria de <i>P. mexicanus</i> (amarilla), izquierda y metacercaria de <i>P. caliensis</i> (rosada) derecha, vistas en estereoscopio (B) <i>P. mexicanus</i> , microscopía de luz objetivo 10X. (C) Metacercaria de <i>P. caliensis</i> saliendo del quiste, la flecha muestra el quiste. (D) Metacercaria de <i>P. caliensis</i> , microscopía de luz objetivo 10X	
Figura 2.	20
Morfotipos de metacercarias visulizados por SEM. (A) <i>P. mexicanus</i> morfotipo 1 (B) <i>P. mexicanus</i> morfotipo 2 (C) <i>P. mexicanus</i> morfotipo 3 (D) <i>P. mexicanus</i> morfotipo 3 (E) <i>P. caliensis</i> morfotipo 1 (F) <i>P. caliensis</i> morfotipo 2 (G) <i>P. caliensis</i> morfotipo 2.	
Figura 3.	24
Árboles filogenéticos generados para las secuencias amplificadas con las regiones 28S, ITS2 y CO1 por máxima verosimilitud, modelo de sustitución y distanciamiento evolutivo de Jukes Cantor. El análisis de remuestreo (con porcentaje de 1,000 replicaciones) está representado por números en cada uno de los nodos. (CR=Costa Rica, MEX=México, ECU=Ecuador, GUA=Guatemala, THAI=Tailandia, JPN=Japón, VNM=Vietnam, LKA=Sri Lanka, IND=India).	

Figura 4.	26
Figura 4. Sitios de muestreo en los cuales se recolectaron cangrejos pseudotelfúsidos en Costa Rica	
Figura 5.	27
Figura 5. Quebradas con cangrejos infectados y no infectados con metacercarias de <i>Paragonimus</i> spp. Quebrada 1 de Nicoya con ausencia de <i>Paragonimus</i> spp., quebrada 2 de Upala con presencia de <i>P. caliensis</i> , quebrada 3 de Sarapiquí con ausencia de <i>Paragonimus</i>	
Figura 6.	28
Figura 6. Quebradas con cangrejos infectados y no infectados con metacercarias de <i>Paragonimus</i> spp. Quebrada 6 de Guácimo con presencia de <i>P. mexicanus</i> , quebrada 7 de Limón con ausencia de <i>Paragonimus</i> spp., quebradas 8 y 9 de Moravia con ausencia de	
Figura 7.	29
Quebradas con cangrejos infectados y no infectados con metacercarias de <i>Paragonimus</i> spp. Quebradas 11 de Limón con presencia de <i>P. mexicanus</i> y <i>P. caliensis</i> , quebradas 12, 13 y 14 de Talamanca con ausencia de <i>Paragonimus</i> spp. y quebrada 15 de Talamanca con	
Figura 8.	30
Figura 8. Quebradas con cangrejos infectados y no infectados con metacercarias de <i>Paragonimus</i> spp. Quebradas 16 y 18 de Coto Brus con ausencia de <i>Paragonimus</i> spp., quebrada 17 de Coto Brus con presencia de <i>P. mexicanus</i> , quebrada 19 de Buenos Aires con ausencia	
Figura 9.	31
Figura 9. Quebradas con cangrejos infectados y no infectados con metacercarias de <i>Paragonimus</i> spp. Quebradas 21 de Buenos Aires con ausencia de <i>Paragonimus</i> spp., quebrada 22 de Buenos Aires con presencia de <i>P. mexicanus</i> y quebradas 23, 24 y 25 de Parrita con	

Figura 10. 32

Figura 10. Quebradas con cangrejos infectados y no infectados con metacercarias de *Paragonimus* spp. Quebrada 26 de Parrita con presencia de *P. caliensis* y quebradas 27, 28, 29 y 30 de Puriscal con ausencia de *Paragonimus* spp.

Artículo II

Figura 1. 52
Huevo de *Paragonimus mexicanus* encontrado en heces de una rata infectada.

Figura 2. 52
Pulmones de rata No. 6, infectada por vía intraperitoneal con metacercarias de *P. mexicanus*. Se observa un quiste de 1.5 cm en el lóbulo medio a los 5 meses post-infección, del cual se extrajo un gusano adulto.

Figura 3. 53
Duela adulta de *P. mexicanus*, (B) Esquema de un gusano adulto de *P. mexicanus*, recuperado de una rata infectada por vía intraperitoneal a los 5 meses post-infección. (C) Ovario. (D) Duela inmadura de *P. mexicanus*.

Figura 4. 55
Microscopía electrónica de barrido de duela adulta de *P. mexicanus*

Introducción General

Historia y descripción del parásito

El género *Paragonimus* del filo Platyhelminthes está representado por los parásitos conocidos como duelas pulmonares de la clase Trematoda de la familia Troglotrematidae. *Paragonimus westermani* es la especie más conocida e importante a nivel mundial y fue descubierta en 1878 durante la necropsia de un tigre de bengala en el zoológico de Amsterdam en Holanda (Kagawa, 1997). Los parásitos fueron enviados al zoólogo Kerbert, quien describió los organismos y los comparó con otras especies de trematodos. Otras duelas similares se habían observado en nutrias y mangostas de la India, Kerbert la denominó *Distoma westermani* en honor al director del zoológico, Westerman (Kagawa, 1997).

El primer caso de paragonimiasis humana se registró en la isla de Formosa, actualmente Taiwán, en un residente de origen portugués (Kawaga, 1997). El paciente murió de un aneurisma aórtico y durante la autopsia se encontraron los parásitos en los pulmones. Posteriormente se estableció el género *Paragonimus* en 1899, el nombre deriva de dos palabras griegas “para” (al lado de) y “gonimos” (gónadas o genitales) (Kagawa, 1997). En 1850 Diesing descubrió un parásito trematodo en los pulmones de una nutria de Brasil, al cual denominó *Distoma rude*. Desde entonces en América han sido descritas las especies: *P. mexicanus*, *P. caliensis*, *P. amazonicus*, *P. ecuadoriensis*, *P. peruvianus* y *P. kellicotti* (Tongu, 2001).

Morfología

El cuerpo de los parásitos adultos es ovoide, con dimensiones que pueden variar según las especies (Marty y Neafie, 2000). Se han reportado longitudes que varían de 7.5 mm hasta 12 mm de largo, de 4 a 6 mm de ancho y de 3.5 hasta 5 mm de grosor (Marty y Neafie, 2000). Los individuos adultos se caracterizan por una morfología que consiste en una ventosa oral, una ventosa ventral conocida como acetábulo, un sistema digestivo que consiste en una faringe y un esófago que se bifurca en un par de ciegos intestinales. Las especies de *Paragonimus* son hermafroditas, contienen un par de testículos lobulados y el ovario se encuentra en uno de los lados del organismo, mientras que el útero fuertemente enrollado se encuentra en el lado opuesto. La pared del parásito está formada por una capa muscular suave y cubierta por un tegumento que a su vez está recubierto por espinas (Marty y Neafie, 2000). El sistema excretor es de tipo protonefridial y está compuesto por células flamígeras. Las células flamígeras están distribuidas principalmente en los márgenes laterales de la región anterior y en la región media posterior del organismo. Se presume que su función es para propulsión de fluido a través de los ductos excretores, y además participan en el filtrado de soluciones que provienen del fluido corporal (Smyth y Halton, 1983).

En Latinoamérica se han descrito dos diferentes metacercarias, *P. mexicanus* y *P. caliensis*. El descubrimiento de *P. caliensis* por Little (1968) y su denominación como especie se determinó por diferencias morfológicas con *P. mexicanus*, basándose en el número de células flamígeras presentes en las metacercarias de ambas especies; 60 para *P. mexicanus* y 90 para *P. caliensis* (Tongu, 2001). Sin embargo, es muy complicado describir y contar el número exacto de células flamígeras en la metacercaria. Por otro lado las diferentes especies de *Paragonimus* han sido clasificadas de acuerdo a características morfológicas en diferentes estadios, principalmente

en los trematodos adultos y en las metacercarias (Blair et al., 1999; Singh et al., 2012,). Para los adultos estas características se basan en la organización de las espinas tegumentarias, número de ramificaciones de los ovarios y de los testículos, largo del cuerpo y tamaño relativo de las ventosas oral y ventral (Miyazaki, 1991; Blair et al., 1999). Para las metacercarias las características distintivas incluyen presencia de ventosa oral, faringe, ventosa ventral, sistema excretor, poro excretor y ciegos intestinales, la metacercaria de *P. mexicanus* se ha descrito desnuda, sin presencia de quiste y con espinas tegumentarias individuales (Figura 2). También se han realizado mediciones morfométricas que consisten en diámetros relativos de las ventosas oral y ventral, presencia y longitud del estilete en la ventosa oral y otras características como presencia y coloración de gránulos en el cuerpo, número de células flamígeras, y presencia y número de papilas en las ventosas oral y ventral (Blair et al., 1999). Según el número de papilas presentes o ausentes se puede clasificar una metacercaria como un morfotipo; que es una metacercaria diferente en su morfología basado únicamente en las papilas sensoriales de la ventosa ventral. Las papilas pueden ser internas, mediales y externas (Figura 3) En Latinoamérica se han descrito cuatro morfotipos de metacercarias procedentes de los estados mexicanos de Chiapas, Colima, Veracruz y el departamento de Santa Rosa, Guatemala; utilizando microscopía electrónica (López-Caballero et al., 2013).

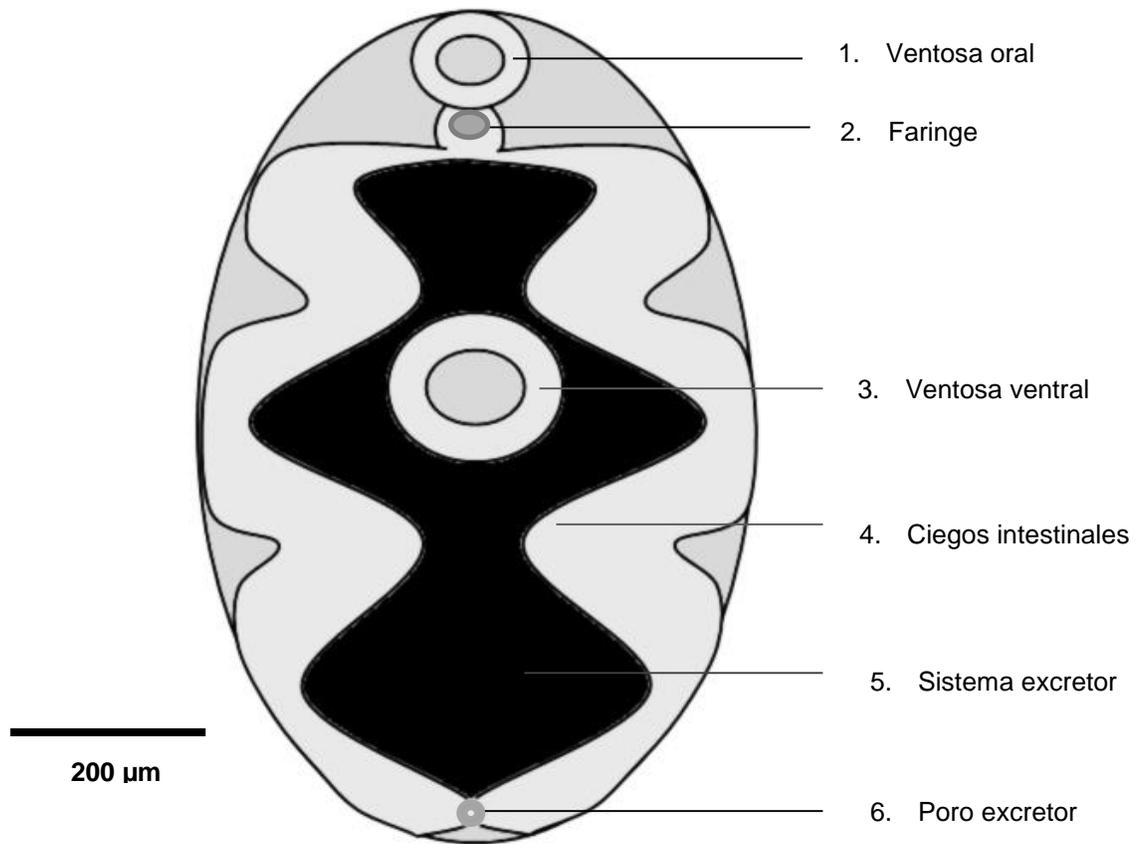


Figura 2. Esquema de la metacercaria de *P. mexicanus*, por microscopía de luz.

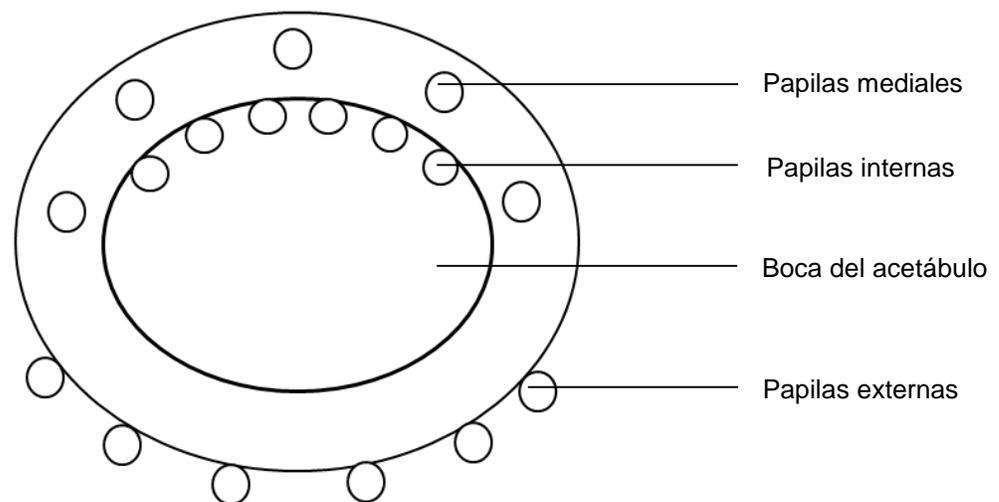


Figura 2. Diagrama de la distribución de las papilas en la ventosa ventral o acetábulo de *Paragonimus* spp. por microscopía electrónica de barrido.

Ciclo de Vida

Las diferentes especies de *Paragonimus* en América son parásitos comunes de mamíferos carnívoros y marsupiales (felinos, zorros, mapaches, mustélidos y zarigüeyas), pero también de carnívoros domésticos, y del ser humano, los cuales son hospedadores definitivos (Caballero, 1956; Montero et al., 1961; Brenes et al., 1968; Healy, 1970). Los parásitos adultos viven en parejas, en quistes en los pulmones de los hospedadores definitivos. Se reproducen por fertilización cruzada y producen 1000 a 2000 huevos diarios. Dichos huevos son expulsados por esputo o bien debido a la acción mecánica de la tos, son deglutidos y pasan al sistema gastrointestinal para salir por las heces. Cuando los huevos alcanzan un cuerpo de agua dulce (río o lago) se desarrollan a miracidios y penetran a su primer hospedador intermediario, que son diversas especies de caracoles de agua dulce (Acha y Szyfres, 2003). Se desarrollan y se reproducen asexualmente dando lugar a redias y cercarias (larvas). La cercaria sale del caracol y libre en el agua, nada o es arrastrada por corrientes de agua para penetrar al hospedador intermediario secundario, un crustáceo de agua dulce (Acha y Szyfres, 2003). En los decápodos el parásito se encuentra en branquias, hepatopáncreas, tejido muscular y corazón. Posteriormente pasa a su estadio infectivo la metacercaria (Brenes et al., 1968, Acha y Szyfres, 2003). Cuando los hospedadores definitivos ingieren los crustáceos infectados, las metacercarias deglutidas pasan por el tracto gastrointestinal hacia duodeno y se desarrollan a gusanos juveniles, luego penetran la pared intestinal y el peritoneo, y migran a través de la pared abdominal del diafragma, hasta llegar a los pulmones, completando así el ciclo (Acha y Szyfres, 2003) . El ciclo biológico de *Paragonimus* spp. se puede apreciar en la Figura 1.

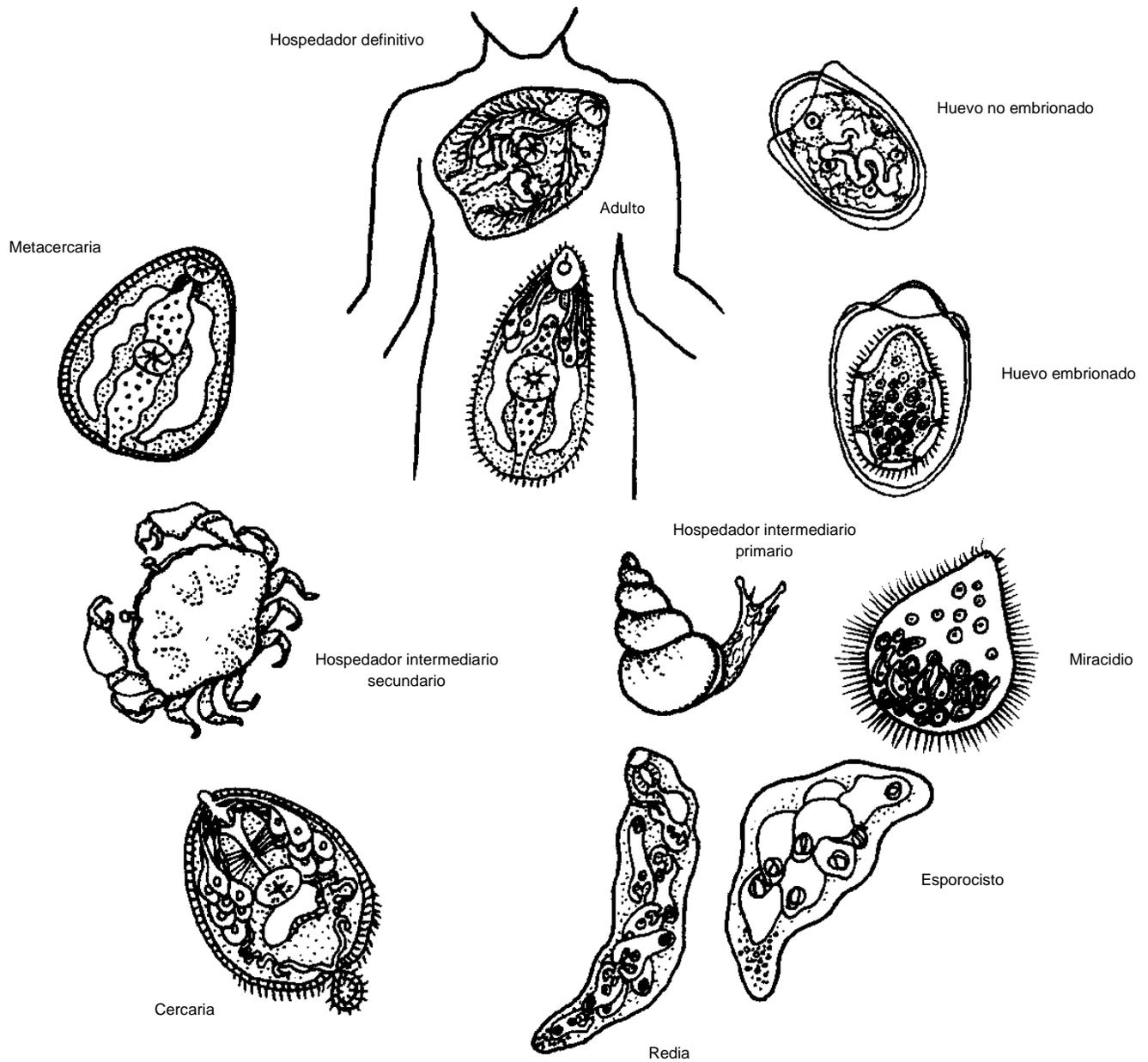


Figura 1. Ciclo biológico de *Paragonimus* spp., (Livingstone, ©BIODIDAC, 1999)

Epidemiología

La paragonimiasis humana es una de las zoonosis más importantes transmitidas por trematodos en América Tropical (Arámbulo y Thakur, 1992; Acha y Szyfres, 2003). La prevalencia de la paragonimiasis a nivel mundial es muy difícil de determinar, debido a la dificultad de su diagnóstico, sin embargo se estima que 293 millones de personas en áreas tropicales y subtropicales están en riesgo de contraer la enfermedad (Procop, 2009). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) actualmente existen al menos 23 millones de casos de paragonimiasis (Fuerst et al., 2012). El número de casos confirmados son en su mayoría del sudeste de Asia y China, sin embargo los casos están subestimados, debido a la poca investigación, falta de reportes y desconocimiento de la enfermedad principalmente en África y América (Procop, 2009). El país del continente americano que ha reportado mayor número de casos es Ecuador, en 1998 se estimó que aproximadamente 500,000 ecuatorianos presentaban la infección (Calvopiña et al., 2014). En el resto de países americanos se sabe de infecciones humanas en Estados Unidos, México, Costa Rica, Guatemala, Nicaragua, Honduras, Panamá, Colombia, Brasil, Perú y Venezuela (Acha y Szyfres, 2003).

Identificación molecular

Existen más de 50 especies descritas del género *Paragonimus* alrededor del mundo, la mayoría en China y el sudeste asiático (Nawa et al., 2014). Siete de ellas corresponden al continente americano (Blair et al., 1999; Vélez et al., 2003). Estas especies han sido diferenciadas principalmente por forma y tamaño de los ovarios y testículos en los parásitos adultos (Voelker y Arzube, 1979). Las especies mejor caracterizadas son *P. kellicoti*, *P. mexicanus*, *P. peruvianus*, *P. inca* y *P. ecuadorensis*. Sin embargo *P. peruvianus*, *P. inca* y *P. ecuadorensis* han sido consideradas recientemente sinónimos de *P. mexicanus* (Tongu, 2001).

Las relaciones taxonómicas de las especies del género *Paragonimus* han cambiado drásticamente debido a la acumulación de información de análisis filogenéticos (Blair et al., 1999). Las especies asiáticas han sido caracterizadas tanto morfológicamente como molecularmente y en la actualidad se reconocen cuatro complejos de especies en el continente asiático. Un complejo se refiere a un grupo de organismos que pertenecen a diferentes especies pero comparten grandes similitudes genéticas así como morfológicas, fisiológicas y así como características fenotípicas (Blair et al., 1999). Recientemente los análisis filogenéticos han revelado que las especies variantes en su morfología pueden no diferir en su secuencia de ADN. La utilización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es de gran utilidad para la identificación de especies utilizando los marcadores moleculares ITS2 (región espaciadora transcrita nuclear ribosomal dos) y CO1 (subunidad genética uno citocromo c oxidasa mitocondrial) (Blair et al., 1999). Algunos estudios sugieren que las variantes morfológicas con poca o ninguna variación genética evidencian la presencia de especies polimórficas (Nawa et al., 2014). En Latinoamérica pocos estudios han caracterizado molecularmente al parásito amplificando las regiones ITS2 y CO1 (Iwagami et al., 2010; López-Caballero et al., 2013). Sin embargo son dos las especies caracterizadas por análisis molecular en el continente americano, *P. mexicanus* y *P. kellicottii* (Fisher et al., 2011).

Infección en el ser humano

Los seres humanos pueden infectarse al ingerir cangrejos y camarones crudos, parcialmente cocidos o mal procesados (ceviche, sal, escabeche, vinagre, salsa de soya, ahumados o secos) (Procop, 2009). Los signos y síntomas clínicos en las personas son significativos cuando los gusanos llegan a los pulmones produciendo tos crónica con expectoración sanguinolenta, dolor de pecho, disnea, fiebre, derrame pleural y neumotórax

(Singh et al., 2005). El trematodo también puede migrar a otros órganos y tejidos ocasionando una paragonimiasis errática o ectópica. Los lugares más frecuentes de migración incluyen el cerebro, la médula espinal, el pericardio, los ojos, el útero, el escroto y los tejidos subcutáneos. La paragonimiasis cerebral es una condición grave que puede estar asociada con dolor de cabeza, discapacidad visual, ataques epilépticos e incluso la muerte (Lamothe et al., 1996). Sin embargo, aunque muchos de los casos reportados son severos, se pueden desarrollar casos crónicos sin mayores complicaciones o con desarrollo de una enfermedad benigna. Incluso pueden existir casos asintomáticos o con infección subclínica (Procop, 2009). Cuando se presentan manifestaciones clínicas importantes, la paragonimiasis se divide en tres categorías: aguda, pleuropulmonar crónica y ectópica o errática.

La paragonimiasis aguda consiste en manifestaciones clínicas que se producen luego de la ingestión de metacercarias y su posterior migración al espacio pleural. Dos a 15 días después de adquirir el parásito puede presentarse dolor abdominal, fiebre y diarrea (Zhong et al., 1981). Dolor de pecho, fatiga y urticaria pueden aparecer posteriormente (Kagawa, 1997). Cuando las formas inmaduras del parásito adulto se localizan en la cavidad pleural ocasionan dolor de pecho y efusiones pleurales (Uchiyama et al., 1999). La paragonimiasis aguda gastrointestinal es muy difícil de diferenciar de cualquier gastroenteritis infecciosa como calicivirus, salmonelosis, shigelosis, campilobacteriosis, giardiasis, entre otras. Mientras que la infección en etapa aguda con manifestaciones pleurales y eosinofilia si pueden causar mayor sospecha de la infección, pero debe diferenciarse de ascariasis e infecciones bacterianas (Procop, 2009).

La pleuroneumonía crónica ocurre cuando los gusanos migran al parénquima pulmonar, por lo general los parásitos adultos se encuentran en parejas y fertilizan los huevos producidos (Blair et al., 2008). La migración de los parásitos adultos de pleura a parénquima pulmonar y la

producción de huevos iniciarán la sintomatología relacionada a la enfermedad crónica. Los huevos deben alcanzar un espacio aéreo para ser expulsados por esputo, la formación de un quiste cerca de las vías aéreas es la localización idónea y este proceso puede causar bronquiectasia, neumonitis intersticial, hemorragias transitorias, bronconeumonía y lesiones del parénquima relacionadas a la migración de los parásitos adultos (Kagawa, 1997). Luego de la producción de huevos y la formación de quistes, uno de los hallazgos clínicos más comunes es hemoptisis; generalmente cuando se presenta suele confundirse con tuberculosis. Si los quistes se localizan cercanos a la pleura y se produce gran cantidad de huevos, estos pueden quedar atrapados en el espacio pleural, entre la pleura parietal y pleura visceral causando así una respuesta inflamatoria severa. Los mediadores de inflamación y la presencia de los huevos como material extraño en los tejidos causan edema y efusiones. El proceso inflamatorio culmina con lesiones fibrosas que restringen la actividad pulmonar normal. (Procop, 2009).

