



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

“ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MOLECULAR DE *Paragonimus mexicanus*
MIYAZAKI E ISHII, 1968 (DIGENEA: PARAGONIMIDAE) DE CHIAPAS,
COLIMA Y VERACRUZ, MÉXICO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(SISTEMÁTICA)

P R E S E N T A

JORGE DAMIÁN LÓPEZ CABALLERO

DIRECTORA DE TESIS: Dra. VIRGINIA LEÓN RÈGAGNON

MÉXICO, D. F.

AGOSTO, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

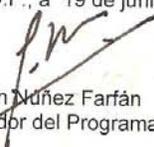
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 1º de junio de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (SISTEMÁTICA)** del alumno **LÓPEZ CABALLERO JORGE DAMIÁN** con número de cuenta **98066083** con la tesis titulada **"Estudio morfológico y molecular de *Paragonimus mexicanus* Miyazaki e Ishii, 1968 (Digenea: Paragonimidae) de Chiapas, Colima y Veracruz, México"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. VIRGINIA LEÓN REGAGNON:**

Presidente: DR. RAFAEL LAMOTHE ARGUMEDO
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN GUZMÁN CORNEJO
Secretario: DRA. VIRGINIA LEON REGAGNON
Suplente: M. EN C. LUIS GARCIA PRIETO
Suplente: DRA. BLANCA ESTELA HERNANDEZ BAÑOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de junio de 2009.


Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

RECONOCIMIENTOS

- ❖ Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por contribuir a mi formación académica y por el apoyo brindado durante la realización del presente proyecto.
- ❖ Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico proporcionado para el desarrollo de mis estudios de posgrado.
- ❖ Al proyecto PAPIIT-UNAM No. IN221307 “Aspectos biológicos de dos zoonosis parasitarias de México: gnathostomiasis y paragonimiasis” por el financiamiento para la realización del presente trabajo.
- ❖ A mi comité tutorial, por el asesoramiento y gran apoyo que me brindaron durante la realización de este proyecto:

Dra. Virginia León Règagnon

Dra. Blanca Estela Hernández Baños

Dr. Marcos Rafael Lamothe Argumedo

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a mi tan querida Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi *Alma Mater*, porque la UNAM no solo es una institución donde se adquieren conocimientos, sino somos todos aquellos que compartimos apasionadamente nuestro saber para hacer de este mundo un mejor hogar. Y por el gran orgullo de ser “Puma” con la sangre azul y piel dorada. Gracias a ti mi “Máxima Casa de Estudios”.

Al Instituto de Biología (IB-UNAM), por permitirme ser parte de unas de las instituciones más importantes en la generación, entendimiento y manejo del conocimiento sobre la biodiversidad de nuestro hermoso país y del mundo.

A la Colección Nacional de Helmintos, por permitirme seguir descubriendo cosas nuevas que me apasionan y por saber más del maravilloso mundo de los Helmintos.

Con gran afecto y admiración agradezco infinitamente a mi directora de tesis, Dra. Virginia León Règagnon, por su dirección siempre tan paciente, por creer en mí, por depositar su confianza y por darme la oportunidad de seguir preparándome académica y personalmente.

Al Dr. Marcos Rafael Lamothe Argumedo y Dra. Blanca Estela Hernández Baños, por sus aportaciones valiosas en el escrito de mi tesis, así como por los comentarios y consejos tan acertados para el trabajo de campo.

Agradezco de todo corazón a David Osorio Sarabia, por su apoyo incondicional, por su disposición de tiempo para discutir cosas que me han ayudado en la realización de mi tesis y sobre todo por sus consejos tanto profesionales como personales que me han ayudado a seguir aprendiendo. Gracias por ser una gran persona conmigo.

De igual manera, agradezco con gran admiración a Luis García, que siempre ha estado en la mejor disposición de ayudarme pese a su tiempo tan ocupado en la producción de nuevo

conocimiento sobre los Helmintos, al igual que por saber de los nuevos chismes de la farándula y por esas sonrisas que provoca a la hora del cafecito “otro ratito, a las nueve y ya”.

Al Dr. Luis Jorge García Márquez por su gran apoyo en el trabajo de campo en Colima y por permitirme ocupar sus instalaciones para la revisión de material.

A los Ing. Bruno y Ricardo Gieseemann, por permitirnos ocupar sus instalaciones de las fincas cafetaleras Argovia y Eduviges, respectivamente, durante el trabajo de campo realizado en Tapachula, Chiapas. De igual manera, agradezco al Ing. Enrique Jiménez de Finca Brasil, de la misma entidad, por el apoyo proporcionado para la realización de trabajo de campo y por las comodidades que nos brindó en sus instalaciones.

A la Jefa de la Estación de Biología Los Tuxtlas, Veracruz, Biól. Rosamond Coates, por permitirme la utilización de las instalaciones a su cargo, para el desarrollo de trabajo de campo en esta localidad.

Agradezco infinitamente a todas las personas que contribuyeron de alguna manera a la obtención del material que se trabajó en el presente estudio. Especialmente a los señores Lázaro Martínez y Dimas Hernández de Finca Brasil, Rolando Gramajo y Guadalupe Gómez de Finca Eduviges, al igual que a los señores Domingo y Juan Velasco que me ayudaron a recolectar en Los Tuxtlas, Veracruz.

A los Drs. Fernando Álvarez y José Luis Villalobos, por la atención y ayuda proporcionada en la identificación de las especies de cangrejos estudiados en el presente proyecto.

A la M. en C. Laura Márquez, por su gran ayuda en la obtención de secuencias y por sus consejos tan acertados en técnicas de biología molecular.

A la M. en C. Berenit Mendoza, por tomar las fotos de microscopía electrónica de barrido de material presentado en este trabajo.

A Silvia Espinosa, por las excelentes imágenes de microscopía electrónica de barrido de material de Veracruz presentado en la presente tesis.

A Rocío “Chio”, por su atención (siempre tan amable) para la realización de mis trámites de posgrado.

A la Dra. María del Carmen Guzmán Cornejo, por aceptar ser parte de mi jurado y, por la revisión y comentarios aportados a mi escrito.

A Lore, por todo su gran apoyo y disposición de tiempo para discutir cosas que me han ayudado en mi formación académica y, por esos momentos de risas.

A mis compañeros de laboratorio: Aline, Chayito, Lore, Andrés, Roge, Elizabeth, Ulises, David “alias el Batista, tranquilo y positivo”, Ángeles, Tony y Lety, por hacer más grata mi estancia en el lab.

Agradezco con gran admiración a la Dra. Rosario Mata López, porque aparte de ser la persona más importante y especial en mi vida personal, es para mí, la persona más admirable académicamente, ya que en todo momento estuvo a mi lado apoyándome incondicionalmente. Gracias de todo corazón, por su invaluable enseñanza en el trabajo de laboratorio de biología molecular, por todas las ideas, consejos, discusiones y críticas que le apporto a este trabajo. Gracias por enseñarme que lo mejor del saber hacer las cosas, es compartirlo.

A mi tan querido Tobish Tobish, porque más que mi mascota, el gran amor y cariño que le tengo lo ha convertido en parte de mi linda familia.

A mi esposa Rosario, el amor de mi vida. Gracias por llegar a mí y convertirme en mi pilar, en mi gran apoyo, en mi mejor amiga y, por compartir lo más hermoso que ha llegado a nuestras vidas, nuestra linda nenetina. Es difícil escribirte palabras que reflejen lo que siento por ti, pero sé muy bien que sabes todo lo que significas para mí. Te adoro mi “linda peque”.

Con especial dedicatoria para la nena más hermosa!! Espero que Dios te bendiga por siempre y que algún día te haga comprender el inmenso amor que has traído a mi vida y que al leer esto te des cuenta que tu has llegado a mí para ser mi inspiración para mirar más allá de lo imaginable y lograrlo por ti. Te amo mi linda nena!!

A mis Padres Martha Caballero y Jorge López, por darme lo más hermoso: mi vida y el placer de compartir con ellos, un sentimiento tan lindo como lo es el amor. Gracias por transmitirme sus valores tan hermosos. Son admirables!

A mis hermanas Carolina “la gangons” e Iriliana “la eshe”, por apoyarme en todo momento, por ser tan lindas conmigo y por todas esas sonrisas que compartimos al ver al bobo de su hermanito!

A Dios... él sabe porque!

**“ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MOLECULAR DE
Paragonimus mexicanus MIYAZAKI E ISHII, 1968 (DIGENEA:
PARAGONIMIDAE) DE CHIAPAS, COLIMA Y VERACRUZ,
MÉXICO”**

CONTENIDO

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
- Importancia médica, síntomas y tratamiento de la paragonimiasis	
- Taxonomía	
- Ciclo de vida de <i>Paragonimus mexicanus</i>	
Antecedentes	15
- Historia y controversias taxonómicas de <i>P. mexicanus</i>	
- Registros de <i>P. mexicanus</i> en México	
Justificación	19
Hipótesis	20
Objetivos	20
Metodología	21
- Obtención de material biológico	
a) Salidas al campo. Captura y revisión de animales silvestres	
b) Estudio de material preservado de <i>Paragonimus mexicanus</i> y <i>P. westermani</i>	
- Morfológico	
- Molecular	
- Determinación de grupo externo	
Resultados	28
- Recolecta de hospederos y obtención de material biológico	

- Morfología
- Análisis filogenético con datos moleculares

Discusión.....	45
Conclusiones.....	53
Literatura citada.....	55
Apéndice 1. Ejemplares de la CNHE revisados e incluidos en el estudio morfológico.....	68
Apéndice 2. Técnicas de tinción para tremátodos.....	69
Apéndice 3. Técnicas de biología molecular.....	72
Apéndice 4. Secuencias de <i>P. mexicanus</i> obtenidas del GenBank.....	80
Apéndice 5. Alineamiento de secuencias de ITS2 de <i>Paragonimus</i>	81
Apéndice 6. Alineamiento de secuencias de COI de <i>Paragonimus</i>	86

RESUMEN

El género *Paragonimus* comprende al menos 50 especies parásitas de los pulmones de mamíferos en las zonas tropicales y subtropicales de Asia, África y América. Este género de digéneo es muy importante desde el punto de vista clínico, ya que varias de sus especies infectan al hombre provocándole una enfermedad llamada paragonimiasis. Su taxonomía ha estado tradicionalmente enfocada sobre la morfología del adulto y las características de la metacercaria. Actualmente, basados en la sistemática filogenética, varios estudios moleculares han sido realizados sobre especies Asiáticas (principalmente en aquellas que constituyen un problema de salud pública), obteniéndose árboles filogenéticos constituidos a partir de secuencias parciales de mDNA de la citocromo C-oxidasa subunidad I (COI) y de rDNA del segundo espaciador transcrito interno (ITS2), tratando de conciliar la información molecular con los caracteres morfológicos de los ejemplares, para identificar características morfológicas diagnósticas para las especies o grupos de especies.

De las nueve especies distribuidas en América, *Paragonimus mexicanus* es la de mayor importancia médica, ya que provoca la paragonimiasis en países como México, Guatemala, Costa Rica, Panamá, Ecuador y Perú. Desde su descripción original realizada por Miyazaki e Ishii en 1968, y en estudios posteriores, se observó una variación morfológica en las poblaciones mexicanas, lo que llevó a pensar que se trataba de una especie ampliamente distribuida con una gran plasticidad fenotípica. Dentro de este marco, se realizó un estudio con base en caracteres morfológicos (obtenidos de ejemplares adultos y metacercarias) y moleculares (a partir de las secuencias del espaciador ITS2 y del gen COI) para evidenciar si tres de las poblaciones de *Paragonimus mexicanus* (Chiapas, Colima y Veracruz), corresponden a un solo taxón ampliamente distribuido en México, o bien, se trata de varias especies. El material estudiado, tanto morfológica como molecularmente, procede de recolectas y ejemplares en préstamo de la Colección Nacional de Helminthos, Instituto de Biología, UNAM. En total se obtuvieron 32 secuencias del marcador ITS2 y de COI para *Paragonimus*. Éstas fueron alineadas, obteniendo para el primer marcador una matriz de 285 sitios por 45 taxones (incluyendo siete secuencias de Guatemala, cinco de Ecuador y una del grupo externo: *P. westermanni*, obtenidas del GenBank). Del mismo modo, se obtuvo para las secuencias de COI una matriz de 383 caracteres por 45 taxones. Ambas matrices se

analizaron por separado en PAUP. En cuanto al primer marcador, se encontraron por medio de un análisis de máxima parsimonia con búsqueda heurística de árboles, seis cladogramas igualmente parsimoniosos, por lo que se construyó un árbol de consenso estricto, el cual presentó valores de L= 34; CI= 0.94; RI= 0.97 y RC= 0.91; mientras que para la matriz de COI se obtuvo un árbol de consenso estricto a partir de dos topologías igualmente parsimoniosas producidas de una búsqueda heurística “Ratched” con 1000 réplicas al azar, con valores de L= 133, CI= 0.79, RI= 0.94 y RC= 0.69.

El análisis cladístico mostró que el marcador molecular ITS2 no proporciona suficiente información para los objetivos del presente trabajo, ya que se obtuvo una politomia total de las secuencias para las poblaciones estudiadas. Por el contrario, el análisis de las secuencias de COI, mostraron que las poblaciones analizadas se anidan en tres subclados, posición que refleja su distribución geográfica. El subclado formado por las poblaciones de Colima corresponde a *P. mexicanus sensu stricto* y los otros dos a taxones en proceso de diferenciación, suposiciones apoyadas en la diferencia genética que existe entre éstas, así como, en la distinción de un morfotipo en cada una de estas poblaciones.

ABSTRACT

The genus *Paragonimus* comprises at least 50 parasitic species inhabiting lungs of mammals from tropical and subtropical regions of Asia, Africa and America. This genus is very important from a clinical point of view because several species infect humans causing a disease called paragonimiasis. The taxonomy of this genus has traditionally focused on adult morphology and metacercariae characteristics. Currently, based on phylogenetic systematics, several molecular studies have been conducted on Asiatic species (particularly those that constitute a public health problem), obtained as result of these studies, phylogenetic trees based on partial sequences of the cytochrome C mDNA oxidase subunit I (COI) and the rDNA second internal transcribed spacer (ITS2), trying to reconcile the molecular information with the morphological characters of the specimens in order to identify diagnostic morphological traits for species or groups of species.

From the nine species distributed in America, *Paragonimus mexicanus* is the most important from a medical point of view, causing paragonimiasis in countries like Mexico, Guatemala, Costa Rica, Panama, Ecuador and Peru. Since its original description given by Miyazaki and Ishii in 1968, and in posterior studies, morphological variations in Mexican populations was observed; this suggested that probably it is a widely distributed species with a great phenotypic plasticity. Based on this framework, a morphological (considering adult and metacercariae stages) and molecular (based on the sequences of the ITS2 and COI) study was conducted to establish if three of the populations of *Paragonimus mexicanus* (from Chiapas, Colima and Veracruz), corresponding to a single widely distributed taxon in Mexico, or if they represent several species. Material recently collected and preserved specimens deposited in the Colección Nacional de Helminthos, Instituto de Biología, UNAM, were examined for morphologic and molecular studies. A total of 32 sequences of *P. mexicanus* for each ITS2 and COI markers was obtained. Sequences of ITS2 were aligned, getting a matrix of 45 taxa and 285 pb (including seven sequences from Guatemala, five from Ecuador and one for the outgroup: *P. westermani*, all of them obtained from GenBank). The COI sequence matrix is conformed by 45 taxa and 383 characters. Both matrices were analyzed separately in PAUP. From a maximum parsimony analysis with heuristic search, a strict consensus tree were built from six equally parsimonious trees, which have values of L

= 34, CI = 0.94, RI = 0.97, and RC = 0.91; on the other hand, from the COI matrix, a strict consensus tree was built from two equally parsimonious topologies produced from a heuristic search "Ratched" with 1000 random replicates, with values of L = 133, CI = 0.79, RI = 0.94, and RC = 0.69.

The cladistic analysis showed that the ITS2 marker not provide sufficient information for the purpose of this work, since this analysis produced a total polytomy of the sequences for the populations studied. In contrast, analysis of the COI sequences showed that the populations analyzed were grouped into three subclades, position that reflects their geographic distribution. One clade (Colima`s population) corresponds to *P. mexicanus sensu stricto* and the other two are taxa in a process of differentiation, assumptions supported by the genetic differences found between them, as well as by the distinction of one morphotype in each population.

INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Paragonimus* Braun, 1899 (Paragonimidae Dollfus, 1939) son digéneos que en su fase adulta se alojan en los pulmones de mamíferos, entre ellos el hombre (Yamaguti, 1971). El género está conformado por al menos 50 especies, las cuales han sido descritas principalmente de países tropicales y subtropicales de Asia, África y América, aunque algunas de estas especies ya no son válidas (Blair *et al.*, 1999b).

En el aspecto clínico, este género de digéneo es muy importante porque varias de sus especies (por ejemplo, *P. westermani*, *P. skrjabini* y *P. heterotremus* en Asia; *P. africanus* y *P. uterobilateralis* en África y *P. mexicanus* y *Paragonimus* sp. de Venezuela, en Latinoamérica) presentan una incidencia alta de infección en el hombre (Yokogawa, 1965; Hu *et al.*, 1982; Miyazaki, 1982; Alarcón *et al.*, 1985a; Alarcón *et al.*, 1985b; Hahn *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1991; Cha *et al.*, 1994; Jeong *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Rha *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2002; Takemasa *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Pham *et al.*, 2007).

Importancia médica, síntomas y tratamiento de la paragonimiasis

La paragonimiasis es una enfermedad zoonótica de gran importancia médica en la mayoría de los países asiáticos y potencial en otros países donde existen algunas especies del género que la provocan, así como los hospederos intermediarios que éstas necesitan para completar su ciclo de vida como sucede en Latinoamérica. La enfermedad constituye un problema de salud pública dada la gran cantidad de personas afectadas (más de 22 millones en todo el mundo), y se asocia con un nivel de vida bajo así como al consumo de cangrejos

de río, principalmente. Por consiguiente, su impacto en el sector salud y económico es considerable en términos de morbilidad y pérdida de productividad, respectivamente (Vélez *et al.*, 2002).

Los focos naturales de esta zoonosis se localizan en las regiones tropicales y subtropicales. El hábitat donde se desarrolla el parásito incluye arroyos con cantos rodados en donde las comunidades bentónicas de macro-invertebrados (moluscos y crustáceos, que actúan como hospederos intermediarios) son las apropiadas (Vélez *et al.*, 2003). Se sabe que la infección es adquirida por el hombre al ingerir cangrejos dulceacuícolas crudos o insuficientemente cocidos infectados con metacercarias o bien, por la ingestión de carne cruda de mamíferos que actúan como hospederos paraténicos (Yokogawa, 1965, 1969, 1982; Miyazaki, 1982). Esta enfermedad es frecuentemente mal diagnosticada confundiéndose con la tuberculosis pulmonar, ya que sus manifestaciones clínicas (tales como: dolor de pecho, tos, hemoptisis, etc) son semejantes. La principal diferencia con la tuberculosis pulmonar consiste en que la mayoría de los enfermos conservan un estado general estable y sólo de vez en cuando se presenta fiebre de bajo grado (Churg, 1971).

AGENTE CAUSAL Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS: A partir de la adquisición del parásito, el tiempo entre la infección y el desarrollo de adultos en los pulmones es de dos a veinte días, y el período de incubación de la enfermedad puede durar hasta un año (Vélez *et al.*, 2002). Otros estudios mencionan que el tiempo que transcurre para que la infección produzca síntomas varía dependiendo de la respuesta inmune de las personas, pero generalmente toma de 6 a 10 semanas. Los síntomas tienden a ceder (sin tratamiento) después de 5 años, pero a veces persisten incluso por 20 años (Health Care Agency, 2006).

La sintomatología general en las primeras tres semanas después de la ingestión de crustáceos infectados con metacercarias incluye diarrea, dolor abdominal, tos, fiebre y urticaria (ronchas), resultado de la migración de los gusanos del estómago a otros órganos. Los síntomas crónicos son producidos cuando el sistema inmune de la persona reacciona a la presencia de gusanos y a los huevos en el cuerpo.

La enfermedad como tal tiene un comienzo gradual y una evolución crónica. Sus dos formas principales son: 1) la paragonimiasis clásica, que afecta los pulmones y 2) la forma no clásica, que origina el síndrome de *larva migrans*. En las infecciones clásicas la infección en los pulmones se acompaña de tos y disnea crónica, pero la mayoría de las infecciones no se manifiestan o generan síntomas leves. Las cargas parasitarias intensas ocasionan paroxismos de tos con lo que los enfermos suelen expulsar esputo sanguinolento con presencia de huevos. A veces aparece derrame pleural (efusión), neumotórax (perforación pulmonar), bronquiectasia y fibrosis pulmonar, producto del proceso de cicatrización. En algunos países de Asia (Japón, Corea, Taiwán y zonas del este de China), la paragonimiasis clásica es causada principalmente por una forma partenogenética triploide de *Paragonimus westermani*. Se ha observado que esta forma triploide desencadena un cuadro patológico más intenso en comparación con las formas diploides de esta misma especie (Agatsuma *et al.*, 1994; Herwerden *et al.*, 1999). *Paragonimus heterotremus* es otra de las especies que provoca la paragonimiasis clásica en Asia (sureste de China) aunque menos severa que la causada por *P. westermani*. Entre las formas africanas que causan la paragonimiasis clásica están *P. africanus* (Nigeria y Camerún) y *P. uterobilateralis* (Liberia, Guinea, Nigeria y Gabón). En Latinoamérica, *P. mexicanus* (= *P. peruvianus*; = *P. ecuadorensis*), *P. caliensis* y *Paragonimus* sp. de Venezuela, son las únicas especies que han sido registradas en

infecciones clásicas en el hombre (Alarcón *et al.*, 1985a; Alarcón *et al.*, 1985b; Vélez *et al.*, 2000).

En la paragonimiasis no clásica o extrapulmonar frecuentemente se presenta derrame pleural. Involucra a la cavidad abdominal, donde puede afectar hígado y bazo (Lee *et al.*, 1985). Puede presentarse también en tejido subcutáneo y músculos, acompañada generalmente de nódulos migratorios que contienen gusanos jóvenes (Takemasa *et al.*, 2002). La invasión del encéfalo por gusanos adultos es menos frecuente, y se caracteriza por presentar convulsiones, hemiplejía, meningoencefalitis y encefalitis fatal (Singcharoen *et al.*, 1988). La paragonimiasis no clásica es causada por las etapas larvarias de *P. skrjabini* y *P. miyazakii*, quienes se distribuyen en China y Japón, respectivamente (Yokogawa, 1965). La maduración de los gusanos de ambas especies ocurre de manera rara en el humano (Blair, 2000).

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS: a) Diagnóstico parasitológico: los huevos de *Paragonimus* pueden ser identificados con un estudio microscópico de esputo, materia fecal, líquido pleural u otras muestras tisulares; b) método serológico: múltiples reacciones serológicas permiten detectar anticuerpos. Las pruebas de RFC (reacción de fijación de complemento) y ELISA han demostrado ser sensibles y específicas, pero no diferencia entre la infección activa y la pasiva (Romeo & Pollock, 1986; Maleewong *et al.*, 1990; Indrawati *et al.*, 1991; Maleewong *et al.*, 1992; Uyema & Sánchez, 1992; Zhang *et al.*, 1996). En infecciones moderadas y severas aparece tos y esputo hemoptoico, que contiene huevos del parásito, material necrótico, eosinófilos y cristales de Charcot-Leyden. c) estudios radiológicos: la paragonimiasis presenta imágenes radiográficas muy variadas. En el 20% de

los pacientes con huevos de *Paragonimus* en el esputo, la radiografía es normal o puede parecerse a la de los pacientes con tuberculosis (Vélez *et al.*, 2002).

TRATAMIENTO: Pocas drogas han demostrado ser efectivas para el tratamiento de la paragonimiasis. Actualmente, se utilizan el praziquantel y el bithionol (Monson *et al.*, 1983; Calvopiña *et al.*, 1991; Ibañez, 1992; Zhang *et al.*, 1996). El primero de éstos, es la droga más importante disponible actualmente para el tratamiento de esta enfermedad. En algunos casos se registra el 100% de curación de pacientes (Vélez *et al.*, 2002). La dosis recomendada es de 75 mg/Kg/día durante tres días. La dosis diaria se divide en tres tomas (una cada ocho horas). El bithionol es un fármaco que ha demostrado ser una buena alternativa terapéutica, sin embargo, es poco aceptado debido a que produce efectos secundarios temporales incómodos tales como trastornos digestivos y erupciones cutáneas (Vélez *et al.*, 2002).

PREVENCIÓN: Los programas para la prevención de la paragonimiasis consisten en promover cambios en los métodos tradicionales para la preparación de alimentos, que involucran técnicas de cocción seguras y la correcta manipulación de los alimentos potencialmente contaminados con metacercarias. También se busca disminuir el crecimiento de la población de moluscos (primeros hospederos intermediarios) por medio de irrigaciones con molusquicidas en los ecosistemas dulceacuícolas. El combate contra las poblaciones de cangrejos no se considera porque son parte del recurso alimenticio de las comunidades (Vélez *et al.*, 2002).

Taxonomía

La taxonomía de las especies de *Paragonimus* ha estado tradicionalmente enfocada en los caracteres morfológicos del adulto (por ejemplo, relación de la longitud/anchura del cuerpo, relación entre el diámetro de las ventosas, posición del acetábulo, forma y arreglo de las espinas en la superficie del cuerpo, tamaño y grado de lobulación del ovario y testículos, así como la forma y tamaño de los huevos) y en el tipo de la metacercaria (especialmente si presenta cubiertas quísticas o es desnuda), dimensiones de la cubierta quística y la morfología de la larva (Blair *et al.*, 1999a; Blair *et al.*, 1999b; Waikagul, 2007). Zhan *et al.* (1997), han realizado estudios de taxonomía numérica (análisis morfométricos) en adultos de varias especies de *Paragonimus*. Aunque esta aproximación no es explícitamente filogenética, es usada para determinar diferencias interespecíficas utilizando criterios morfológicos. Estos autores usaron la relación longitud/ancho del cuerpo como una característica discriminante entre especies de este género.

Debido a la importancia biológica y médica que tiene este género de parásito, en el año de 1993 se comenzó a producir información más detallada sobre la variación no sólo morfológica, sino también molecular de individuos pertenecientes a este género. El primero de los estudios sobre genomas nucleares de especies del género *Paragonimus* se realizó utilizando aloenzimas. La técnica de electroforesis de aloenzimas fue utilizada para examinar la estructura genética dentro de *P. westermani*, cuyos resultados permitieron distinguir que las poblaciones de Malasia y Filipinas están genéticamente más relacionadas entre sí, y que ambas son diferentes de las poblaciones diploides de Taiwán, Japón y Noreste de China (Blair, 1997).

Años más tarde, se iniciaron varios estudios morfológicos y moleculares (ADN) de especies distribuidas en Asia, tratando de conciliar la información molecular con las características morfológicas de ejemplares, con el objetivo de identificar caracteres diagnósticos para las especies o grupos de especies (Blair *et al.*, 1999a; Blair *et al.*, 1999b; Blair, 2000; Agatsuma *et al.*, 2003; Iwagami *et al.*, 2003; Blair *et al.*, 2005; Pham *et al.*, 2007).

Recientemente, se han realizado estudios moleculares de especies de *Paragonimus* que se distribuyen en Asia y se han obtenido árboles filogenéticos basados en secuencias parciales de mDNA de la citocromo C-oxidasa subunidad I (COI) y de rDNA del segundo espaciador transcrito interno (ITS2); los resultados muestran que *P. westermani* está cercanamente relacionado con *P. siamensis* y se distingue de *P. harinasutai*, *P. heterotremus* y *P. macrorchis* (Blair *et al.*, 1999b). Asimismo, se han llevado al cabo estudios de variación intraespecífica en especies de *Paragonimus* usando secuencias parciales de COI e ITS2 y notaron que el primer marcador molecular brindaba resultados de variación geográfica entre aislados de *P. westermani*, consistente con la idea de que *P. westermani* es un complejo de especies (Blair *et al.*, 1997a; Blair *et al.*, 1997b).

En América se han registrado nueve especies (Blair *et al.*, 1999b), entre las que se encuentra *Paragonimus mexicanus* Miyazaki e Ishii, 1968. Esta especie de parásito es también de gran importancia médica ya que provoca la paragonimiasis en países como México, Guatemala, Costa Rica, Panamá, Ecuador y Perú (Miyazaki e Ishii, 1968a y 1968b; Lamothe-Argumedo, 1985; Cornejo *et al.*, 2000).

Ciclo de vida de *Paragonimus mexicanus*

Los gusanos adultos normalmente se alojan sobre el parénquima pulmonar del hospedero definitivo (mamíferos carnívoros), formando cápsulas; también se localizan en los bronquios o bronquiolos; generalmente se encuentran dos individuos en cada cápsula pero en algunos casos se han encontrado hasta cinco (Lamothe-Argumedo *et al.*, 1978). Los huevos del parásito son expectorados o deglutidos, salen junto con el esputo o con las heces y caen al agua y necesitan un período de dos a nueve semanas para embrionarse, después eclosionan y emergen los miracidios; esta etapa dura 24 horas aproximadamente. El miracidio, mediante su movimiento ciliar, nada hasta encontrar y penetrar (a través del tegumento) a un caracol hidróbido de agua dulce (que actúa como primer hospedero intermediario) (Brenes & Rojas, 1975; Malek, 1975; Lamothe-Argumedo *et al.*, 1977; Lamothe-Argumedo *et al.*, 1983). En el caracol, el miracidio migra al hepatopáncreas, y allí se desarrolla en un esporocisto, el cual produce una primera generación de redias y a su vez, cada una produce redias hijas, dentro de las cuales se desarrollan las cercarias (caracterizadas por presentar una cola muy corta). Las cercarias perforan el tegumento del molusco y salen, reptan hasta encontrar a un cangrejo dulceacuícola, al cual parasitan (vía penetración), albergándose en diferentes órganos de éstos, y dando origen a metacercarias, que en el caso de *P. mexicanus*, se encuentran libres, es decir, sin ninguna cubierta quística, principalmente entre los divertículos del hepatopáncreas, en los músculos del cuerpo y en las patas (Lamothe-Argumedo *et al.*, 1977). Tanto los mamíferos carnívoros, como el hombre, adquieren esta enfermedad al ingerir este tipo de cangrejos dulceacuícolas crudos o insuficientemente cocidos infectados con metacercarias o bien, por la ingestión de carne cruda de mamíferos que actúan como hospederos paraténicos (Blair, 2000). Al ser ingeridas las metacercarias, éstas pueden penetrar en tres posibles sitios: el esófago, el estómago o el

intestino. Si sucede a través del estómago o intestino, implica que la larva penetre en primer lugar a la cavidad abdominal, teniendo así la opción de llegar al hígado y posteriormente migrar a la cavidad torácica a través del diafragma (Tantalean *et al.*, 1974); pero si la migración se lleva a cabo por el esófago, la metacercaria llega directamente a la cavidad torácica y atraviesa hasta llegar al parénquima pulmonar donde se encapsulan y maduran hasta su fase adulta (Ramírez-López, 1986) (**Figura 1**).

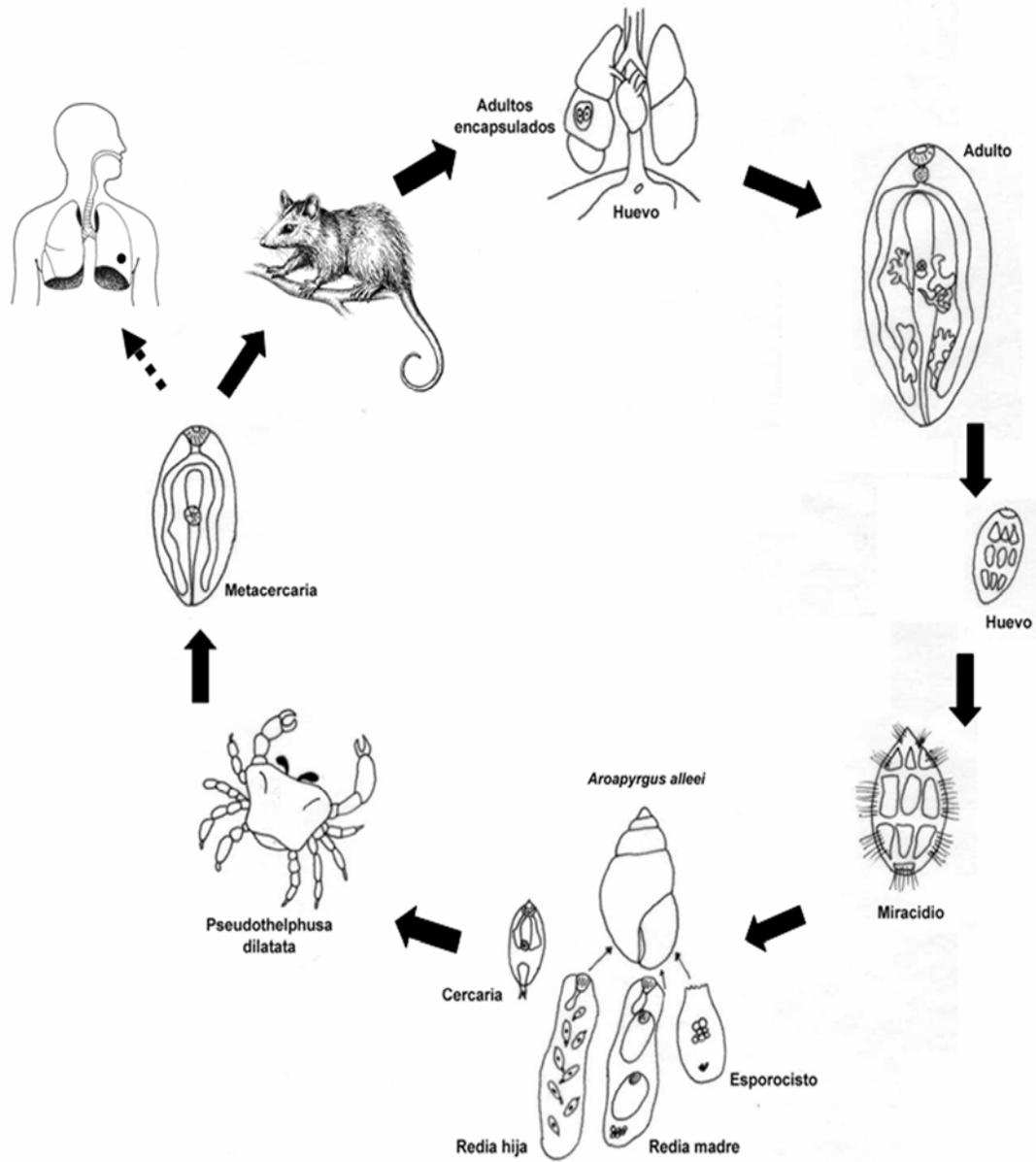


Figura 1. Ciclo de vida de *Paragonimus mexicanus*. Modificado de Lamothe-Argumedo (1989).

ANTECEDENTES

Historia y controversias taxonómicas de *Paragonimus mexicanus*

El primer caso sobre paragonimiasis pulmonar humana en México fue señalado por el Dr. M. Toussaint en 1895, cuando descubrió en los pulmones del cadáver de un paciente huevos de un tremátodo. En el año de 1913, el Dr. Lara (en Yucatán) dio a conocer varios casos de hemoptisis parasitaria (como también se le conoce a la paragonimiasis) en emigrantes coreanos y dos en nativos que consideró autóctonos (Lamothe-Argumedo & García-Prieto, 1988); sin embargo, el Dr. Sandground en 1933, consideró errónea la identificación de estos casos autóctonos de Yucatán y expresó que la paragonimiasis en este Estado requería de una verificación y un estudio más profundo. En 1961, los Dres. Martínez-Báez y Jiménez-Galán encontraron huevos de una especie de *Paragonimus* en tejido pulmonar de un paciente procedente de Taretan, Michoacán (Martínez-Báez & Jiménez-Galán, 1961).

En cuanto a hallazgos de este tremátodo en animales silvestres, el primer registro fue señalado por el Dr. L. Mazzotti en 1965, quien recolectó 36 ejemplares de *Paragonimus* adultos encontrados en pulmones de dos tlacuaches (*Didelphis marsupialis* L.), capturados en el Estado de Colima. El Dr. Mazzotti envió 27 de estos ejemplares al Dr. Miyazaki, quien junto con el Dr. Ishii determinaron que se trataba de una especie nueva a la que nombraron *Paragonimus mexicanus* Miyazaki e Ishii, 1968. La determinación de este material resultó controversial, ya que los autores compararon los ejemplares de México con *P. kellicotti* Ward, 1908 y *P. miyazakii* Kamo, Nishida, Hatsushika y Tomimura, 1961, de Estados Unidos y Japón, respectivamente; lo cual reveló que el material de México en el que se basó

Miyazaki e Ishii se separaban en dos especies (A y B) y que ambas se distinguían perfectamente de las especies mencionadas anteriormente. La especie A estaba representada por 26 ejemplares y la especie B por uno solo; éstas se distinguían entre sí por la forma del ovario y los testículos. Los ejemplares de la especie A fueron determinados como *Paragonimus mexicanus*, mientras que el único ejemplar de la especie B, fue incorporado a lo que se consideró como una especie nueva de Colombia, cuya descripción nunca fue publicada (en: Miyazaki e Ishii, 1968a).

Desde entonces, el Dr. Miyazaki tuvo un profundo interés en investigar la problemática de la paragonimiasis en México y otros países de Latinoamérica. Como resultado de dicho interés, identificó (junto con otros colaboradores) a *Paragonimus peruvianus* Miyazaki, Ibáñez y Miranda, 1969, en Perú, cuya metacercaria fue diferente de cualquiera de las otras especies de tremátodos pulmonares conocidos, pues ésta carecía de cubierta quística alrededor del cuerpo (Miyazaki *et al.*, 1969; Miyazaki *et al.*, 1971). La infección experimental en gatos con estas metacercarias reveló que los gusanos adultos obtenidos presentaban características semejantes a los de *P. mexicanus*. Diez años más tarde, el Dr. Miyazaki realizó un estudio sobre la forma de la metacercaria de *P. mexicanus* en Colima (localidad tipo). Gracias a este trabajo, se llegó a la conclusión de que tanto los adultos como las metacercarias de *P. peruvianus* eran morfológicamente idénticos a los de *P. mexicanus*; por consiguiente, se estableció a la primera especie como sinónimo de esta última (Miyazaki *et al.*, 1980). Como resultado de este arreglo taxonómico, *P. mexicanus* tiene una amplia distribución en Latinoamérica, ya que se le ha registrado en México, Guatemala, Costa Rica, Panamá, Perú y Ecuador.

Iwagami *et al.* (2003) analizaron molecularmente dos poblaciones de *P. mexicanus*, una de Guatemala y otra de Ecuador, con base en secuencias de un gen ribosomal (ITS2) y uno mitocondrial (COI). Como resultado de este estudio encontraron que la diferencia genética en *P. mexicanus* fue menor a la encontrada entre miembros del complejo *P. westermanni* en Asia (Iwagami *et al.*, 2000), sugiriendo que las dos poblaciones americanas pertenecen a la misma especie y sus diferencias genéticas corresponden a variación entre subespecies.

Registros de *Paragonimus mexicanus* en México

A la fecha, *P. mexicanus* se ha registrado en 17 localidades de la República Mexicana (**Tabla 1**).

Tabla 1. Registros de *Paragonimus mexicanus* en México.