La paragonimiasis ectópica o errática es la migración aberrante de *Paragonimus* spp. puede ocurrir cuando existen cargas parasitarias muy altas. La migración de los parásitos juveniles puede ocurrir en una variedad de órganos, desafortunadamente el cerebro es el sitio primario para paragonimiasis ectópica (Uchiyama et al., 1999). Otras paragonimiasis ectópicas incluyen la invasión de corazón, ojo, tejido subcutáneo (incluyendo la glándula mamaria), órganos genitales, cavidad abdominal e hígado. Incluso la paragonimiasis ectópica ha sido reportada como una causa poco común de infertilidad secundaria debido a la obstrucción de las trompas de Falopio en mujeres y de inflamación escrotal en hombres. (Harinasuta et al., 1993). La paragonimiasis cerebral es más común en niños que en adultos por razones desconocidas. La edad de los pacientes parece ser un factor que contribuye a la presencia de la migración aberrante del parásito (Kusner y King, 1993). Existen dos manifestaciones de paragonimiasis cerebral, una

minoría de los pacientes presenta meningoencefalitis, mientras que la mayoría presenta lesiones ocupantes de espacio en el cerebro que pueden producir vómitos, cambios de conducta drásticos, convulsiones, cefalea, entre otros síntomas. (Kusner y King, 1993). La especie mejor conocida de causar migración aberrante es *Paragonimus skrjabini*; causa paragonimiasis cerebral y además entre un 30 a 60% de las personas infectadas con esta especie pueden presentar nódulos subcutáneos (Procop, 2009). Es importante tener en cuenta que los pacientes con paragonimiasis ectópica pueden al mismo tiempo padecer de la infección pulmonar. Los pacientes sospechosos de paragonimiasis cerebral o ectópica en general deben de ser examinados clínicamente por imagenología, estudios serológicos, examen de heces y esputo, hematología y bioquímica sanguínea para descartar la infección pulmonar (Otsuji, 2003).

Cuando se realiza imagenología médica usualmente no se sospecha de paragonimiasis; se confunde la parasitosis con otras condiciones como tuberculosis o cáncer (Kim et al., 2011). Algunos hallazgos radiológicos importantes son: neumotórax, efusión pleural, consolidaciones de espacio aéreo, opacidades lineares, lesiones quísticas y nodulares de 3 a 4 centímetros de diámetro y bronquiectasia en infecciones ya establecidas (Im et al., 1997; Jeon et al., 2005). La tomografía computarizada y resonancia magnética son comúnmente utilizadas cuando existe paragonimiasis cerebral. En una infección activa se observan lesiones granulomatosas en forma de anillo y lesiones en forma de racimos de 1 a 3 centímetros de diámetro rodeados por áreas edematosas. Estas lesiones llegan a calcificarse asemejándose a burbujas de jabón (Im et al., 1997).

Diagnóstico

Existen tres técnicas diagnósticas que se pueden utilizar: examen parasitológico, serología e inmunología y diagnóstico molecular. La demostración de los huevos del trematodo en heces y esputo, en lavados bronquiales o especímenes removidos quirúrgicamente proveen el diagnóstico definitivo de la enfermedad. Sin embargo, los huevos pueden ser muy difíciles de encontrar, aún con paragonimiasis pulmonar, y más difícil aún, si se trata de paragonimiasis ectópica. En ese caso, las pruebas inmunodiagnósticas son las más sensibles y las más utilizadas (Doanh et al., 2011). La ausencia de huevos puede deberse a una toma de muestras durante el periodo prepatente, en infecciones tempranas y paragonimiasis ectópica. Los huevos no suelen observarse en heces, sin embargo pueden presentarse con mayor frecuencia en heces de niños debido a que comúnmente tragan el esputo. Los huevos pueden presentarse en lavados bronquiales, así como en muestras de pacientes que presentan efusión pleural o bien en tejido removido quirúrgicamente y biopsias (Toscano et al., 1995; Blair et al., 1999; Slesak et al., 2011).

Los hallazgos generales de laboratorio, aunque no específicos, pueden sugerir una infección parasitaria por helmintos. La eosinofilia puede ser un hallazgo común en sangre, aproximadamente dos tercios de los pacientes la manifiestan con $>500 \times 10^9$ eosinófilos/mm³; un tercio de los pacientes pueden manifestar además leucocitosis (Uchiyama et al., 1999). Otro hallazgo es la presencia de eosinófilos y cristales de Charcot-Leyden en secreciones respiratorias y heces de pacientes con paragonimiasis (Choi, 1984). El examen de fluido pleural de pacientes infectados con *Paragonimus* spp. muestra un exudado con niveles elevados de IgE. El fluido pleural es una muestra muy valiosa para evidenciar la presencia de anticuerpos específicos contra el parásito (Yokogawa, 1965).

Los hallazgos patológicos en los tejidos dependen de la etapa de la infección parasitaria. La continua migración de las formas inmaduras del parásito en los tejidos ocasiona degradación tisular debido a las proteasas liberadas. En las áreas de migración del parásito se observan hemorragias focales e infiltración de células blancas (Kagawa, 1997). La etapa tardía de la paragonimiasis pleuropulmonar se puede presentar con nódulos en parénquima y quistes, las lesiones pleurales que contienen los nódulos representan quistes inmaduros, las paredes de los quistes los cuales contienen los parásitos adultos eventualmente se convierten en tejido fibrótico (Choi, 1984). Cuando los parásitos adultos mueren, los quistes se contraen y cicatrizan conteniendo huevos atrapados y el tejido fibrótico llega a calcificarse (Nana y Bovornkitti, 1991). Cuando se observa la cápsula fibrótica, es posible encontrar dos gusanos adultos, sin embargo también puede encontrarse un solo trematodo en su variante triploide (3 juegos completos de cromosomas) que puede habitar en un quiste y producir huevos por partenogénesis causando la enfermedad (Blair et al., 2008). En cantidades abundantes y sin distorsiones, los huevos tienen características que soportan el diagnóstico de la enfermedad; por ejemplo el tamaño, forma y presencia de opérculo. Además los huevos de *Paragonimus* son birrefringentes cuando se exponen a luz polarizada en microscopía, esta característica los diferencia de huevos de otros trematodos como *Schistosoma* spp., cestodos como *Spirometra* spp. y otros helmintos que tienen huevos operculados (Procop, 2009).

Con respecto al diagnóstico serológico, el método más utilizado ha sido la prueba intradérmica. Consiste en la aplicación de antígenos somáticos diluidos del trematodo vía subcutánea en el antebrazo. La lectura de la prueba se realiza inmediatamente después de su aplicación. Una reacción positiva se manifestará con una roncha, la cual debe ser medida (reacción hipersensibilidad tipo I), y se realiza otra lectura a las 72 horas (reacción

hipersensibilidad retardada). La prueba es simple, económica y sensible (Yokogawa, 1965). Sin embargo, tiene algunos inconvenientes para su uso ya que puede dar resultados falsos positivos debido a las reacciones cruzadas con otras infecciones parasitarias, específicamente por otros trematodos, más aún si los antígenos utilizados no se encuentran purificados. Una reacción positiva puede persistir por varios años, aún después de haberse superado la infección, por lo tanto detecta tanto infecciones activas como infecciones pasadas. Sin embargo la prueba intradérmica es útil, para detectar la parasitosis en poblaciones humanas donde la enfermedad es endémica (Yokogawa, 1965; Cheng et al., 2005).

También se han utilizado muchas variantes del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para el diagnóstico serológico de paragonimiasis. Los antígenos del parásito son adheridos a las superficie de una placa de poliestireno, los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes infectados con *Paragonimus* spp. se unirán a estos antígenos adheridos. Luego se agrega el conjugado, que es una enzima marcadora unida a un segundo anticuerpo, que produce un cambio en la coloración del sustrato (Lee et al., 2010). Otras variantes incluyen la utilización de proteína A de origen bacteriano y proteína G en lugar del anticuerpo secundario y varios antígenos parasitarios como antígeno Excretor-Secretor (E-S), péptidos recombinantes y cisteinas-proteasas (Ikeda et al., 1996). Algunos estudios han comparado la utilización del antígeno somático con el antígeno excretor-secretor (ES) del parásito para la prueba de ELISA; ambos antígenos muestran buena sensibilidad pero el antígeno E-S demostró una mayor especificidad (Narain et al., 2005; Ulate et al., 2015). El Dot-Blot (DIGFA, dot immunogold filtration assay, por sus siglas en inglés) ha demostrado ser superior al ELISA para el diagnóstico de paragonimiasis humana. Los antígenos son adheridos a una membrana de nitrocelulosa, luego se agrega el suero a analizar, y el conjugado (anti-anticuerpo humano unido

a oro coloidal). En sueros positivos se formará una mancha coloreada en la membrana (Gan et al., 2005; Qian y Sugiyama 2007; Feng et al., 2010). Este método es económico, práctico, no requiere de equipo sofisticado para su interpretación y además muestra buena sensibilidad y especificidad. El inmunoblot se basa en la separación previa de antígenos parasitarios mediante electroforesis, la ventaja de esta técnica es que determina anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos parasitarios. Este método ha sido utilizado para el diagnóstico de paragonimiasis humana por los Centros de Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta a partir del año 1988. El antígeno generalmente utilizado es un extracto crudo de *P. westermani*, también se han utilizado extractos crudos de *P. kellicoti* (Slemenda et al., 1988; Fisher et al., 2013).

Recientemente, se han utilizado técnicas moleculares para detectar huevos del parásito en esputo o en heces. Mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es posible detectar un número tan pequeño como 3 a 5 huevos en esputo (Chang et al., 2000) y en muestras de heces (Nkouawa et al., 2009; Xiong et al., 2011). Esta técnica se realiza amplificando la región ribosomal ITS2, y seguidamente secuenciando el producto amplificado para determinar la especie de *Paragonimus*. El diagnóstico de paragonimiasis en humanos utilizando PCR y secuenciación se ha realizado únicamente en Asia, Camerún y Estados Unidos (Chang et al., 2000).

Tratamiento

Actualmente se utilizan dos drogas antiparasitarias efectivas para la paragonimiasis a nivel mundial; praziquantel y triclabendazol (Fürst et al., 2012, Chai, 2013). El praziquantel debe administrarse a una dosis de 25 mg/kg tres veces al día por 3 días. El medicamento es muy efectivo, sin embargo en casos de infecciones severas la dosis debe repetirse especialmente si el paciente sufre de efusión pleural o paragonimiasis cerebral activa (Vidamaly et al., 2009; Cho et

al., 2011). La utilización de triclabendazol tiene ventaja sobre el praziquantel, ya que solo requiere de dos dosis de 10 mg/kg o bien a 20 mg/kg en infecciones severas. Esta dosis es mejor tolerada por el paciente y además es más fácil de controlar para los médicos. La cirugía se práctica principalmente en casos de paragonimiasis ectópica, principalmente en la cerebral y subcutánea. El tratamiento de paragonimiasis cerebral activa puede resolverse con drogas antiparasitarias (Cha et al., 1994), sin embargo en casos de paragonimiasis cerebral inactiva o crónica se recomienda la remoción del tejido quirúrgicamente, únicamente si este es de fácil acceso y su localización es superficial (Chen et al., 2013).

Paragonimiasis en Costa Rica

Los dos primeros casos humanos de paragonimiasis en Costa Rica se reportaron por Morera en 1968 y correspondieron a paragonimiasis pulmonar, con derrame pleural en dos niñas de cuatro y seis años de edad, de las cuales una falleció. Desde entonces han sido reportados 28 casos en el país, distribuidos en el Valle Central: Cantón de Puriscal, Cantón de Mora y Cantón de Pérez Zeledón; Atlántico: Cantón de Talamanca y Pacífico; Cantón de Parrita, Buenos Aires y Coto Brus (Morera 1968, Brenes et al., 1976; Duarte et al., 1976; Brenes et al., 1982; Brenes et al., 1985; Arroyo et al., 1992; Saborío et al., 1994; Saborío et al., 1995). La paragonimiasis humana en Costa Rica es una enfermedad que se presenta principalmente en zonas rurales. Los casos humanos publicados demuestran que es una enfermedad mayormente diagnosticada en niños (90%), con 50% de la casuística asociada a manifestaciones extrapulmonares (Ulate et al., 2015). En el año 2000, se realizó un estudio utilizando una prueba intradérmica en 100 niños de la Escuela de Alto Katsi en Talamanca, provincia de Limón, Costa Rica, y se determinó un 23% de los niños con exposición previa a *Paragonimus* spp. A finales del año 2013, se reportó el último caso de paragonimiasis, el paciente fue un niño indígena internado en el Hospital

Nacional de Niños, procedente de la provincia de Bocas del Toro, Panamá. La tomografía axial computarizada detectó una masa en la región temporo-parietal derecha del cerebro, la cual se extrajo mediante neurocirugía y se envió para análisis histopatológico. El examen reveló la presencia de huevos de *Paragonimus* spp. (com. pers. Dra. York,).

Referencias Bibliográficas

- Acha, P. N., & Szyfres, B. (2003). *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Parasitic Zoonoses* (Vol. 3). Pan American Health Org. 3(3) 158-163.
- Arámbulo V. P., Thakur A. S. (1992). *Impact of Zoonoses in Tropical America*. Tropical Veterinary Medicine. Current Issues and Perspectives. *Journal Elsevier*; (663): 407.
- Arroyo, R., Santamaría, S., & Brenes, R. (1992). Hemorragia subaracnoidea producida por *Paragonimus mexicanus*. *Parasitol. día*, 16(1/2), 40-3.
- Blair D, Agatsuma T & Wang W. (2008) Food-borne parasitic zoonoses, vol. 11. Fish and plant-borne parasites. In K. D. Murrell and B. Fried (ed.). Springer, New York, NY; 117–150.
- Blair, D., Wu, B., Chang, Z. S., Gong, X., Agatsuma, T., Zhang, Y. N., ... & Guevara, A. G. (1999). A molecular perspective on the genera *Paragonimus* Braun, *Euparagonimus* Chen and *Paragonimus* Chen. *Journal of helminthology*, 73(04), 295-299.
- Blair, D., Xu, Z. B., & Agatsuma, T. (1999). Paragonimiasis and the genus *Paragonimus*. *Advances in parasitology*, 42, 113-222.
- Brenes RR, Monge E, Duarte G, López F, Rojas G. (1976) *Paragonimiasis errática*. Resúmenes de trabajos libres, IV Congreso Latinoamericano de Parasitología, IV Congreso Centroamericano de Microbiología y Parasitología, III Congreso Nacional de Microbiología y Parasitología, San José, Costa Rica, 50.
- Brenes, M. R., Rodríguez-Ortiz, B., Vargas, S. G., Ocamp, O. E., & Ruiz, S. P. (1982). Cerebral hemorrhagic lesions produced by *Paragonimus mexicanus*. Report of three cases in

- Costa Rica. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 31(3 Pt 1), 522-526.
- Brenes, R. R., Zeledón, R., and Rojas, G. (1968). The finding of *Paragonimus* sp. In mammals, crabs and snails in Costa Rica. *Bol. Chil. Parasitol.* 23: 164.
- Caballero E. (1956). Presencia de *Paragonimus rudis* en mamíferos silvestres de Centroamérica. *Annals Institute Biology.* (27): 397-401.
- Calvopiña, M., Romero, D., Castañeda, B., Hashiguchi, Y., & Sugiyama, H. (2014). Current status of *Paragonimus* and paragonimiasis in Ecuador. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(7), 849-855.
- Cha, S. H., Chang, K. H., Cho, S. Y., Han, M. H., Kong, Y. O. O. N., Suh, D. C. & Kim, M. S. (1994). Cerebral paragonimiasis in early active stage: CT and MR features. *AJR. American journal of roentgenology*, 162(1), 141-145.
- Chai, J. Y. (2013). Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: an update. *Infection & chemotherapy*, 45(1), 32-43.
- Chang, Z. S., Wu, B., Blair, D., Zhang, Y. N., Hu, L., Chen, S. H., ... & Davis, G. M. (1999). Gene sequencing for identification of *Paragonimus* eggs from a human case. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi= Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*, 18(4), 213-215.
- Cheng, Y. Z., Xu, L. S., Chen, B. J., Li, L. S., Zhang, R. Y., Lin, C. X., ... & Lin, K. Q. (2005). [Survey on the current status of important human parasitic infections in Fujian province]. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi= Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*, 23(5), 283-287.

- Cho, A. R., Lee, H. R., Lee, K. S., Lee, S. E., & Lee, S. Y. (2011). A case of pulmonary paragonimiasis with involvement of the abdominal muscle in a 9-year-old girl. *The Korean journal of parasitology*, 49(4), 409-412.
- Choi, W. Y. (1983). *Paragonimus westermani*: pathogenesis and clinical features of infection. *Arzneimittel-Forschung*, 34(9B), 1184-1185.
- Doanh, P. N., 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. *Parasitology international*, 60(4), 534-537.
- Duarte G, Monge E, Brenes RR, Rojas G. (1976). *Un caso humano de paragonimiasis*. Resúmenes de trabajos libres, IV Congreso Latinoamericano de Parasitología, IV Congreso Centroamericano de Microbiología y Parasitología, III Congreso Nacional de Microbiología y Parasitología, San José, Costa Rica, 49.
- Feng, X., Wen, H., Zhang, Z., Chen, X., Ma, X., Zhang, J., ... & Craig, P. S. (2010). Dot immunogold filtration assay (DIGFA) with multiple native antigens for rapid serodiagnosis of human cystic and alveolar echinococcosis. *Acta tropica*, 113(2), 114-120.
- 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 84(6), 1005-1011.
- Fischer, P. U., Curtis, K. C., Folk, S. M., Wilkins, P. P., Marcos, L. A., & Weil, G. J. (2013). Serological diagnosis of North American Paragonimiasis by Western blot using

Paragonimus kellicotti adult worm antigen. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 88(6), 1035-1040.

Fürst, T., Keiser, J., & Utzinger, J. (2012). Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*, 12(3), 210-221.

Fürst, T., Sayasone, S., Odermatt, P., Keiser, J., & Utzinger, J. (2012). Manifestation, diagnosis, and management of foodborne trematodiasis. *BMJ*, 344, e4093.

Gan, X. X., Shi, X. H., Wang, Y., Wang, P. P., Shen, H. Y., Zhu, M. D., ... & ZHANG, S. E. (2005). Development of rapid diagnostic Kit (Dot Immunogold Filtration Assay) for detection of antibodies against *Paragonimus westermani*. *Chinese Journal of Zoonoses*, 21(11), 988.

Harinasuta, T., Pungpak, S., & Keystone, J. S. (1993). Trematode infections. Opisthorchiasis, clonorchiasis, fascioliasis, and paragonimiasis. *Infectious disease clinics of North America*, 7(3), 699-716.

Healy, G. R. (1970). Trematodes transmitted to man by fish, frogs, and crustacea. *Journal of wildlife diseases*, 6(4), 255-261.

Im, J. G., Chang, K. H., & Reeder, M. M. (1997, October). Current diagnostic imaging of pulmonary and cerebral paragonimiasis, with pathological correlation. In *Seminars in roentgenology* (Vol. 32, No. 4, pp. 301-324). WB Saunders.

Ikeda, T., Oikawa, Y., & Nishiyama, T. (1996). Enzyme-linked immunosorbent assay using cysteine proteinase antigens for immunodiagnosis of human paragonimiasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 55(4), 435-437.

Iwagami, M., Monroy, C., Rosas, M. A., Pinto, M. R., Guevara, A. G., Vieira, J. C., & Agatsuma, T. (2003). A molecular phylogeographic study based on DNA sequences

- from individual metacercariae of *Paragonimus mexicanus* from Guatemala and Ecuador. *Journal of helminthology*, 77(1), 33-38.
- Jeon, K., Koh, W. J., Kim, H., Kwon, O. J., Kim, T. S., Lee, K. S., & Han, J. (2005). Clinical features of recently diagnosed pulmonary paragonimiasis in Korea. *CHEST Journal*, 128(3), 1423-1430.
- Kagawa, F. T. (1997, June). Pulmonary paragonimiasis. In *Seminars in respiratory infections* (Vol. 12, No. 2, pp. 149-158).
- Kim, K. U., Lee, K., Park, H. K., Jeong, Y. J., Yu, H. S., & Lee, M. K. (2011). A pulmonary paragonimiasis case mimicking metastatic pulmonary tumor. *The Korean journal of parasitology*, 49(1), 69-72.
- Kusner, D. J., & King, C. H. (1993, June). Cerebral paragonimiasis. In *Seminars in neurology* (Vol. 13, No. 2, p. 201).
- Lamothe, R., Garcia, L., Osorio, D., Perez, G. (1996). Catálogo de la Colección Nacional de Helmintos. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, 76.
- Lee, M. K., Hong, S. J., & Kim, H. R. (2010). Seroprevalence of tissue invading parasitic infections diagnosed by ELISA in Korea. *Journal of Korean medical science*, 25(9), 1272-1276.
- Livingstone, I. (2016). ©BIODIDAC - *Animalia Platyhelminthes Trematoda Paragonimus - trem009b.gif*. [En línea] Biodidac.bio.uottawa.ca. Disponible en:http://biodidac.bio.uottawa.ca/thumbnails/filedet.htm/File_name/trem009b/File_type/gif [Acceso 14 Mar. 2016].

- 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. *Molecular ecology resources*, 13(6), 1125-1136.
- Marty, A. M., and Neafie R. C. Paragonimiasis. (2000) In W. M. Myers, Pathology of infectious diseases, Helminthiasis. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1: 49-67.
- Miyazaki, I. (1991). An illustrated book of helminthic zoonoses. *An illustrated book of helminthic zoonoses*. 125-129.
- Morera P. (1968) Trematodiasis Pulmonar: Estudio de dos casos encontrados en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, (11): 225-237.
- Montero-Gei, F., Vargas R. A. & Chinchilla, M. (1961). *Philander oposum fuscogriseus* nuevo huésped natural de *Paragonimus rudis* en Costa Rica. II Congreso Latinoamericano y I Nacional de Microbiología Costa Rica, 60.
- Nana, A., & Bovornkitti, S. (1991). Pleuropulmonary paragonimiasis. In *Seminars in respiratory medicine* (Vol. 12, No. 1, pp. 46-54). Thieme.
- Narain, K., Devi, K. R., & Mahanta, J. (2005). Development of enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human paragonimiasis. *Indian Journal of Medical Research*, 121(6), 739.
- Nawa, Y., Thaenkham, U., & Ngoc Doanh, P. (2014). *Paragonimus westermani* and *Paragonimus* species. *Encyclopedia of food safety*. Elsevier, 179-88.
- Nkouawa, A., Okamoto, M., Mabou, A. K., Edinga, E., Yamasaki, H., Sako, Y., ... & Enyong, P. (2009). Paragonimiasis in Cameroon: molecular identification, serodiagnosis and

clinical manifestations. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(3), 255-261.

Otsuji, Y. (2003). Paragonimiasis. *Prog. Med. Parasitol. Jpn*, 8, 183-200.

Procop, G. W. (2009). North American paragonimiasis (caused by *Paragonimus kellicotti*) in the context of global paragonimiasis. *Clinical microbiology reviews*, 22(3), 415-446.

Qian, B. Z., & Sugiyama, H. (2007). Development of an immunological diagnostic kit for paragonimiasis and its use for an epidemiological survey of zoonotic paragonimiasis in Mainland China, 1. *Multi-antigen dot immunogold assay (Multi-DIGFA) for serodiagnosis of paragonimiasis, Final report of JHSF project. The Japan Health Sciences Foundation, Tokyo.*

Rojas G, Monge E, Brenes R. *Paragonimus caliensis en Costa Rica*. (1976). IV Congreso Latinoamericano de Parasitología, IV Congreso Centroamericano de Microbiología y Parasitología, III Congreso Nacional de Microbiología y Parasitología, Costa Rica; 58.

Saborío Chacón, P., & Lanzas Rodríguez, R. (1994). Hallazgos electrocardiográficos en 4 pacientes con paragonimiasis pericárdica. *Rev. costarric. cienc. méd*, 15(3/4), 65-8.

Saborio, P., Lanzas, R., Arrieta, G., & Arguedas, A. (1995). *Paragonimus mexicanus* pericarditis: report of two cases and review of the literature. *Tropical Medicine and International Health*, 98(5), 316-318.

Singh, T. N., Kananbala, S., & Devi, K. D. (2005). Pleuropulmonary paragonimiasis mimicking pulmonary tuberculosis-a report of three cases. *Indian journal of medical microbiology*, 23(2), 131.

Singh, T. S., Sugiyama, H., & Rangsiruji, A. (2012). *Paragonimus* & paragonimiasis in India. *The Indian journal of medical research*, 136(2), 192.

- Slemenda, S. B., Maddison, S. E., Jong, E. C., & Moore, D. D. (1988). Diagnosis of paragonimiasis by immunoblot. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 39(5), 469-471.
- Slesak, G., Inthalad, S., Basy, P., Keomanivong, D., Phoutsavath, O., Khampoui, S., ... & Odermatt, P. (2011). Ziehl-Neelsen staining technique can diagnose paragonimiasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(5), e1048.
- Smyth, J. D., & Halton, D. W. (1983). *The physiology of trematodes*. CUP Archive.
- Tongu, Y., & 頓宮廉正. (2001). The species of *Paragonimus* in Latin America. *Bull Fac Health Sci Okayama Univ Med Sch*, 12, 1-5.
- Toscano C, Yu SH, Nunn P et al. (1995). Paragonimiasis and tuberculosis, diagnostic confusion: a review of the literature. *Trop Dis Bull*, 92:R1–R26
- Uchiyama, F., Morimoto, Y., & Nawa, Y. (1999). Re-emergence of paragonimiasis in Kyushu, Japan. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 30(4), 686-691.
- Uchiyama N., F., Mukae, H., & Nawa, Y. (2002). Paragonimiasis: a Japanese perspective. *Clinics in chest medicine*, 23(2), 409-420.
- 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. *Journal Of Harmonized Research in Medical & Health Sci*, 2(3), 122-131.
- Vidamaly, S., Choumlivong, K., Keoulouangkhot, V., Vannavong, N., Kanpittaya, J., & Strobel, M. (2009). Paragonimiasis: a common cause of persistent pleural effusion in Lao PDR. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(10), 1019-1023.

- 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. *Journal of parasitology*, 89(4), 749-755.
- Voelker, J., & Arzube, M. (1979). A new lung fluke from the coastal range of Ecuador: *Paragonimus ecuadoriensis* n. sp. (Paragonimidae, trematoda. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 30(2), 249-263.
- Xiong, T. Q., Yang, B. B., Cheng, Y. J., Liu, N., & Zhou, B. J. (2011). Sequence analysis of egg DNA to identify the paragonimiasis caused by *Paragonimus skrjabini*. *Journal of Tropical Medicine*, 11, 012.
- Yokogawa, M. (2011). *Paragonimus* and paragonimiasis. *Advances in parasitology*, 3, 99-158.
- Zhong, H. L., CHUNG, H., HE, L., Ho, L. Y., Xu, Z. B., Hsu, C. P., ... & TSAO, W. (1981). Recent progress in studies of *Paragonimus* and paragonimiasis control in China. *Chinese medical journal*, 94(8), 483-494.