Estado	Localidad	Referencia
Chiapas	Puente Escocia (Tapachula) ^C	Lamothe-Argumedo (1984)
	Finca Brasil (Tapachula) ^C	Lamothe-Argumedo (1984)
Colima	Río Coahuayana (Tecomán) ^T	Monet-Mendoza <i>et al.</i> (2005)
	La Esperanza (Coquimatlán) ^{C-T}	Miyazaki <i>et al.</i> (1980) ; Yokogawa <i>et al.</i> (1985)
	Arroyo “La Barragana” (Comala) ^{C-H-T}	Miyazaki e Ishii (1968a); Lamothe-Argumedo <i>et al.</i> (1977)
	Ojo de Agua (Madrid) ^{C-T-S}	Miyazaki <i>et al.</i> (1980); Lamothe-Argumedo <i>et al.</i> (1981); Ito <i>et al.</i> (1985)
Estado de México	Nanchititla ^F	Lamothe-Argumedo & Jaimes-Cruz (1993)
Hidalgo	San Esteban ^H	Karam & Bernal (1987)
Michoacán	La Escalera (Taretan) ^{C-H}	Martínez-Baéz & Jiménez-Galan (1961); Lamothe-Argumedo (1984)
	Manantial de Hortigal (Caracha) ^{C-T}	Lamothe-Argumedo (1984)
	Arrollo del Balneario (Agua Blanca) ^{C-T}	Lamothe-Argumedo (1984)
	El Guayabito (Macatán) ^{C-T}	Lamothe-Argumedo <i>et al.</i> (1986)
Nayarit	El Mamey (Macatán) ^{C-T}	Lamothe-Argumedo <i>et al.</i> (1986)
Puebla	Huauchinango ^H	Salazar <i>et al.</i> (1987)
Tabasco	Tapijulapa ^C	Lamothe-Argumedo (1984)
Veracruz	Laguna Escondida (Los Tuxtlas) ^{C-T}	Cañeda-Gúzman (1997)
	Arroyo de “Las Cabañas” (Sontecomapan) ^{C-T}	Lamothe-Argumedo <i>et al.</i> (1985)

C=cangrejo; F=férido; H=humano; T=tlacuache; S= caracol

JUSTIFICACIÓN

Debido a que esta parasitosis presenta distintos grados de patogenicidad en los hospederos (directamente relacionado con el órgano que invaden), así como diferencias en la sintomatología (Blair, 2000; Cornejo *et al.*, 2000; Moyou-Somo *et al.*, 2003), es importante saber con precisión la identidad específica de este parásito en sus poblaciones. Dada la variación morfológica observada en los ejemplares de *Paragonimus* en México (Miyazaki e Ishii, 1968a, 1968b), es posible que exista más de una especie.

Las secuencias de DNA han sido de mucha utilidad para diferenciar especies de este género (Blair *et al.*, 1999a; Blair *et al.*, 1999b; Iwagami *et al.*, 2000; Iwagami *et al.*, 2003; Blair *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta la fecha no se contaba con información molecular de individuos de *P. mexicanus* recolectados en México que ayudara a definir si existe más de una especie en nuestro país. Por ello, el presente estudio pretende analizar la información molecular conjuntamente con la información morfológica para evidenciar si tres poblaciones geográficamente separadas de este parásito, conforman una sola especie o se tratan de más especies.

HIPÓTESIS

Las poblaciones de *P. mexicanus* registradas en México conforman una sola especie ampliamente distribuida.

OBJETIVOS

General

Determinar con base en caracteres morfológicos y moleculares si tres de las poblaciones de *Paragonimus mexicanus* corresponden a un solo taxón ampliamente distribuido en México, o bien, se trata de más especies.

Particulares

Emplear marcadores nucleares y citoplásmicos (mitocondriales) para comparar tres poblaciones de México que hasta la fecha se han considerado como *P. mexicanus* en México.

Correlacionar los datos morfológicos de ejemplares preservados de esta especie con la información molecular generada en el presente estudio.

METODOLOGÍA

Obtención de material biológico

Con la finalidad de obtener ejemplares frescos de *Paragonimus mexicanus*, tanto para su estudio molecular como para su estudio morfológico, se realizaron las siguientes actividades:

a) Salidas al campo. Captura y revisión de animales silvestres

Se llevaron al cabo seis salidas al campo en localidades de tres Estados de la República en donde se tienen registros previos de *P. mexicanus* (**Tabla 2**). Asimismo, se exploraron localidades nuevas en dichos Estados para determinar la presencia de este parásito e incrementar el número de registros en nuestro país.

GUSANOS ADULTOS: Se recolectaron tres especies de tlacuache (*Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana* y *Philander opossum*), empleando dos métodos. El primer método (más utilizado) fue con ayuda de trampas-jaula “Tomahawk” usando como cebo sardina en lata o plátanos maduros. El segundo método de captura fue con arma de fuego, con la ayuda de cazadores locales. Los mamíferos capturados fueron sacrificados mediante la inhalación directa de cloroformo durante un lapso aproximado de 15-20 minutos o por sobredosis de pentobarbital sódico inyectado vía intra-peritoneal para someterlos a estudios helmintológicos generales. Posteriormente, se les realizó una incisión ventral desde el ano hasta la tráquea y se extrajeron los órganos internos, los cuales fueron revisados con la ayuda de equipo de disección (poniendo mayor atención en los pulmones) con la finalidad de reconocer las cápsulas que albergan a los gusanos. Una vez localizada(s)

la(s) cápsula(s) se separaron del tejido pulmonar con sumo cuidado. Los gusanos encontrados en cada cápsula se colocaron en cajas de Petri con solución salina al 0.85 % para estudiarse *in vivo*.

Tabla 2. Localidades de recolecta de tlacuaches y cangrejos silvestres.

Estado	Localidad	Georreferencia	Fechas de recolecta
Chiapas	Finca Eduviges (Nueva Alemania) Tapachula	18° 35' 29.6'' N 95° 05' 14.9'' O	02-10 de enero de 2008 08-12 de julio de 2008
	Río Sta. Rita, Finca Brasil, Tapachula	15° 05' 41.7'' N 92° 18' 48.8'' O	
Colima	Río Los Amiales, Coquimatlán	19° 10' 28.2'' N 103° 49' 38.3'' O	01-09 de noviembre de 2007
	Ojo de Agua, Madrid	19° 03' 59.6'' N 103° 52' 25.6'' O	
	Río Mezcales, Comala	19° 20' 14.1'' N 103° 46' 35.0'' O	
Veracruz	Ejido Laguna Escondida	18° 35' 21.1'' N 95° 05' 24.1'' O	12-15 de enero de 2007 10-12 de agosto de 2007 02-13 de marzo de 2008
	Río Los Pocitos, Laguna Escondida	18 ° 38' 29.6'' N 95° 05' 14.9'' O	
	Río Piso, Playa Escondida	18° 34' 43.4'' N 95° 03' 40.9'' O	
	Laguna de Sontecomapan	18° 30' 46.5'' N 95° 01' 59.2'' O	

Posteriormente, uno o dos gusanos (dependiendo de la cantidad de individuos encontrados por cápsula) se fijaron directamente en alcohol absoluto (etanol 100%) para su estudio molecular. El resto de los individuos hallados en la misma cápsula se fijaron con formol al 4% caliente y se preservaron en etanol al 70% en frascos de vidrio; finalmente, se procesaron con técnicas de tinción convencionales en helmintología para su estudio morfológico (Lamothe-Argumedo, 1997).

METACERCARIAS: Para la obtención de metacercarias, se recolectaron a mano cangrejos de la familia Pseudothelphusidae en arroyos de las mismas localidades donde se capturaron los tlacuaches. Los cangrejos se sacrificaron abriéndolos del carapacho. Posteriormente, el hepatopáncreas y los divertículos fueron removidos del carapacho en su totalidad y colocados entre dos placas de vidrio para su examen minucioso bajo el microscopio estereoscópico, con la finalidad de hallar las metacercarias. Del mismo modo, el resto de tejido del cangrejo fue colocado entre dos placas de vidrio y observado bajo el microscopio estereoscópico. Las metacercarias que se obtuvieron fueron colocadas en cajas de Petri con solución salina al 0.65 % para estudiarse *in vivo* y se separaron en dos lotes, uno destinado para su estudio molecular, el cual se fijó del mismo modo que los adultos, mientras que las metacercarias del segundo lote se fijaron con formol al 4% caliente y se preservaron en etanol al 70% en frascos de vidrio para su posterior procesamiento.

Todos los gusanos recuperados (adultos y metacercarias) destinados al estudio morfológico (microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido) en el presente trabajo, fueron depositados en la Colección Nacional de Helminths (CNHE), Instituto de Biología, UNAM.

b) Estudio de material preservado de *Paragonimus mexicanus* y *P. westermani*

Se obtuvieron en préstamo varios lotes de *P. mexicanus* de la CNHE procedentes de algunas de las localidades mencionadas en el presente trabajo, para incluirlos en el estudio morfológico. Del mismo modo, se obtuvo un lote de dos ejemplares de *P. westermani* donado por el Dr. Habe de la Universidad de Fukuoka, Japón (**Apéndice 1**).

Morfológico

MICROSCOPIA ÓPTICA: Los ejemplares destinados a estudios morfológicos (gusanos adultos), después de ser procesados mediante técnicas de tinción convencionales en helmintología como Paracarmín de Meyer y Tricrómica de Gomori (**Apéndice 2**), fueron observados y medidos con un ocular calibrado milimétricamente. Posteriormente, con la ayuda de una cámara clara se realizaron esquemas de las estructuras que son utilizadas para diferenciar especies de este género. Se midió el tamaño de las ventosas y la posición del acetábulo con respecto al extremo anterior corporal; asimismo, se midieron y dibujaron el ovario y los testículos para expresar gráficamente su tamaño y grado de lobulación. Estas estructuras fueron fotografiadas utilizando una cámara digital Olympus (SP-350), adaptada a un microscopio compuesto de luz Olympus (CX40).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO: Para su estudio bajo esta técnica, los gusanos se deshidrataron con alcohol etílico en concentraciones graduales (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%), posteriormente se secaron hasta punto crítico con CO₂ y se cubrieron con una mezcla de oro-paladio, montándose en un porta-muestras con papel adhesivo para su observación en microscopía electrónica de barrido utilizando los microscópios Hitachi S-2460N y JEOL JSM-5310LV.

Molecular

El material preservado en etanol absoluto fue procesado mediante técnicas estandarizadas para la obtención de DNA genómico (**Apéndice 3**). Inicialmente se digirió a cada uno de los ejemplares en una mezcla de proteinasa K (25 mg/ml), 500 µl de buffer STE y 75 µl de SDS al 10%; las muestras se incubaron durante 24 horas a 55 °C y posteriormente, se extrajo el DNA total usando el método de extracción fenol-cloroformo (Hillis *et al.*, 1996), para gusanos adultos y el método de Chelex, para la extracción de DNA de metacercarias. Se usó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el espaciador transcrito interno 2 (ITS2) y parcialmente, el gen mitocondrial citocromo-C oxidasa subunidad I (COI) de cada una de las muestras. Para la amplificación de las secuencias de ITS2 se utilizaron los iniciadores 5'-CGG TGG ATC ACT CGG CTC GT-3' (3S) (forward) y 5'-CCT GGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC-3' (A28) (reverse) (Bowles *et al.*, 1995). Para la amplificación de secuencias parciales de COI se utilizaron los iniciadores 5'-TTT TTT GGG GAT CCT GAG GTT TAT-3' (FH5) (forward) y 5'-TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG-3' (FH3) (reverse) (Bowles *et al.*, 1993). El volumen final de la reacción de amplificación fue de 25 µl, utilizándose los siguientes reactivos para cada una de las muestras: 2.5 µl de Buffer PCR, 2.5 µl de dNTP's, 1.25 µl de MgCl₂, 2.5 µl de cada uno de los iniciadores a una concentración de 10 pmol, 0.125 µl de Taq polimerasa (Amplificasa de Biogénica) y 1 µl de templado. Las condiciones de la PCR para ambos marcadores fueron las siguientes: desnaturalización a 94° C durante 1 min, alineación a 50° C durante 1 min, síntesis a 72° C durante 2 min, todo durante 30 ciclos, finalmente las muestras se guardaron a 4° C. Los resultados se evaluaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se realizó la purificación de los fragmentos amplificados con el kit de purificación QIAquick PCR Purification Kit o el kit

Montage PCR Filter Units de Millipore y fueron secuenciados con el método enzimático descrito por Sanger *et al.* (1977), tomando en cuenta los parámetros recomendados para el Big Dye Terminator®, utilizando por cada muestra y por cada iniciador 2 µl de Edge BioSystems 2.5X Sequencing Diluent, 2 µl de Dye Terminator Mix, 1 µl del iniciador a la misma concentración empleada en la amplificación (10 pmol) y entre 1 y 2 µl del templado dependiendo de la concentración calculada para cada muestra (fragmento purificado), agregándose la cantidad restante de agua bidestilada estéril para un volumen final de 10 µl. El ciclo de reacción de secuencia que se usó fue el protocolo recomendado para el Edge BioSystems 5X Sequencing Diluent: un paso inicial de desnaturalización a 96° C por 3 min., seguido por 25 ciclos de 96° C por 10 seg., en el paso siguiente se utilizó la misma temperatura de alineación que se uso en la amplificación del segmento para cada uno de los marcadores por un lapso de 5 seg., seguida por un periodo de síntesis de 4 minutos a 60° C y para completar la síntesis, las muestras se mantuvieron a 60° C por 4 minutos, manteniéndose finalmente a 4° C. La lectura de las secuencias se realizó en un secuenciador automático (ABI Prism 310) y las secuencias obtenidas para cada uno de los marcadores se editaron manualmente con el programa de cómputo BioEdit versión 7.0.4.1 (Hall, 1999). Se realizó una prueba de BLAST con cada una de las secuencias obtenidas para corroborar que se trata de las secuencias esperadas. La alineación fue realizada manualmente, tomando como referencia las secuencias de ITS2 y COI de *Paragonimus westermani* (números de acceso en el GenBank AF333278 y U97205, respectivamente). También, se incluyeron en el análisis las secuencias parciales de ITS2 y de COI de *Paragonimus mexicanus* (Iwagami *et al.*, 2003) previamente registradas en GenBank (**Apéndice 4**).

Se construyó una matriz de datos moleculares de cada uno de los marcadores. Se valoró la variación genética inter e intra-poblacional de las muestras incluidas mediante la aplicación de distancias genéticas no corregidas (Uncorrected Genetic Distances), implementado en PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002). Las matrices de datos de cada marcador se utilizaron para reconstruir por separado las relaciones entre los taxones utilizando el algoritmo de Máxima Parsimonia (MP) implementado en el programa de cómputo PAUP* 4.0b10.

Determinación de grupo externo

Hasta el momento, no existen secuencias de otras especies americanas de *Paragonimus* en GenBank, en cambio se cuenta con secuencias de especies asiáticas del género. Se incluyeron secuencias de *Paragonimus westermani* que es una de las especies más importantes desde el punto de vista médico, para utilizarse como grupo externo en el análisis.

RESULTADOS

De las 17 localidades registradas para *Paragonimus* en México, se adicionaron tres nuevas como resultado del muestreo realizado durante el presente estudio; éstas son: río Los Amiales, en Coquimatlán, Colima, río Los Pocitos y río Piso en el Estado de Veracruz. Por otro lado, en la localidad de Finca Brasil, Tapachula, Chiapas, se obtuvo por primera vez la fase adulta de este parásito, ya que solo se habían registrado metacercarias (Lamothe-Argumedo, 1984). Asimismo, con el presente trabajo se comprobó la presencia actual de este digéneo en Finca Brasil, Chiapas y Ojo de Agua, Madrid, Colima.

Recolecta de hospederos y obtención de material biológico

GUSANOS ADULTOS: Se revisó un total de 37 tlacuaches de los tres Estados muestreados, [Chiapas (n= 6), Colima (n= 9) y Veracruz (n= 22)]. De éstos, solo ocho resultaron positivos a *Paragonimus* (**Tabla 3**), obteniéndose 34 gusanos en total (23 tlacuaches del Estado de Colima y once de Chiapas). Los 22 tlacuaches capturados en localidades de Veracruz (ver **Tabla 2**), se encontraron libres de infección de este parásito.

METACERCARIAS: Se revisaron 173 cangrejos de ríos ubicados en las localidades de los tres Estados anteriormente mencionados; de éstos, 84 son de Chiapas (Río Sta. Rita n=60, de los cuales ocho resultaron positivos, Río Mexiquito n=24, todos negativos); 14 de Colima (Ojo de Agua, Madrid n=10, de los cuales cuatro resultaron positivos con una metacercaria cada uno, del Río Los Amiales, Coquimatlán n=4 resultando uno positivo con una metacercaria) y 75 de Veracruz (de los ríos Maquinas y La Palma, Los Tuxtlas, n= 5 y n=2, respectivamente, y todos fueron negativos; en cambio, del río Los Pocitos, Laguna

Escondida se recolectaron 48 cangrejos, siete de ellos infectados y en Río Piso, Playa Escondida, se capturaron 20 cangrejos, estando solo cuatro infectados; cada cangrejo infectado solo presentó una metacercaria). El número total de metacercarias encontradas fue de 24. En la **tabla 4** se presenta de forma resumida la obtención de este material biológico, así como su procedencia y procesamiento, de acuerdo a la metodología previamente descrita.

Tabla 3. Obtención de material biológico (gusanos adultos) en las localidades de recolecta.

Localidad	Hospedero	No. de cápsulas/ ubicación en pulmón	No. de gusanos por cápsula	Procesamiento	
				BM	Morfología
Chiapas					
Finca Brasil, Tapachula	<i>Didelphis virginiana</i> ♀	1 / Der	2	1	1
	<i>Didelphis virginiana</i> ♀	1 / Der – 1 / *	2 – 3	3	2 (1 MEB)
	<i>Didelphis virginiana</i> ♀	2 / Izq	2,2	2	2 (1 MEB)
Colima					
Río Los Amiales, Coquimatlán	<i>Didelphis marsupialis</i> ♂	1 / Der	2	1	1
	<i>Didelphis marsupialis</i> ♂	4 / Der	2,2,2,0	3	3
	<i>Didelphis virginiana</i> ♀	2 / Der – 3 / Izq	2,2 – 2,2,2	5	5 (2 MEB)
	<i>Philander opossum</i> ♀	1 / Izq	3	2	1
Ojo de Agua, Madrid	<i>Didelphis marsupialis</i> ♀	1 / Der	2	1	1

BM= Biología Molecular; **Der**= Derecho; **Izq**= Izquierdo; **MEB**= Microscopía Electrónica de Barrido; *= Esófago

Tabla 4. Obtención de material biológico (metacercarias) en las localidades de recolecta.

Localidad	No. cangrejos inf / revisados (%)	Hospedero / No. de Mc	Procesamiento	
			BM	Morfología
Chiapas				
Río Sta. Rita, Finca Brasil, Tapachula	8 / 60 (13.3)	<i>R. tuberculatus</i> / 8	5	3 (1 MEB)
Colima				
Río Los Amiales, Coquimatlán	1 / 4 (25)	<i>P. aff. seiferti</i> / 1	1	
Ojo de Agua, Madrid	4 / 10 (40)	<i>P. aff. seiferti</i> / 4	3	1 (MEB)
Veracruz				
Río Los Pocitos, Laguna Escondida	7 / 48 (14.5)	<i>T. poglayenorum</i> / 7	6	1 (MEB)
Río Piso, Playa Escondida	4 / 20 (20)	<i>T. poglayenorum</i> / 4	2	2 (1 MEB)

BM= Biología Molecular; **Inf**= infectados; **Mc**= Metacercarias; **MEB**= Microscopía Electrónica de Barrido
P. aff. seiferti= *Pseudothelphusa aff. seiferti*; *R. tuberculatus*= *Raddaus tuberculatus*; *T. poglayenorum*=
Tehuana poglayenorum

Los ejemplares obtenidos durante el presente trabajo y utilizados en microscopía óptica y MEB fueron depositados en la CNHE con sus respectivos números de catálogo (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Adultos de *Paragonimus* depositados en la CNHE.

Localidad	Hospedero	No. gusanos	No. Cat. CNHE
Chiapas			
Finca Brasil, Tapachula	<i>D. virginiana</i>	1	6553
	<i>D. virginiana</i>	2	6554
		2 MEB	6555
Colima			
Río Los Amiales, Coquimatlán	<i>D. marsupialis</i>	4	6556
	<i>D. virginiana</i>	3	6557
		2 MEB	6558
	<i>P. opossum</i>	1	6559
	<i>D. marsupialis</i>	1	6560
Ojo de Agua, Madrid			

MEB= Microscopía Electrónica de Barrido

Morfología

Con base en las observaciones de ejemplares adultos y metacercarias estudiados tanto en microscopía óptica como en MEB, se pudieron reconocer tres morfotipos (**Tabla 7**). Éstos fueron caracterizados principalmente por el tamaño, forma y grado de lobulación del ovario y de los testículos en los gusanos adultos (**Figuras 2 y 3**), debido a que en los ejemplares adultos procesados para MEB no se encontraron diferencias en las estructuras de la superficie corporal (ventosa oral, acetábulo, espinas tegumentarias, poro genital y poro excretor) (**Figura 4**). Otras de las características de los gusanos adultos que distinguen a los morfotipos son: la relación entre el ancho de la ventosa oral y el acetábulo, así como el porcentaje del tamaño del cuerpo que ocupa la distancia del acetábulo al extremo anterior corporal. Adicionalmente, otro aspecto que ayudó a caracterizar los morfotipos fue el patrón papilar acetabular observado en las metacercarias estudiadas en MEB (**Figura 5**).