ARTÍCULO I

Caracterización morfológica y molecular de *Paragonimus mexicanus* y *Paragonimus caliensis* en cangrejos de agua dulce de Costa Rica.

Resumen

El tremátodo *Paragonimus mexicanus* es el agente etiológico de la paragonimiasis, una enfermedad zoonótica de transmisión alimentaria en Costa Rica. En nuestro país se ha reportado una segunda especie, *Paragonimus caliensis*, sin embargo, se desconoce si se trata de una especie diferente o sinónima de *P. mexicanus*. Resultados de estudios morfológicos y moleculares han reconocido hasta la fecha únicamente dos especies de *Paragonimus* presentes en el continente americano: *P. mexicanus* en Centroamérica y Suramérica, y *Paragonimus kellicotti* en Norteamérica. El presente estudio tuvo como objetivo establecer las especies de *Paragonimus* presentes en cangrejos de agua dulce mediante análisis morfológico (microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido) y análisis molecular (amplificación de las regiones 28S, ITS2 y CO1). De un total de 347 cangrejos pseudotelfúsidos recolectados en diferentes zonas de las vertientes Atlántica y Pacífica, y en el Valle Central, 44 (12.6%) individuos se determinaron como infectados con metacercarias de *Paragonimus* spp., las cuales se encontraron sobre todo en hepatopáncreas (56.7%) y en tejido muscular (43.0%). Los cangrejos pertenecieron a cinco especies, tres especies reportadas previamente como hospedadores intermediarios de *Paragonimus* spp. (*Potamocarcinus magnus* y *Ptychophallus tristani*) y tres especies no reportadas hasta la fecha (*Ptychophallus uncinatus*, *Achlidon agrestis* y *Allacanthos yawi*). Mediante microscopía de luz la metacercaria de *P. mexicanus* se mostró sin membrana o quiste, con un cuerpo de color amarillo con gránulos rojizos, mientras que las metacercarias de *P. caliensis* se encontraron recubiertas por una membrana transparente o quiste viscoso, con cuerpo de

color rosado con gránulos rojizos. Mediante microscopía electrónica de barrido se determinaron morfotipos, basados en el número y la distribución de papilas en la ventosa ventral, tres para *P. mexicanus* y dos para *P. caliensis*. El análisis molecular determinó a las dos especies, *P. mexicanus* y *P. caliensis*, separadas entre sí y con distanciamiento genético de las especies asiáticas. Esto representa el primer reporte molecular de una tercera especie de *Paragonimus* presente en el continente americano. La comparación de los resultados obtenidos en el análisis morfológico y molecular indican que las dos especies *P. mexicanus* y *P. caliensis* son polimórficas. Cangrejos infectados con *P. caliensis* y *P. mexicanus* se encontraron sobre todo en zonas peri-urbanas y selváticas de Costa Rica. La confirmación de *P. caliensis* como especie separada de *P. mexicanus* dirige varios cuestionamientos sobre la ecología, diversidad biológica y epidemiología del género *Paragonimus* en Costa Rica.

Palabras clave: *Paragonimus mexicanus*, *Paragonimus caliensis*, caracterización morfológica, caracterización molecular, Costa Rica.

Abstract

The trematode, *Paragonimus mexicanus* is the etiological agent of human paragonimiasis, a foodborne zoonotic disease in Latin America. In Costa Rica a second species, *Paragonimus caliensis* has been reported, however it is unknown whether it is a different species or a synonym of *P. mexicanus*. Results of morphological and molecular studies have recognized so far only two species of *Paragonimus* in the American continent, *P. mexicanus* in South and Central America and *Paragonimus kellicotti* in North America. The objective of the present study was to determine the species of *Paragonimus* present in freshwater crabs through morphological (light microscopy and scanning electron microscopy), and molecular and phylogenetic analyses (amplification of 28S, ITS2 and CO1 regions). Of a total of 347 pseudotelfusid crabs collected in different areas in the Atlantic

and Pacific slopes, and the Central Valley, 44 crabs (12.6%) were determined infected with metacercariae of *Paragonimus* spp., they were found primarily in the hepatopancreas (56.7%) and the muscle tissue (43.0%).

Five species of crabs were found as intermediate hosts of *Paragonimus* spp., of which three have been reported previously (*Potamocarcinus magnus* and *Ptychophallus tristani*) and three are described for the first time (*Ptychophallus uncinatus*, *Achlidon agrestis* y *Allacanthos yawi*). Light microscopy showed the metacercariae of *P. mexicanus* excysted, with a yellow body, and red granules; whereas the metacercariae of *P. caliensis* was encysted, with a pink body and red granules. Scanning electron microscopy determined three morphotypes of *P. mexicanus* metacercariae and two of *P. caliensis*, based on the number and distribution of papillae in the ventral sucker. Molecular analysis established the presence of two species in the country, *P. mexicanus* and *P. caliensis*, with genetic distance between each other and also with the Asian *Paragonimus* species. This is the first report of a third species of *Paragonimus* in the American continent. Comparison of the morphological and molecular results revealed that *P. mexicanus* and *P. caliensis* are polymorphic species. The confirmation of *P. caliensis* as a different species from *P. mexicanus* raises several questions regarding the biological diversity, ecology and epidemiology of the genus *Paragonimus* in Costa Rica.

Key words: *Paragonimus mexicanus*, *Paragonimus caliensis*, morphological characterization, molecular characterization, Costa Rica.

1. Introducción

La paragonimiasis es una enfermedad parasitaria de transmisión alimentaria, la cual se encuentra listada entre las trematodiasis más importantes en Asia, África y América Tropical. Es ocasionada por varias especies del género *Paragonimus* y desde la denominación de este género por Braun en 1899, se han descrito alrededor de 50 especies (Blair, 2014). La mayoría de estas especies se encuentran en el sudeste de Asia y China; cuya especie más importante es *P. westermani*, sin embargo, también existen especies en África; *Paragonimus africanus* y *Paragonimus uterobilateralis*, y en el continente Americano; *Paragonimus kellicotti* y *Paragonimus mexicanus*. De todas las especies descritas, diez son patógenas para el ser humano, entre las cuales se encuentran las únicas dos especies reportadas en el continente Americano (Procop, 2009).

El género *Paragonimus* presenta gran dificultad de clasificación taxonómica, lo cual es importante resolver, ya que la biología, ecología, patogenia y manifestaciones clínicas pueden diferir entre las especies (Miyazaki 1991). La clasificación de especies de este trematodo se ha basado en el pasado en características morfológicas de diferentes estadios del parásito, principalmente de los gusanos adultos y de las metacercarias (Blair et al., 1999; Singh et al., 2012). Sin embargo, estudios moleculares recientes han determinado algunas especies de *Paragonimus* como sinónimas de otras, como ocurrió con *Paragonimus ecuadoriensis* en Ecuador, la cual se determinó después de análisis moleculares y filogenéticos, como sinónima de *P. mexicanus* (Iwagami et al., 2003; Calvopiña, 2014). Hasta la fecha solamente se reconocen dos especies presentes en el continente americano: *P. kellicotti* en Norteamérica y *P. mexicanus* en Centroamérica y Suramérica. Estudios con técnicas moleculares han confirmado la presencia de *P. mexicanus* en México, Guatemala y Ecuador (Iwagami et al., 2003; López-Caballero et al., 2013; Vargas-Arzola et al., 2014).

En Costa Rica se han reportado dos especies de *Paragonimus*: *P. mexicanus* y *Paragonimus caliensis* (Brenes et al., 1980), sin embargo, esta última aún no es aceptada como especie, debido a que su caracterización morfológica es insuficiente para separarla de *P. mexicanus*, por lo que se considera también como una posible variante morfológica de *P. mexicanus* (Vélez et al., 2011). Los estudios sobre paragonimiasis en Costa Rica se han concentrado principalmente en la caracterización morfológica de *Paragonimus* spp., en la determinación de especies de hospedadores intermediarios y definitivos, y en reportes de casos clínicos en humanos ocasionados por este parásito.

El uso de técnicas moleculares para amplificar segmentos del marcador nuclear CO1 y del marcador mitocondrial ITS2 se consideran indispensables, para clasificar las especies de *Paragonimus* presentes en Latinoamérica (Iwagami et al., 2003; López-Caballero et al., 2013).

Hasta la fecha se han determinado cuatro complejos de especies en la clasificación taxonómica de especies de *Paragonimus* en Asia, sin embargo, no ha sido posible establecer si *P. mexicanus* conformaría un complejo de especies, por falta de evidencia molecular. En este sentido, López-Caballero et al. (2013) propusieron que *P. mexicanus* encontrada en México se clasificara como especie críptica, debido a las variaciones genéticas determinadas en sus dos genes (CO1 e ITS2), además por las diferencias morfológicas encontradas por microscopía electrónica de barrido en la distribución y el número de papilas en el acetábulo de las metacercarias, clasificándolas en diferentes morfotipos.

Actualmente no existe ningún estudio sobre la caracterización molecular del género *Paragonimus* en Costa Rica, además no existe evidencia molecular en el continente americano para clasificar a *P. caliensis* como especie separada. Estudios moleculares, filogenéticos y con microscopía electrónica complementarían la información que existe en el

país sobre estos parásitos, y permitirían determinar y caracterizar la(s) especie(s) de *Paragonimus* presentes en Costa Rica. Es por eso que en el presente trabajo se propuso determinar las especies de *Paragonimus* presentes en cangrejos mediante análisis morfológico (por microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido), análisis molecular y filogenético (por amplificación de las regiones 28S, ITS2 y CO1) e identificar (y caracterizar) las quebradas con cangrejos positivos a *Paragonimus* spp.

2. Materiales y Métodos

2.1 Diseño de estudio

Se realizó un estudio transversal descriptivo para establecer la presencia/ausencia de *Paragonimus* spp. y determinar las especies existentes en cangrejos de agua dulce de Costa Rica. Se recolectaron cangrejos de agua dulce capturados in situ en las giras programadas. Ante la ausencia de datos fehacientes sobre el tamaño poblacional de las especies de cangrejos de agua dulce en las vertientes de Costa Rica, no se realizó un cálculo de tamaño de muestra. Se procesaron en el laboratorio los cangrejos recolectados machos, hembras, adultos y juveniles.

2.2 Áreas de Estudio

Se seleccionaron 11 sitios de estudio de acuerdo a reportes sobre avistamientos de cangrejos de agua dulce (com. pers. Ingo Wehrtmann). También se consideraron áreas con reporte de casos de paragonimiasis humana según los expedientes médicos disponibles en el Hospital Nacional de Niños y los casos reportados en la literatura. Los nombres de los sitios y coordenadas se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Sitios de recolección de cangrejos de agua dulce en quebradas de Costa Rica.

Sitio	Provincia	Cantón	Coordenadas N	Coordenadas W	Altura msnm
1	Limón	Limón	9.9258	-83.1909	400
2	Limón	Guácimo	10.2442	-83.6483	332
	Heredia	Sarapiquí	10.2442	-83.9693	373
3	Limón	Talamanca	9.5586	-82.9113	200
4	Alajuela	Upala	10.7262	-85.0562	700
5	Guanacaste	Nicoya	10.0964	-85.4595	500
6	Puntarenas	Parrita	9.6048	-84.2323	231
7	Puntarenas	Buenos Aires	9.2501	-83.3883	916
8	Puntarenas	Coto Brus	9.2815	-83.3707	1,109
9	San José	Puriscal	9.8846	-84.2224	815
10	San José	Moravia	9.2310	-83.4029	1,422
11	Limón	Parismina	10.1438	-83.6769	365

2.3 Recolecta de cangrejos

Fueron recolectados cangrejos psudotelfúsidos en sitios distribuidos en la vertiente Atlántica, vertiente Pacífica y Valle Central de Costa Rica, durante los meses de marzo a noviembre de 2015. Los cangrejos se recolectaron mediante levantamiento de rocas y materia orgánica en las orillas de las quebradas, posteriormente fueron introducidos en bolsas de cierre hermético y mantenidos en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

2.4 Determinación de especies de cangrejos y extracción de metacercarias

Los cangrejos se sacrificaron por choque térmico a -20°C por 10 minutos. Se realizaron mediciones del largo y ancho del cefalotórax de cada uno de los individuos recolectados. Posteriormente se separaron los gonopodios de los individuos machos, para la determinación de las especies de cangrejos mediante análisis morfológico. Los gonopodios fueron examinados en la Universidad de Costa Rica, Centro de investigación de Ciencias Marinas y Limnología (CIMAR) por el Dr. Ingo Wehrtmann y Lic. Fresia Villalobos. Una extremidad de cada individuo de ambos sexos fue almacenada en alcohol 70%, para confirmar las especies de cangrejos por análisis molecular y secuenciación. Este análisis se está llevando a cabo en el Instituto Tecnológico de Costa Rica por parte de M.Sc. Johnny Peraza y se utilizará en una publicación científica para complementar la biodiversidad de cangrejos de agua dulce encontrada en este estudio.

Para la disección de los cangrejos se realizó un corte medio a lo largo del cefalotórax y se separó del cuerpo, dejando expuestos los tejidos blandos, se identificó cada uno de los órganos (falso pulmón, branquias, corazón y hepatopáncreas). Los órganos y el tejido muscular fueron colocados individualmente en platos de Petri de vidrio con solución salina 0.9%. Las quelas y extremidades se colocaron en un mortero con solución salina 0.9% y se trituraron con un pistilo. El contenido se trasladó a platos de Petri y fue observado directamente en estereoscopio (Nikon, ECLIPSE E200, objetivos 10X y 40X), las metacercarias visibles se recolectaron con un gotero y se almacenaron en tubos con solución salina 0.9% hasta su procesamiento.

2.5 Análisis Estadístico

Se realizaron tablas de 2X2 mediante la prueba de chi-cuadrado para determinar las diferencias estadísticas entre porcentaje de infección de las especies de cangrejos, sitios de muestreo y el sexo de los cangrejos. Para este propósito se utilizó el programa Statistical Package for the Social Sciences V.21 (SPSS).

2.6 Identificación morfológica de *Paragonimus* spp.

2.6.1 Microscopía de luz

Las metacercarias fueron lavadas 2 veces con solución salina 0.9%, se colocaron en una lámina portaobjetos, con cubreobjetos y se fijaron con etanol 70%. Los especímenes se observaron en microscopio de luz (Nikon Eclipse E200, objetivos 10X y 40X). Además se realizaron medidas morfométricas del largo y ancho del cuerpo, largo y ancho de la ventosa oral y largo y ancho de la ventosa ventral.

2.6.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés)

Las metacercarias lavadas se fijaron con glutaraldehído 80%, paraformaldehído 10% y Tampón de fosfato 10%, pH 7.2 por 2 minutos. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente por 5 minutos. Las muestras se introdujeron al microscopio electrónico de barrido (Hitachi TM 3000) y se localizó la ventosa ventral, determinándose la presencia de papilas. En base al número de papilas y su distribución en esta estructura se determinó el morfotipo de metacercaria.

2.7 Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación

Las metacercarias seleccionadas se lavaron 2 veces con solución salina 0.9%, se extrajo ADN individualmente de cada una con el ensayo Dneasy® Blood & Tissue

(QIAGEN 2006), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Luego se sometieron a la técnica de PCR. Se amplificaron tres regiones, una correspondiente a un marcador mitocondrial: CO1 (citocromo c oxidasa subunidad 1) y dos correspondientes a marcadores nucleares: un segmento del gen ITS2 (región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal subunidad dos) y un segmento del gen 28S. Las secuencias de los iniciadores se detallan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Cebadores utilizados para las regiones 28S, ITS2 y CO1

Región amplificada	Cebadores	Tamaño (pb)	Referencia
28S	TSD2 (5'-GTACCGTGAGGGAAAGTTG-3')	554	Littlewood y Johnston (1995)
	D4AR (5'-GTCCGTGTTTCAAGAC- GGG-3')		
ITS2	3S (5'-CGG TGG ATC ACT CGG CTC GT-3')	285	Bowles et al. (1995)
	A28 (5'-CCT GGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC-3')		
CO1	FH5 (5'-TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TA-3')	383	Bowles et al. (1995)
	FH3 (5'-TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG-3')		

Cada una de las muestras se preparó de la siguiente manera: 12.5 µl de Dream Taq™ PCR Master Mix (Fermentas®), 2.25 µl (10 pmol/µl) de cada cebador, 3 µl de ADN genómico y 5 µl de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 25 µl. El ADN de un gusano adulto de la especie *Paragonimus heterotremus* se utilizó como control positivo (gentilmente donado por el Dr. Paron Dekumyoy, Mahidol University, Bangkok, Tailandia). Una muestra sin ADN genómico con las mismas cantidades de los reactivos mencionados anteriormente, se utilizó como control negativo.

El protocolo para termociclador de la región CO1 fue el siguiente: desnaturalización de 94°C por 1 min, hibridación de 50°C por 1 min y extensión de 72°C por 2 min (35 ciclos), con una extensión final de 72°C por 10 min. Para la región ITS2 se realizó una desnaturalización de 94°C por 1 min, hibridación de 52°C por 1 min y extensión de 72°C por 2 min (35 ciclos) con una extensión final de 72°C por 10 min. Para la región 28S se realizó una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos; 94°C por 30 segundos, hibridación de 50°C por 30 segundos, extensión de 72°C por 45 segundos (30 ciclos) y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa 1%, en TBE 1X (Tris base, ácido bórico, EDTA, pH8, 0.5M) y teñidos con colorante GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain. La corrida electroforética se realizó a 90 voltios durante 45 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó GenRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas®). Los productos amplificados que mostraron tamaños de 380, 280 y 550 pb con los marcadores moleculares CO1, ITS2 y 28S respectivamente, se consideraron positivos y fueron enviados para su purificación y secuenciación a Macrogen, Seoul, Korea.

2.8 Análisis de secuencias y construcción de árboles filogenéticos

La similitud de cada secuencia fue evaluada utilizando el buscador BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) disponible en la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information), GenBank. La edición de las secuencias se realizó manualmente utilizando el programa Bioedit 7.2 (Hall, 1999) y la alineación a través del programa MUSCLE (Edgar, 2004) con los parámetros predeterminados. El análisis filogenético se realizó con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 6.0 y se construyeron árboles filogenéticos para los genes 28S, ITS2 y CO1 por máxima verosimilitud (Maximum likelihood). Se empleó el modelo de Jukes Cantor (Jukes y Cantor, 1969) para medir las distancias evolutivas y análisis de remuestreo (bootstrap) de 1,000 réplicas para determinar la relación de los clados.

2.9 Georeferenciación de los sitios de estudio

En cada uno de los 11 sitios del estudio se georeferenciaron las quebradas y se generaron mapas de las quebradas mostrando la presencia de cangrejos infectados con metacercarias de *P. mexicanus* y *P. caliensis*, así como cangrejos no infectados. Se incluyó además información sobre la especie de cangrejo macho encontrado en la quebrada o la presencia de cangrejos hembras. Se generó un mapa de Costa Rica con todos los 11 sitios en los cuales se recolectaron cangrejos. Para observar la ubicación de las quebradas con respecto a hidrografía de Costa Rica, se utilizó la escala cartográfica 1:50,000 la cual se obtuvo del Instituto Geográfico Nacional. Los mapas se realizaron con el programa ArcGis 10.

3. Resultados

3.1 Especies de cangrejos y porcentajes de infección

Se recolectaron un total de 347 cangrejos de agua dulce, en la vertiente del Pacífico se recolectaron 222, en la vertiente Atlántica 89 y en Valle Central 36. De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis morfológico de los gonopodios en los individuos machos, se clasificaron 5 especies de cangrejos de agua dulce de la familia Pseudothelphusidae como hospedadores de *Paragonimus* spp., las especies encontradas en cada sitio de muestreo y el porcentaje de infección se muestran en el Cuadro 3. Cuarenta y cuatro cangrejos de un total 347 resultaron infectados (12.9%), 137 fueron machos y 210 hembras. El número de cangrejos recolectados por sitio según sexo se muestra en el Cuadro 3 y Cuadro 4. La diferencia entre el porcentaje de infección con metacercarias de *Paragonimus* spp. entre cangrejos machos y hembras mediante la prueba de chi-cuadrado fue estadísticamente significativa ($P < 0.01$), siendo mayor el porcentaje de infección en cangrejos machos (19.7%) que en hembras (8.0%). Las especies de cangrejos pseudotelfúsidos de las cuales se extrajeron metacercarias de *P. mexicanus* fueron: *Ptychophallus uncinatus*, *Achlidon agrestis* y

Allacanthos yawi. Las metacercarias de *P. caliensis* se extrajeron de 3 diferentes especies de cangrejos las cuales fueron: *Ptychophallus uncinatus*, *Ptychophallus tristani* y *Potamocarcinus magnus*.

No se determinó diferencia significativa entre las especies de cangrejos pseudotelfúsidos y la presencia de metacercarias de *Paragonimus* spp, ($P>0.05$), en todos los casos. Se tomaron los valores de Corrección de continuidad y prueba exacta de Fisher para corregir el error entre poblaciones de especies de cangrejos, debido a que el tamaño de la muestra por especie no fue proporcional en cada sitio de muestreo. Según la localización anatómica de las metacercarias de *Paragonimus* spp. en los órganos y tejidos de los cangrejos; el hepatopáncreas fue el órgano con mayor porcentaje de metacercarias (56.7%, 337), seguido del tejido muscular (43.0%, 258) y las branquias (0.3%, 4).

Los resultados del análisis estadístico de los sitios de muestreo con respecto al porcentaje de infección de cangrejos se muestran en el Cuadro 5. En resumen se determinó la localidad de Limón (Reserva ecológica de Veragua), como el lugar con mayor probabilidad de encontrar cangrejos infectados (porcentaje de infección de 56.5%) y Upala como el segundo sitio con mayor probabilidad (porcentaje de infección de 33.33%), la comparación de estos dos sitios con otros sitios con presencia de *Paragonimus* spp. como Coto Brus, Parrita y Buenos Aires, con porcentajes de infección más bajos (3.8%, 3.3% y 4.6%, respectivamente), mostró una diferencia estadística altamente significativa ($P<0.01$). Para los demás lugares no se encontró diferencia significativa entre el sitio y el porcentaje de infección de cangrejos ($P>0.05$).

Cuadro 3. Especies de cangrejos, porcentajes de infección en cangrejos machos por sitio de muestreo y distribución de metacercarias de *Paragonimus* spp. en órganos y tejidos de los cangrejos.

Sitio	Especie de cangrejo Morfología	Cangrejos ♂			No. metacercarias			Total
		(%)infectados/ Infectados/ Recolectados/	Hepatopáncreas	Tejido muscular	Branquias			
1	<i>Ptychophallus uncinatus</i>	(65.3) 17/26	247	189	4	436		
2	<i>Achlidon agrestis</i> <i>Ptychophallus uncinatus</i>	(25) ¼ (0) 0/2	1	0	0	1		
3	<i>Ptychophallus uncinatus</i> <i>Potamocarcinus magnus</i> <i>Ptychophallus montanus</i>	(28.5) 2/7 (0) 0/6 (0) 0/1	2	0	0	2		
4	<i>Potamocarcinus magnus</i> <i>Ptychophallus montanus</i>	(100) 4/4 (0) 0/2	4	0	0	4		
6	<i>Ptychophallus tristani</i>	(7.14) 1/14	0	1	0	1		
7	<i>Ptychophallus tristani</i> <i>Ptychophallus montanus</i> <i>Potamocarcinus magnus</i> <i>Achlidon puntarenas</i> <i>Allacanthos yawi</i>	(0) 0/30 (0) 0/1 (0) 0/1 (0) 0/2 (20) 2/10	4	0	0	4		
8	<i>Ptychophallus tristani</i> <i>Allacanthos yawi</i>	(0) 0/5 (0) 0/8	0	0	0	0		
9	<i>Ptychophallus tristani</i> <i>Potamocarcinus magnus</i> <i>Potamocarcinus nicaraguensis</i>	(0) 0/4 (0) 0/1 (0) 0/1	0	0	0	0		
10	<i>Ptychophallus tumimanus</i> <i>Ptychophallus kuna</i>	(0) 0/2 (0) 0/5	0	0	0	0		
11	<i>Ptychophallus uncinatus</i>	(0) 0/1	0	0	0	0		
	Total	(19.7) 27/137	254	193	4	450		

Cuadro 4. Porcentajes de infección en cangrejos hembras por sitio de muestreo y distribución de metacercarias de *Paragonimus* spp. en órganos y tejidos de los cangrejos.

Sitio	Cangrejos ♀	No. metacercarias			Total
	(%)infectados/ Infectados/ Recolectados/	Hepatopáncreas	Tejido muscular	Branquias	
1	(45) 9/20	78	62	0	140
2	(33.3) 1/3	1	0	0	1
3	(5.5) 1/18	1	0	0	1
4	(11.1) 1/9	0	1	0	1
5	(0) 0/4	0	0	0	0
6	(2.1) 1/47	1	0	0	1
7	(4.16) 3/72	2	1	0	3
8	(7.7) 1/13	1	0	0	1
9	(0) 0/16	0	0	0	0
10	(0) 0/6	0	0	0	0
11	(0) 0/2	0	0	0	0
Total	(8) 17/210	84	64	0	148

Cuadro 5. Resultados de análisis estadístico para determinar diferencias estadísticas entre los sitios de muestreo y porcentajes de infección de cangrejos positivos a *Paragonimus* spp.