Cabe señalar que durante el estudio *in vivo* de estas últimas, se observó claramente una coloración distinta entre las poblaciones de los tres Estados muestreados: las metacercarias encontradas en los cangrejos de Veracruz (*T. poglayenorum*) presentaron una coloración rosada; las metacercarias de Chiapas (*R. tuberculatus*) mostraron un color amarillo, mientras que las metacercarias de los cangrejos de Colima (*Pseudothelphusa aff. seiferti*) presentaron un color blanco.

Tabla 6. Metacercarias de *Paragonimus* depositadas en la CNHE.

Localidad	Hospedero	No. gusanos	No. Cat. CNHE
Chiapas			
Río Sta. Rita, Finca Brasil, Tapachula	<i>R. tuberculatus</i>	2 1 MEB	6561 6562
Colima			
Ojo de Agua, Madrid	<i>P. aff. seiferti</i>	1 MEB	6563
Veracruz			
Río Los Pocitos, Laguna Escondida	<i>T. poglayenorum</i>	1 MEB	6564
Río Piso, Playa Escondida	<i>T. poglayenorum</i>	2 1 MEB	6565 6566

MEB= Microscopía Electrónica de Barrido

Considerando la distribución geográfica, los morfotipos corresponden con cada uno de los Estados muestreados. El morfotipo 1 fue reconocido en los ejemplares de Finca Brasil, Tapachula, Chiapas. El morfotipo 2 corresponde a los ejemplares de las poblaciones de Los Amiales, Coquimatlán, Ojo de Agua, Madrid y Arroyo de la Barragana, todas estas pertenecientes al Estado de Colima. Y finalmente, el morfotipo 3, cuyos representantes son los ejemplares de poblaciones de Las Cabañas, Sontecomapan, Río Piso y Río Los Pocitos, Veracruz.

Tabla 7. Comparación entre los morfotipos de *Paragonimus* localizados en el material del presente trabajo.

Valores expresados en promedio seguido por el valor mínimo y máximo entre paréntesis.

		Morfotipo 1 n= 2	Morfotipo 2 n= 15	Morfotipo 3 n= 5
Adulto	Ancho Vo: Ancho acetábulo	1: 0.86 (0.72 – 1.00)	1: 0.90 (0.77 – 1.18)	1: 0.77 (0.70 – 0.91)
	% Acetábulo-extremo anterior [¥]	33.77	37.80 (28.57 – 44.14)	41.60 (40.26 – 42.20)
	Tamaño Ovario*	Pequeño 20.00 (19.50 – 20.0)	Grande 25.36 (18.50 – 31.10)	Pequeño 19.80 (17.00 – 21.70)
	Forma Ovario	Compacto	Distendido	Compacto
	Lobulación Ovario	2 ^a	3 ^a	1 ^a y 2 ^a
	Tamaño testículos [†]	Pequeños	Grandes	Pequeños
	Der.	15.00	19.33 (17.1 – 24.00)	16.10 (11.10 – 20.20)
	Izq.	18.50	18.50 (13.20 – 26.10)	15.00 (14.50 – 15.80)
	Forma Testículos	Distendido	Distendido	Compacto
	Ramificación Testículos	Solo lóbulos	Con cuerpo y lóbulos	Solo lóbulos
Metacercaria	Patrón papilar acetabular	6 int., 22 ext.	Sin papilas	6 int., 6 med., 22 – 31 ext.

Der= Derecho; **ext**= externas; **int**= internas; **Izq**= Izquierdo; **med**= medias; **Vo**= Ventosa oral

[¥]% Distancia del acetábulo al extremo anterior corporal

* % Ancho Ovario / ancho máximo del cuerpo

[†] % Longitud testículo / longitud total del cuerpo

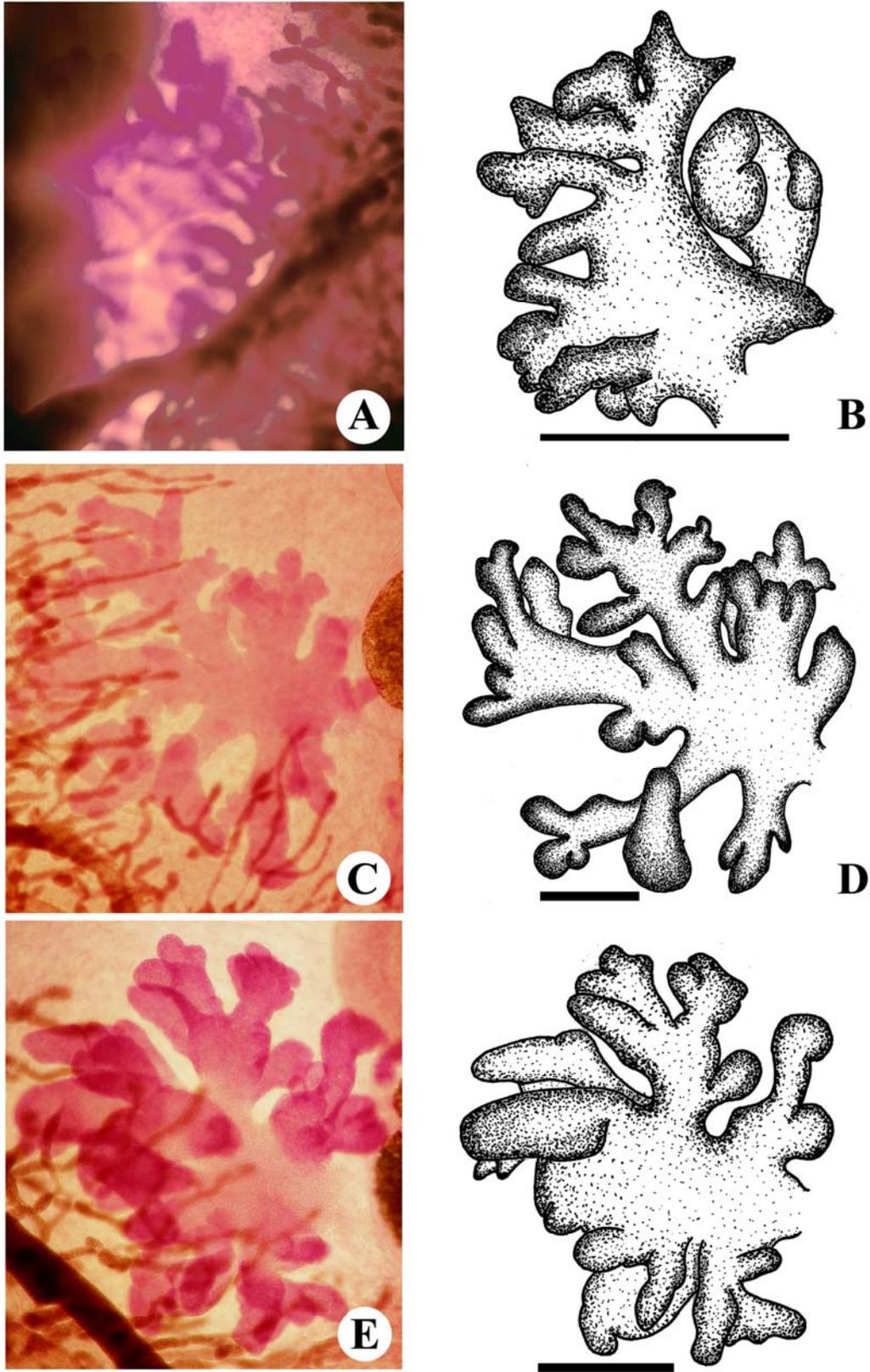


Figura 2. Ovario en los morfotipos observados de *Paragonimus*. **A, B:** Morfotipo 1: Finca Brasil, Chiapas; **C, D:** Morfotipo 2: río Los Amiales, Ojo de Agua y río La Barragana, Colima; **E, F:** Morfotipo 3: Las Cabañas, Veracruz. Escala 0.5 mm.

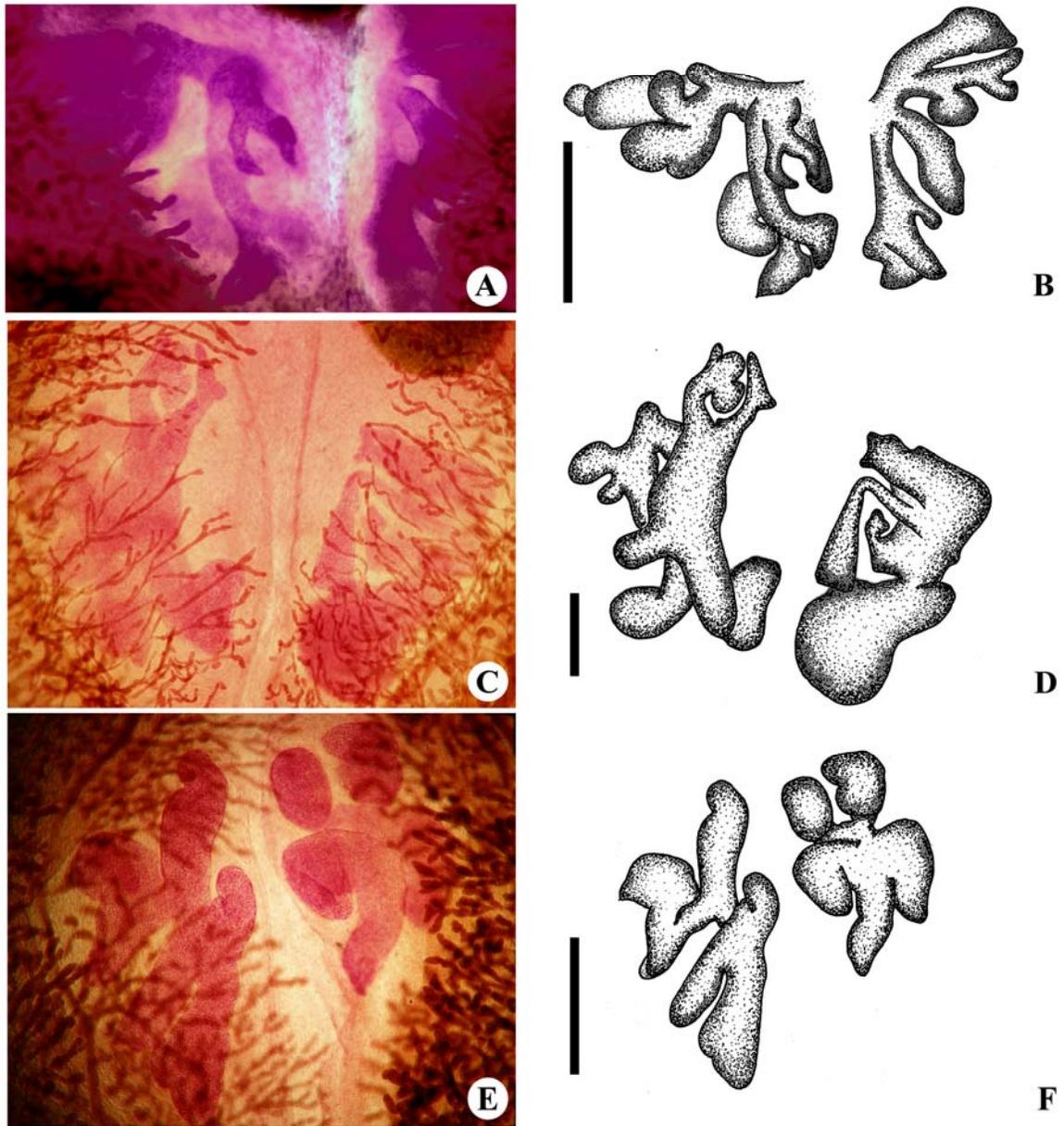


Figura 3. Testículos en los morfotipos observados de *Paragonimus*. **A, B:** Morfotipo 1: Finca Brasil, Chiapas; **C, D:** Morfotipo 2: río Los Amiales, Ojo de Agua y río La Barragana, Colima; **E, F:** Morfotipo 3: Las Cabañas, Veracruz. Escala 1 mm.

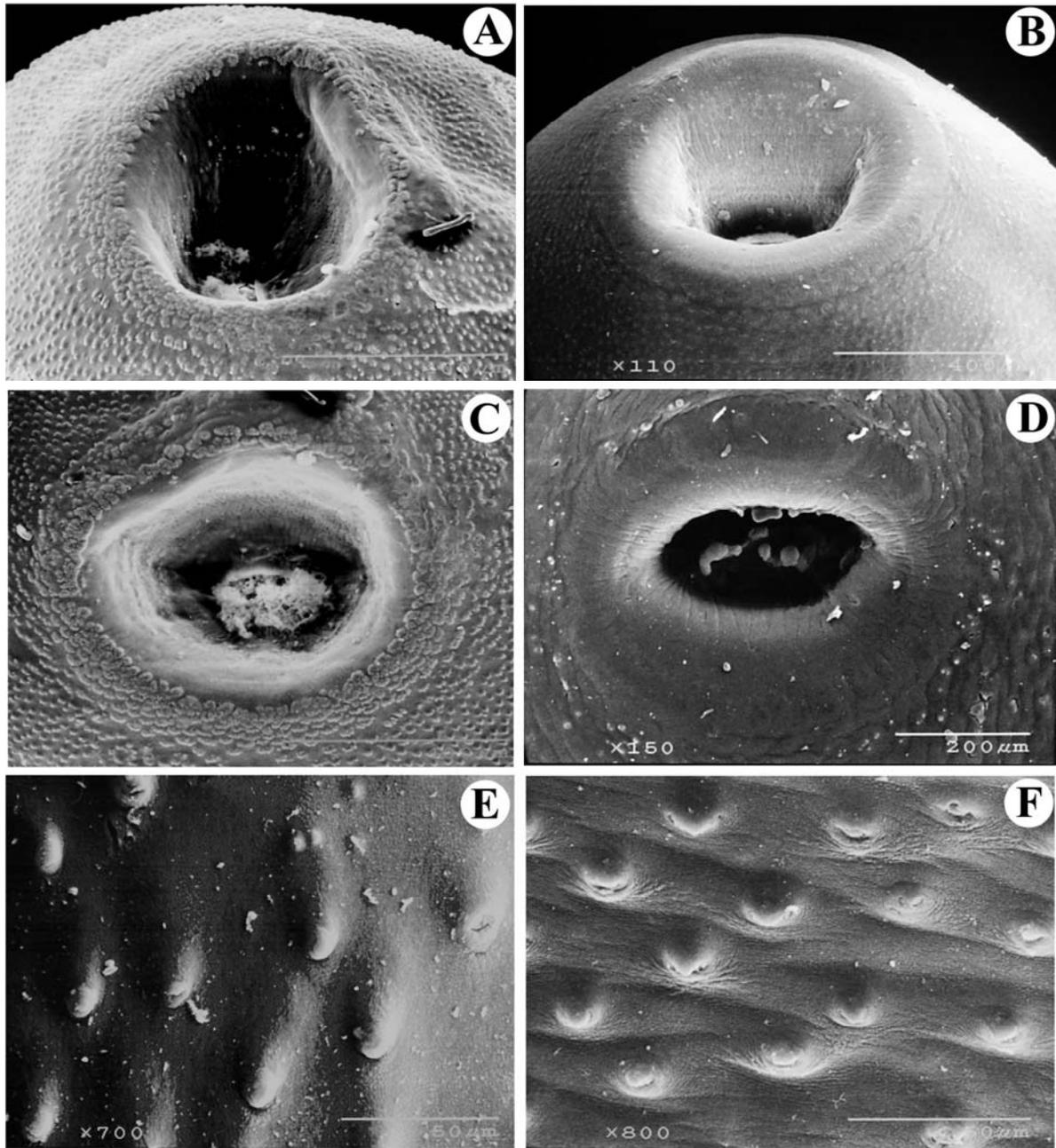


Figura 4. Adultos de *Paragonimus*. **A, C, E:** Finca Brasil, Chipas; **B, D, F:** río Los Amiales, Colima. A y B: ventosa oral; C y D: acetábulo; E y F: espinas tegumentarias en la región media dorsal.

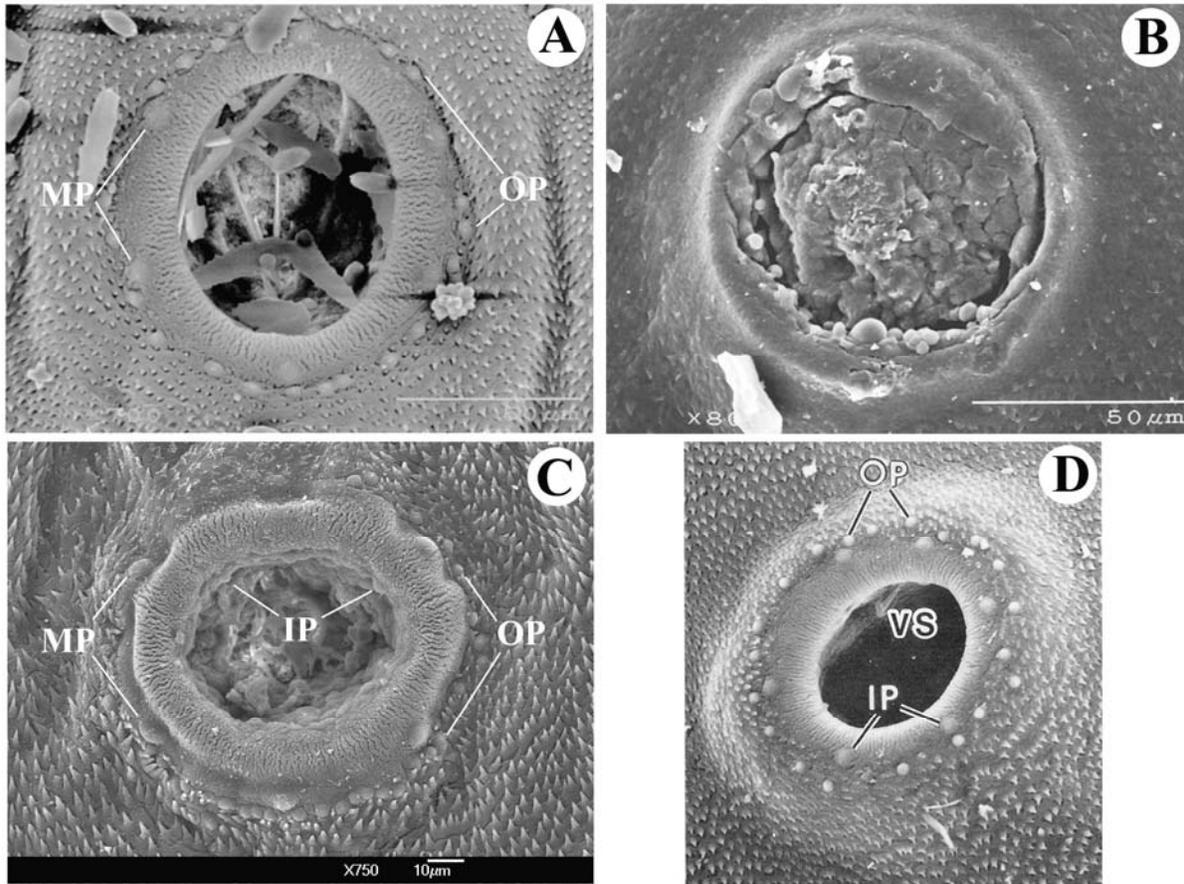


Figura 5. Acetábulo de las metacercarias en los morfotipos observados de *Paragonimus*. **A:** Morfotipo 1: Finca Brasil, Chiapas, 6 papilas internas - 22 papilas externas; **B:** Morfotipo 2: río Los Amiales, Colima, s/papilas; **C:** Morfotipo 3: río Los Pocitos y río Piso, Veracruz, 6 papilas internas - 6 papilas medias - 22 - 31 papilas externas. **D:** Guatemala, 6 papilas internas - 20 papilas externas (Tongu *et al.*, 1995).

Ejemplares de *Paragonimus* incluidos en los análisis moleculares

En los análisis moleculares se incluyeron 32 ejemplares recolectados de los tres Estados muestreados (doce gusanos adultos y cinco metacercarias de Colima; seis ejemplares adultos y cuatro metacercarias de Chiapas; así como cinco metacercarias de Veracruz) (**Tabla 8**).

Análisis filogenético con datos moleculares

ITS2: Del segundo espaciador transcrito interno se obtuvieron 32 secuencias a partir de los gusanos recolectados y destinados a esta técnica (ver **Tablas 3 y 4**). Además, del GenBank se obtuvieron siete secuencias de Guatemala y cinco de Ecuador de *Paragonimus mexicanus*, para incluirse en el análisis como parte del grupo interno (ver **Apéndice 4**).

El alineamiento inicial de las secuencias obtenidas con los primers 3S (forward) y A28 (reverse) de *ITS2*, fue de 454 pares de bases (pb); sin embargo, se eliminaron las regiones correspondientes a la parte inicial del gen 28S (48 pb) y la parte final del gen 5.8S (119 pb) en ambos extremos del alineamiento, debido a que en el trabajo realizado por Iwagami *et al.* (2000), se hace referencia al uso exclusivo de la región correspondiente al *ITS2*. Por consiguiente, la matriz obtenida del alineamiento de estas secuencias está constituida por 45 taxones (incluyendo la del grupo externo) y 285 caracteres (**Apéndice 5**). Con esta matriz se realizó un análisis bajo el algoritmo de parsimonia en el programa de cómputo PAUP* 4.0b1. A partir de una búsqueda heurística (con 100 replicas al azar) se encontraron seis topologías igualmente parsimoniosas (Longitud= 34), cuyos valores fueron los siguientes: Índice de Consistencia CI= 0.94, Índice de Retención RI= 0.97 e Índice de Consistencia Reescalado RC= 0.91, por lo que se construyó un árbol de consenso estricto, en el que se observa una politomía general, incluyendo a todos los individuos de Chiapas, Colima, Veracruz y Guatemala; mientras que las secuencias de los ejemplares de Ecuador se agrupan en un clado (**Figura 6**).

El porcentaje de divergencia entre la secuencia del grupo externo (*P. westermanni*) y las del grupo interno (incluyendo las de *P. mexicanus* del GenBank) es de 10.17-10.5 % (29-31 cambios), mientras que la divergencia entre el grupo interno a nivel intra-poblacional va de 0-0.7% (0-3 cambios); a nivel inter-poblacional no se observó variación entre las poblaciones de Chiapas vs Guatemala, pero entre las poblaciones de Colima vs Chiapas y Colima vs Ecuador la variación fue de 0.7-1.8% (3-8 cambios).

COI: De la citocromo C-oxidasa subunidad I, se obtuvieron 32 secuencias del total de ejemplares destinados a biología molecular. Del mismo modo que para el ITS2, se obtuvieron secuencias de *COI* de *P. mexicanus* del GenBank (ver **Apéndice 4**) y se incluyeron en el análisis como parte del grupo interno.

A partir del alineamiento de las secuencias, se construyó una matriz de 45 terminales por 383 caracteres (incluyendo las del grupo externo) (**Apéndice 6**).

Tabla 8. Ejemplares de *Paragonimus* recolectados en el presente trabajo e incluidos en los análisis moleculares.

N	Localidad	Clave	Obtención de región parcial	
			ITS2	COI
Colima				
1	Los Amiales, Coquimatlán	Coq 1	*	*
2		Coq 2	*	*
3		Coq 3	*	*
4		Coq 4	*	*
5		Coq 5	*	*
6		Coq 6	*	*
7		Coq 7	*	*
8		Coq 8	*	*
9		Coq 9	*	*
10		Coq 10	*	*
11		Coq 11	*	*
Ojo de Agua, Madrid				
12	Ojo de Agua, Madrid	Mad 1	*	*
13		Mad 2 Mc	*	*
14		Mad 3 Mc	*	*
15		Mad 4 Mc	*	*
16		Mad 5 Mc	*	*
17		Mad 6 Mc	*	*
Chiapas				
18	Río Sta. Rita, Finca Brasil, Tapachula	FB 1	*	*
19		FB 2 Mc	*	*
20		FB 3	*	*
21		FB 4	*	*
22		FB 5	*	*
23		FB 6	*	*
24		FB 7	*	*
25		FB 8 Mc	*	*
26		FB 9 Mc	*	*
27		FB 10 Mc	*	*
Veracruz				
28	Río Los Pocitos, Laguna Escondida, Los Tuxtlas	Po 1 Mc	*	*
29		Po 2 Mc	*	*
30		Po 3 Mc	*	*
31	Río Piso, Playa Escondida, Los Tuxtlas	Piso 1 Mc	*	*
32		Piso 2 Mc	*	*

Coq= Río Los Amiales, Coquimatlán; **FB**= Finca Brasil; **Mad**= Ojo de Agua, Madrid; **Mc**= Metacercaria
Pi= Río Piso; **Po**= Río Los Pocitos

Con base en una búsqueda heurística, ejecutando la aplicación “Ratchet” con 1000 replicas al azar, se encontraron dos topologías igualmente parsimoniosas con una longitud de 133 pasos, mostrando los siguientes valores: Índice de Consistencia CI= 0.79, Índice de Retención RI= 0.95 e Índice de Consistencia Reescalado RC= 0.75. En la **Figura 7** se muestra, a modo de filograma, el árbol de consenso estricto de las dos topologías resultantes con la finalidad de representar gráficamente el número de cambios presentes en cada rama. Se pueden reconocer tres clados principales, sustentados con valores de soporte de Bootstrap mayores a 75% e Índice de Bremer entre 2 y 10. Las muestras de Chiapas (Finca Brasil) quedan agrupadas junto con las provenientes de Guatemala, estando este clado más cercanamente relacionado al de las secuencias provenientes de Ecuador. El clado formado por las secuencias de Veracruz (Río Piso y Río Los Pocitos) se situó como grupo hermano del clado formado por (Ecuador (Chiapas-Guatemala)). Mientras que las secuencias de ejemplares de *Paragonimus* de Colima se situaron basalmente en grupos con valores de soporte muy bajos (menores al 65%) resultando una politomía basal. El grado de divergencia obtenido entre la secuencia del grupo externo (*P. westermanni*) y los ejemplares asignados inicialmente como *P. mexicanus* es de 10.06 a 21.41%, presentando la menor diferencia con respecto a las muestras de Guatemala (10.06 a 19.58%) y la mayor con respecto a las de Ecuador (20.89 a 21.41%). Entre las poblaciones de lo que hasta ahora se ha considerado como *P. mexicanus* de las localidades estudiadas, se encontraron los siguientes valores de diferencia genética: Chiapas vs Guatemala del 0 a 1.3%, Chiapas vs Veracruz del 4.44 a 4.96%, Ecuador vs Guatemala del 4.6 a 5.5%, Colima vs Veracruz del 4.7 al 6.79%, Colima vs Chiapas del 6.27 al 7.57% y Colima vs Guatemala del 6.0 al 10.2%. Dentro de las poblaciones, la diferencia vario entre 0 y 1.83%, siendo más conservada entre las secuencias de Veracruz (0–0.26%) y la más divergente entre las de Colima (0–1.83%).

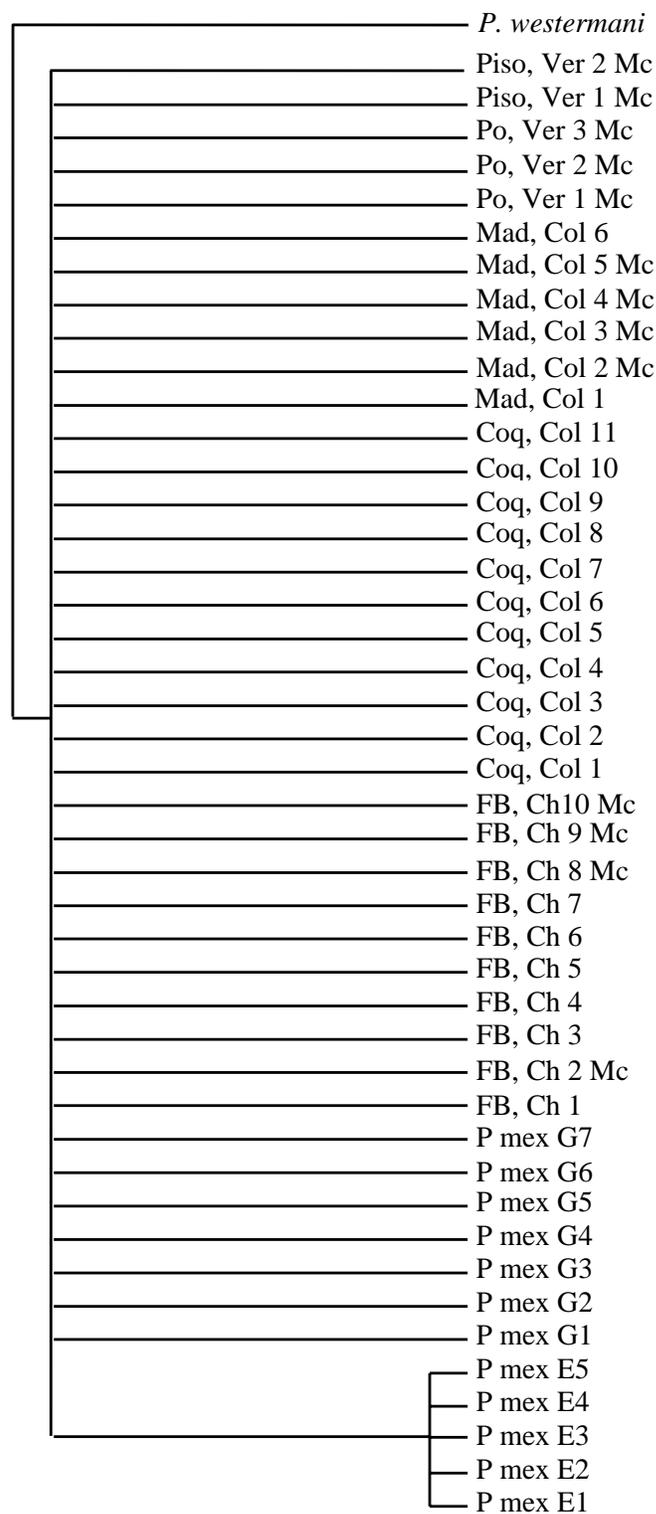


Figura 6. Árbol de consenso estricto de 6 topologías resultantes de una búsqueda heurística con 100 réplicas al azar de la matriz de datos de ITS2. **L**= 34; **CI**= 0.94; **RI**= 0.97 y **RC**= 0.91 **Coq**, **Col**=Coquimatlán, y **Mad, Col**= Madrid, Colima; **FB**= Finca Brasil, Chiapas; **P. mex E**= Ecuador; **P. mex G**= Guatemala; **Piso, Ver**= río “Piso”, Veracruz; **Po, Ver**= río “Los Pocitos”, Veracruz.

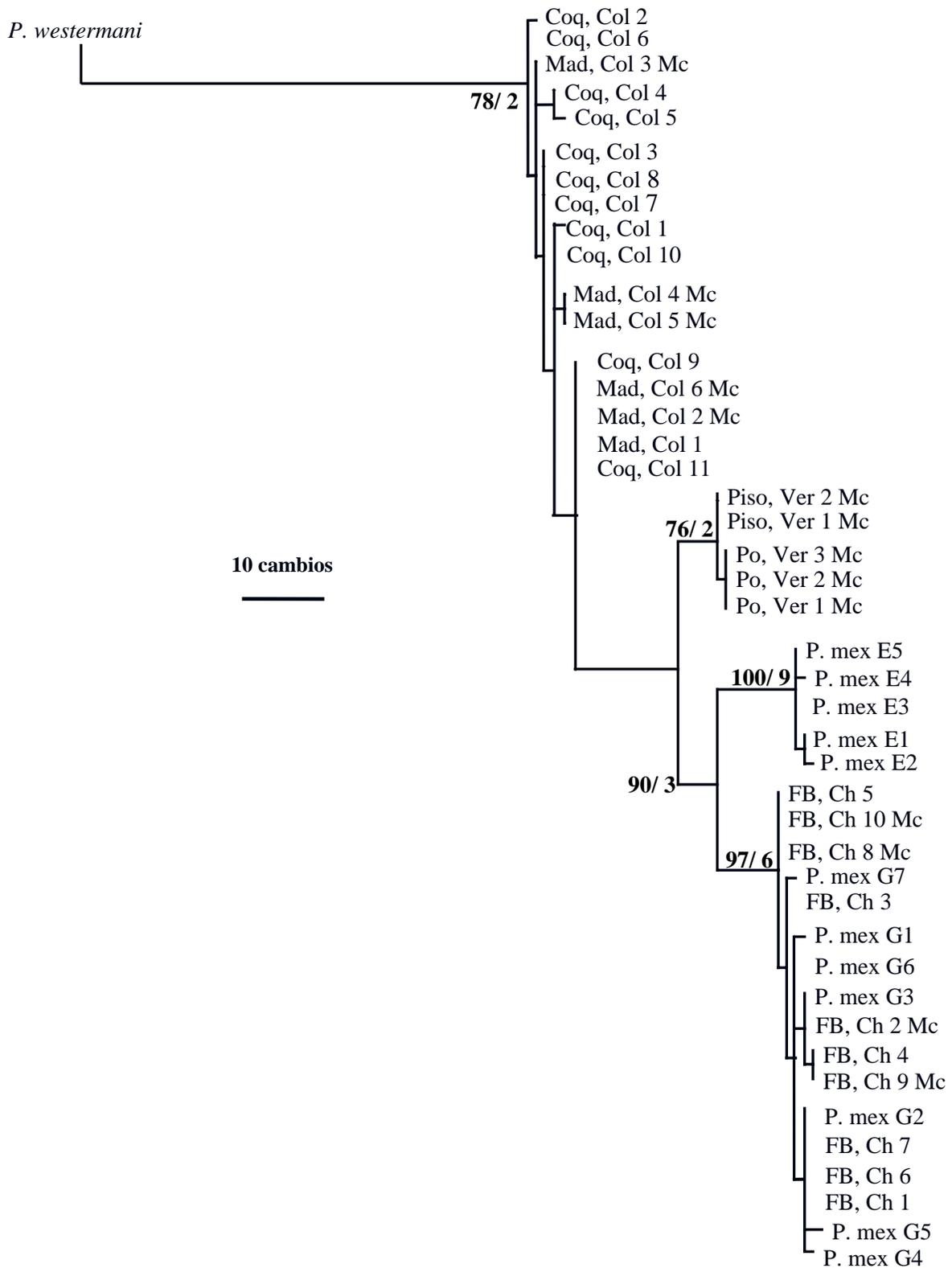


Figura 7. Árbol de consenso estricto de las 2 topologías resultantes de una búsqueda heurística con 1000 réplicas al azar de la matriz de datos de COI. $L= 133$, $CI= 0.79$, $RI= 0.94$ y $RC= 0.69$. Valores de soporte de rama: Bootstrap / Bremer. Abreviaturas, ver figura 6.

DISCUSIÓN

La diferenciación morfológica entre las especies puede ser un tema controversial, sobre todo en aquellos casos en los que la variación morfológica puede confundir la taxonomía de un grupo (León-Règagnon *et al.*, 1999; Stock *et al.*, 2001), o cuando los caracteres morfológicos están tan conservados, que linajes independientes no pueden diferenciarse (Chilton *et al.*, 1995; Verneau *et al.*, 1997). En estos casos, las secuencias de DNA proveen una fuente independiente de información tanto para diferenciar linajes, como para evaluar caracteres morfológicos que han sido utilizados tradicionalmente en la determinación taxonómica de los grupos (Nadler, 2002). Por ello, la caracterización molecular se ha convertido en una práctica común para distinguir entre especies o poblaciones de organismos morfológicamente similares, y más recientemente, para la identificación de especies y variedades (objetivo inicial del proyecto Barcode of Life, www.dnabarcodes.org). Los estudios filogenéticos representan uno de los principales usos de la información genética generada (Morgan & Blair, 1998; Hwang & Kim, 1999; León-Règagnon *et al.*, 1999; Sorensen *et al.*, 1999; Blair, 2000; Iwagami *et al.*, 2000; Le *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2001).

Aún cuando los datos moleculares son la base para la formulación de la hipótesis filogenética que se propone en el presente estudio, es necesario conciliar este tipo de información con las características morfológicas de los taxones estudiados y con ello el tratar de identificar sus características diagnósticas. Para los digéneos se han utilizado una variedad de marcadores moleculares para tratar de esclarecer preguntas a diferentes niveles taxonómicos, siendo más empleados los genes ribosomales o nucleares para resolver problemas a niveles supraespecíficos, y los genes mitocondriales para evidenciar relaciones a nivel específico o por debajo de este nivel.

Recientemente se han realizado estudios sobre filogenia y/o variación intraespecífica en especies de *Paragonimus* usando DNA ribosomal nuclear (ITS2) y DNA mitocondrial (COI) (Blair *et al.*, 1997a; Blair *et al.*, 1997b; Iwagami *et al.*, 2000; Iwagami *et al.*, 2003; Blair *et al.*, 2005). Se ha visto que los genes ribosomales proveen información para distinguir entre especies (Luton *et al.*, 1992; Bowles *et al.*, 1995; Morgan & Blair, 1998;) o para distinguir taxones a niveles supraespecíficos (Grechko, 2002), pero debido a que son genes conservados, no proporcionan información para evidenciar estructuras genéticas por debajo del nivel de especie. El marcador nuclear ITS2 fue empleado inicialmente dentro de la familia Paragonimidae para validar la identidad de los géneros *Paragonimus*, *Euparagonimus* y *Pagumogonimus*, proporcionando suficiente información para sinonimizar los dos últimos con el primero (Blair *et al.*, 1999a). Dentro de *Paragonimus*, Iwagami *et al.* (2000) distinguieron variación geográfica en las secuencias de ITS2 de aislados de *P. westermani* de Asia, consistente con el hecho de que *P. westermani* es un complejo de especies crípticas. Sin embargo, cuando este marcador se ha empleado en estudios de poblaciones cercanas de una misma especie, la variación intraespecífica es mínima o no existe (Morgan & Blair, 1995; Despres *et al.*, 1993; Hashimoto *et al.*, 1997). Esta condición se observa también en los resultados del análisis de este marcador en el presente estudio, ya que no se encontró una variación marcada entre las secuencias de los individuos de las poblaciones de los tres Estados muestreados, dando como resultado una politomía total. Por el contrario, se ha demostrado que las secuencias de COI son muy valiosas para rescatar relaciones a niveles poblacionales dentro de una misma especie y entre grupos de especies (Awise, 1994; Boore, 1999; Blair, 2000). Tal es el caso de *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni* y *P. westermani* (Garey & Wolstenholme, 1989), por lo que el gen COI ha sido considerado como un marcador potencial para estudiar especiación (Bowles *et al.*, 1993). Dentro de este trabajo, fue con este marcador con el que se obtuvo una mayor resolución.

De acuerdo con la información proporcionada por las secuencias del COI, en el presente estudio las muestras se agruparon en clados que corresponden con su distribución geográfica. Con respecto a la variación intrapoblacional, se obtuvieron valores bajos en las secuencias analizadas. Aquellas de las localidades más cercanas geográficamente, Chiapas y Guatemala, que se agruparon en un mismo clado, presentaron valores de 0.8 y 0.3–1.3%, respectivamente. Estos valores son semejantes a los encontrados en estudios de poblaciones de otros digéneos como *Haematoloechus floedae* con 0.28% y *Oligogonotylus mayae*, que varía entre 0.28% y 0.84% (León-Règagnon *et al.*, 2005; Razo-Mendívil *et al.*, 2008), y menores a los valores que se han encontrado en *Paragonimus westermani* del noreste de Asia que va de 0.26–1.82% y *Glypthelmins californiensis* que presenta hasta 1.56%, (Blair *et al.*, 1997a; Iwagami *et al.*, 2000; Razo-Mendívil *et al.*, 2004). De esta misma manera se comportan las poblaciones de Veracruz y Ecuador, que presentaron valores de diferencia genética de 0–0.24% y 0.3–0.8%, respectivamente. En cuanto a las muestras de las dos localidades de Colima (Río Los Amiales, Coquimatlán y Ojo de Agua, Madrid), donde se obtuvieron los valores más altos, su variación genética osciló entre 0–1.83%, semejante al valor máximo obtenido para *P. westermani*. Estas últimas muestras se estructuraron en una politomia basal, por lo que consideramos que es necesario incluir en un futuro más información para esclarecer esta situación.