Sitio 1	Sitio 2	Prueba de chi-cuadrado	Resultado P≤0.01	% de infección sitio 1	% de infección sitio 2
Limón	Talamanca	Pearson	0.0023	56.5	9.4
Limón	Buenos Aires	Pearson	0.00000	56.5	4.3
Limón	Coto Brus	Pearson	0.0009	56.5	3.8
Limón	Parrita	Pearson	0.001	56.5	3.3
Upala	Parrita	Fisher	0.003	33.3	3.3
Upala	Buenos Aires	Fisher	0.002	33.3	4.3
Upala	Coto Brus	Fisher	0.01	33.3	3.8

Sitio 1	Sitio 2	Prueba de chi-cuadrado	Resultado P>0.05	% de infección sitio 1	% de infección sitio 2
Limón	Guácimo-Sarapiquí	Fisher	0.07	56.5	22.2
Limón	Upala	Pearson	0.1	56.5	33.3
Guácimo-Sarapiquí	Talamanca	Fisher	0.2	22.2	9.4
Guácimo-Sarapiquí	Upala	Fisher	0.6	22.2	33.3
Guácimo-Sarapiquí	Parrita	Fisher	0.07	22.2	3.3
Guácimo-Sarapiquí	Buenos Aires	Fisher	0.08	22.2	4.3
Guácimo-Sarapiquí	Coto Brus	Fisher	0.1	22.2	3.8
Talamanca	Upala	Fisher	0.08	9.4	33.3
Talamanca	Parrita	Fisher	0.3	9.4	3.3
Talamanca	Buenos Aires	Fisher	0.3	9.4	4.3
Talamanca	Coto Brus	Fisher	0.6	9.4	3.8
Parrita	Buenos Aires	Fisher	1.00	3.3	4.3
Parrita	Coto Brus	Fisher	1.00	3.3	3.8
Buenos Aires	Coto Brus	Fisher	1.00	4.3	3.8

3.2 Morfología de las metacercarias por microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés).

En base a las características morfológicas mediante microscopía de luz se determinaron dos metacercarias, *P. mexicanus* y *P. caliensis* (Figura 1A). La metacercaria de *P. mexicanus* se observó desnuda, sin membrana o quiste, con un cuerpo de color amarillo, presencia de gránulos rojizos y con movimiento (Figura 1B). Las medidas morfométricas de un total de 20 metacercarias de *P. mexicanus* se detallan en el Cuadro 6.

La metacercaria de *P. caliensis* se mostró más elongada que la metacercaria de *P. mexicanus*, recubierta por una fina membrana transparente o quiste de aspecto viscoso, con un cuerpo de color rosado y con gránulos rojizos. Fuera del quiste las metacercarias se

observaron con ciegos intestinales transparentes y presentaron movimientos (Figura 1C y 1D). Las medidas promedio de un total de 4 metacercarias de *P. caliensis* se detallan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Mediciones morfométricas de 20 metacercarias de *P. mexicanus* y 4 metacercarias de *P. caliensis*. Se obtuvo promedio (\bar{x}) y desviación estándar (σ) para cada medición.

Medición	Metacercaria de <i>P. mexicanus</i>		Metacercaria de <i>P. caliensis</i>	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
Largo-ancho del cuerpo μm	1,202 – 631	493.1 - 48.3	1,300 - 683	173.2 – 125.8
Largo-ancho de la ventosa oral μm	105 – 112	8.8 – 12	154 -158	6.92 – 6.92
Largo-ancho de la ventosa ventral μm	222 – 215	22.8 – 13.3	263 - 263	32.14 – 32.14

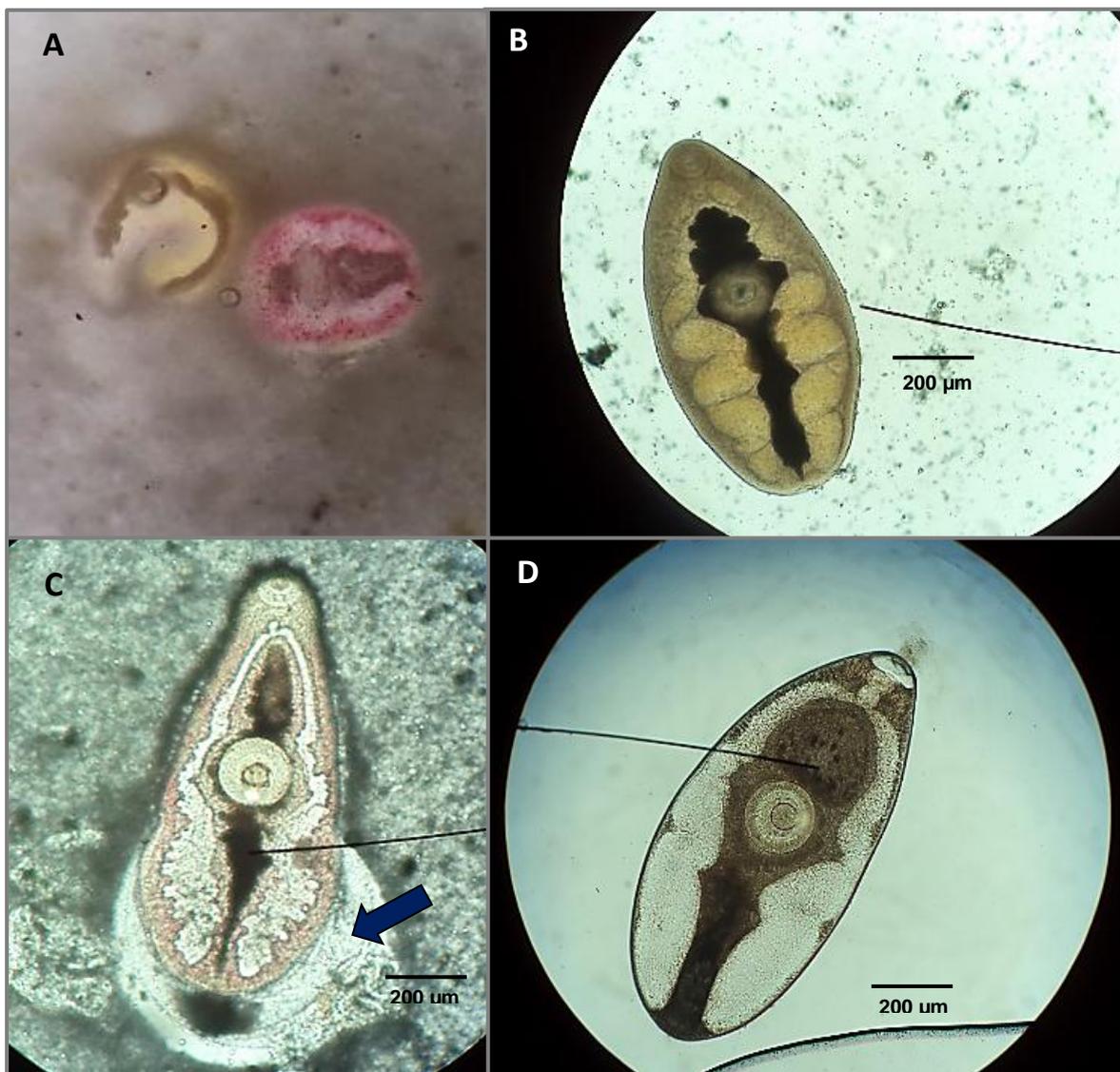


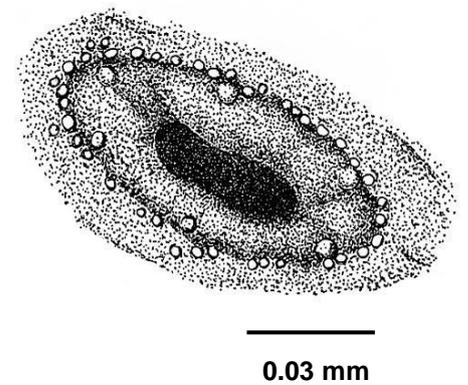
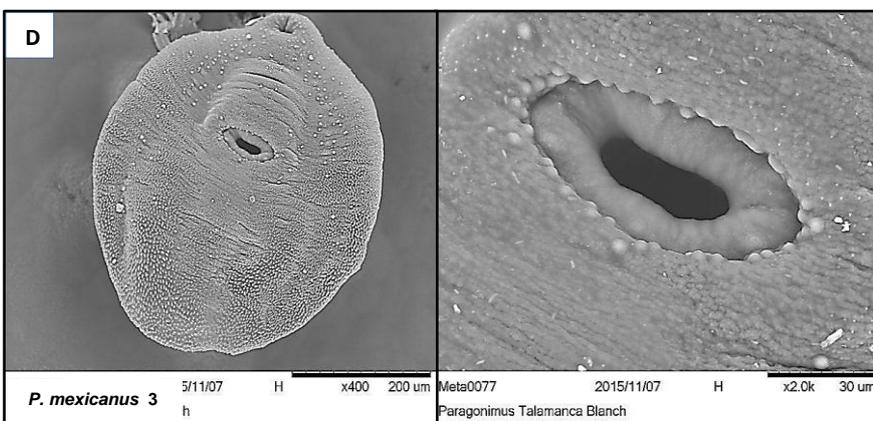
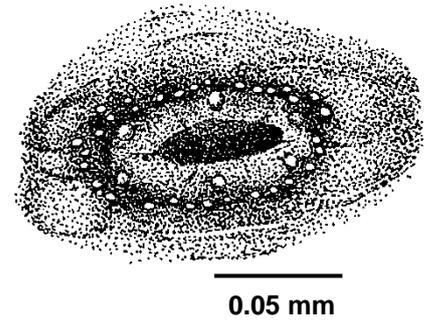
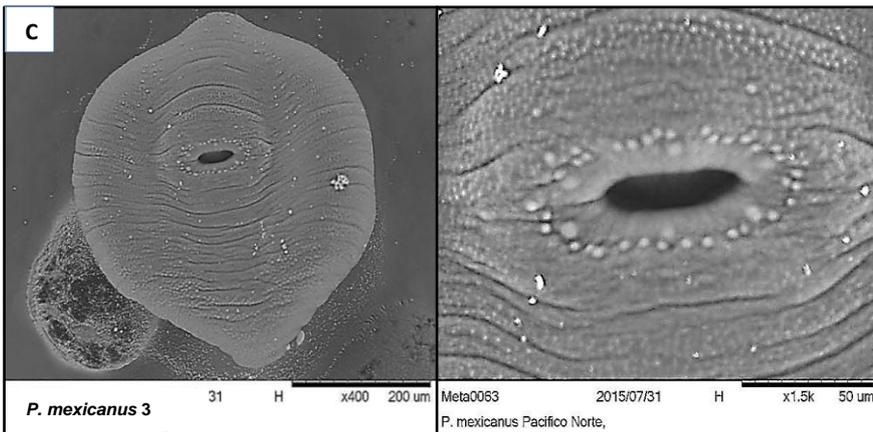
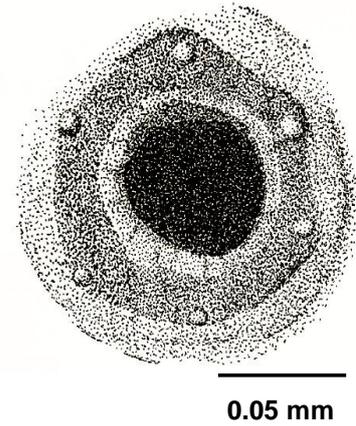
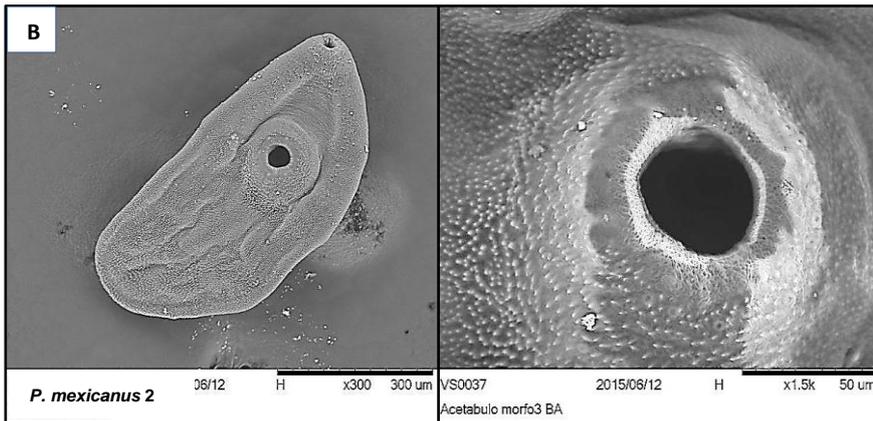
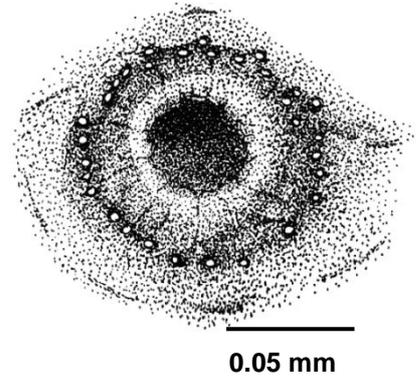
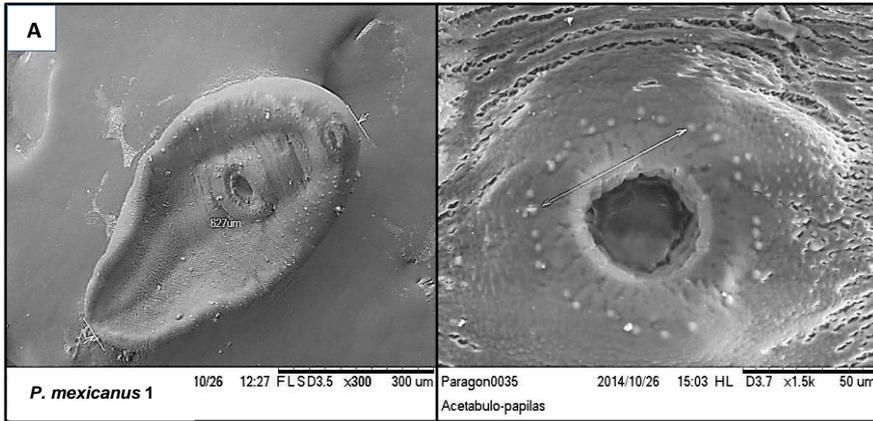
Figura 1. (A) Metacercaria de *P. mexicanus* (amarilla), izquierda y metacercaria de *P. caliensis* (rosada) derecha, vistas en estereoscopio (B) *P. mexicanus*, microscopía de luz objetivo 10X. (C) Metacercaria de *P. caliensis* saliendo del quiste, la flecha muestra el quiste. (D) Metacercaria de *P. caliensis*, microscopía de luz objetivo 10X.

Mediante microscopía electrónica de barrido se establecieron 3 morfotipos de metacercarias de *P. mexicanus*. El morfotipo 1 con 19 a 30 papilas externas en el acetábulo (Figura 2A), el morfotipo 2 con 6 papilas mediales en el acetábulo (Figura 2B) y el morfotipo 3 con 6 papilas mediales y 36-38 externas (Figuras 2C y 2D). En el Cuadro 7 se muestran los sitios donde se encontraron los diferentes morfotipos de metacercarias.

Se identificaron 2 morfotipos de metacercarias de *P. caliensis*, el morfotipo 1 con 6 papilas mediales y 7 internas en el acetábulo (Figura 2E) y el morfotipo 2 con 6 papilas mediales en acetábulo (Figuras 2F y 2G), en el Cuadro 7 se muestran los sitios en los cuales se encontraron morfotipos de *P. caliensis*.

Cuadro 7. Descripción morfológica de metacercarias por SEM según el número de papilas en la ventosa ventral y sitio de recolecta de los decápodos.

Sitios	Especie	Morfotipo	No. de Papilas sensoriales presentes en el acetábulo o ventosa ventral		
			Papilas externas	Papilas mediales	Papilas internas
1	<i>P. mexicanus</i>	1	19-30	0	0
7,8	<i>P. mexicanus</i>	2	0	6	0
2,3	<i>P. mexicanus</i>	3	36-38	6	0
1	<i>P. caliensis</i>	1	0	6	7
4,6	<i>P. caliensis</i>	2	0	6	0



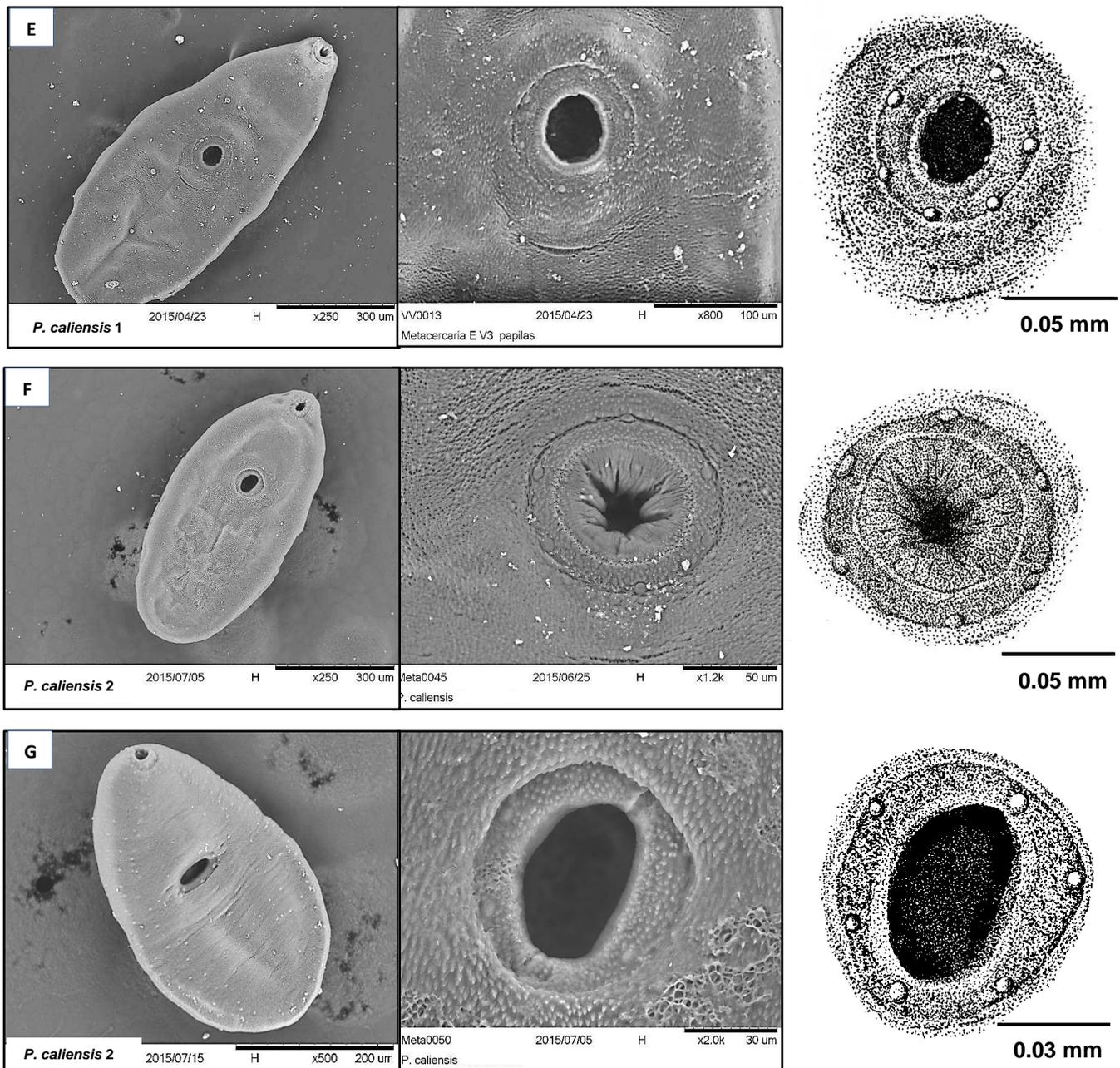


Figura 2. Morfotipos de metacercarias visualizados por SEM. (A) *P. mexicanus* morfotipo 1 (B) *P. mexicanus* morfotipo 2 (C) *P. mexicanus* morfotipo 3 (D) *P. mexicanus* morfotipo 3 (E) *P. caliensis* morfotipo 1 (F) *P. caliensis* morfotipo 2 (G) *P. caliensis* morfotipo 2.

3.3 Análisis molecular y filogenético

Un total de 17 metacercarias (11 *P. mexicanus* y 6 *P. caliensis*) se analizaron e identificaron mediante PCR y secuenciación. Los resultados de los análisis para la región 28S de los morfotipos 1, 2 y 3 de *P. mexicanus* secuenciados mostraron 99%-100% de identidad nucleotídica con *P. mexicanus* de Ecuador (GenBank HM172619), y los morfotipos 1 y 2 de *P. caliensis* un 97% de identidad con *P. heterotremus* de India (GenBank HM172615) y 96% con *P. mexicanus* de Ecuador (GenBank HM172619). Las secuencias nucleotídicas de la región ITS2 de los 11 *P. mexicanus* fueron 100% idénticas con una secuencia de *P. mexicanus* de México (GenBank KC562246), mientras que las secuencias de *P. caliensis* mostraron un 90% de identidad con *P. heterotremus* de Vietnam (GenBank AB827365) y 89% con *P. mexicanus* de Guatemala (AF538946). Igualmente, al analizar secuencias parciales del gen CO1, las metacercarias de *P. mexicanus* costarricenses mostraron un porcentaje de identidad de 97%-98% con *P. mexicanus* de Ecuador (GenBank AF538936), y las secuencias de *P. caliensis* mostraron un 88% de identidad con *P. westermanni* de India (GenBank KF781292) y 88% con *P. mexicanus* de México (GenBank KC562285). En el Cuadro 8 se muestran los resultados de las 17 metacercarias según el análisis molecular de las regiones secuenciadas.

En la Figura 3 se muestran los análisis filogenéticos de las regiones 28S, ITS2 y CO1, con el fin de dilucidar las relaciones entre las distintas especies de *Paragonimus*. Se utilizó el método Bootstrap (BS) o “remuestreo” con 1000 réplicas, descrito por Efron (1979) para calcular el error estándar del análisis de Máxima verosimilitud aplicado a las secuencias. Los valores de remuestreo (BS, por sus siglas en inglés) al inicio de cada brazo muestran las estimaciones de la confianza con que las secuencias se separan y asocian dentro del árbol. Para la región 28S, ITS2 y CO1 se determinaron valores de BS de 100, 36 y 37, respectivamente.

De acuerdo con estos valores, la región 28S es la más confiable (BS=100) para separar las metacercarias de *P. mexicanus* y *P. caliensis*, comparada con la regiones ITS2 (BS=36) y CO1 (BS=37). Igualmente, la región 28S separa con un BS=100 a las especies de *Paragonimus* americanas de las asiáticas. Además, se puede observar en los tres árboles, que los especímenes de *P. mexicanus* de Costa Rica se encuentran en el mismo grupo con otras metacercarias *P. mexicanus* de Latinoamérica (BS=90, 99 y 89, respectivamente); mientras que las metacercarias *P. caliensis* costarricenses forman un grupo claro y sin mayor distanciamiento genético.

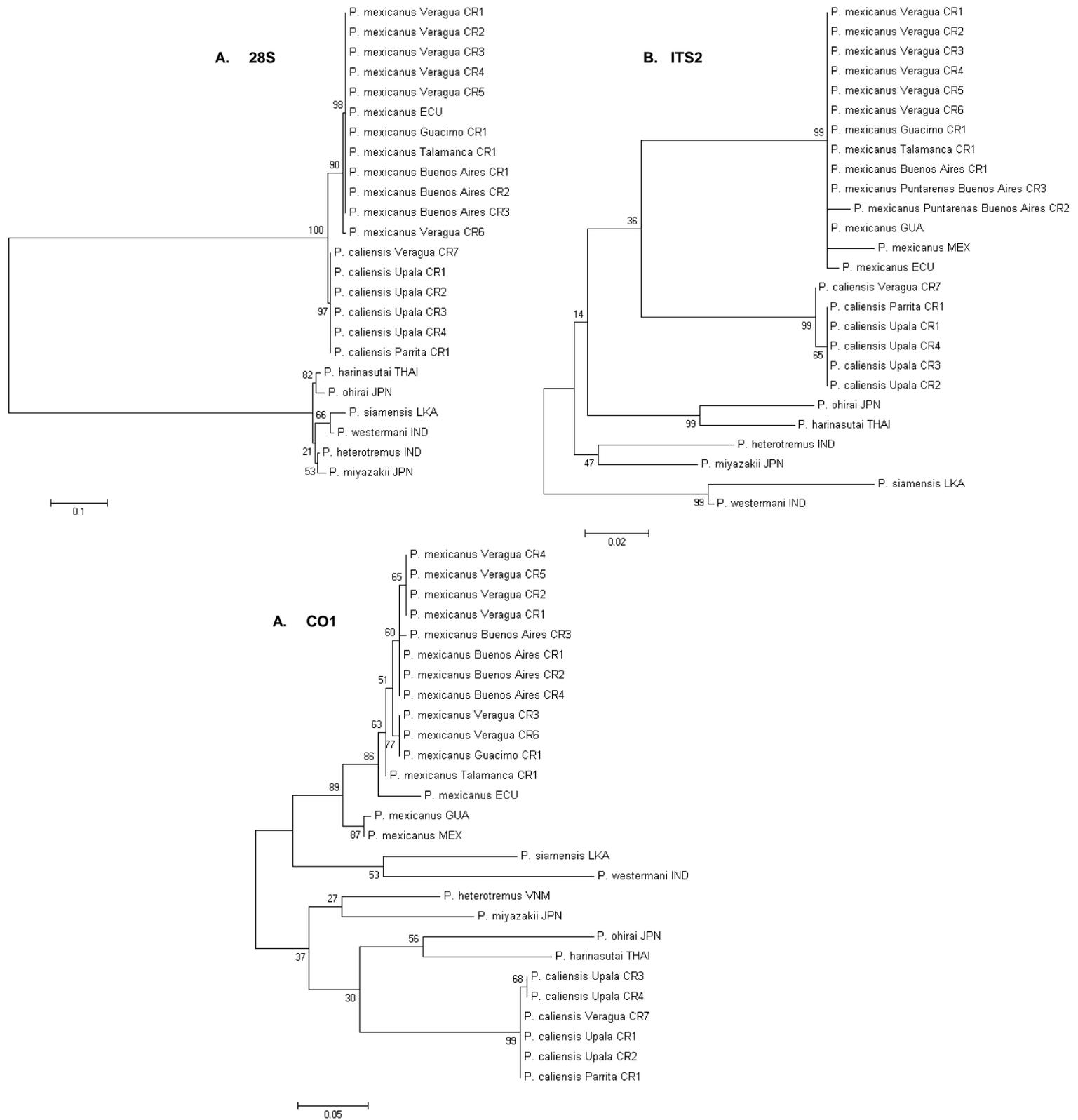


Figura 3. Árboles filogenéticos generados para las secuencias amplificadas con las regiones 28S, ITS2 y CO1 por máxima verosimilitud, modelo de sustitución y distanciamiento evolutivo de Jukes Cantor. El análisis de remuestreo (con porcentaje de 1,000 replicaciones) está representado por números en cada uno de los nodos. (CR=Costa Rica, MEX=México, ECU=Ecuador, GUA=Guatemala, THAI=Tailandia, JPN=Japón, VNM=Vietnam, LKA=Sri Lanka, IND=India).

Cuadro 8. Comparación de los morfotipos de metacercarias de *P. mexicanus* y *P. caliensis* según microscopia electrónica con los resultados del análisis molecular de cada región amplificada.

Especie	Morfotipo SEM	Sitio	% 28S/Especie/ No. GenBank	% ITS2/Especie/ No. GenBank	% COI/Especie/ No. GenBank	Especie de cangrejo
<i>P. mexicanus</i>	1	1	100 / <i>P. mexicanus</i> ECU HM172619	100 / <i>P. mexicanus</i> MEX KC562246	97 / <i>P. mexicanus</i> ECU AF538936	<i>P. uncinatus</i>
<i>P. mexicanus</i>	1	1	100 / <i>P. mexicanus</i> ECU HM172619	100 / <i>P. mexicanus</i> MEX KC562246	97 / <i>P. mexicanus</i> ECU AF538936	<i>P. uncinatus</i>
<i>P. mexicanus</i>	1	1	100 / <i>P. mexicanus</i> ECU HM172619	100 / <i>P. mexicanus</i> MEX KC562246	97 / <i>P. mexicanus</i> ECU AF538936	<i>P. uncinatus</i>
<i>P. mexicanus</i>	1	1	100 / <i>P. mexicanus</i> ECU HM172619	100 / <i>P. mexicanus</i> MEX KC562246	97 / <i>P. mexicanus</i> ECU AF538936	<i>P. uncinatus</i>
<i>P. mexicanus</i>	1	1	100 / <i>P. mexicanus</i> ECU HM172619	100 / <i>P. mexicanus</i> MEX KC562246	97 / <i>P. mexicanus</i> ECU AF538936	<i>P. uncinatus</i>
<i>P. mexicanus</i>	1	1	100 / <i>P. mexicanus</i> ECU HM172619	100 / <i>P. mexicanus</i> MEX KC562246	97 / <i>P. mexicanus</i> ECU AF538936	<i>P. uncinatus</i>
<i>P. mexicanus</i>	2	7	99 / <i>P. mexicanus</i> ECU HM172619	100 / <i>P. mexicanus</i> MEX KC562246	98 / <i>P. mexicanus</i> ECU AF538936	<i>P. tristani</i>
<i>P. mexicanus</i>	2	7	99 / <i>P. mexicanus</i> ECU HM172619	100 / <i>P. mexicanus</i> MEX KC562246	98 / <i>P. mexicanus</i> ECU AF538936	<i>P. tristani</i>
<i>P. mexicanus</i>	2	7	99 / <i>P. mexicanus</i> ECU HM172619	100 / <i>P. mexicanus</i> MEX KC562246	98 / <i>P. mexicanus</i> ECU AF538936	<i>P. tristani</i>
<i>P. mexicanus</i>	3	2	100 / <i>P. mexicanus</i> ECU HM172619	100 / <i>P. mexicanus</i> MEX KC562246	97 / <i>P. mexicanus</i> ECU AF538936	<i>A. agrestis</i>
<i>P. mexicanus</i>	3	3	100 / <i>P. mexicanus</i> ECU HM172619	100 / <i>P. mexicanus</i> MEX KC562246	98 / <i>P. mexicanus</i> ECU AF538936	<i>P. uncinatus</i>
<i>P. caliensis</i>	1	1	97 / <i>P. heterotremus</i> IND HM172615	90 / <i>P. heterotremus</i> VNM AB827365	88 / <i>P. westermani</i> IND KF781292	<i>P. uncinatus</i>
<i>P. caliensis</i>	2	4	97 / <i>P. heterotremus</i> IND HM172615	90 / <i>P. heterotremus</i> VNM AB827365	88 / <i>P. westermani</i> IND KF781292	<i>P. magnus</i>
<i>P. caliensis</i>	2	4	97 / <i>P. heterotremus</i> IND HM172615	90 / <i>P. heterotremus</i> VNM AB827365	88 / <i>P. westermani</i> IND KF781292	<i>P. magnus</i>
<i>P. caliensis</i>	2	4	97 / <i>P. heterotremus</i> IND HM172615	90 / <i>P. heterotremus</i> VNM AB827365	88 / <i>P. westermani</i> IND KF781292	<i>P. magnus</i>
<i>P. caliensis</i>	2	4	97 / <i>P. heterotremus</i> IND HM172615	90 / <i>P. heterotremus</i> VNM AB827365	88 / <i>P. westermani</i> IND KF781292	<i>P. magnus</i>
<i>P. caliensis</i>	2	6	97 / <i>P. heterotremus</i> IND HM172615	90 / <i>P. heterotremus</i> VNM AB827365	88 / <i>P. westermani</i> IND KF781292	<i>P. tristani</i>

3.4 Sitios de muestreo con cangrejos positivos y negativos a *Paragonimus* spp.

En la Figura 4 se muestran las quebradas en las que se encontraron cangrejos positivos a *P. mexicanus* y *P. caliensis*, como quebradas en las que no se encontraron cangrejos infectados, con respecto a la elevación de los sitios. Los cangrejos de agua dulce se recolectaron en quebradas con elevaciones desde los 500 hasta 1500 m.s.n.m.

En las Figuras 5 a 10 se muestran en detalle las quebradas en las que se encontraron cangrejos negativos y positivos. Cangrejos positivos con metacercarias de *P. mexicanus* se encontraron en sitios donde previamente se habían reportado casos de paragonimiasis humana (sitios 7 y 8, Figura 8, quebradas 17 y 18), Cantones de Buenos Aires y Coto Brus. *P. mexicanus* se encontró en áreas ecológicamente conservadas (sitio 1, Reserva de Veragua, Limón, Figura 7, quebrada 11) y en áreas peri-urbanas. Así mismo *P. caliensis* se encontró en un área peri-urbana (sitio 4, Upala, Figura 5, quebrada 2) y en un área ecológicamente conservada sitio 1, Reserva de Veragua, Limón, Figura 7, quebrada 11.

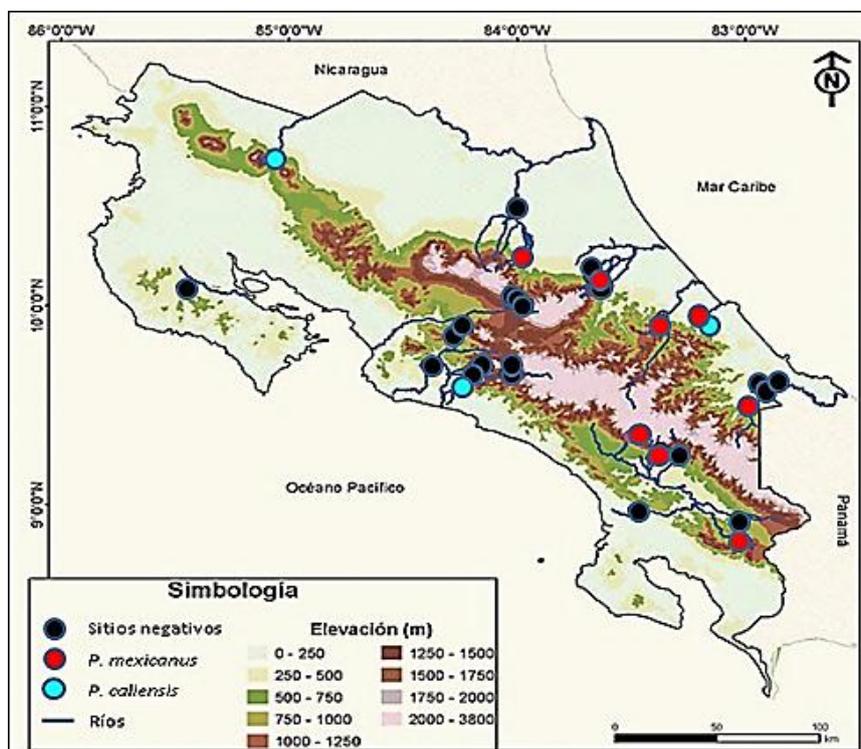


Figura 4. Sitios de muestreo en los cuales se recolectaron cangrejos pseudotelfúsidos en Costa Rica

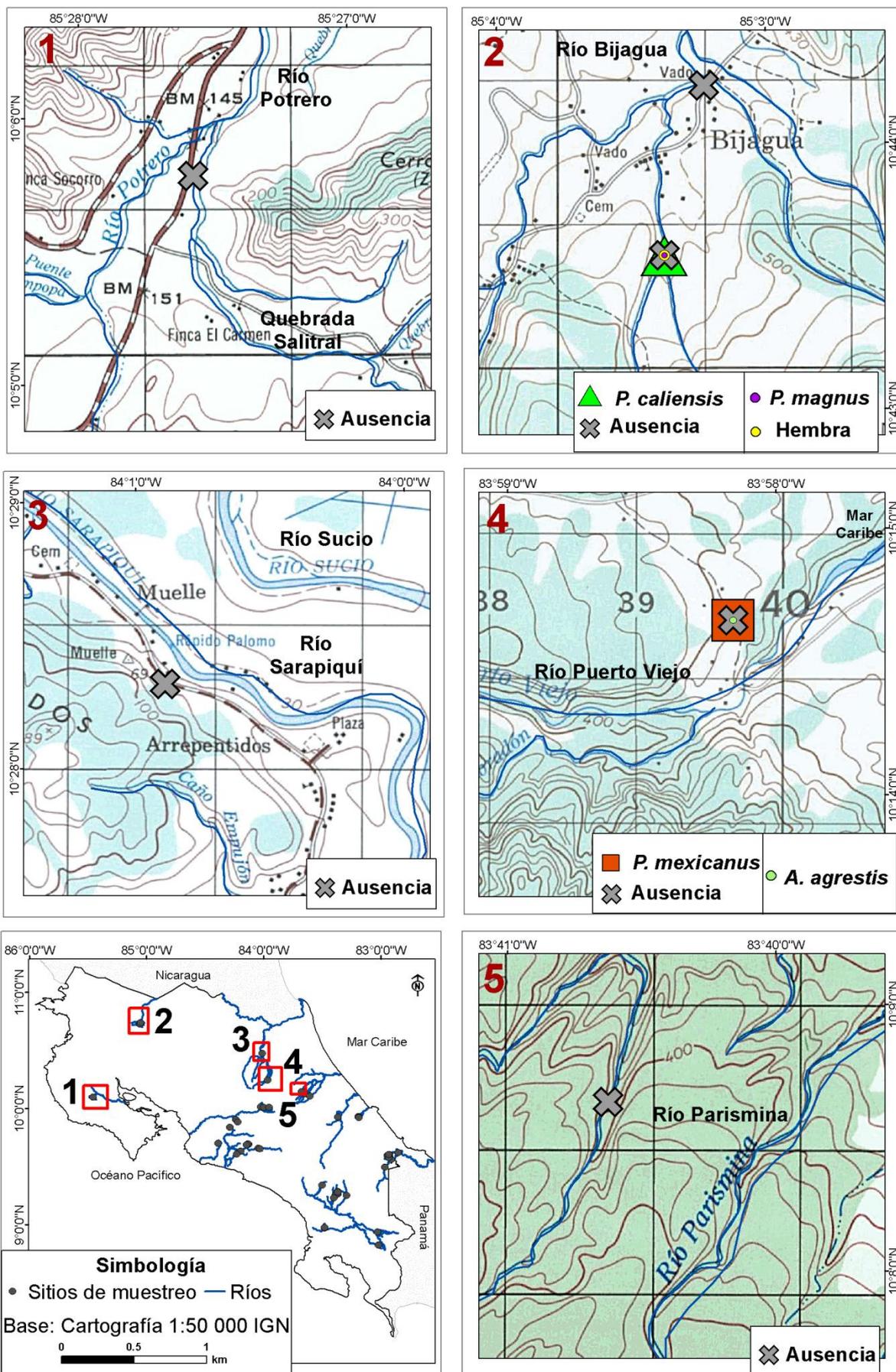


Figura 5. Quebradas con cangrejos infectados y no infectados con metacercarias de *Paragonimus* spp. Quebrada 1 de Nicoya con ausencia de *Paragonimus* spp., quebrada 2 de Upala con presencia de *P. caliensis*, quebrada 3 de Sarapiquí con ausencia de *Paragonimus* spp., quebrada 4 de Sarapiquí con presencia de *P. mexicanus* y quebrada 5 de Guácimo con ausencia de *Paragonimus* spp.

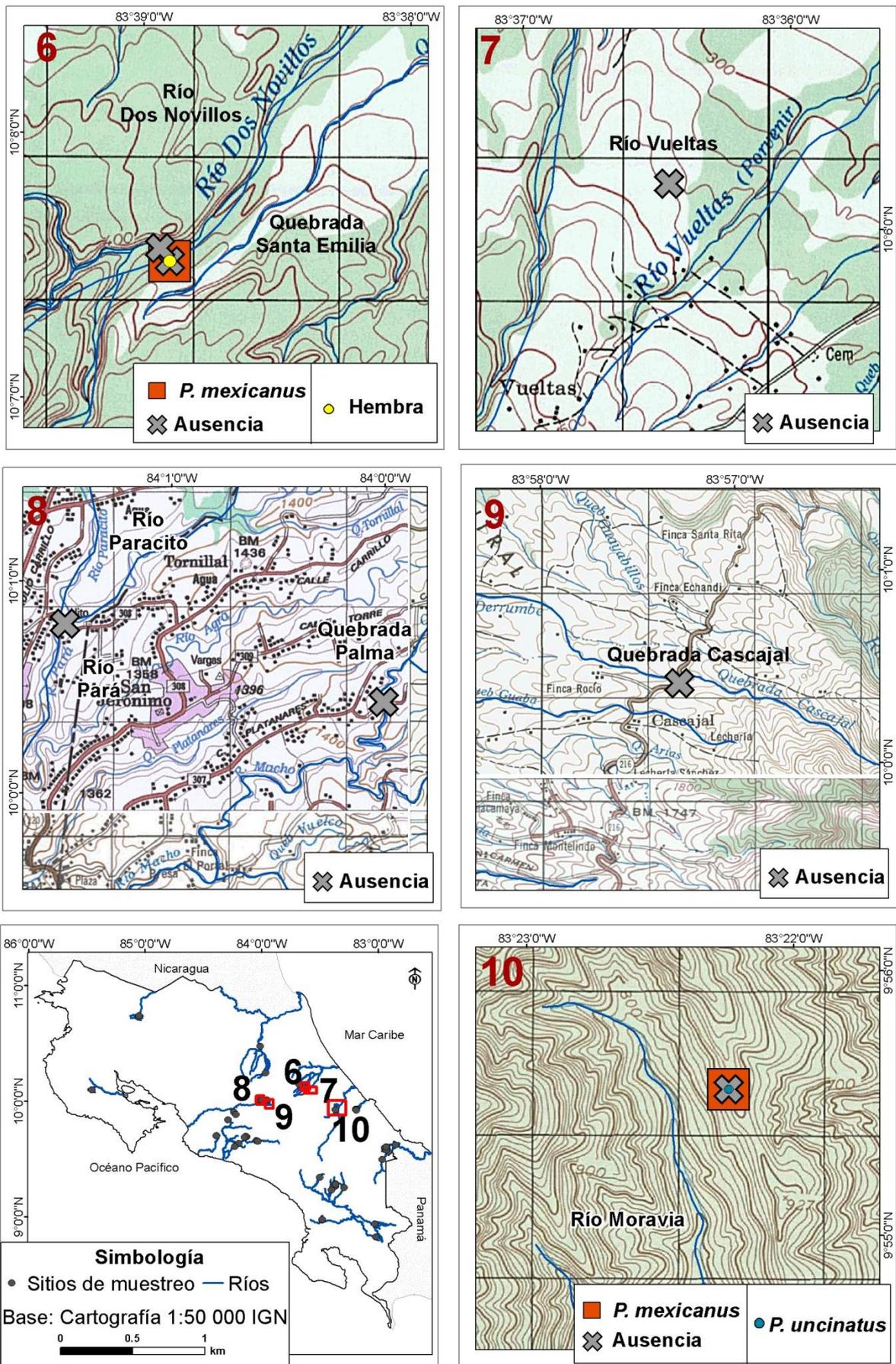


Figura 6. Quebradas con cangrejos infectados y no infectados con metacercarias de *Paragonimus* spp. Quebrada 6 de Guácimo con presencia de *P. mexicanus*, quebrada 7 de Limón con ausencia de *Paragonimus* spp., quebradas 8 y 9 de Moravia con ausencia de *Paragonimus* spp. y quebrada 10 de Limón con presencia de *P. mexicanus*.

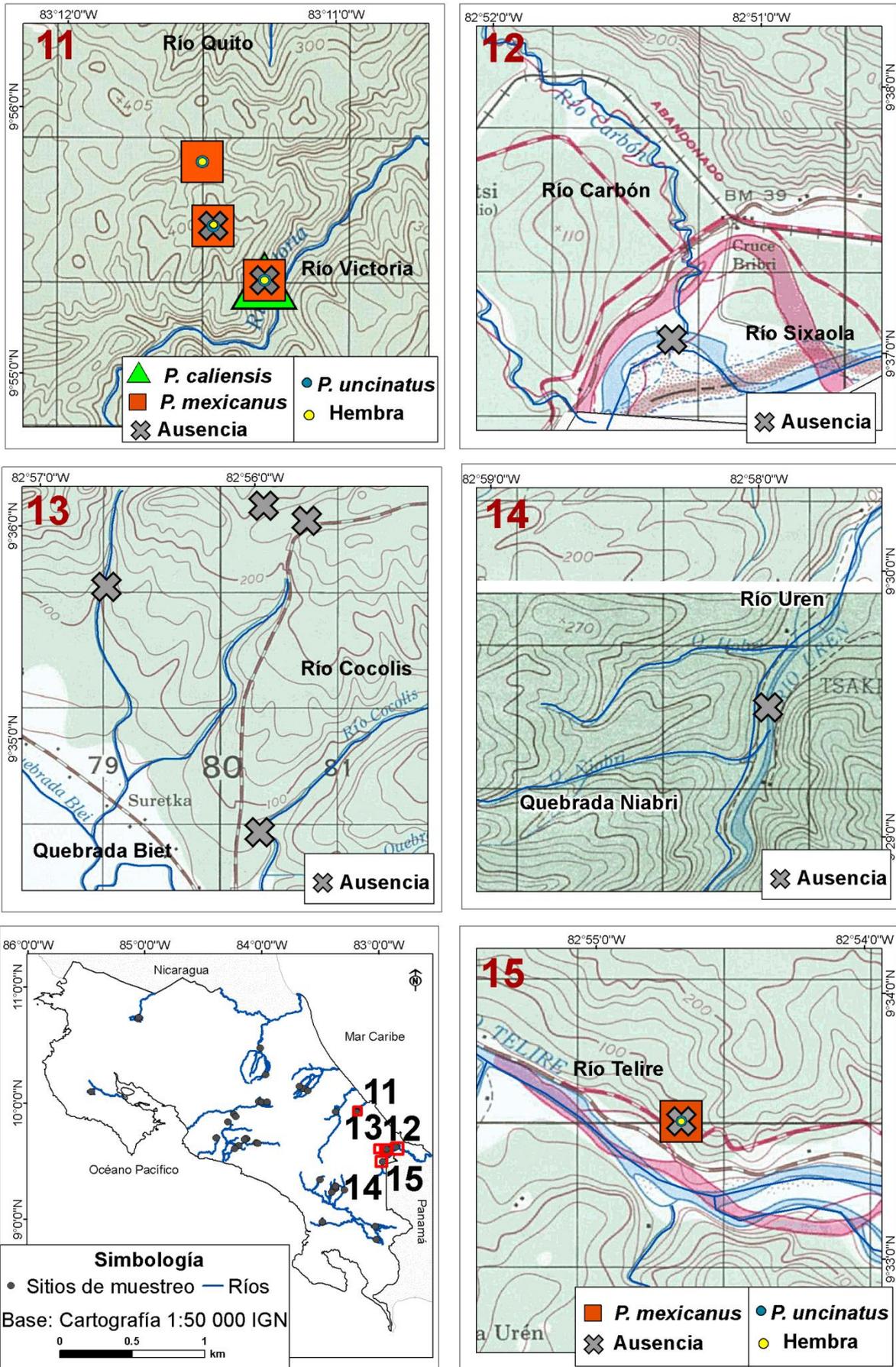


Figura 7. Quebradas con cangrejos infectados y no infectados con metacercarias de *Paragonimus* spp. Quebradas 11 de Limón con presencia de *P. mexicanus* y *P. caliensis*, quebradas 12, 13 y 14 de Talamanca con ausencia de *Paragonimus* spp. y quebrada 15 de Talamanca con presencia de *P. mexicanus*.

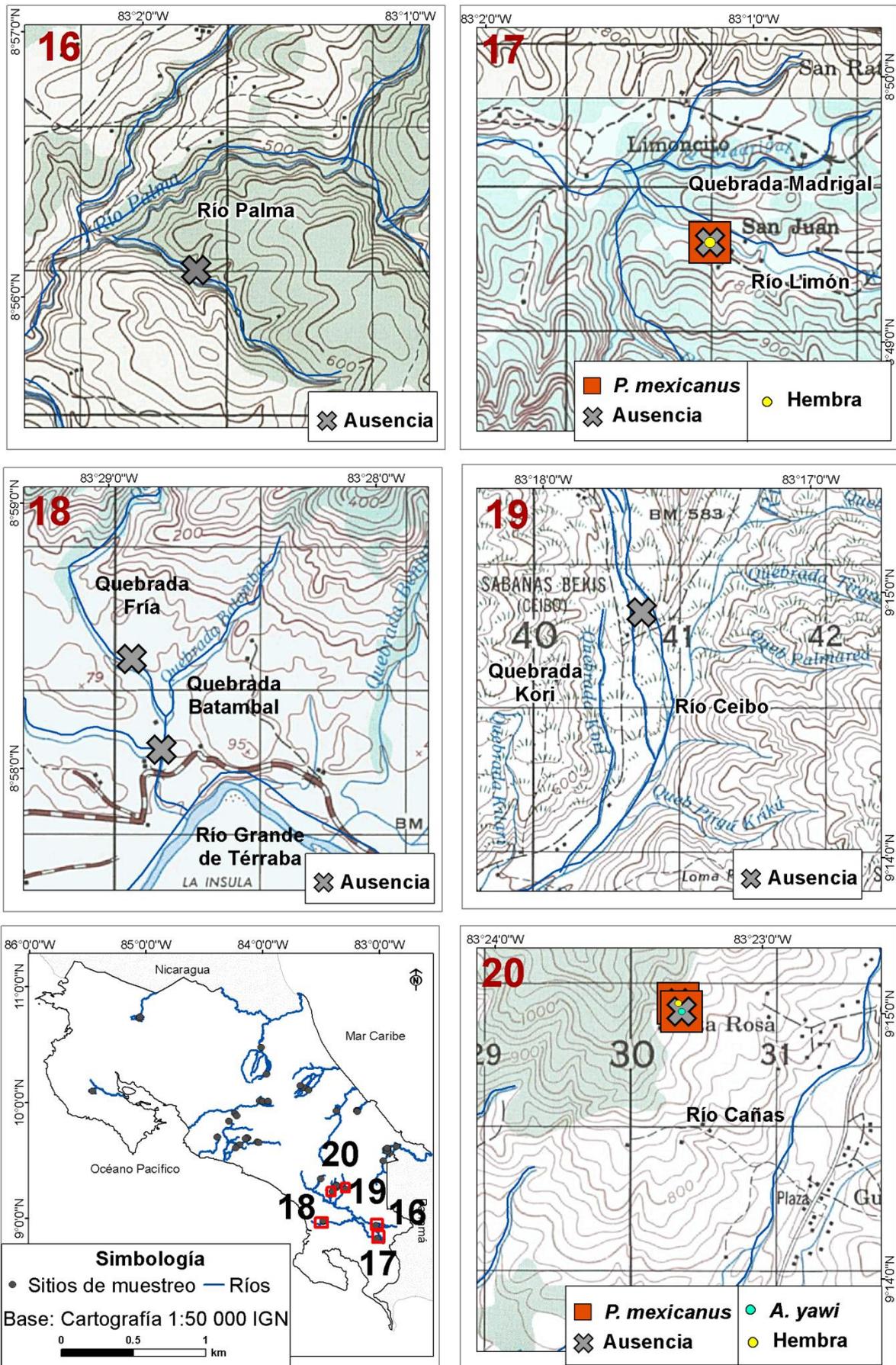


Figura 8. Quebradas con cangrejos infectados y no infectados con metacercarias de *Paragonimus* spp. Quebradas 16 y 18 de Coto Brus con ausencia de *Paragonimus* spp., quebrada 17 de Coto Brus con presencia de *P. mexicanus*, quebrada 19 de Buenos Aires con ausencia de *Paragonimus* spp. y quebradas 20 de Buenos con presencia de *P. mexicanus*.

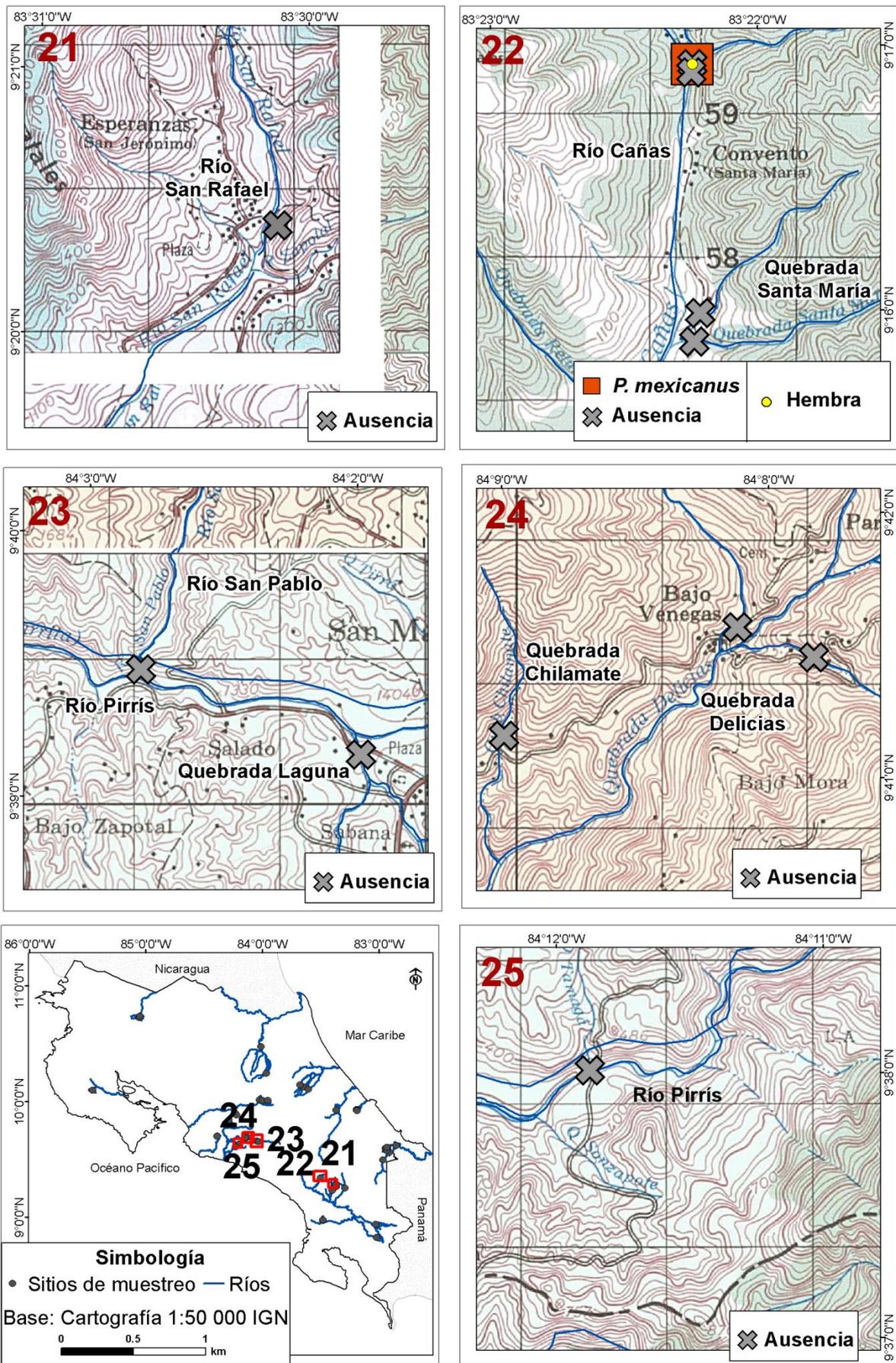


Figura 9. Quebradas con cangrejos infectados y no infectados con metacercarias de *Paragonimus* spp. Quebradas 21 de Buenos Aires con ausencia de *Paragonimus* spp., quebrada 22 de Buenos Aires con presencia de *P. mexicanus* y quebradas 23, 24 y 25 de Parrita con ausencia de *Paragonimus* spp.