En estudios moleculares entre especies de digéneos usando regiones del COI, se han evidenciado valores de variación interespecífica que van de 6.1–12.2% en *Haematoloechus*, de 9.55 a 10.39% en *Oligogonotylus* y de 15.92 a 18.53% entre especies de *Glypthelmins* (Razo-Mendívil *et al.*, 2004; León-Règagnon *et al.*, 2005; Razo-Mendívil *et al.*, 2008). En el presente estudio los valores interpoblacionales más bajos se obtuvieron entre las secuencias de los ejemplares de Chiapas y Guatemala (0–1.3%), y la diferencia genética de estas dos poblaciones con respecto a las de Veracruz y Ecuador, fue de 4.44 a 5.2% y 4.6 a 5.5%, respectivamente, lo

que concuerda con su posición en el cladograma obtenido (**Figura 7**). Considerando los valores de diferencia genética entre especies de los otros géneros antes citados, así como la evidencia molecular y morfológica obtenida en el presente estudio, suponemos que el clado Chiapas-Guatemala corresponde a un mismo taxón; y que los clados independientes formados por las secuencias de Veracruz y Ecuador, son linajes en proceso de especiación. Esta idea está basada en sus valores de diferencia genética, ya que son menores a los establecidos entre especies de digéneos para este marcador, pero también son altos para aquellos valores observados dentro de lo que se considera como una misma especie (Iwagami *et al.*, 2000; Razo-Mendivil *et al.*, 2004; León-Règagnon *et al.*, 2005; Razo-Mendivil *et al.*, 2008). Asimismo, las secuencias de los ejemplares de las tres zonas de Colima muestran una mayor diferencia genética con respecto a las secuencias restantes del grupo interno (6.0–10.2%). Al comparar estos valores con los que se han obtenido en los estudios antes citados, nos indican que aunque no son tan altos como los obtenidos para *Glythelmins*, si se encuentran dentro de la variación registrada para *Haematoloechus* y *Oligogonotylus*; por lo que en este caso, y de acuerdo a las características morfológicas observadas tanto en los adultos como en las metacercarias, aseveramos que se trata de un taxón diferente. Cabe señalar que Miyazaki e Ishii (1968a) describieron a *P. mexicanus* solo con base en características de ejemplares adultos recolectados en pulmones de *Didelphis marsupialis*. En su descripción citan medidas del ejemplar tipo y de cuatro paratipos, así como la forma, grado de lobulación y dimensiones del ovario y de los testículos; datos que al ser comparados con los que obtuvimos de los ejemplares de Colima, muestran gran similitud con los observados en el morfotipo 2, identificado en este Estado. Es por ello que consideramos que las dos poblaciones muestreadas de Colima, pretencen efectivamente a la especie *P. mexicanus*.

Nuestros resultados moleculares se ven respaldados con las características morfológicas observadas en los individuos de las poblaciones estudiadas (ver **Tabla 7** y **Figura 8**). En este

contexto, cabe señalar que aunque se habían realizado estudios sobre la morfología de la metacercaria de *P. mexicanus* (Lamothe-Argumedo *et al.*, 1977 y 1979; Lamothe-Argumedo, 1989) no se había evidenciado con la ayuda de microscopía electrónica de barrido, el patrón papilar que éstas muestran sobre la superficie del acetábulo en ejemplares de México. Su presencia o ausencia, así como la conformación del patrón papilar, ayudó a diferenciar los morfotipos anteriormente señalados. Hasta la fecha, el único estudio que abordaba este aspecto era el realizado por Tongu *et al.* (1995). Estos autores describieron características de la superficie del tegumento de metacercarias de *P. mexicanus* de Guatemala. Comparando los resultados de su estudio con los nuestros, no se encontró diferencia alguna en lo que respecta a la forma y distribución de las espinas; sin embargo, al comparar la superficie del acetábulo, se distinguió que el patrón papilar citado por Tongu *et al.* (1995) (6 papilas formando un anillo interno y 20 - 30 papilas en un anillo externo), este patrón está presente también en la metacercaria de Chiapas (6 papilas en el anillo interno y 22 papilas en el anillo externo). Dada esta información y su anidación en un solo clado en el árbol obtenido con caracteres moleculares (**Figura 7**), suponemos que ese taxón se distribuye en Chiapas y Guatemala. Para confirmar esta hipótesis es necesario consultar u obtener material de estas localidades; de ambas se requiere material de gusanos adultos para constatar principalmente las características de los órganos reproductores, además de otras características (ver **Tabla 7**); asimismo, es necesario obtener más metacercarias de Chiapas para su estudio en MEB y con ello, observar si existe variación en el número de papilas presentes en la superficie del acetábulo, pues en este trabajo solo se pudo observar un ejemplar en este estadio de desarrollo. En cuanto a las metacercarias de Veracruz, observamos que presentan un patrón papilar semejante al que muestran las metacercarias de Chiapas y Guatemala, esto en cuanto a las papilas que conforman los dos anillos señalados por Tongu *et al.* (1995), como papilas internas y papilas externas y que en el presente estudio las denominamos como papilas medias y papilas externas, respectivamente. Adicionalmente, observamos en el

material de Veracruz la presencia de seis papilas conformando un tercer anillo situado en la superficie interna del acetábulo. No consideramos que esta característica sea única en las metacercarias de las localidades muestreadas de Veracruz, sino que pudieron observarse gracias al grado de contracción de esta estructura, lo que muy probablemente no sucedió en el material observado de Chiapas y Guatemala. Debido a esto, reiteramos la inclusión de más metacercarias de estas dos últimas localidades así como de Veracruz. De las localidades de Colima, solo se observó una metacercaria, la cual carece de patrón papilar; sin embargo, creemos pertinente analizar más material para ratificar su ausencia. De igual manera, debido a la presencia de mucus en la superficie de la ventosa oral, no se pudo apreciar algún patrón papilar sobre esta estructura; por lo que también sería importante incluir nuevo material en estudios futuros.

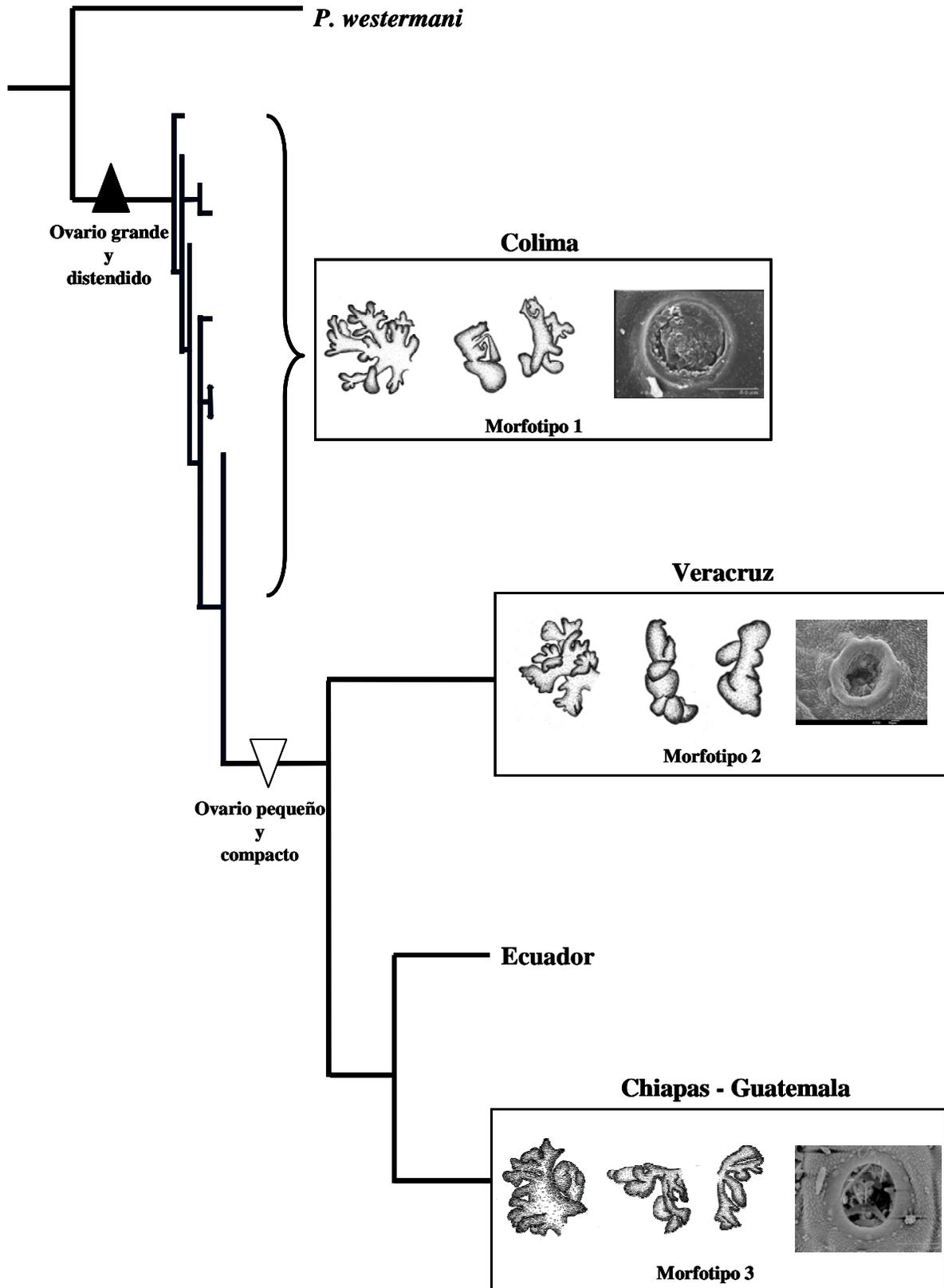


Figura 8. Cladograma resumido del árbol de consenso estricto obtenido con el marcador COI, mostrando las características principales por las cuales fueron reconocidos los 3 morfotipos (Tabla 7).

En cuanto a la coloración distintiva entre las metacercarias de las poblaciones de los tres Estados muestreados, Iwagami *et al.* (2003) en un estudio independiente, mencionan que esto podría ser un efecto local de la relación hospedero-parásito, por lo que hasta ahora no se considera una característica distintiva. Sin embargo, para poder aseverar o descartar que se trata de un efecto producido por la relación local de este parásito con su hospedero es necesario el realizar estudios más específicos a este nivel.

CONCLUSIONES

- ✓ Se amplió a 20 el número de registros para *Paragonimus* en México al adicionarse tres nuevas localidades, estas son: río Los Amiales, en Coquimatlán, Colima, y río Los Pocitos y río Piso en el Estado de Veracruz.
- ✓ Se comprobó la presencia actual de *Paragonimus* en dos localidades previamente registradas: Finca Brasil, Tapachula, Chiapas y Ojo de Agua, Madrid, Colima.
- ✓ Se corroboró que la especie de cangrejo *Raddaus tuberculatus* actúa como hospedero intermediario en Finca Brasil, Chiapas. Además, se establecen como registros nuevos a *Pseudothelphusa aff. seiferti* y *Tehuana poglayenorum* de Río Los Amiales, Coquimatlán, Colima y de Río Piso y Río Los Pocitos, Veracruz, respectivamente.
- ✓ La determinación de los cangrejos que se encontraron infectados con metacercarias de este parásito nos conllevan a proponer que se actualicen los registros de los hospederos intermediarios de acuerdo a su nomenclatura actual.
- ✓ Las diferencias genéticas encontradas entre cada población analizada que además coinciden con cada uno de los tres morfotipos identificados y su distribución geográfica, nos llevan a concluir que éstas se han diferenciado a un nivel tal, que bien podrían considerarse como especies diferentes. Sin embargo, es necesario evaluar otro tipo de información (ya sea utilizando otro gen u otras características de otras fases de desarrollo) para poder confirmar esta hipótesis.

- ✓ Considerando la información citada en la descripción original de *P. mexicanus*, además de la información molecular analizada en el presente estudio, se determina que las poblaciones muestreadas de Colima corresponden a esta especie *sensu stricto*. Por el contrario, las poblaciones de Veracruz y Ecuador por un lado y las de Chiapas junto con Guatemala por otro lado, pertenecen a tres taxones en proceso de diferenciación con respecto las unas de las otras y a su vez a las de Colima.

- ✓ Es necesario incluir más individuos para dar mayor resolución al cladograma; y/o la inclusión de más caracteres moleculares tanto para resolver como para robustecer nuestra hipótesis.

LITERATURA CITADA

- Agatsuma, T., Iwagami, M., Sato, Y., Iwashita J., Hong, S. J., Kang, S. Y., Ho, L. Y., Su, K. E., Kawashima, K. & Abe, T. 2003. The origin of the triploid in *Paragonimus westermani* on the basis of variable regions in the mitochondrial DNA. *Journal of Helminthology* **77**, 279-288.
- Agatsuma, T., Yang L., Kim, D. & Yonekawa, H. 1994. Mitochondrial DNA differentiation of Japanese diploid and triploid *Paragonimus westermani*. *Journal of Helminthology* **68**, 7-11.
- Alarcón, B., Abreu, G. & Noya, O. 1985a. Pathological and parasitological aspects of the first autoctonous case of human Paragonimiasis in Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **34**, 761-765.
- Alarcón, B., Noya, O., Torres H. & Botto A. 1985b. Field study of paragonimiasis in Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **34**, 766-769.
- Avise, J. C. 1994. Molecular markers. Natural history and evolution. Chapman y Hall, New York. 511 p.
- Blair, D. 2000. Genomes of *Paragonimus westermani* and related species: current state of knowledge. *International Journal for Parasitology* **30**, 421-426.
- Blair, D., Agatsuma T., Watanobe T., Okamoto M. & Ito A. 1997a. Geographical genetic structure within the human lung fluke, *Paragonimus westermani*, detected from DNA sequences. *Parasitology* **115**, 411-417.
- Blair, D., Watanobe T. & Agatsuma T. 1997b. Molecular evidence for the synonymy of three species of *Paragonimus*, *P. ohirai* Miyazaki, 1939, *P. iloktsuenensis* Cheng, 1940 and *P. sadoensis* Miyazaki *et al.*, 1968. *Journal of Helminthology* **71**, 305-310.

- Blair, D., Wu, B., Chang, Z. S., Gong, X., Agatsuma, T., Zhang, Y. N., Chen, S. H., Lin, J. X., Chen, M. G., Waikagul, J., Guevara, A. G., Feng, Z. & Davis, G. 1999a. A molecular perspective on the genera *Paragonimus* Braun, *Euparagonimus* Chen and *Pagumogonimus* Chen. *Journal of Helminthology* **73**, 295-299.
- Blair, D., Xu, Z. B. & Agatsuma, T. 1999b. Paragonimiasis and the genus *Paragonimus*. *Advances in Parasitology* **42**, 113-222.
- Blair, D., Zhengshan, C., Minggang, C., Bo W., Agatsuma, T., Iwagami, M., Corlis, D., Chengbin, F. & Ximei, Z. 2005. *Paragonimus skrjabini* Chen, 1959 (Digenea: Paragonimidae) and related species in eastern Asia: a combined molecular and morphological approach to identification and taxonomy. *Systematic Parasitology* **60**, 1-21.
- Boore, J. L., 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* **27**, 1767–1780.
- Bowles, J., Blair, D. & McManus, D. P. 1995. A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **4**, 103-109.
- Bowles, J., Hope, M., Tiu, W., Liu, X. & McManus, D. P. 1993. Nuclear and mitochondrial genetic markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. *Acta Tropica* **55**, 217-229.
- Brenes, R. & Rojas, G. 1975. *Aroapyrgus costarisensis*, hydrobiid snail host of paragonimiasis in Costa Rica. *Journal of Parasitology* **2**: 355-359.
- Calvopiña, M., Paredes, W., Guderian, R. & Poltera, A. 1991. Eficacia del tricabendazole en paragonimiasis pulmonar humana refractaria a la emetina, bithionol y praziquantel. *Parasitología del día* **17**, 44-46.
- Cañeda-Guzmán, C. I. 1997. Parásitos de tres especies de marsupiales de la estación “Los Tuxtles” y algunas zonas cercanas, Veracruz, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 193 pp.

- Cha, S. H., Chang, K. H., Cho, S. Y., Han, M. H., Kong, Y., Suh, D. C., Choi, C. G., Kang, H. K. & Kim, M. S. 1994. Cerebral paragonimiasis in early active stage: CT and MR features. *American Journal of Roentgenology* **162**, 141-145.
- Chilton, N. B., Gasser, R. B. & Beveridge, I. 1995. Differences in a ribosomal DNA sequence of morphologically indistinguishable species within the *Hypodontus macropi* complex (Nematoda: Strongyloidea). *International Journal for Parasitology* **25**, 647-651.
- Churg, C. 1971. Human paragonimiasis. Pathology of protozoal and helminthic diseases with clinical correlation. Williams and Wilkins, Baltimore. 504 pag.
- Cornejo, W., Huiza, A., Espinoza, Y., Alva, P., Sevilla, C. & Centurion, W. 2000. Paragonimosis in the Cajabamba and Condebamba Districts, Cajamarca, Peru. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **42**: 245-247.
- Despres, L., Imbert-Establet, D. & Monnerot, M. 1993. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. *Molecular and Biochemical Parasitology* **60**, 221-230.
- Garey, J. R. & Wolstenholme, D. R. 1989. Platyhelminth mitochondrial DNA: evidence for early evolutionary origin of a tRNA^{ser} AGN that contains a dihydrouridine-arm replacement loop and of serine-specifying AGA and AGG codons. *Journal Molecular and Evolution* **28**, 374-387.
- Grenchko, V. V. 2002. Molecular DNA markers in phylogeny and systematics. *Russian Journal of Genetics* **38**, 1013-1033.
- Hahn, S. T., Park, S. H., Kim, C. Y. & Shinn, K. S. 1991. Adrenal paragonimiasis simulating adrenal tumor: a case report. *Journal of Korean Medical Science* **11**, 275-277.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. **41**, 95-98.

- Hashimoto, K., Watanobe, T., Liu, C. X., Init, I., Blair, D., Ohnishi, T. & Agatsuma, T. 1997. Mitochondrial DNA and nuclear DNA indicate that the Japanese *Fasciola* species is *F. gigantica*. *Parasitology Research* **83**, 220-225.
- Health Care Agency, 2006. <http://www.ochealthinfo.com/epi/paragonimus.htm>
- Herwerden, L., Blair, D. & Agatsuma, T. 1999. Intra- and interindividual variation in ITS1 of *Paragonimus westermani* (Trematoda: Digenea) and related species: implications for phylogeneric studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **12**, 67-73.
- Hillis, D. M., Mable, B. K. & Moritz, C. 1996. Nucleic acids IV: Sequencing and cloning. En: Molecular Systematics, D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable (eds.) Sinauer, Sunderland, Massachusetts. pag. 321-383.
- Hu, X., Feng, R., Zheng, Z., Liang, J., Wang, H. & Lu, J. 1982. Hepatic damage in experimental and clinical paragonimiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **31**, 1148-1155.
- Hwang, U. W. & Kim, W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology* **37**, 215-228.
- Ibáñez, J. C. 1992. Experimental paragonimiasis: theurapeutical tests with praziquantel-first report. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **87**, (Suppl. I): 107.
- Indrawati, I., Chaicumpa, W., Setasuban, P. & Ruangkunaporn, Y. 1991. Studies on immunodiagnosis of human paragonimiasis and specific antigen of *Paragonimus heterotremus*. *International Journal for Parasitology* **21**, 395-401.
- Ito, J., Yokogawa, M., Lamothe, R. & Hata, H. 1985. Studies on the cercariae of *Paragonimus mexicanus* in *Aroapyrgus alleei* from Colima, Mexico, with special reference to its morphology (Trematoda: Troglotrematidae) *Japanese Journal of Parasitology* **34**, 71-77.