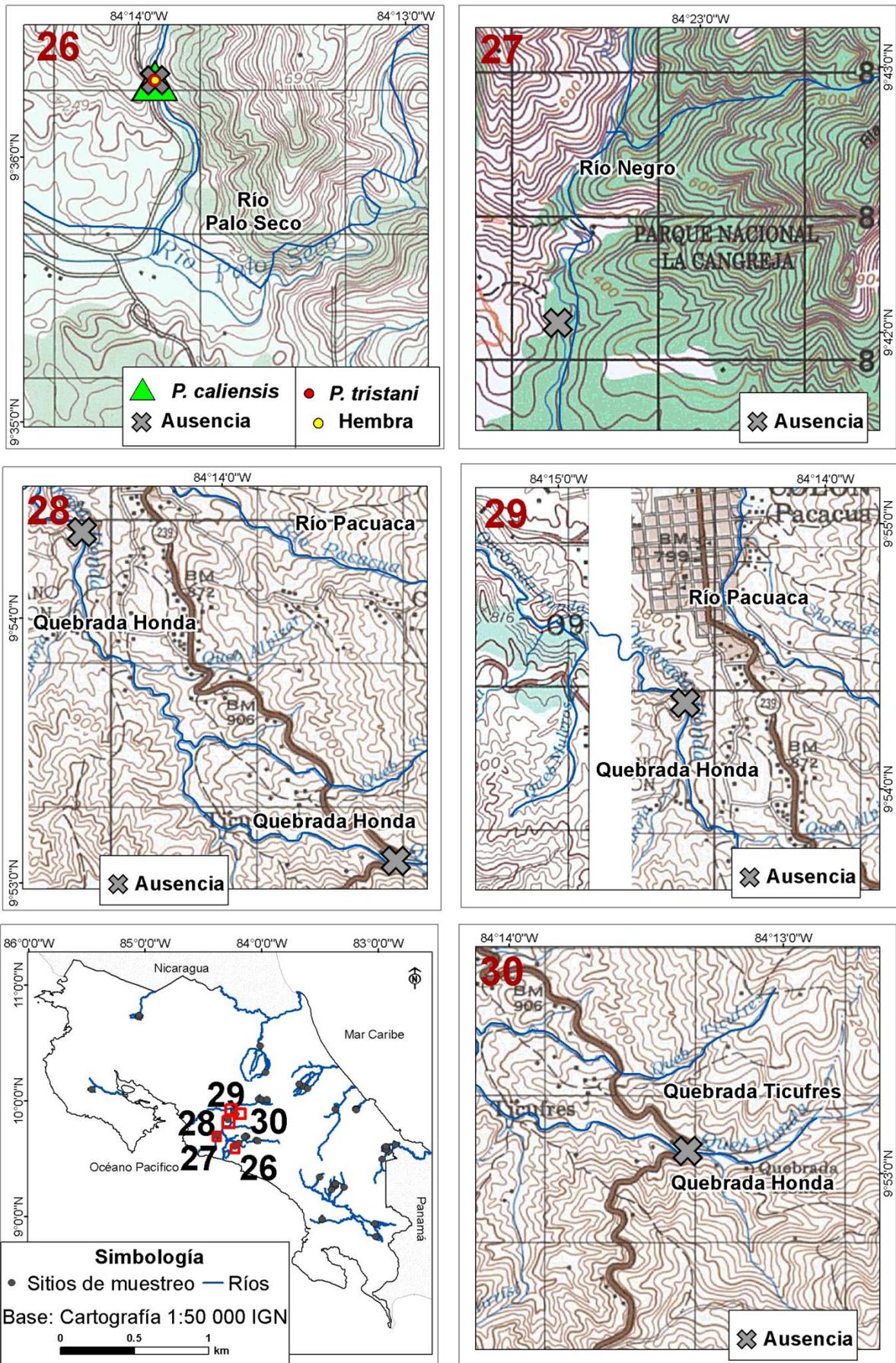


Figura 10. Quebradas con cangrejos infectados y no infectados con metacercarias de *Paragonimus* spp. Quebrada 26 de Parrita con presencia de *P. caliensis* y quebradas 27, 28, 29 y 30 de Puriscal con ausencia de *Paragonimus* spp.

4. Discusión

Las metacercarias de *Paragonimus* spp. se encontraron en un 12.9% (44/347) de los cangrejos analizados y en un 64% (7/11) de localidades muestreadas, tanto en la Vertiente Atlántica como en la Vertiente Pacífica. El porcentaje de infección de cangrejos de agua dulce machos fue estadísticamente mayor que el porcentaje de infección de cangrejos hembras. Aunque es difícil explicar este resultado, ecológica- como biológicamente, se podría hipotetizar, que los cangrejos hembras se esconden y entierran mientras son portadoras de huevos, por lo que estarían menos expuestas a los parásitos (comunicación personal Ingo Wehrtmann). Sin embargo, nuestros resultados contrastan con lo reportado por Monge et al. (1985), quienes analizaron 182 cangrejos de las especies *Ptychophallus tristani* y *Pseudothelphusa magna* y no encontraron diferencia significativa en el porcentaje de infección de cangrejos hembras y machos con *P. mexicanus*, por lo que se necesitan más estudios para determinar si el sexo de los cangrejos influye en el porcentaje de infección con metacercarias de *Paragonimus* spp. En los resultados obtenidos en el presente trabajo no se encontró asociación entre la especie de cangrejo y la presencia de metacercarias de *Paragonimus* spp., indicando que existe la misma probabilidad de encontrar metacercarias de *Paragonimus* spp. en las diferentes especies de cangrejos pseudotelfúsidos.

Se encontraron tres especies de cangrejos como hospedadores de las especies de *Paragonimus* en Costa Rica, que no habían sido reportados con anterioridad en nuestro país ni en América. En *P. uncinatus* se encontraron metacercarias de *P. mexicanus* y *P. caliensis*, mientras que en *A. yawi* y *A. agrestis* metacercarias de *P. mexicanus*, siendo además *P. uncinatus*, la especie de cangrejo de la cual se extrajo el mayor número de metacercarias de *P. mexicanus*.

Las metacercarias de *Paragonimus* spp. se encontraron sobre todo en el hepatopáncreas y tejido muscular, y muy pocas en branquias de cangrejos infectados. El órgano con mayor número de metacercarias fue el hepatopáncreas con 56.7%, seguido del tejido muscular con 43.0%, estos resultados son similares a lo reportado por Brenes et al. (1980), quienes encontraron metacercarias de *P. mexicanus* en hepatopáncreas 46.2% y en tejido muscular 53.8%. Estos autores también encontraron muy pocas metacercarias en branquias. Es probable que *P. mexicanus* y *P. caliensis* se encuentren en hepatopáncreas y tejido muscular para beneficiarse de la absorción de nutrientes, como otras especies de *Paragonimus* y digeneos microfalidos (Overstreet, 1983). En este estudio se encontraron metacercarias de *P. caliensis* tanto en hepatopáncreas (6) como en tejido muscular (5), este hallazgo es similar a lo reportado por Songandares-Bernal y Seed (1973), quienes reportaron la especificidad de *P. caliensis* por el hepatopáncreas en infecciones experimentales en cangrejos de agua dulce, sin embargo en este estudio también se encontró *P. caliensis* en tejido muscular de cangrejos infectados naturalmente.

Los sitios que presentaron los mayores porcentajes de infección de cangrejos con especies de *Paragonimus* fueron el sitio 1 (Limón, 56.5%) y el sitio 4 (Upala, 33.3%), encontrándose diferencias altamente significativas con respecto a los demás sitios (Coto Brus, Buenos Aires y Parrita). Se considera importante informar a la población que vive en estos sitios, sobre el riesgo que supone consumir cangrejos crudos o mal o poco cocidos y realizar investigaciones futuras, para generar información sobre el consumo de crustáceos de agua dulce y aspectos culturales de las poblaciones que los consumen, ya que, aunque en las localidades de Buenos Aires y Coto Brus no se encontraron porcentajes altos de cangrejos infectados con *Paragonimus* spp., es en estas localidades, donde se han reportado en el pasado, casos de paragonimiasis pulmonar y ectópica en niños (Morera 1968, Brenes et al., 1976; Brenes et al., 1982; Brenes et al., 1985).

En total se encontraron 588 metacercarias de *P. mexicanus* y 11 metacercarias de *P. caliensis*. *Paragonimus mexicanus* se ha encontrado en zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*, *Philander opossum*), prociónidos y mefitidos, mientras que *P. caliensis* únicamente se ha reportado en mapaches y zarigüeyas de agua (*Chironectes minimus*) (Rojas et al., 1976). Estos reportes sugieren, que *P. mexicanus* puede infectar varias especies de mamíferos, mientras que *P. caliensis* parece tener menos hospedadores definitivos, lo que podría explicar por qué no se encontró un número mayor de metacercarias de *P. caliensis*.

Los resultados obtenidos por microscopia de luz concuerdan con lo reportado por Brenes et al. (1980) y Little (1968), quienes reportaron la morfología de *P. mexicanus*; una metacercaria desnuda, con coloración amarilla del cuerpo y *P. caliensis*; una metacercaria enquistada con el cuerpo de color rosado, respectivamente. Desde el descubrimiento de la metacercaria y gusanos adultos de *P. caliensis* en Colombia (Little, 1968) y posterior descripción en Costa Rica (Rojas et al., 1976; Brenes et al., 1984), no se había descrito una metacercaria enquistada de *Paragonimus* spp. en Latinoamérica. En ese entonces, la diferenciación entre *P. mexicanus* y *P. caliensis* se basó en la variación del número de células flamíferas presentes en las metacercarias, tamaño del cuerpo, ventosa oral, ventosa ventral, y forma y tamaño de los ovarios y testículos de los gusanos adultos. Sin embargo, estas características morfológicas se consideraron insuficientes para diferenciar ambas especies (Tongu, 2001). En ese sentido Veléz et al. (2011) propusieron la sinonimia entre *P. mexicanus* y *P. caliensis*.

A través de microscopia electrónica de barrido se caracterizaron 3 morfotipos de metacercarias de *P. mexicanus* y 2 de *P. caliensis*. El morfotipo 3 de *P. mexicanus* encontrado en Costa Rica, es muy similar a los morfotipos descritos por López-Caballero et al. (2013), de Chiapas, México y Guatemala. Sin embargo, el morfotipo de Costa Rica tiene 8 papilas externas más que el morfotipo de Guatemala y 16 más que el de México; con el

mismo número de papilas mediales. Es probable, que el número de papilas externas pueda variar de 20 hasta 40 en este morfotipo; sin embargo para confirmar esta hipótesis se requieren más estudios morfológicos por microscopía electrónica de barrido en Latinoamérica.

Los morfotipos 1 y 2 de *P. mexicanus* y *P. caliensis* se describen en este trabajo por primera vez. Resultó interesante encontrar, que tanto *P. mexicanus* como *P. caliensis* comparten un morfotipo de metacercaria con 6 papilas mediales en el acetábulo. Esto muestra que ambas especies pueden mantener la misma morfología en esta estructura, pero diferenciarse claramente por microscopía de luz, por la presencia de quiste y la coloración del cuerpo. Los resultados encontrados en este estudio evidencian la importancia de realizar análisis morfológicos incluyendo microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido, para determinar variaciones morfológicas del género *Paragonimus*, específicamente en el acetábulo. Futuros estudios en Latinoamérica podrían aportar datos interesantes sobre las variaciones morfológicas y morfotipos existentes.

El análisis molecular y filogenético confirman que *P. mexicanus* y *P. caliensis* son dos especies separadas. La comparación de las secuencias nucleotídicas de los morfotipos 1, 2 y 3 de *P. mexicanus*, para las regiones 28S, ITS2 y CO1 son 99% idénticas, lo que indica que corresponden a la misma especie. Así mismo la identidad de secuencia de los morfotipos 1 y 2 de *P. caliensis* es del 100% para las 3 regiones analizadas. Estos resultados demuestran que *P. mexicanus* y *P. caliensis* son especies polimórficas.

Debido a que no existen secuencias depositadas en GenBank de *P. caliensis*, el porcentaje de identidad genética se relacionó con *P. westermanni*, *P. heterotremus* y *P. mexicanus*. Los árboles filogenéticos generados para las tres regiones (28S, ITS2 y CO1), demostraron la separación de las especies encontradas en Costa Rica, y muestran la

divergencia molecular que existe entre las especies encontradas en Costa Rica y las especies asiáticas. Además existe distanciamiento genético entre las especies *P. mexicanus* y *P. caliensis*, el árbol filogenético del gen 28S demostró que la probabilidad de distanciamiento genético entre ambas especies es del 100% y por lo tanto son especies separadas.

Es probable que las especies de *Paragonimus* se originaran y diversificaran aproximadamente hace 200 millones de años, antes de la separación de India, África y Suramérica (Blair et al., 2001). Esta hipótesis explicaría la presencia y diversidad de los hospedadores intermediarios primarios (gasterópodos) y las especies de *Paragonimus* presentes en África, América y Asia. *P. caliensis* comparte características morfológicas (presencia de quiste) y moleculares con algunas especies asiáticas (*P. heterotremus*, *P. westermani*) y con la especie americana *P. mexicanus*, probablemente es una especie alopátrica que evolucionó de las especies asiáticas, quedando aislada, cuando se separó India, África y Suramérica, limitándose su distribución en Suramérica y posterior extensión hasta Centroamérica. *P. mexicanus* pudo haberse establecido posteriormente en Suramérica y Centroamérica, y adaptarse a los hospedadores intermediarios primarios. Estudios de genética poblacional y distribución geográfica podrían contribuir a dilucidar la evolución de *P. caliensis* y *P. mexicanus* como parásitos de caracoles del género *Aroapyrgus* y la presencia de ambas especies de duela pulmonar en Costa Rica.

La georeferenciación de las quebradas con cangrejos positivos a *P. mexicanus* y *P. caliensis* mostraron que ambas especies se encontraron distribuidas tanto en lugares ecológicamente conservados como en zonas peri-urbanas. Las zonas peri-urbanas en las que se encontró de *P. mexicanus* se localizaron en los cantones de Buenos Aires y Coto Brus y *P. caliensis* en Upala. Estos hallazgos indican, que en estos lugares están activos los ciclos de estos parásitos, y se debe de alertar a la población del riesgo que corren al alimentarse de cangrejos crudos o mal cocinados. La caracterización morfológica y molecular de *P. caliensis*

en Costa Rica, sin duda deja varios cuestionamientos sobre su epidemiología, ecología y biología. ¿Es *P. caliensis* un patógeno para el humano? ¿Utiliza esta especie los mismos hospedadores primarios, secundarios y definitivos que *P. mexicanus*?, si es un patógeno para el humano ¿Provocaría la misma cantidad de casos de paragonimiasis ectópica como *P. mexicanus*? Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la importancia sobre la caracterización de especies de *Paragonimus* en Latinoamérica mediante análisis morfológico y molecular, y deja un precedente para que se continúe la investigación sobre el diagnóstico, prevención y hábitos humanos relacionados a la paragonimiasis en Costa Rica y en el continente americano.

5. Conclusiones

1. Los sitios con mayor probabilidad de encontrar cangrejos infectados con metacercarias de *Paragonimus* spp. fueron Limón y Upala, ahí se determinaron porcentajes de infección de 56.5% y 33.3%, respectivamente.
2. No se determinó asociación entre especies de cangrejos pseudotelfúsidos y el porcentaje de infección con metacercarias de *Paragonimus* spp.
3. Se determinó una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de infección entre cangrejos machos y hembras, siendo mayor el porcentaje de infección de cangrejos machos.
4. Se reporta por primera vez a *P. uncinatus* como hospedador intermediario de *P. mexicanus* y *P. caliensis* y a *A. yawi* y *A. agrestis* como hospedadores de *P. mexicanus*.
5. El número de metacercarias de *P. mexicanus* (588) extraídas de órganos y tejidos de cangrejos fue ampliamente superior a las extraídas de *P. caliensis* (11).
6. Los morfotipos de *P. mexicanus* y *P. caliensis* comparten la misma identidad genética, este resultado demuestra que ambas especies son polimórficas.
7. Se describen por primera las especies *P. mexicanus* y *P. caliensis* en Costa Rica mediante análisis morfológico (microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido) y análisis molecular (amplificación de las regiones 28S, ITS2 y CO1).
8. El análisis filogenético demostró que *P. caliensis* es una especie separada de *P. mexicanus*, reportando la presencia de una tercera especie de duela pulmonar en el continente americano.

6. Recomendaciones

1. Informar a las autoridades de salud pública sobre las áreas con presencia de *Paragonimus* spp. en cangrejos de agua dulce de Costa Rica.
2. Realizar estudios sobre la ecología y biología de *P. caliensis*.
3. Identificar otras áreas geográficas con presencia de *Paragonimus* spp. en Costa Rica.
4. Investigar sobre el consumo e importancia de los cangrejos de agua dulce en la dieta de poblaciones humanas, principalmente en zonas rurales de Costa Rica.
5. Realizar estudios sobre la distribución de *Paragonimus* spp. y comparar los porcentajes de infección en los hospedadores intermediarios secundarios, así como porcentajes de infección según el área geográfica.
6. Divulgar información en centros educativos sobre la prevención de la paragonimiasis, a través del involucramiento de las poblaciones humanas con obras de teatro, conferencias, actividades recreativas y juegos interactivos. Principalmente en las áreas donde se demuestre un alto consumo de decápodos de agua dulce.

7. Referencias bibliográficas

- Acha, P. N., & Szyfres, B. (2003). *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Parasitic Zoonoses* (Vol. 3). Pan American Health Org. 3(3) 158-163.
- Arámbulo V. P., Thakur A. S. (1992). *Impact of Zoonoses in Tropical America*. Tropical Veterinary Medicine. Current Issues and Perspectives. *Journal Elsevier*; (663): 407.
- Blair, D., Davis, G. M., & Wu, B. (2001). Evolutionary relationships between trematodes and snails emphasizing schistosomes and paragonimids. *Parasitology*, 123(07), 229-243.
- Blair, D., Xu, Z. B., & Agatsuma, T. (1999). Paragonimiasis and the genus *Paragonimus*. *Advances in parasitology*, 42, 113-222.
- Blair, D., Zhengshan, C., Minggang, C., Aili, C., Bo, W., Agatsuma, T., & Ximei, Z. (2005). Chen, 1959 (Digenea: Paragonimidae) and related species in eastern Asia: a combined molecular and morphological approach to identification and taxonomy. *Systematic Parasitology*, 1(60), 1-21.
- Bowles, J., Blair, D., & McManus, D. P. (1995). A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 4(2), 103-109.
- Brenes, R. R., Zeledón, R. & Rojas, G. (1980). Biological cycle and taxonomy position of Costa Rican paragonimiasis and the present status of *Paragonimus* from the New World. *BRENESIA* 18: 353.
- Brenes, R. R., Zeledón, R., and Rojas, G. (1968). The finding of *Paragonimus* sp. In mammals, crabs and snails in Costa Rica. *Bol. Chil. Parasitol.* 23: 164.
- Caballero E. (1956). Presencia de *Paragonimus rudis* en mamíferos silvestres de Centroamérica. *Annals Institute Biology*. (27): 397-401.
- Calvopiña, M., Romero, D., Castañeda, B., Hashiguchi, Y., & Sugiyama, H. (2014). Current status of *Paragonimus* and paragonimiasis in Ecuador. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(7), 849-855.

- Cha, S. H., Chang, K. H., Cho, S. Y., Han, M. H., Kong, Y. O. O. N., Suh, D. C. & Kim, M. S. (1994). Cerebral paragonimiasis in early active stage: CT and MR features. *AJR. American journal of roentgenology*, 162(1), 141-145.
- Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32:1792–1797.
- Fürst, T., Sayasone, S., Odermatt, P., Keiser, J., & Utzinger, J. (2012). Manifestation, diagnosis, and management of foodborne trematodiasis. *BMJ*, 344, e4093.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Iwagami, M., Monroy, C., Rosas, M. A., Pinto, M. R., Guevara, A. G., Vieira, J. C., & Agatsuma, T. (2003). A molecular phylogeographic study based on DNA sequences from individual metacercariae of *Paragonimus mexicanus* from Guatemala and Ecuador. *Journal of helminthology*, 77(1), 33-38.
- Jukes TH & Cantor CR. (1969). *Evolution of protein molecules*, In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism* ed. New York: Academic Press. 21-132.
- Littlewood, D. T. J., & Johnston, D. A. (1995). Molecular phylogenetics of the four *Schistosoma* species groups determined with partial 28S ribosomal RNA gene sequences. *PARASITOLOGY-CAMBRIDGE-*, 111, 167-176.
- Little, M. D. (1968). *Paragonimus caliensis* sp. n. and paragonimiasis in Colombia. *The Journal of parasitology*, 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. *Molecular ecology resources*, 13(6), 1125-1136.

- Montero-Gei, F., Vargas R. A. & Chinchilla, M. (1961). *Philander oposum fuscogriseus* nuevo huésped natural de *Paragonimus rudis* en Costa Rica. II Congreso Latinoamericano y I Nacional de Microbiología Costa Rica, 60.
- Procop, G. W. (2009). North American paragonimiasis (caused by *Paragonimus kellicotti*) in the context of global paragonimiasis. *Clinical microbiology reviews*, 22(3), 415-446.
- Qiagen, A. G. (2006). Dneasy® blood and tissue handbook. *Qiagen AG, Hombrechtikon, Switzerland*.
- Overstreet, R. M. (1983). Metazoan symbionts of crustaceans. *The biology of crustacea: pathobiology*, 6, 155-250.
- Rodríguez, G., & Magalhães, C. (2005). Recent advances in the biology of the Neotropical freshwater crab family Pseudothelphusidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura). *Revista brasileira de Zoologia*, 22(2), 354-365.
- Rojas G, Monge E, Brenes R. *Paragonimus caliensis* en Costa Rica. (1976). IV Congreso Latinoamericano de Parasitología, IV Congreso Centroamericano de Microbiología y Parasitología, III Congreso Nacional de Microbiología y Parasitología, Costa Rica; 58.
- Singh, T. N., Kananbala, S., & Devi, K. D. (2005). Pleuropulmonary paragonimiasis mimicking pulmonary tuberculosis-a report of three cases. *Indian journal of medical microbiology*, 23(2), 131.
- Tongu, Y., & 頓宮廉正. (2001). The species of *Paragonimus* in Latin America. *Bull Fac Health Sci Okayama Univ Med Sch*, 12, 1-5.
- 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. *Journal Of Harmonized Research in Medical & Health Sci*, 2(3), 122-131.
- Vargas-Arzola, J., Segura-Salvador, A., Reyes-Velasco, L., Díaz-Chiguer, D. L., Márquez-Navarro, A., León-Avila, G., ... & Noguera-Torres, B. (2014). Detection of

Paragonimus mexicanus (Trematoda) metacercariae in crabs from Oaxaca, Mexico. *Acta tropica*, 137, 95-98.

Velásquez, L. E., Gómez, C., Valencia, E., Salazar, L., & Casas, E. (2008). Estudio de foco de paragonimosis en Fuente Clara, Robledo, área periurbana de Medellín, Antioquia
Paragonimosis in the peri-urban zone of Medellín, Antioquia.

Vélez, I., Lenis, C., & Velásquez, L. E. (2011). *Paragonimus mexicanus* (Digenea: Troglotrematidae) de Valle de Pérdidas, Urrao, Antioquia. *Revista de Ciencias*, 13, 49-56.

Artículo 2

Modelo experimental para *Paragonimus mexicanus* a través de la infección de ratas Wistar (*Rattus norvegicus*)

Resumen

La paragonimiasis es una enfermedad zoonótica de transmisión alimentaria causada por las duelas pulmonares del género *Paragonimus*. En Latinoamérica *Paragonimus mexicanus* es el agente causal de la enfermedad. Este trematodo utiliza una variedad de especies de mamíferos carnívoros silvestres los cuales son hospedadores definitivos mientras que los roedores y cerdos actúan como hospedadores paraténicos. En este estudio se realizó la infección experimental de siete ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), las cuales fueron infectadas con metacercarias de *P. mexicanus*, extraídas de órganos y tejidos de cangrejos de agua dulce *Ptychophallus uncinatus* recolectados en el Caribe costarricense. Cuatro roedores fueron infectados por vía oral y tres por vía intraperitoneal. En uno de los roedores infectados por vía intraperitoneal se pudo detectar la presencia de huevos en heces a los cinco meses post-infección. Cinco de siete roedores desarrollaron formas inmaduras (3) y adultas (2), los gusanos adultos extraídos de ratas infectadas por vía intraperitoneal presentaron desarrollo de gónadas, demostrándose así, que es posible producir gusanos adultos de *P. mexicanus* en ratas Wistar. Aunque la tasa de recuperación de gusanos fue muy baja (2.29%), se demostró la susceptibilidad de estos roedores hacia este parásito. Se recomienda el uso de la rata Wistar como modelo animal para infecciones experimentales en futuras investigaciones.