- Iwagami, M., Ho, L. Y., Su, K., Lai, P. F., Fukushima, M., Nakano, M., Blair, D., Kawashima, K. & Agatsuma, T. 2000. Molecular phylogeographic studies on *Paragonimus westermani* in Asia. *Journal of Helminthology* **74**, 315-322.
- Iwagami, M., Monroy, C., Rosas, M. A., Pinto, M. R., Guevara, A. G., Vieira, J. C., Agatsuma, Y. & Agatsuma, T. 2003. A molecular phylogeographic study based on DNA sequences from individual metacercariae of *Paragonimus mexicanus* from Guatemala and Ecuador. *Journal of Helminthology* **77**, 33-38.
- Jeong, M. K., Yu, J. S., Kim, K. W., Kim, J. K., Kim, S. J., Kim, H. J. & Choi, Y. D. 1999. Retroperitoneal paragonimiasis: a case of ectopic paragonimiasis presenting as periureteral masses. *Journal of Computation Assistant Tomography* **23**, 696-698.
- Karam, B. J. & Bernal, R. M. 1987. Paragonimiasis pulmonar. Informe de dos casos en niños. *Boletín de Medicina del Hospital Infantil de México* **44**, 690-695.
- Kim, D. M., Chung, J. P., Park, W. I., Park, Y. N., Park, S. W., Lee, S. J., Song, S. Y., Lee, K. S., Chung, J. B., Lee, S. I., Kang, J. K., Kim, K. W. & Chi, H. S. 2002. A case of hepatic paragonimiasis combined with intrahepatic bile duct stones. *Korean Journal of Gastroenterology* **39**, 133-136.
- Kim, S. L., Kim, S. E., Lee, K. S., Cho, J. G., Jang, M. Y. & Kim, J. M. 1991. A case of liver paragonimiasis. *Korean Journal of Internal Medicine* **41**, 140-145.
- Kim, M. J., Park, S. M., Kim, N. K., Kim, M. J., Chung, J. J. & Outwater, E. K. 1999. Perirectal cystic paragonimiasis: endorectal coil MRI. *Journal of Computation Assistant Tomography* **23**, 94-95.
- Kim, E. A., Seon-Kwan J., Kim H. W., Lee Y. W., Cho H. J. & Won J. J. 2004. Imaging findings of hepatic paragonimiasis: a case report. *Journal of Korean Medical Science* **19**, 759-762.

- Lamothe-Argumedo, R. 1981. Hospederos definitivos e intermediarios de *Paragonimus mexicanus* Miyazaki e Ishii, 1968, en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* **52**, 39-44.
- Lamothe-Argumedo, R. 1984. Nuevos datos sobre la distribución geográfica de *Paragonimus mexicanus*, y tres nuevos hospederos intermediarios en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* **1**, 85-89.
- Lamothe-Argumedo, R. 1985. La paragonimiasis en el Continente Americano. *Salud Pública de México* **27**, 514-523.
- Lamothe-Argumedo, R. 1986. La paragonimiasis pulmonar humana en México. *Salud Pública de México*. **28**, (1):37- 40.
- Lamothe-Argumedo, R. 1989. *Paragonimus mexicanus* y paragonimiasis en México y América. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 133 pp.
- Lamothe-Argumedo, R. 1997. Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos de animales silvestres. AGT Editor, México, 43 pp.
- Lamothe-Argumedo, R., Alonso, J. L. & López, R. 1986. Una nueva zona endémica de paragonimiasis en México. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México* **57**, 415-418.
- Lamothe-Argumedo, R., Caballero, J. & Lázaro, Ch. 1977. *Pseudothelphusa (P.) dilatata* Rathbun (Crustacea: Decapada). Segundo hospedero intermediario de *Paragonimus mexicanus* (Trematoda). *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México* **48**, Serie de Zoología, 295-298.
- Lamothe-Argumedo, R., Caballero, J. & Lázaro, Ch. 1978. Paragonimiasis experimental en gatos (*Felis catus* L.) con *Paragonimus mexicanus* Miyazaki e Ishii, 1968. *Neumología y Cirugía del Torax de México* **39**, 71-80.

- Lamothe-Argumedo, R., Caballero, J. & Lázaro, Ch. 1979. Descripción de la metacercarias de *Paragonimus mexicanus* Miyazaki e Ishii, 1968. (Trematoda: Troglotrematidae). *Neumología y Cirugía del Torax de México* **40**, 179-187.
- Lamothe-Argumedo, R., Caballero, J., Pineda, R. & Meave, O. 1985. Hallazgo de *Paragonimus mexicanus* en nuevo hospedero y una localidad en México. *Universidad y Ciencia* **2**, 41-45.
- Lamothe-Argumedo, R. & García-Prieto, L. 1988. HelminCIAS del hombre en México. Tratamiento y profilaxis. AGT Editor, S. A., D. F., México: 139 pp.
- Lamothe-Argumedo, R. & Jaimes-Cruz, B. 1993. Nota sobre un hospedero nuevo y una localidad nueva de *Paragonimus mexicanus* en México. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Serie de Zoología* **66**, 171-172.
- Lamothe-Argumedo, R., Malek, E. & Meave, O. 1983. *Aroapyrgus allei* Morrison, 1946 (Gastropoda: Hydrobiidae) first intermediate host of *Paragonimus mexicanus* in Colima, Mexico. *Journal of Parasitology*, 226-228.
- Lamothe-Argumedo, R., Pineda & Meave, O. 1981. Infección natural de *Paragonimus mexicanus* en *Didelphis virginiana californica* en Colima, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* **52**, 45-50.
- Le, T. H., Blair, D & McManus, D. P. 2000. Mitochondrial DNA sequences of human schistosomes: the current status. *International Journal for Parasitology* **30**, 283-290.
- Lee, J. S., Jung, T. J., Cho, S. Y., Huh, S. C., Chun, H. I. & Um, S. J. 1985. A case of liver paragonimiasis. *Korean Journal of Internal Medicine* **29**, 294-297.
- León-Règagnon, V., Brooks, D. & Pérez-Ponce de León, G. 1999. Differentiation of Mexican species of *Haematoloechus* Looss, 1899 (Digenea: Plagiorchiformes): Molecular and morphological evidence. *Journal of Parasitology* **85**, 935-946.

- León-Règagnon, V., Guillen-Hernández, S. & Arizmendi-Espinosa, M. A. 2005. Intraespecific variation of *Haematoloechus floedae* Harwood, 1932 (Digenea: Plagiorchiidae), from *Rana* spp. in North and Central America. *Journal of Parasitology* **91**, 915-921.
- Lo, C. M., Morgan, J. A. T., Galzin, R. & Cribb, T. H. 2001. Identical digeneans reef fishes from French Polynesia and the Great Barrier Reef (Australia) demonstrated by morphology and molecules. *International Journal for Parasitology* **31**, 1573-1578.
- Luton, K., Walker, D. & Blair, D. 1992. Comparison of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminths: Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology* **56**, 323-328.
- Malek, E. 1975. Snails hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: A manual. O.P.S., Washington, D.C., 336.
- Maleewong, W., Pariyanonda, S., Wongkham, C., Intapan, P. & Morakote, N. 1990. Comparison of adult somatic and excretory-secretory antigens in enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human infection with *Paragonimus heterotremus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **84**, 840-841.
- Maleewong, W., Wongkham, C., Intapan, P., Pariyanonda, S. & Morakote, N. 1992. Excretory-secretory antigenic components of *Paragonimus heterotremus* recognized by infected human sera. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 2077-2079.
- Martínez-Báez, M. & Jiménez-Galán, A. 1961. Un caso de trematodiasis pulmonar registrado en México. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de México*. **21**, 101-144.
- Miyazaki, I. 1982. Paragonimiasis. In CRC Handbook Series in Zoonoses. Section C: Parasitic Zoonoses. Vol. III. G. V. Hillyer and C. E. Hopla (eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, U.S.A: 143-164 pp.

- Miyazaki, I., Ibañez, N. & Miranda H. 1969. On a new lung fluke found in Perú, *Paragonimus peruvianus* n. sp. (Trematoda: Troglotrematidae). *Japanese Journal of Parasitology* **18**, 123-130.
- Miyazaki, I., Ibañez, N. & Miranda H. 1971. Studies on the Metacercaria of *Paragonimus peruvianus*. (Trematoda: Troglotrematidae). *Japanese Journal of Parasitology* **5**, 425-430.
- Miyazaki, I. & Ishii, Y. 1968a. Studies on the Mexican lung flukes, with special reference to a description of *Paragonimus mexicanus* sp. nov. (Trematoda: Troglotrematidae). *Japanese Journal of Parasitology* **17**, 445-453.
- Miyazaki, I. & Ishii, Y. 1968b. Comparative study of the Mexican lung flukes with *Paragonimus kellicotti* Ward, 1908. *Journal of Parasitology* **54**, 845-846.
- Miyazaki, I., Kifune T. & Lamothe-Argumedo R. 1980. Taxonomical and biological studies on the lung flukes of Central America. (Occasional Publication No. 2). Department of Parasitology, School of Medicine, Fukuoka University, Japón 1-80.
- Monet-Mendoza, A., Osorio-Sarabia, D. & García-Prieto, L. 2005. Helminth of the virginia opossum *Didelphis virginiana* (Mammalia: Didelphidae) in Mexico. *Journal of Parasitology* **91**, 213-219.
- Monson, M. H., Koeing, J. W. & Sachs, R. 1983. Successful treatment with praziquantel. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **32**, 371.
- Morgan, J. A. T. & Blair, D. 1995. Nuclear rDNA ITS sequence variation in the Trematode genus *Echinostoma*: An aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group. *Parasitology* **111**, 609-615.
- Morgan, J. A. T. & Blair, D. 1998. Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial CO1 and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda). *Parasitology* **116**, 289-297.

- Moyou-Somo, R., Kefie-Arrey, C., Dreyfuss, G. & Dumas, M. 2003. An epidemiological study of pleuropulmonary paragonimiasis among pupils in the peri-urban zone of Kumba town, Meme Division, Cameroon. *BMC Public Health* **3**, 1451- 2458.
- Nadler, S. A. 2002. Species delimitation and nematode biodiversity: Phylogenies rule. *Nematology* **4**, 615-625.
- Pham, D., Shinohara, A., Horii, Y., Habe, S., Nawa, Y., The, D. & Le, N. 2007. Morphological and molecular identification of two *Paragonimus* spp., of which metacercariae concurrently found in a land crab, *Potamiscus tannanti*, collected in Yenbai Province, Vietnam. *Parasitology Research* **100**, 1075-1082.
- Ramirez-López, S. E. 1986. Ruta de migración de la metacercarias de *Paragonimus mexicanus* Miyazaki e Ishii, 1968 en *Rattus norvegicus*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 70 pp.
- Razo-Mendivil, U. J., León-Règagnon, V. & Pérez-Ponce de León, G. 2004. Description of two new species of *Glypthelmins* Stafford, 1905 (Digenea: Macroderoididae) in *Rana* spp. from Mexico, based on morphology and mtDNA and rDNA sequences. *Systematic Parasitology* **59**, 199–210.
- Razo-Mendivil, U. J., Rosas-Valdez, R. & Pérez-Ponce de León, Gerardo. 2008. A new cryptogonimid (Digenea) from the Mayan cichlid, *Cichlasoma urophthalmus* (Osteichthyes: Cichlidae), in several localities of the Yucatán peninsula, Mexico. *Journal of Parasitology* **94**, 1371-1378.
- Rha, S. E., Ha, H. K., Kim, J. G., Choi, B. I., Kim, P. N., Lee, M. G., Shim, J. C., Yu, E. S. & Auh, Y. H. 1999. CT features of intraperitoneal manifestations of parasitic infestation. *American Journal of Roentgenology* **172**, 1289-1292.
- Romeo, D. P. & Pollock, J. J. 1986. Pulmonary paragonimiasis: diagnostic value of pleural fluid analisis. *South Medical Journal* **79**, 241.

- Salazar, M., Rodriguez, J., Laufer, B. & Sosa, F. 1987. Paragonimiasis pulmonar. Informe de un caso. *Salud Pública de México* **29**, 470-473.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 5463-5468.
- Sasaki, M., Kamiyama, T., Yano, T., Nakamura-Uchiyama, F. & Nawa, Y. 2002. Active hepatic capsulitis caused by *Paragonimus westermani* infection. *Internal Medicine* **41**, 661-663.
- Singcharoen, T., Rawd-Aree, P. & Baddeley, H. 1988. Computed tomography findings in disseminated paragonimiasis. *Journal of Radiology* **61**, 83-86.
- Sorensen, E., Bogh, H. O., Johansen, M. V. & McManus, D. P. 1999. PCR-based identification of individuals of *Schistosoma japonicum* representing different subpopulations using a genetic marker in mitochondrial DNA. *International Journal for Parasitology* **29**, 1121-1128.
- Stock, S. P., Heng, J., Hunt, D. J., Reid, A. P., Shen, X. & Choo, H. Y. 2001. Redescription of *Steinernema longicaudum* Sheng and Wang (Nematoda: Steinernematidae); geographic distribution and phenotypic variation between allopatric populations. *Journal of Helminthology* **75**, 81-92.
- Swofford, D. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) 4.0 Beta. Florida State University. CD-ROM.
- Takemasa, H., Saito, K., Nakayamada, S., Kanazawa, T. & Tanaka, Y. 2002. A case of *Paragonimiasis westermani* complicated with migrating subcutaneous induration and multiple involvements in the liver. *Kansenshogaku Zasshi* **76**, 594-599.
- Tantalean, V., Naquira, V., Hwiza, A. & Delgado, E. 1974. La vía de penetración de la larva de *Paragonimus peruvianus* en animales de experimentación. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* **16**, 332-336.

- Uyema N. & Sánchez, E. 1992. Investigación epidemiológica de la paragonimiasis en el Perú. Estudio realizado en la provincia de San Pablo (Cajamarca) en 1987. *Boletín de Lima* **84**, 49-60.
- Vélez, I. D., Ortega, J., Hurtado, M. I., Robledo, S. M., Jiménez, J. N. & Velásquez, E. 2000. Epidemiology of paragonimosis in Colombia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **94**, 661-663.
- Vélez, I., Velásquez, E. & Vélez, D. 2003. Morphological description and life cycle of *Paragonimus* sp. (Trematoda: Troglotrematidae): causal agent of human paragonimiasis in Colombia. *Journal of Parasitology* **89**, 749-755.
- Vélez, I. & Velásquez, E. 2002. Paragonimosis. Una investigación multidisciplinaria en salud, biología y cultura en Colombia. Universidad de Antioquia, Colombia: 61 pp.
- Verneau, O., Renaud, F. & Catzeflis, F. 1997. Evolutionary relationships of sibling tapeworm species (Cestoda) parasitizing teleost fishes. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 630-636.
- Waikagul, J. 2007. A new species of *Paragonimus* (Trematoda: Troglotrematidae) from a cat infected with metacercariae from mountain crabs *Larnaudia larnaudii*. *Journal of Parasitology* **93**, 1496-1500.
- Waikagul, J., Setasuban, P. & Vajrasthira, S. 1989. On a species of *Paragonimus* lung fluke metacercaria in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **20**, 495-497.
- Yamaguti, S. 1971. Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Keigaku Publishing, Japan: 1074 pp.
- Yokogawa, M. 1965. *Paragonimus* and paragonimiasis. *Advances in Parasitology* **3**, 99-158.
- Yokogawa, M. 1969. *Paragonimus* and paragonimiasis. *Advances in Parasitology* **7**, 375-387.

- Yokogawa, M. 1982. Paragonimiasis. *In* CRC Handbook Series in Zoonoses. Section C: Parasitic Zoonoses. Vol. III. G. V. Hillyer and C. E. Hopla (eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, U.S.A: 123-142 pp.
- Yokogawa, M., Tsuji, M., Ito, J., Kojima, S., Tongu, S., Kobayashi, M., Hata, H., Lamothe, R., Pineda, R. & Osorio, D. 1985. Pathobiological studies in paragonimiasis in Mexico. Report of results of the research support by Grant-in-aid for scientific research. Chiba University. 1-48.
- Zhan, X. M., Li, Z. Y., Xu, X. C. & Li, Q. Y. 1997. Studies on the numerical taxonomy of lung flukes and their application. *Supplement to the Journal of Sun Yatsen University*, **1**, 6-10.
- Zhang, Z., Zhang, Y., Liu, L., Dong, C., Zhang, Y., Wu, Z. & Piessens, W. 1996. Antigen detection assay to monitor the efficacy of praziquantel for treatment of *Paragonimus westermani* infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **90**, 43.

Apéndice 1

Ejemplares de la CNHE revisados e incluidos en el estudio morfológico.

Nombre de Registro	Localidad	No. Cat. (No. Ejemplares)
<i>P. mexicanus</i>	Colima Ojo de Agua, Madrid	1026 (5)
	Río de la Barragana, Comala	1028 (2)
		1029 (4)
	Veracruz Las Cabañas, Sontecomapan	1145 (3)
		1015 (1)
	Jardín Botánico*	2971 (1)
<i>P. westermani</i>	Japón Univerisdad de Fukuoka, Japón	910 (2)

* Jardín Botánico de la Estación de Biología Trópicos "Los Tuxtlas", San Andrés Tuxtla, Veracruz

Apéndice 2

Técnicas de tinción para tremátodos

Paracarmín de Meyer

1. Para matar el ejemplar se sumerge en líquido de Bernald, no más de un minuto.
2. El parásito se coloca sobre un portaobjetos que tenga una o dos gotas de fijador (líquido de Bouin), y se le pone un cubreobjetos con la intención de aplanarlo ligeramente, en caso de que el ejemplar sea muy grueso, se ponen dos o más cubreobjetos y se fija por 24 horas, se añade suficiente fijador para evitar que la preparación se seque.
3. Transcurrido ese tiempo el parásito se desmonta quitando cuidadosamente el cubreobjetos y con un pincel o con una aguja de disección, se desprende con el fin de no romperlo y se coloca en una caja de Petri que contenga alcohol al 70%.
4. Se lava en alcohol al 70% hasta que quede perfectamente blanco, libres de color amarillo del líquido de Bouin, para ello se requiere de muchos cambios.
5. Lavar en alcohol al 96%, dos cambios de 10 minutos cada uno.
6. Teñir con Paracarmín de Meyer durante 8 a 10 minutos.
7. Lavar con alcohol 96% para quitar el exceso de colorante durante 5 o más minutos.
8. Diferenciar en alcohol acidulado al 2% con ácido clorhídrico, hasta que los bordes del gusano queden blancos y los órganos internos visiblemente teñidos.
9. Lavar con alcohol al 96% durante uno o dos minutos para evitar que el alcohol acidulado siga actuando.
10. Lavar en alcohol absoluto durante 20 ó 30 minutos.
11. Montar con bálsamo de Canadá, el parásito debe quedar ventral, vertical y en el centro de la preparación.
12. Etiquetar con datos de colecta.

Tricrómica de Gomori

SOLUCIÓN ACUOSA

1. Fijar y aplanar en líquido de Bouin durante 24 horas.
2. Desmontar con cuidado y lavar con alcohol al 70%.
3. Hidratar con alcoholes sucesivos de 70%, 50% y 25% hasta agua destilada.
4. Teñir de 20 a 30 minutos o más según el grosor del parásito, en una solución diluida de Tricrómica de Gomori, que se prepara con una gota de solución madre del colorante por cada 3cc de agua destilada, hasta que el parásito tome un color azul.
5. Lavar con agua destilada para eliminar el exceso del colorante.
6. Diferenciar con agua acidulada al 2% con ácido clorhídrico, hasta que los bordes del gusano queden ligeramente blancos.
7. Lavar con agua destilada para evitar que el agua acidulada siga actuando, uno o dos cambios de 5 minutos cada uno.
8. Deshidratar con alcoholes sucesivos hasta alcohol absoluto, 10 minutos en cada cambio.
9. Aclarar con aceite de clavos, xilol o salisilato de metilo.
10. Montar en bálsamo de Canadá.
11. Etiquetar con los datos de colecta.