Palabras clave: Infección experimental, *Paragonimus mexicanus*, ratas Wistar, gusanos adultos.

Abstract

Paragonimiasis is a food-borne zoonotic disease caused by lung flukes of the genus *Paragonimus*. In Costa Rica the causal agent is *Paragonimus mexicanus*, this trematode uses a variety of carnivores as definitive hosts, whereas rodents and hogs can play a role in the biological cycle as paratenic hosts. In this study seven Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were experimentally infected with metacercariae of *P. mexicanus*, isolated from organs and tissues of freshwater crabs *Ptychophallus uncinatus* collected in the Atlantic slope of Costa Rica. Four rodents were infected via oral and three by intraperitoneal (IP) injection. One of the rodents infected by IP injection showed eggs of the trematode in stools five months post-infection. Five of seven rodents developed immature (3) and adult (2) worms, adults presented a complete development of testicles and ovary, showing that it is possible the development of adult lung flukes of *P. mexicanus* in Wistar rats. Even though the recovery rate of worms was very low (2.71%), susceptibility of these rodents to metacercariae of *P. mexicanus* was demonstrated.

These findings suggest that Wistar rats are susceptible to *P. mexicanus* infections under laboratory conditions. The use of Wistar rats as an animal model for further researches is recommended.

Keywords: experimental infection, *Paragonimus mexicanus*, Wistar rats, adult worms.

1. Introducción

La duela pulmonar *Paragonimus mexicanus* es un trematodo de transmisión alimentaria, y es el agente causal de la paragonimiasis en Centroamérica. El humano adquiere la infección al consumir cangrejos de agua dulce crudos o insuficientemente cocidos (Procop, 2009). La infección en los humanos puede producir neumonía crónica y se caracteriza por hemoptisis, fatiga y derrame pleural en su forma pulmonar. La paragonimiasis errática es la migración aberrante del trematodo hacia diferentes órganos y su manifestación más grave es la paragonimiasis cerebral (Cha et al., 1994).

La forma adulta de *P. mexicanus* se encuentra en quistes en pulmones de mamíferos carnívoros (mapaches, félidos y canidos) y marsupiales (zarigüeyas), los cuales actúan como hospedadores definitivos y mantienen el ciclo en forma natural. También existen hospedadores paraténicos, como el cerdo y los roedores, los cuales albergan formas inmaduras del parásito adulto en diferentes órganos y tejido muscular, y al ser consumidos pueden llegar a infectar a los hospedadores definitivos, incluyendo al ser humano (Caballero, 1956; Montero-Gei et al., 1961; Brenes et al., 1968; Healy, 1970).

Establecer un modelo experimental animal es fundamental para producir gusanos adultos de *Paragonimus* en el laboratorio, y poder utilizarlos en el desarrollo de pruebas diagnósticas específicas o para investigar nuevas opciones terapéuticas. Existen varios estudios, en los cuales se han realizado infecciones experimentales, en perros, gatos y roedores con *Paragonimus westermani* y *Paragonimus heterotremus* (Sugiyama et al., 1990). Hasta la fecha existe un único reporte sobre la infección experimental de ratas Wistar con *P. mexicanus*, en éstas se logró recuperar gusanos juveniles del tejido muscular (Miyazaki, 1991). El desarrollo de gusanos adultos de *P. mexicanus* en roedores tiene la ventaja, de

utilizar un animal de menor tamaño que puede ser mantenido en laboratorios, evitando así, los conflictos éticos de trabajar con perros y gatos.

Utilizar diferentes vías de inoculación es importante en las infecciones experimentales, ya que se ha demostrado, que el número de gusanos juveniles y el desarrollo de gusanos adultos puede ser mayor, si se utilizan ciertas vías, como la intraperitoneal (Habe, 1996).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la susceptibilidad de la rata Wistar (*Rattus norvegicus*) a las metacercarias de *P. mexicanus* a través de una infección experimental y caracterizar morfológicamente los gusanos desarrollados en los roedores.

2. Materiales y métodos

2.1. Recolecta, procesamiento de decápodos y extracción de metacercarias

Se recolectaron cangrejos de agua dulce de la especie *Ptychophallus uncinatus* en quebradas de la reserva ecológica de Veragua, Provincia de Limón, Costa Rica (N 9.92585, W -83.19098). Los cangrejos fueron trasladados en una hielera a una temperatura de 4°C al laboratorio y fueron sacrificados por choque térmico a una temperatura de -20°C por 10 minutos. La disección se realizó cortando y removiendo el cefalotórax; se identificó el corazón, hepatopáncreas y tejido muscular. Los órganos y tejidos se colocaron en platos de Petri con solución salina 0.9%, los cuales fueron examinados por observación en estereoscopio. Siete de las metacercarias extraídas de los tejidos de los cangrejos fueron confirmadas como *P. mexicanus*, mediante análisis molecular y secuenciación de segmentos de los genes 28S, ITS2 y CO1, las restantes 220 metacercarias se almacenaron en tubos con solución salina 0.9% a una temperatura de 4°C, hasta su inoculación en los roedores.

2.2 Infección experimental

Este estudio contó con la aprobación del Comité Científico de Bienestar Animal de la Universidad Nacional, Escuela de Medicina Veterinaria (Oficio No. 03-2014). Los roedores se mantuvieron en jaulas con agua y alimento comercial el cual fue administrado *ad libitum*. Se utilizaron 7 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), 4 machos y 3 hembras de 2 meses y medio de edad. Cuatro ratas fueron inoculadas por vía oral utilizando una pipeta Pasteur, el inoculo para cada una contenía 2 ml de solución salina 0.9% con 30 a 35 metacercarias de *P. mexicanus*. Tres de las ratas fueron infectadas por vía intraperitoneal cada una con 2ml de solución salina 0.9% que contenía 30 a 35 metacercarias. Los roedores inoculados por vía intraperitoneal fueron sacrificados a los 5 meses post-infección, mientras que los inoculados por vía oral fueron sacrificados a los 7 meses (2 individuos) y 9 meses (2 individuos) post-infección (Cuadro 1).

2.3 Tinción de los parásitos y microscopía electrónica de barrido

Previo al sacrificio de cada individuo se tomó una muestra de heces y se procesó por técnica de sedimentación para evidenciar la presencia de huevos. El sacrificio de los roedores se realizó por inhalación de CO₂. Posteriormente, los roedores se fijaron en una plataforma y se realizó un corte en la línea alba para examinar los órganos abdominales (hígado, estómago, riñones e intestinos) para la búsqueda de las duelas pulmonares. Se revisó el diafragma y se realizó un corte longitudinal por el esternón para examinar los pulmones. Previo a la extracción de los pulmones se buscó la presencia de quistes o gusanos en la pleura pulmonar. Los pulmones fueron extraídos junto con el corazón y se lavaron 3 veces con solución salina 0.9%, se colocaron en platos de Petri y se examinaron minuciosamente para observar quistes o gusanos. Los quistes fueron cortados cuidadosamente, extrayendo los gusanos que

contenían en su interior, los cuales se lavaron 2 veces con solución salina 0.9%. Se determinó el número de gusanos y la localización de éstos en los animales infectados.

Para determinar el desarrollo de los gusanos recuperados se utilizó el criterio de clasificación según Doahn et al., (2015) para gusanos adultos de *P. heterotremus*, encontrando gusanos inmaduros (sin o poco desarrollo de gónadas) o adultos completamente desarrollados (con desarrollo de gónadas). Tres de los gusanos recuperados se utilizaron para fijación y se colocaron entre dos láminas portaobjetos cada uno y se refrigeraron a 4°C por 30 minutos. Se sumergieron en AFA (95 ml de alcohol 70°, 3 ml formalina 10% y 2 ml ácido acético) durante 12 horas. Luego fueron teñidos y fijados con Carmín Clorhídrico (alcohol 90°-200 ml, agua destilada-5ml, ácido clorhídrico-5g carmín-5g) y bálsamo de Canadá según Castro y Guerrero (1961).

Se utilizó un gusano adulto para microscopía electrónica de barrido y fue lavado 2 veces en solución salina 0.9% y fijado en glutaraldehído 80%, paraformaldehído 10%, Buffer fosfato 10% (pH de 7.2) por 2 minutos. Se secó a temperatura ambiente por 5 minutos. La muestra fue introducida al microscopio electrónico de barrido (Hitachi TM 3000) para caracterizar la morfología de las siguientes estructuras: ventosa oral, ventosa ventral y espinas en el tegumento.

3. Resultados

3.1 Morfología del gusano adulto de *Paragonimus mexicanus*

Se realizaron exámenes coproparasitológicos de las heces recolectadas de cada una de las ratas. Únicamente la muestra de heces de la rata No. 5 presentó huevos de *P. mexicanus*, este individuo fue inoculado por vía intraperitoneal. Los huevos se observaron de una

coloración café-oro, ovalados, opérculo escasamente visible y con medidas promedio: largo 70 μm y ancho 44 μm (Figura 1).

En total se recuperaron 5 gusanos de *P. mexicanus*. Un gusano inmaduro de quiste pulmonar, 2 inmaduros de cavidad pleural, 1 adulto de cavidad pleural y 1 adulto de quiste pulmonar. Dos roedores no desarrollaron gusanos sin embargo si presentaron quistes pulmonares (Cuadro 1). En la Figura 2 se muestra un quiste de 1.5 cm del cual se extrajo un gusano adulto.

Uno de los gusanos adultos fijado y teñido mostró las siguientes características morfológicas por microscopía de luz: largo del cuerpo 6.5 mm, ancho del cuerpo 3.75 mm, largo de la ventosa oral 0.6 mm, ancho de la ventosa oral 0.68 mm, largo de la ventosa ventral 0.66 mm y ancho de la ventosa ventral 0.7 mm (Figura 3A). Ovario lobulado con algunas ramificaciones, ubicado en el lado derecho del cuerpo del trematodo y de similar tamaño que los testículos, testículo izquierdo con cuatro lóbulos y testículo derecho con cuatro lóbulos y algunas ramificaciones (Figura 3B). Uno de los gusanos inmaduros mostró las siguientes características por microscopía de luz: largo del cuerpo 5.6 mm, ancho del cuerpo 3.3 mm, largo de la ventosa oral 0.6 mm, ancho de la ventosa oral 0.62 mm, largo de la ventosa ventral 0.62 mm y ancho de la ventosa ventral 0.68 mm (Figura 3D). Este gusano se clasificó como adulto inmaduro debido a que no desarrolló gónadas.

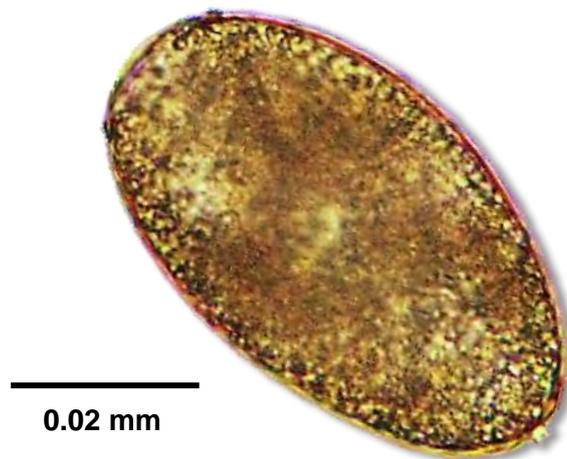


Figura 1. Huevo de *Paragonimus mexicanus* encontrado en heces de una rata infectada.

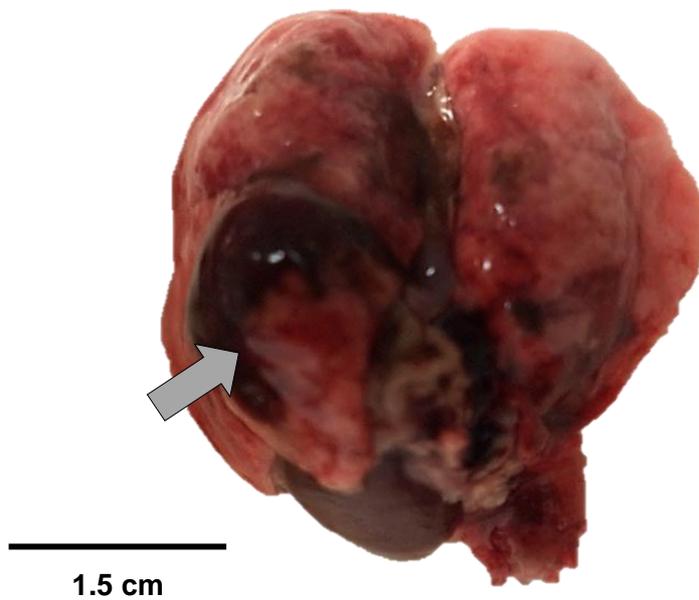


Figura 2. Pulmones de rata No. 6, infectada por vía intraperitoneal con metacercarias de *P. mexicanus*. Se observa un quiste de 1.5 cm en el lóbulo medio a los 5 meses post-infección, del cual se extrajo un gusano adulto.

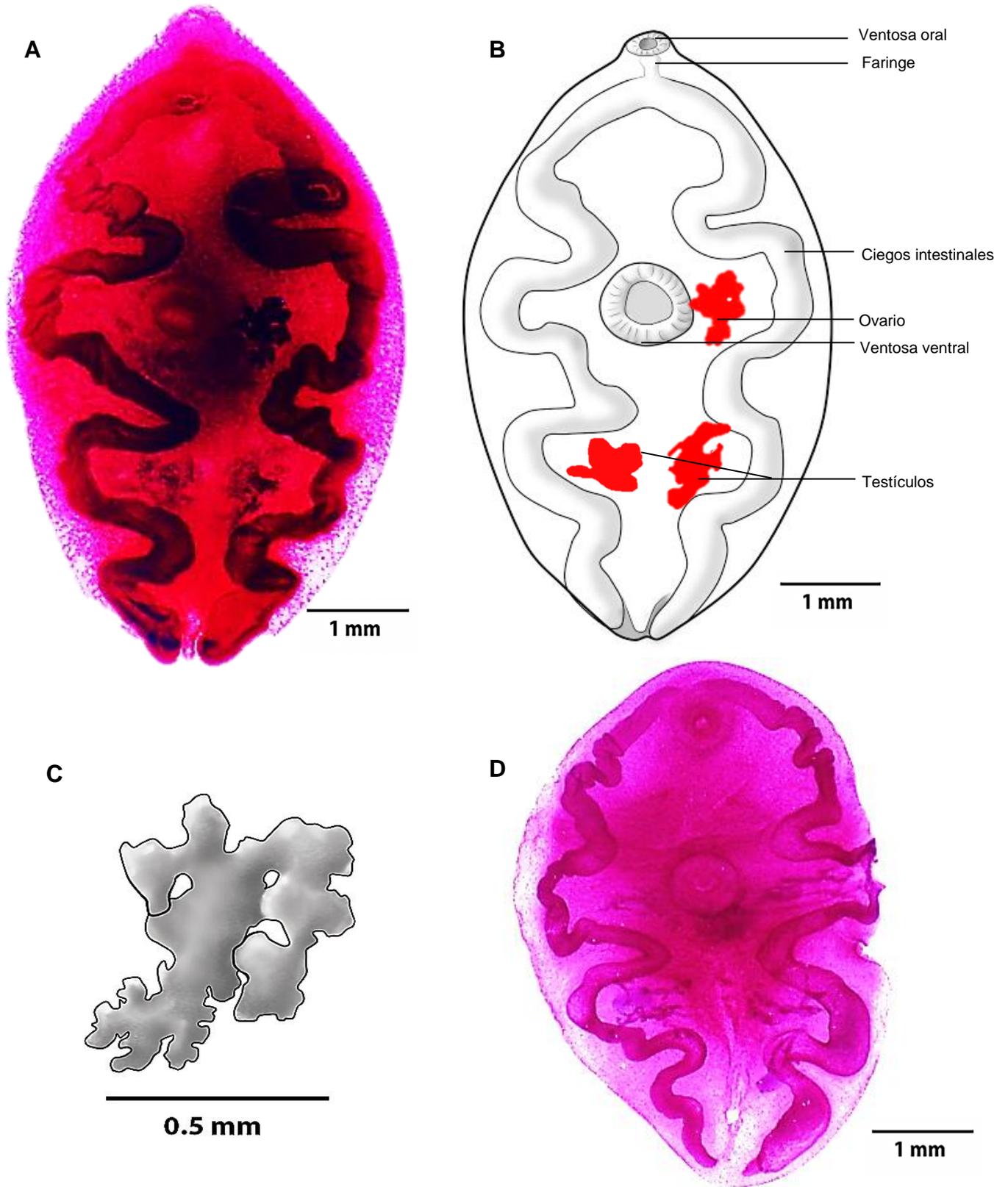


Figura 3. (A) Duela adulta de *P. mexicanus*, (B) Esquema de un gusano adulto de *P. mexicanus*, recuperado de una rata infectada por vía intraperitoneal a los 5 meses post-infección. (C) Ovario. (D) Duela inmadura de *P. mexicanus*.

Cuadro 1. Infección experimental con ratas Wistar infectadas con metacercarias de *Paragonimus mexicanus*. Porcentaje de recuperación de gusanos adultos en diferentes periodos de sacrificio de las ratas.

No. Rata Wistar infectada	Sexo	Vía de Infección	Necropsia meses post-infección	Localización/ Lesión	No. de metacercarias ingeridas	Total de gusanos por individuo infectado	% de recuperación	Estado de desarrollo
1	M	Oral	9	Cavidad pleural	30	1	3.33	Adulto Inmaduro
2	M	Oral	9	Cavidad pleural	35	1	2.85	Adulto inmaduro
3	M	Oral	7	Quiste en parénquima pulmonar	30	0	0	---
4	M	Oral	7	Quiste en parénquima pulmonar	30	1	3.33	Adulto Inmaduro
5	F	Intraperitoneal	5	Cavidad pleural	30	1	3.33	Adulto Maduro
6	F	Intraperitoneal	5	Quiste en parénquima pulmonar	30	1	3.33	Adulto Maduro
7	F	Intraperitoneal	5	Quiste en parénquima pulmonar	35	0	0	---
Total					220	5	\bar{x} 2.29	

3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM) de *P. mexicanus*

El gusano adulto extraído de cavidad pleural de un roedor infectado vía intraperitoneal fue analizado por microscopía electrónica de barrido y se determinaron las siguientes medidas: largo del cuerpo 4.2 mm, ancho del cuerpo 1.7 mm, ventosa oral 470 μm de ancho, 480 μm de largo y acetábulo 387 μm de ancho y 375 μm de largo.

Las características morfológicas fueron: cuerpo ovalado (Figura 4A), ventosa oral (Figura 4B) de mayor tamaño que ventosa ventral, ventosa ventral con algunas papilas externas

(Figura 4C) y las espinas tegumentarias que se observaron cómo escamas individuales y presentes en todo el cuerpo (4D).

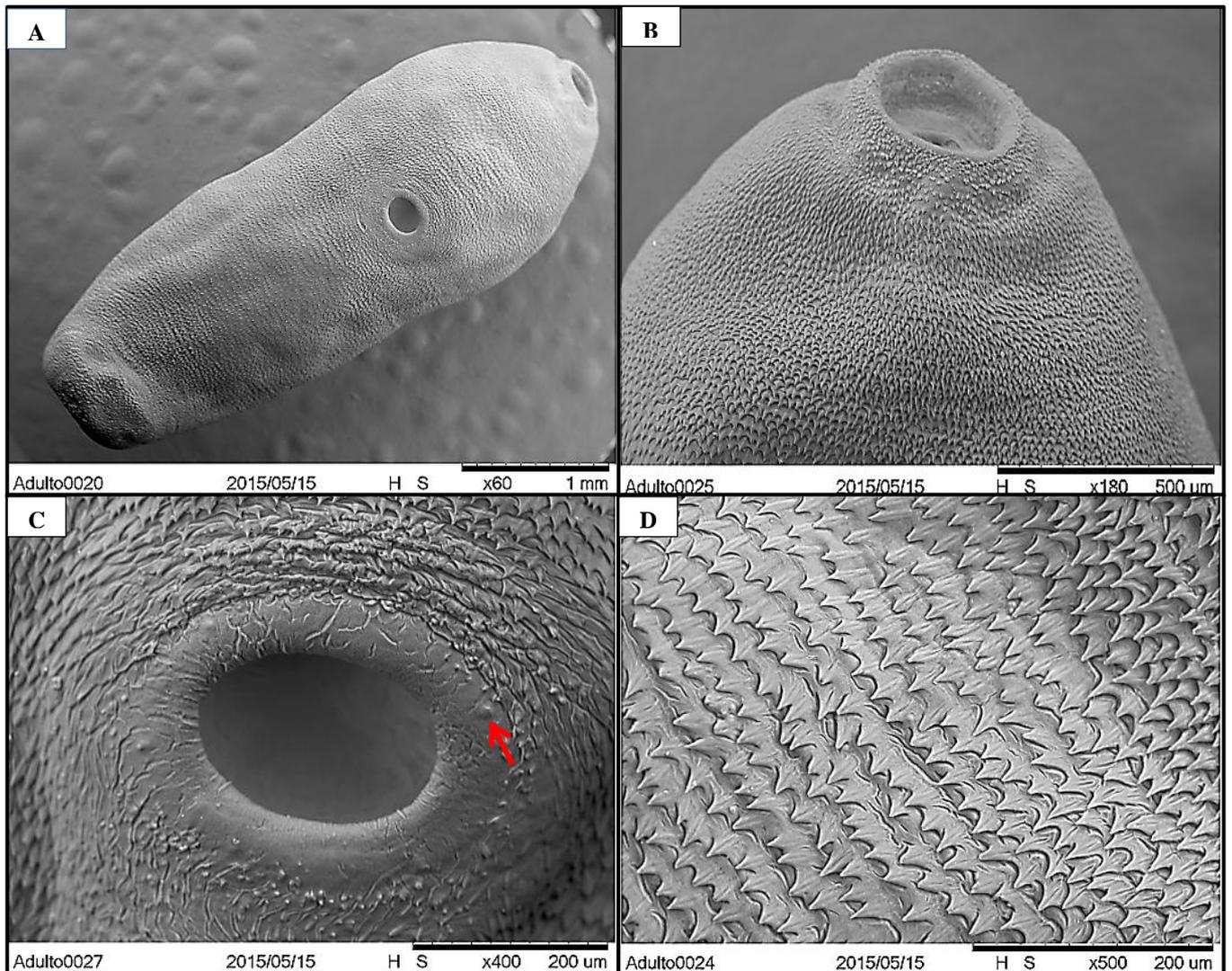


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido de duela adulta de *P. mexicanus*.

4. Discusión

En este estudio se reporta la susceptibilidad de la rata Wistar (*Rattus norvegicus*) a la infección con metacercarias de *P. mexicanus*. Hasta la fecha solamente se habían reportado infecciones experimentales de *P. mexicanus* en gatos y perros domésticos para desarrollar gusanos adultos (Brenes et al., 1980; Ulate et al., 2015) mientras que Huiza et al. (2011), solamente lograron recuperar gusanos juveniles e inmaduros de hámsters (*Mesocricetus auratus*) infectados por vía oral, al igual que Miyazaki (1991), recuperó gusanos inmaduros de tejido muscular de ratas Wistar. Las infecciones experimentales de gatos domésticos reportan un porcentaje de recuperación de gusanos adultos de 70% (186 gusanos inoculados/131 gusanos recuperados), y en perros de 42% (159/66) (Brenes et al., 1980), en comparación con estos resultados, los porcentajes de recuperación en ratas Wistar son sumamente bajos (2.29%), sin embargo, se lograron obtener dos gusanos adultos de *P. mexicanus* en cinco de siete de los animales infectados (71%).

Existe evidencia que los roedores pueden actuar como hospedadores definitivos de *P. macrorchis* de Sri Lanka (Kannangara, 1969) y *P. heterotremus* de Vietnam (Narain, 2003; Doahn et al., 2015), y pueden actuar como hospedadores paraténicos de *P. westermani* en China (Fan et al., 1993). En este estudio fue posible evidenciar la presencia de huevos de *P. mexicanus* en una muestra de heces procesada en el laboratorio de una rata infectada por vía intraperitoneal, lo cual indica, que bajo condiciones de laboratorio y por infección vía intraperitoneal, es probable que *Rattus norvegicus* pueda actuar como hospedador definitivo de la duela pulmonar *P. mexicanus*. Sin embargo, no se pudo comprobar si los huevos fueron fértiles y hubiesen podido continuar con el ciclo del parásito, debido a que en los quistes examinados se encontró únicamente un solo gusano. Es conocido, que *P. mexicanus* se reproduce mediante fertilización cruzada dentro de quistes en parénquima pulmonar de los hospedadores definitivos, y cuando el quiste se rompe y se encuentra en la periferia de vías

aéreas como bronquiolos y bronquios, los huevos son expulsados por el reflejo de tos hacia tráquea y posteriormente al medio ambiente. Sin embargo, se desconoce, si existen variantes triploides capaces de reproducirse por partenogénesis como ocurre con *P. westermani*.

El hallazgo de gusanos adultos es de suma importancia si se desea implementar un modelo experimental de infección con *P. mexicanus* en ratas Wistar para su utilización en investigación. Bajo condiciones naturales *Rattus norvegicus* solamente podría ingerir metacercarias de *P. mexicanus* al consumir cangrejos infectados. En los resultados obtenidos por infección oral, se obtuvieron únicamente gusanos inmaduros, esto indica, que a través de esta vía de infección, las ratas parecieran actuar como hospedadores paraténicos de *P. mexicanus*, como lo demostró Miyazaki (1991), llegando a infectar hospedadores definitivos, como perros y gatos domésticos, al consumir los tejidos infectados de los roedores infectados.

En comparación con los resultados obtenidos por Brenes et al. (1980), los gusanos adultos obtenidos en este estudio fueron más pequeños (la mitad de tamaño que los obtenidos de gatos). Esto probablemente se debe a la adaptación evolutiva de *P. mexicanus* en carnívoros, específicamente en cánidos y félidos. También se observaron diferencias en el desarrollo de testículos y ovario; las gónadas fueron de menor tamaño que en los adultos obtenidos en gatos, principalmente los testículos.

La recuperación de gusanos adultos de *P. mexicanus* fue más eficiente en roedores infectados por vía intraperitoneal que por vía oral. Los dos gusanos adultos con gónadas completamente desarrolladas fueron recuperados de ratas infectadas por vía intraperitoneal. La migración del parásito en los hospedadores definitivos ocurre de duodeno hacia cavidad peritoneal, diafragma y pulmones (Singh et al., 2012). La inoculación en cavidad peritoneal en ratas, evita que las metacercarias pasen por el tracto digestivo, así la migración es más

corta y directa. Probablemente el paso más directo de las metacercarias podría haber influido en el desarrollo de gusanos adultos en los pulmones de los roedores.

En las especies *P. westermani* y *P. macrorchis* se comparó la cantidad de gusanos recuperados por vía intraperitoneal vs. vía oral, en ratas de laboratorio, encontrándose que por vía intraperitoneal la cantidad de gusanos adultos era mayor (Kannangara, 1969; Habe et al. 1996). En este estudio no se pudo demostrar un aumento en el número de gusanos en ratas infectadas por vía intraperitoneal, ya que en ambas vías de infección el máximo número de gusanos recuperados por individuo infectado fue de uno.

Este estudio demostró la utilidad de la rata Wistar como modelo experimental para el desarrollo de gusanos de *P. mexicanus*. Aunque el porcentaje de recuperación fue muy bajo, se recuperaron adultos y es posible utilizar este modelo para realizar investigaciones sobre la respuesta inmune, nuevas opciones terapéuticas, caracterizar los productos antigénicos que secreta el gusano adulto y su uso en pruebas específicas inmunodiagnósticas. Además este modelo animal minimiza los costos de mantenimiento comparado con otros modelos animales como perros y gatos. Por otro lado las ratas Wistar son animales de laboratorio, por lo que al utilizar este modelo animal se evitan los conflictos éticos relacionados al uso de animales de compañía como animales de experimento.

5. Conclusiones

1. La rata Wistar (*Rattus norvegicus*) actúa como hospedador paraténico de *P. mexicanus* cuando las metacercarias son inoculadas vía oral.
2. La rata Wistar puede actuar como hospedador definitivo de *P. mexicanus*, bajo condiciones de laboratorio y mediante inoculación de la metacercaria vía intarperitoneal, llegando a expulsar huevos del trematodo en las heces.
3. El porcentaje de recuperación de gusanos de *P. mexicanus* en ratas Wistar fue bajo (2.29%), sin embargo es posible obtener gusanos adultos para propósitos de investigación.
4. Los adultos recuperados de *P. mexicanus* en pulmones de ratas Wistar presentan variaciones morfológicas en comparación con los recuperados en gatos domésticos. Las variaciones más importantes son la diferencia entre el tamaño del cuerpo, forma y tamaño de las gónadas, siendo de menor tamaño en los gusanos recuperados en ratas.
5. La utilización de ratas Wistar en un modelo experimental para la obtención de gusanos de *P. mexicanus*, reduce los costos de mantenimiento en comparación con el uso de otros animales (perros y gatos domésticos).

6. Recomendaciones

1. Utilizar la rata Wistar como modelo animal experimental para la producción de gusanos adultos de *P. mexicanus*.
2. Infectar roedores de laboratorio por vía intraperitoneal con metacercarias de *P. mexicanus*, ya que demostró ser más efectiva que la infección oral.
3. Utilizar un número mayor de metacercarias de *P. mexicanus* para la infección intraperitoneal en ratas Wistar.
4. Realizar estudios sobre infecciones experimentales de ratas Wistar con metacercarias de *P. mexicanus* para la obtención de antígenos, investigación sobre la respuesta inmune y elaboración de pruebas diagnósticas específicas.

7. Referencias bibliográficas

- Brenes, R. R., Zeledón, R. & Rojas, G. (1980). Biological cycle and taxonomy position of Costa Rican paragonimiasis and the present status of *Paragonimus* from the New World. *BRENESIA* 18: 353.
- Brenes, R. R., Zeledón, R., and Rojas, G. (1968). The finding of *Paragonimus* sp. In mammals, crabs and snails in Costa Rica. *Bol. Chil. Parasitol.* 23: 164.
- Caballero E. Presencia de *Paragonimus rudis* en mamíferos silvestres de Centroamérica. *Annals Institute Biology* 1956; (27): 397-401.
- Cha, S. H., Chang, K. H., Cho, S. Y., Han, M. H., Kong, Y. O. O. N., Suh, D. C. & Kim, M. S. (1994). Cerebral paragonimiasis in early active stage: CT and MR features. *AJR. American journal of roentgenology*, 162(1), 141-145.
- Castro A., Guerrero O. (1961). Técnicas de diagnóstico parasitológico, 2da ed. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica. 47-48.
- Doanh, P. N., Hien, H. V., An, P. T., & Tu, L. A. (2015). Development of lung fluke, *Paragonimus heterotremus*, in rat and mice, and the role of paratenic host in its life cycle. *TAP CHI SINH HOC*, 37(3), 265-271. Fan PC, Lu H, Lin LH. Experimental infection of *Paragonimus westermani* in mice and rats. *The Korean Journal of Parasitology* 1993; 31(2): 91-97.
- Habe, S., Lai, K. P., Agatsuma, T., Ow-Yang, C. K., & Kawashima, K. (1996). Growth of Malaysian *Paragonimus westermani* in Mammals and the Mode of Transmission of the Fluke among Mammals. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 24(4), 225-232.
- Kannangara, D. W. W. (1969). Occurrence of the lung-fluke *Paragonimus macrorchis* Chen, 1962 in Ceylon. *Ceylon Journal of Medical Science*, 18(1), 33-38.

- Miyazaki, I. (1991). An illustrated book of helminthic zoonoses. *An illustrated book of helminthic zoonoses*. 125-129.
- Montero-Gei, F., Vargas R. A. & Chinchilla, M. (1961). *Philander oposum fuscogriseus* nuevo huésped natural de *Paragonimus rudis* en Costa Rica. II Congreso Latinoamericano y I Nacional de Microbiología Costa Rica; 60.
- Narain, K., Devi, K. R., & Mahanta, J. (2003). A rodent model for pulmonary paragonimiasis. *Parasitology research*, 91(6), 517-519.
- 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. *Journal Of Harmonized Research in Medical & Health Sci*, 2(3), 122-131.
- Singh, T. S., Sugiyama, H., Devi, K. R., Singh, L. D., Binchai, S., & Rangsiruji, A. (2011). Experimental infection with *Paragonimus heterotremus* metacercariae in laboratory animals in Manipur, India. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 42(1), 34.
- Singh, T. S., Sugiyama, H., & Rangsiruji, A. (2012). *Paragonimus* & paragonimiasis in India. *The Indian journal of medical research*, 136(2), 192.

Discusión General

Las metacercarias de *Paragonimus* spp. se encontraron en un 12.9% (44/347) de los cangrejos analizados y en un 64% (7/11) de localidades muestreadas, tanto en la Vertiente Atlántica como en la Vertiente Pacífica. El porcentaje de infección de cangrejos de agua dulce machos fue estadísticamente mayor que el porcentaje de infección de cangrejos hembras. Aunque es difícil explicar este resultado, ecológica- como biológicamente, se podría hipotetizar, que los cangrejos hembras se esconden y entierran mientras son portadoras de huevos, por lo que estarían menos expuestas a los parásitos (comunicación personal Ingo Wehrtmann). Sin embargo, nuestros resultados contrastan con lo reportado por Monge et al. (1985), quienes analizaron 182 cangrejos de las especies *Ptychophallus tristani* y *Pseudothelphusa magna* y no encontraron diferencia significativa en el porcentaje de infección de cangrejos hembras y machos con *P. mexicanus*, por lo que se necesitan más estudios para determinar si el sexo de los cangrejos influye en el porcentaje de infección con metacercarias de *Paragonimus* spp. En los resultados obtenidos en el presente trabajo no se encontró asociación entre la especie de cangrejo y la presencia de metacercarias de *Paragonimus* spp., indicando que existe la misma probabilidad de encontrar metacercarias de *Paragonimus* spp. en las diferentes especies de cangrejos pseudotelfúsidos.

Se encontraron tres especies de cangrejos como hospedadores de las especies de *Paragonimus* en Costa Rica, que no habían sido reportados con anterioridad en nuestro país ni en América. En *P. uncinatus* se encontraron metacercarias de *P. mexicanus* y *P. caliensis*, mientras que en *A. yawi* y *A. agrestis* metacercarias de *P. mexicanus*, siendo además *P. uncinatus*, la especie de cangrejo de la cual se extrajo el mayor número de metacercarias de *P. mexicanus*.

Las metacercarias de *Paragonimus* spp. se encontraron sobre todo en el hepatopáncreas y tejido muscular, y muy pocas en branquias de cangrejos infectados. El órgano con mayor número de metacercarias fue el hepatopáncreas con 56.7%, seguido del tejido muscular con 43%, estos resultados son similares a lo reportado por Brenes et al. (1980), quienes encontraron metacercarias de *P. mexicanus* en hepatopáncreas 46.2% y en tejido muscular 53.8%. Estos autores también encontraron muy pocas metacercarias en branquias. Es probable que *P. mexicanus* y *P. caliensis* se encuentren en hepatopáncreas y tejido muscular para beneficiarse con la absorción de nutrientes, como otras especies de *Paragonimus* y digeneos microfalidos (Overstreet, 1983). En este estudio se encontraron metacercarias de *P. caliensis* tanto en hepatopáncreas (6) como en tejido muscular (5), este hallazgo contrasta con lo reportado por Songandares-Bernal y Seed (1973), quienes reportaron la especificidad de *P. caliensis* por el hepatopáncreas en infecciones experimentales en cangrejos de agua dulce.

Los sitios que presentaron los mayores porcentajes de infección de cangrejos con especies de *Paragonimus* fueron el sitio 1 (Limón, 56.5%) y el sitio 4 (Upala, 33.3%), encontrándose diferencias altamente significativas con respecto a los demás sitios (Coto Brus, Buenos Aires y Parrita). Se considera importante informar a la población que vive en estos sitios, sobre el riesgo que supone consumir cangrejos crudos o mal o poco cocidos y realizar investigaciones futuras, para generar información sobre el consumo de crustáceos de agua dulce y aspectos culturales de las poblaciones que lo consumen, ya que, aunque en las localidades de Buenos Aires y Coto Brus no se encontraron porcentajes altos de cangrejos infectados con *Paragonimus* spp., es en estas localidades, donde se han reportado en el pasado, casos de paragonimiasis pulmonar y ectópica en niños (Morera 1968, Brenes et al., 1976; Brenes et al., 1982; Brenes et al., 1985).

En total se encontraron 588 metacercarias de *P. mexicanus* y 11 metacercarias de *P. caliensis*. *Paragonimus mexicanus* se ha encontrado en zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*, *Philander opossum*), prociónidos y mefitidos, mientras que *P. caliensis* únicamente se ha reportado en mapaches y zarigüeyas de agua (*Chironectes minimus*) (Rojas et al., 1976). Estos reportes sugieren, que *P. mexicanus* puede infectar varias especies de mamíferos, mientras que *P. caliensis* parece tener menos hospedadores definitivos, lo que podría explicar por qué no se encontró un número mayor de metacercarias de *P. caliensis*.

Los resultados obtenidos por microscopia de luz concuerdan con lo reportado por Brenes et al. (1980) y Little (1968), quienes reportaron la morfología de *P. mexicanus*; una metacercaria desnuda, con coloración amarilla del cuerpo y *P. caliensis*; una metacercaria enquistada con el cuerpo de color rosado, respectivamente. Desde el descubrimiento de la metacercaria y gusanos adultos de *P. caliensis* en Colombia (Little, 1968) y posterior descripción en Costa Rica (Rojas et al., 1976; Brenes et al., 1984), no se había descrito una metacercaria enquistada de *Paragonimus* spp. en Latinoamérica. En ese entonces, la diferenciación entre *P. mexicanus* y *P. caliensis* se basó en la variación del número de células flamíferas presentes en las metacercarias, tamaño del cuerpo, ventosa oral, ventosa ventral, y forma y tamaño de los ovarios y testículos de los gusanos adultos. Sin embargo, estas características morfológicas se consideraron insuficientes para diferenciar ambas especies (Tongu, 2001). En ese sentido Veléz et al. (2011) propusieron la sinonimia entre *P. mexicanus* y *P. caliensis*.

A través de microscopia electrónica de barrido se caracterizaron 3 morfotipos de metacercarias de *P. mexicanus* y 2 de *P. caliensis*. El morfotipo 3 de *P. mexicanus* encontrado en Costa Rica, es muy similar a los morfotipos descritos por López-Caballero et al. (2013), de Chiapas, México y Guatemala. Sin embargo, el morfotipo de Costa Rica tiene 8 papilas externas más que el morfotipo de Guatemala y 16 más que el de México; con el

mismo número de papilas mediales. Es probable, que el número de papilas externas pueda variar de 20 hasta 40 en este morfotipo; sin embargo para confirmar esta hipótesis se requieren más estudios morfológicos por microscopía electrónica de barrido en Latinoamérica.

Los morfotipos 1 y 2 de *P. mexicanus* y *P. caliensis* se describen en este trabajo por primera vez. Resultó interesante encontrar, que tanto *P. mexicanus* como *P. caliensis* comparten un morfotipo de metacercaria con 6 papilas mediales en el acetábulo. Esto muestra que ambas especies pueden mantener la misma morfología en esta estructura, pero diferenciarse claramente por microscopía de luz, por la presencia de quiste y la coloración del cuerpo. Los resultados encontrados en este estudio evidencian la importancia de realizar análisis morfológicos incluyendo microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido, para determinar variaciones morfológicas del género *Paragonimus*, específicamente en el acetábulo. Futuros estudios en Latinoamérica podrían aportar datos interesantes sobre las variaciones morfológicas y morfotipos existentes.

El análisis molecular y filogenético confirman que *P. mexicanus* y *P. caliensis* son dos especies de metacercarias diferentes. La comparación de las secuencias nucleotídicas de los morfotipos 1, 2 y 3 de *P. mexicanus*, para las regiones 28S, ITS2 y CO1 son 99% idénticas, lo que indica que corresponden a la misma especie. Así mismo la identidad de secuencia de los morfotipos 1 y 2 de *P. caliensis* es del 100% para las 3 regiones analizadas. Estos resultados demuestran que *P. mexicanus* y *P. caliensis* son especies polimórficas.

Debido a que no existen secuencias depositadas en GenBank de *P. caliensis*, el porcentaje de identidad genética se relacionó con *P. westermanni*, *P. heterotremus* y *P. mexicanus*. Los árboles filogenéticos generados para las tres regiones (28S, ITS2 y CO1), demostraron la separación de las especies encontradas en Costa Rica, y muestran la

divergencia molecular que existe entre las especies encontradas en Costa Rica y las especies asiáticas. Además existe distanciamiento genético entre las especies *P. mexicanus* y *P. caliensis*, el árbol filogenético del gen 28S demostró que la probabilidad de distanciamiento genético entre ambas especies es del 100% y por lo tanto son especies separadas.

Es probable que las especies de *Paragonimus* se originaran y diversificaran aproximadamente hace 200 millones de años, antes de la separación de India, África y Suramérica (Blair et al., 2001). Esta hipótesis explicaría la presencia y diversidad de los hospedadores intermediarios primarios (gasterópodos) y las especies de *Paragonimus* presentes en África, América y Asia. *P. caliensis* comparte características morfológicas (presencia de quiste) y moleculares con algunas especies asiáticas (*P. heterotremus*, *P. westermanni*) y con la especie americana *P. mexicanus*, probablemente es una especie alopátrica que evolucionó de las especies asiáticas, quedando aislada, cuando se separó India, África y Suramérica, limitándose su distribución en Suramérica y posterior extensión hasta Centroamérica. *Paragonimus mexicanus* pudo haberse establecido posteriormente en Suramérica y Centroamérica, y adaptarse a los hospedadores intermediarios primarios. Estudios de genética poblacional y distribución geográfica podrían contribuir a dilucidar la evolución de *P. caliensis* y *P. mexicanus* como parásitos de caracoles del género *Aroapyrgus* y la presencia de ambas especies de duela pulmonar en Costa Rica.

La georeferenciación de las quebradas con cangrejos positivos a *P. mexicanus* y *P. caliensis* indican que ambas especies están distribuidas tanto en lugares conservados ecológicamente como en zonas peri-urbanas. Las zonas peri-urbanas encontradas de *P. mexicanus* se localizan en los Cantones de Buenos Aires y Coto Brus y la de *P. caliensis* en Upala. Considerando estos hallazgos se puede asumir que el ciclo de *Paragonimus* spp., está ocurriendo en estos lugares debido a la presencia de hospedadores definitivos como mapaches y zarigüeyas, los cuales han demostrado adaptarse en zonas urbanas y peri-urbanas.

Estos hallazgos son similares a los encontrados por Velásquez et al., (2008) en un área urbana de Colombia con presencia de *P. mexicanus*. De existir infecciones humanas posteriores podrían ocurrir en zonas selváticas como peri-urbanas, dependiendo de los hábitos dietéticos y culturales de las poblaciones que viven cerca de las quebradas muestreadas con cangrejos positivos a *Paragonimus* spp.

La caracterización morfológica y molecular de *P. caliensis* en Costa Rica, sin duda deja varios cuestionamientos sobre su epidemiología, ecología y biología. ¿Es *P. caliensis* un patógeno para el humano? ¿Utiliza esta especie los mismos hospedadores primarios, secundarios y definitivos que *P. mexicanus*?, si es un patógeno para el humano ¿Provocaría la misma cantidad de casos de paragonimiasis ectópica como *P. mexicanus*? Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la importancia sobre la caracterización de especies de *Paragonimus* en Latinoamérica mediante análisis morfológico y molecular, y deja un precedente para que se continúe la investigación sobre el diagnóstico, prevención y hábitos humanos relacionados a la paragonimiasis en Costa Rica y en el continente americano.

En este estudio se reporta la susceptibilidad de la rata Wistar (*Rattus norvegicus*) a la infección con metacercarias de *P. mexicanus*. Hasta la fecha solamente se habían reportado infecciones experimentales de *P. mexicanus* en gatos y perros domésticos para producir gusanos adultos (Brenes et al., 1980; Ulate et al., 2015) mientras que Huiza et al. (2011), solamente lograron recuperar gusanos juveniles e inmaduros de hámsters (*Mesocricetus auratus*) infectados por vía oral, al igual que Miyazaki (1991), recuperó gusanos inmaduros de tejido muscular de ratas Wistar. Las infecciones experimentales de gatos domésticos reportan un porcentaje de recuperación de gusanos adultos de 70% (186 gusanos inoculados/131 gusanos recuperados), y en perros de 42% (159/66) (Brenes et al., 1980), en comparación con estos resultados, los porcentajes de recuperación en ratas Wistar son

sumamente bajos (2.29%), sin embargo, se lograron obtener dos gusanos adultos en cinco de siete de los animales infectados (71%) y fue posible recuperar gusanos *P. mexicanus*.

Existe evidencia que los roedores pueden actuar como hospedadores definitivos de *P. macrorchis* de Sri Lanka (Kannangara, 1969) y *P. heterotremus* de Vietnam (Narain, 2003; Doahn et al., 2015), y pueden actuar como hospedadores paraténicos de *P. westermani* en China (Fan et al., 1993). En este estudio fue posible evidenciar la presencia de huevos de *P. mexicanus* en una muestra de heces procesada en el laboratorio de una rata infectada por vía intraperitoneal, lo cual indica, que bajo condiciones de laboratorio y por infección vía intraperitoneal, es probable que *Rattus norvegicus* pueda actuar como hospedador definitivo de la duela pulmonar *P. mexicanus*. Sin embargo, no se pudo comprobar si los huevos fueron fértiles y hubiesen podido continuar con el ciclo del parásito, debido a que en los quistes examinados se encontró únicamente un solo gusano. Es conocido, que *P. mexicanus* se reproduce mediante fertilización cruzada dentro de quistes en parénquima pulmonar de los hospedadores definitivos, y cuando el quiste se rompe y se encuentra en la periferia de vías aéreas como bronquiolos y bronquios, los huevos son expulsados por el reflejo de tos hacia tráquea y posteriormente al medio ambiente. Sin embargo, se desconoce, si existen variantes triploides capaces de reproducirse por partenogénesis como ocurre con *P. westermani*.

El hallazgo de gusanos adultos es de suma importancia si se desea implementar un modelo experimental de infección con *P. mexicanus* en ratas Wistar para su utilización en investigación. Bajo condiciones naturales *Rattus norvegicus* solamente podría ingerir metacercarias de *P. mexicanus* al consumir cangrejos infectados. En los resultados obtenidos por infección oral, se obtuvieron únicamente gusanos inmaduros, esto indica, que a través de esta vía de infección, las ratas parecieran actuar como hospedadores paraténicos de *P. mexicanus*, como lo demostró Miyazaki (1991), llegando a infectar hospedadores definitivos,

como perros y gatos domésticos, al consumir los tejidos infectados de los roedores infectados.

En comparación con los resultados obtenidos por Brenes et al. (1980), los gusanos adultos obtenidos en este estudio fueron más pequeños (la mitad de tamaño que los obtenidos de gatos). Esto probablemente se debe a la adaptación evolutiva de *P. mexicanus* en carnívoros, específicamente en cánidos y félidos. También se observaron diferencias en el desarrollo de testículos y ovario; las gónadas fueron de menor tamaño que en los adultos obtenidos en gatos, principalmente los testículos.

La recuperación de gusanos adultos de *P. mexicanus* fue más eficiente en roedores infectados por vía intraperitoneal que por vía oral. Los dos gusanos adultos con gónadas completamente desarrolladas fueron recuperados de ratas infectadas por vía intraperitoneal. La migración del parásito en los hospedadores definitivos ocurre de duodeno hacia cavidad peritoneal, diafragma y pulmones (Singh et al., 2012). La inoculación en cavidad peritoneal en ratas, evita que las metacercarias pasen por el tracto digestivo, así la migración es más corta y directa. Probablemente el paso más directo de las metacercarias podría haber influido en el desarrollo de gusanos adultos en los pulmones de los roedores.

En las especies *P. westermani* y *P. macrorchis* se comparó la cantidad de gusanos recuperados por vía intraperitoneal vs. vía oral, en ratas de laboratorio, encontrándose que por vía intraperitoneal la cantidad de gusanos adultos era mayor (Kannangara, 1969; Habe et al. 1996). En este estudio no se pudo demostrar un aumento en el número de gusanos en ratas infectadas por vía intraperitoneal, ya que en ambas vías de infección el máximo número de gusanos recuperados por individuo infectado fue de uno.

Este estudio demostró la utilidad de la rata Wistar como modelo experimental para la producción de gusanos de *P. mexicanus*. Aunque el porcentaje de recuperación fue muy

bajo, se recuperaron adultos y es posible utilizar este modelo para realizar investigaciones sobre la respuesta inmune, nuevas opciones terapéuticas, caracterizar los productos antigénicos que secreta el gusano adulto y su uso en pruebas específicas inmunodiagnósticas. Además este modelo animal minimiza los costos de mantenimiento comparado con otros modelos animales como perros y gatos. Por otro lado las ratas Wistar son animales de laboratorio, por lo que al utilizar este modelo animal se evitan los conflictos éticos relacionados al uso de animales de compañía como animales de experimento.

Conclusiones Generales

1. Los sitios con mayor probabilidad de encontrar cangrejos infectados con metacercarias de *Paragonimus* spp. fueron Limón y Upala, ahí se determinaron porcentajes de infección de 56.5% y 33.3%, respectivamente.
2. No se determinó asociación entre especies de cangrejos pseudotelfúsidos y el porcentaje de infección con metacercarias de *Paragonimus* spp.
3. Se determinó una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de infección entre cangrejos machos y hembras, siendo mayor el porcentaje de infección de cangrejos machos.
4. Se reporta por primera vez a *P. uncinatus* como hospedador intermediario de *P. mexicanus* y *P. caliensis*, *A. yawi* y *A. agrestis* como hospedadores de *P. mexicanus* y *P. tristani* como hospedador de *P. caliensis*.
5. El número de metacercarias de *P. mexicanus* (588) extraídas de órganos y tejidos de cangrejos fue ampliamente superior a las extraídas de *P. caliensis* (11).
6. Los morfotipos de *P. mexicanus* y *P. caliensis* comparten la misma identidad genética, este resultado demuestra que ambas especies son polimórficas.
7. Se describen por primera las especies *P. mexicanus* y *P. caliensis* en Costa Rica mediante análisis morfológico (microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido) y análisis molecular (amplificación de las regiones 28S, ITS2 y CO1).
8. El análisis filogenético demostró que *P. caliensis* es una especie separada de *P. mexicanus*, reportando la presencia de una tercera especie de duela pulmonar en el continente americano.
9. La rata Wustar (*Rattus novergicus*) actúa como hospedador paraténico de *P. mexicanus* cuando las metacercarias son inoculadas vía oral.

10. La rata Wistar puede actuar como hospedador definitivo de *P. mexicanus*, bajo condiciones de laboratorio y mediante inoculación de la metacercaria vía intarperitoneal, llegando a expulsar huevos del trematodo en las heces.
11. El porcentaje de recuperación de gusanos de *P. mexicanus* en ratas Wistar fue bajo (2.71%), sin embargo es posible obtener gusanos adultos para propósitos de investigación.
12. Los adultos recuperados de *P. mexicanus* en pulmones de ratas Wistar presentan variaciones morfológicas en comparación con los recuperados en gatos domésticos. Las variaciones más importantes son la diferencia entre el tamaño del cuerpo, forma y tamaño de las gónadas, siendo de menor tamaño en los gusanos recuperados en ratas.
13. La utilización de ratas Wistar en un modelo experimental para producción de gusanos de *P. mexicanus*, reduce los costos de mantenimiento en comparación con el uso de otros animales (perros y gatos domésticos).

Recomendaciones Generales

1. Informar a las autoridades de salud pública sobre las áreas con presencia de *Paragonimus* spp. en cangrejos de agua dulce de Costa Rica.
2. Realizar estudios sobre la ecología y biología de *P. caliensis*.
3. Identificar otras áreas geográficas con presencia de *Paragonimus* spp. en Costa Rica.
4. Investigar sobre el consumo e importancia de los cangrejos de agua dulce en la dieta de poblaciones humanas, principalmente en zonas rurales de Costa Rica.
5. Realizar estudios sobre la distribución de *Paragonimus* spp. y comparar los porcentajes de infección en los hospedadores intermediarios secundarios, así como porcentajes de infección según el área geográfica.
6. Divulgar información en centros educativos sobre la prevención de la paragonimiasis, a través del involucramiento de las poblaciones humanas con obras de teatro, conferencias, actividades recreativas y juegos interactivos. Principalmente en las áreas donde se demuestre un alto consumo de decápodos de agua dulce
7. Utilizar la rata Wistar como modelo animal experimental para el desarrollo de gusanos adultos de *P. mexicanus*.
8. Infectar roedores de laboratorio por vía intraperitoneal con metacercarias de *P. mexicanus*, ya que demostró ser más efectiva que la infección oral.
9. Utilizar un número mayor de metacercarias de *P. mexicanus* para la infección intraperitoneal en ratas Wistar.
10. Realizar estudios sobre infecciones experimentales de ratas Wistar con metacercarias de *P. mexicanus* para la obtención de antígenos, investigación sobre la respuesta inmune y elaboración de pruebas diagnósticas específicas.