SOLUCIÓN ALCOHÓLICA

1. Fijar y aplanar en líquido de Bouin durante 24 horas.
2. Desmontar con cuidado y lavar con alcohol al 70% hasta que los ejemplares queden blancos.
3. Teñir con una solución alcohólica diluida, que se prepara poniendo una gota de solución madre de Tricrómica de Gomori, que se prepara con una gota de solución madre del

colorante por cada 3cc de alcohol al 96%, durante 20 a 30 minutos o más, según el grueso del parásito.

4. Lavar con alcohol al 96% para eliminar el exceso del colorante.
5. Diferenciar con alcohol al 96% acidulado al 2 % con ácido clorhídrico, hasta que los bordes queden completamente blancos.
6. Lavar con alcohol al 96% durante 10 minutos para que el alcohol acidulado deje de actuar.
7. Lavar con alcohol absoluto durante 10 minutos.
8. Aclarar en aceite de clavos, xilol o salicilato de metilo.
9. Montar en bálsamo de Canadá.
10. Etiquetar.

Apéndice 3

Técnicas de biología molecular

DIGESTIÓN DEL TEJIDO

Rotular cuatro series de tubos de 1.5 ml con la clave de cada muestra.

1. Fragmentar el tejido y colocarlo, cuidadosamente, en la primera serie de tubos.
2. Añadir a cada tubo 500 µl de buffer STE, 20 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y 75 µl de SDS al 10%.
3. Incubar a 55 °C durante 24 hr, agitar con vortex ocasionalmente.

EXTRACCIÓN DEL DNA CON EL MÉTODO FENOL-CLOROFORMO

En la campana de extracción

4. En los tubos con las muestras digeridas, añadir 600 µl de fenol. Mezclar con vortex o a mano e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Mezclar cada vez que las fases se separen.
5. Centrifugar a 13, 200 rpm durante 5 minutos.
6. Transladar el sobrenadante a la segunda serie de tubos rotulados, tratando de no alterar la interfase.
7. Repetir pasos de 4-6.
8. Adicionar 600 µl de CI (solución de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1). Mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Mezclar frecuentemente.
9. Centrifugar a 13, 200 rpm durante 3 minutos.
10. Trasladar el sobrenadante a la cuarta serie de tubos.
11. Agregar 1/10 de la muestra (aproximadamente 45 µl) de NaCl 2M y 2.5 veces el volumen de la muestra de alcohol 96% frío (-20 °C).
12. Dejar precipitando a -20 °C durante 24 hr.

13. Centrifugar a 13, 200 rpm durante 10 minutos.
14. Decantar el alcohol o sacarlo utilizando una pipeta de 200 μ l, teniendo cuidado de no llevarse el botón de DNA.
15. Añadir a cada tubo 50-100 μ l de etanol 70 % frío para lavar el botón de DNA. Si el botón se despega de la pared del tubo volver a centrifugar durante 2 minutos a la misma velocidad.
16. Decantar de nuevo el alcohol y secar el botón de DNA en una centrifuga al vacío. Resuspender en 50-100 μ l de agua bidestilada estéril (ddH₂O), dependiendo del tamaño del botón de DNA.

EXTRACCIÓN DE DNA CON EL MÉTODO DE CHELEX

1. La solución de Chelex se prepara en un tubo de 1.5 ml. Agregar 0,15 g de Chelex en polvo, 1 ml de ddH₂O y 8 μ l de proteinasa K.
2. Agitar en vortex hasta homogenizar.
3. Se rotulan tubos de 1.5 ml, de acuerdo a las muestras que se vayan a extraer.
4. Se agita nuevamente el Chelex hasta obtener una resina homogénea y se colocan 80 μ l en los tubos previamente rotulados.
5. Agitar el Chelex antes de vaciar los 80 μ l en cada tubo.
6. Se debe utilizar un “punto” de tejido visible a simple vista para la extracción. Secar perfectamente el alcohol de cada muestra, colocándola en papel filtro por alrededor de 3 a 5 minutos (hasta que la muestra “brinque” cuando se tome con las pinzas).
7. Al tener listos todos los tubos con la muestra de tejido, se mezclan con vortex y se incuban por 5 minutos a 50 °C.
8. Se agita nuevamente todos los tubos hasta que la resina se homogenice, cuidando que el tejido permanezca dentro del líquido.

9. Incubar los tubos por 2 horas a 50 °C.
10. Incubar los tubos por 10 minutos a 95 °C.
11. Centrifugar 20 segundos a 13,000 rpm.
12. Esperar 5 minutos a que se enfríen las extracciones.
13. Guardar los tubos en la caja personal en el refrigerador de -20 °C.
14. La extracción se aclimata y se agita cuando se vaya a utilizar en la amplificación. Dejar reposar alrededor de 30 segundos. Al tomar la cantidad requerida para la PCR, cuidar de hacerlo pegado a la pared del tubo por arriba del “aceite” y DNA que quedan abajo.
15. La solución de Chelex se guarda en el refrigerador de -20 °C. Para utilizarla siempre hay que tener cuidado de aclimatarla y mezclarla con vortex hasta homogenizar la resina perfectamente para cada muestra.

Técnica de PCR

1. Preparar una mezcla maestra con las siguientes proporciones:

Primer F [10 pmol] 1.0 µl x (número de muestras + el control)

Primer R [10 pmol] 1.0 µl x (número de muestras + el control)

Buffer 5x 2.5 µl x (número de muestras + el control)

dNTPs 2.5 µl x (número de muestras + el control)

MgCl₂ 1.25 µl x (número de muestras + el control)

Taq. Polimerasa 0.125 µl x (número de muestras + el control)

2. Hacer una suma del volumen total de líquidos y dividirlo entre el número de muestras más el control y repartir en tubos de 0.2 ml.

3. Agregar a cada tubo (excepto al control) 1.0 μ l templado de DNA (el volumen puede variar según la concentración de DNA).
4. Completar el volumen de cada reacción a 25 μ l con ddH₂O estéril. Mezclar suavemente y colocar las muestras en el Termociclador.

Purificación de productos de PCR

Columnas de Millipore (No. Cat. UFC7PC250 Montage PCR centrifugal filter devices).

1. Coloque la columna en uno de los dos tubos proporcionados.
2. Adicione 375 μ l de agua destilada dentro de la columna (si el volumen de amplificación fue de 25 μ l) sin tocar la membrana de la columna con la punta de la pipeta y posteriormente adicione los 25 μ l de la PCR. Cierre la columna.

Nota: Volúmenes pequeños de reacción de PCR pueden ser usados, pero el volumen en la columna debe ser ajustado siempre a un volumen final de 400 μ l.

3. Coloque el dispositivo (columna-vial) en la microcentrífuga con la unión de la tapa hacia el centro del rotor.
4. Centrifugue a 3,300-4,000 rpm durante 15 min. NO CENTRIFUGUE MÁS DE ESTE TIEMPO.
5. Retire cuidadosamente el dispositivo de la centrífuga. Separe la columna del tubo y coloque la columna en otro vial limpio.
6. Adicione cuidadosamente 20 μ l de agua destilada a la membrana sin tocarla con la punta de la micropipeta.
7. Centrifugue a 3,300-4,000 rpm durante 2 min.

Reacción de secuenciación (Big Dye v3.1)

Reactivos:

Big Dye Terminator (-20 °C)

2.5X Sequencing Buffer (-20 °C)

Sephadex G-50-50

Nota: Se preparan dos tubos de reacción por cada muestra (uno para cada primer). Se rotulan los tubos eppendorff de 0.2 ml necesarios por cada muestra y por cada primer.

1. En cada tubo eppendorff se adicionan:

2 μ l de 2.5 Sequencing Buffer (en el refrigerador de -20 °C)

2 μ l de Big Dye Terminator (en el refrigerador de -20 °C)

0.5 μ l de oligo o primer (si está a una concentración de 5 pmol)

X μ l de DNA

Y μ l de agua bidestilada estéril

El volumen final debe ser de 10 μ l.

Nota:

X está relacionado con cantidad de DNA que se visualice en la fotografía del gel de electroforesis para la concentración después de la PCR (10 ng por cada 100 pb que se quieran leer).

Y es la cantidad de agua que se necesita para completar el volumen final (Vf) de 10 μ l.

2. Cada tubo de reacción se mezcla con cuidado a mano.

3. Se centrifugan 15 segundos a máxima velocidad.

4. Se colocan los tubos en el termociclador para llevar al cabo la amplificación en el programa

ABI (según la temperatura de alineación 50 °C, 55 °C, etc.).

Para recobrar el DNA después de la reacción de secuenciación

En el caso de columnas nuevas:

1. Se debe verificar que el Sephadex (el polvo blanco dentro de la columna) no se encuentre adherido a la tapa de la columna dando unos golpecitos a la tapa para que el Sephadex caiga al fondo de la columna.
2. A cada columna se le adicionan 800 μ l de agua bidestilada esterilizada.
3. Se mezcla en el vortex hasta que se disuelva el Sephadex (el agua de la columna se observa turbia), teniendo cuidado de que no se formen burbujas.
4. Las columnas se dejan hidratar por dos horas.
5. Transcurrido este tiempo, las columnas se destapan, a una por una se le quita la base y se tapa la abertura de la columna con el dedo y se oprime para que el agua de la columna se elimine y se coloca en un tubo colector.
6. Cuando se observe que se ha eliminado totalmente el agua de la columna, se tira el agua que se depositó en cada tubo colector y las columnas se centrifugan a 2800 rpm por dos minutos.
7. Se tira el agua que se depositó en el tubo colector.
8. Se coloca la muestra (producto de PCR) (20 μ l) en el centro de la columna sin tocar las paredes de la misma ni al Sephadex.
9. Se coloca la columna en un tubo eppendorff de 1.5 mL ya rotulado con la clave de la muestra.
10. Se centrifuga a 2800 rpm por dos minutos a una temperatura de 4 °C.
11. Los tubos eppendorff ya con la solución con el DNA se colocan en la centrifuga al vacío, donde se centrifugan hasta secar las muestras (aproximadamente 15-20 minutos). El Sephadex de la columna se desecha en el recipiente para desechos no tóxicos. Las tapas, bases, columnas y tubos colectores se colocan en el recipiente dispuesto para tal objetivo.

12. Las muestras ya secas se dejan en el refrigerador de -20 °C hasta que sean entregadas a la técnico del secuenciador automático.

Importante:

Las bases, las tapas, las columnas y los tubos colectores se colocan en el recipiente dispuesto para tal propósito. Cuando se acumule una cantidad considerable, se deben de lavar conalconox 2X por 30 minutos en la estufa de movimiento (mosca) con calor, pasado este tiempo se enjuagan con agua destilada y se repite el proceso de lavado. Después de enjuagarse por segunda vez, se separan las tapas y las bases, se dejan secar, se guardan en su bolsa y se colocan en el cajón de material de reacción de secuenciación. Las columnas y los tubos colectores deben de esterilizarse para que puedan ser utilizados de nuevo.

Para preparar el Sephadex G-50-50

2.6 gr de Sephadex

40 ml de agua bidestilada estéril.

Se mezcla en el vortex hasta que el sephadex se haya disuelto completamente. Se mantiene en el refrigerador de -20 °C.

Si se van a usar columnas para recobrar el producto de la PCR, se toman 750-800 µl y se colocan en la columna, dejándose hidratar por dos horas. Después de este tiempo se sigue con el procedimiento.

Para preparar 100 µl el 2.5X Sequencing Buffer

50 µl de 5X Sequencing Buffer (en el refrigerador de -20 °C)

50 µl de agua bidestilada estéril.

Colocar en un tubo eppendorf rotulado. Conservar en el refrigerador de -20 °C.

Para poner las muestras en el secuenciador:

1. Agregar 10 µl de formamida al tubo con la muestra seca.
2. Centrifugar a 13,200 rpm durante 4.5 minutos.
3. Pasar la muestra a los tubos pequeños previamente marcados.
4. Poner la tapa gris.
5. Desnaturalizar a 95 °C durante 3 minutos.
6. Poner inmediatamente en hielo.

Apéndice 4

Secuencias parciales de *Paragonimus mexicanus* obtenidas del GenBank incluidas en los análisis del presente trabajo.

Marcador	Localidad	Haplotipo	Número de acceso
ITS2	Guatemala	G	AF538946
	Ecuador	E	AF538945
		-	-
COI	Guatemala	G7	AF538944
		G6	AF538943
		G5	AF538942
		G4	AF538941
		G3	AF538940
		G2	AF538939
		G1	AF538938
	Ecuador	E4	AF538937
		E3	AF538936
		E2	AF538935
		E1	AF538934
-	-	AF159596	

Apéndice 5

Alineamiento de secuencias de ITS2 de *Paragonimus* incluidas en el presente estudio.

	10	20	30	40	50	60
Pwestermani	taaactatcgcgacgcccaaaaagtcgcggcttggggtttgccagctggcgatctccc					
Pmex G1t.....t....					
Pmex G2t.....t....					
Pmex G3t.....t....					
Pmex G4t.....t....					
Pmex G5t.....t....					
Pmex G6t.....t....					
Pmex G7t.....t....					
Pmex E1t.....t....					
Pmex E2t.....t....					
Pmex E3t.....t....					
Pmex E4t.....t....					
Pmex E5t.....t....					
FB, Ch1T.....T....					
FB, Ch2McT.....T....					
FB, Ch3T.....T....					
FB, CH4T.....T....					
FB, Ch5T.....T....					
FB, Ch6T.....T....					
FB, Ch7T.....T....					
FB, Ch8McT.....T....					
FB, Ch9McT.....T....					
FB, Ch10McT.....T....					
Coq, Col1T.....T...T					
Coq, Col2T.....T...T					
Coq, Col3T.....T...T					
Coq, Col4T.....T...T					
Coq, Col5T.....T...T					
Coq, Col6T.....T...T					
Coq, Col7T.....T...T					
Coq, Col8T.....T...T					
Coq, Col9T.....T...T					
Coq, Col10T.....T...T					
Coq, Col11T.....T...T					
Mad, Col1T.....T...T					
Mad, Col2McT.....T...T					
Mad, Col3McT.....T...T					
Mad, Col4McT.....T...T					
Mad, Col5McT.....T...T					
Mad, Col6McT.....T...T					
Po, Ver1McT.....T...T					
Po, Ver2McT.....T...T					
Po, Ver3McT.....T...T					
Piso, Ver1McT.....T...T					
Piso, Ver2McT.....T...T					

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

70 80 90 100 110 120

Pwestermani caatctgggtcttgtgcctgtgggggtgccagatctatggcggtttccctaacataactcgggc

Pmex G1a.....a.....t.a.t.c..t..

Pmex G2a.....a.....t.a.t.c..t..

Pmex G3a.....a.....t.a.t.c..t..

Pmex G4a.....a.....t.a.t.c..t..

Pmex G5a.....a.....t.a.t.c..t..

Pmex G6a.....a.....t.a.t.c..t..

Pmex G7a.....a.....t.a.t.c..t..

Pmex E1a.....a.....t.a.t.c..t..

Pmex E2a.....a.....t.a.t.c..t..

Pmex E3a.....a.....t.a.t.c..t..

Pmex E4a.....a.....t.a.t.c..t..

Pmex E5a.....a.....t.a.t.c..t..

FB, Ch1A.....A.....T.A.TC..T..

FB, Ch2McA.....A.....T.A.TC..T..

FB, Ch3A.....A.....T.A.TC..T..

FB, CH4A.....A.....T.A.TC..T..

FB, Ch5A.....A.....T.A.TC..T..

FB, Ch6A.....A.....T.A.TC..T..

FB, Ch7A.....A.....T.A.TC..T..

FB, Ch8McA.....A.....T.A.TC..T..

FB, Ch9McA.....A.....T.A.TC..T..

FB, Ch10McA.....A.....T.A.TC..T..

Coq, Col1A.....A.....A.TC..T..

Coq, Col2A.....A.....A.TC..T..

Coq, Col3A.....A.....A.TC..T..

Coq, Col4A.....A.....A.TC..T..

Coq, Col5A.....A.....A.TC..T..

Coq, Col6A.....A.....A.TC..T..

Coq, Col7A.....A.....A.TC..T..

Coq, Col8A.....A.....A.TC..T..

Coq, Col9A.....A.....A.TC..T..

Coq, Col10A.....A.....A.TC..T..

Coq, Col11A.....A.....A.TC..T..

Mad, Col1A.....A.....A.TC..T..

Mad, Col2McA.....A.....A.TC..T..

Mad, Col3McA.....A.....A.TC..T..

Mad, Col4McA.....A.....t.A.TC..T..

Mad, Col5McA.....A.....A.TC..T..

Mad, Col6McA.....A.....A.TC..T..

Po, Ver1McA.....A.....A.TC..T..

Po, Ver2McA.....A.....A.TC..T..

Po, Ver3McA.....A.....A.TC..T..

Piso, Ver1McA.....A.....A.TC..T..

Piso, Ver2McA.....A.....A.TC..T..

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

Pwesterni gcacccacggttgccggctgaaagccttgacggggatgtggcaacggaatcgtggctcagta
Pmex G1 .t.....t.....t.....t.....t.g....g.....
Pmex G2 .t.....t.....t.....t.....t.g....g.....
Pmex G3 .t.....t.....t.....t.....t.g....g.....
Pmex G4 .t.....t.....t.....t.....t.g....g.....
Pmex G5 .t.....t.....t.....t.....t.g....g.....
Pmex G6 .t.....t.....t.....t.....t.g....g.....
Pmex G7 .t.....t.....t.....t.....t.g....g.....
Pmex E1 .t.....t.....t.....t.....t.g....g.....
Pmex E2 .t.....t.....t.....t.....t.g....g.....
Pmex E3 .t.....t.....t.....t.....t.g....g.....
Pmex E4 .t.....t.....t.....t.....t.g....g.....
Pmex E5 .t.....t.....t.....t.....t.g....g.....
FB, Ch1 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
FB, Ch2Mc .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
FB, Ch3 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
FB, CH4 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
FB, Ch5 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
FB, Ch6 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
FB, Ch7 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
FB, Ch8Mc .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
FB, Ch9Mc .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
FB, Ch10Mc .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Coq, Col1 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Coq, Col2 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Coq, Col3 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Coq, Col4 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Coq, Col5 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Coq, Col6 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Coq, Col7 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Coq, Col8 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Coq, Col9 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Coq, Col10 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Coq, Col11 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Mad, Col1 .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Mad, Col2Mc .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Mad, Col3Mc .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Mad, Col4Mc .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Mad, Col5Mc .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Mad, Col6Mc .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Po, Ver1Mc .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Po, Ver2Mc .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Po, Ver3Mc .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Piso, Ver1Mc .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....
Piso, Ver2Mc .T.....T.....T.....T.....T.G....G.....

190 200 210 220 230 240
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

Pwestermani aatgatttatgtgcgcggtccgctgtcctgtcctcatctgtggttcatggtgcgcggtggt
 Pmex G1 ...a...g...a.....a.....a...g...c.....
 Pmex G2 ...a...g...a.....a.....a...g...c.....
 Pmex G3 ...a...g...a.....a.....a...g...c.....
 Pmex G4 ...a...g...a.....a.....a...g...c.....
 Pmex G5 ...a...g...a.....a.....a...g...c.....
 Pmex G6 ...a...g...a.....a.....a...g...c.....
 Pmex G7 ...a...g...a.....a.....a...g...c.....
 Pmex E1 ...a...g...a.....a.....a...g.c.c.....
 Pmex E2 ...a...g...a.....a.....a...g.c.c.....
 Pmex E3 ...a...g...a.....a.....a...g.c.c.....
 Pmex E4 ...a...g...a.....a.....a...g.c.c.....
 Pmex E5 ...a...g...a.....a.....a...g.c.c.....
 FB, Ch1 ...A...G...A.....A.....A...G...C.....
 FB, Ch2Mc ...A...G...A.....A.....A...G...C.....
 FB, Ch3 ...A...G...A.....A.....A...G...C.....
 FB, CH4 ...A...G...A.....A.....A...G...C.....
 FB, Ch5 ...A...G...A.....A.....A...G...C.....
 FB, Ch6 ...A...G...A.....A.....A...G...C.....
 FB, Ch7 ...A...G...A.....A.....A...G...C.....
 FB, Ch8Mc ...A...G...A.....A.....A...G...C.....
 FB, Ch9Mc ...A...G...A.....A.....A...G...C.....
 FB, Ch10Mc ...A...G...A.....A.....A...G...C.....
 Coq, Col1 ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Coq, Col2 ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Coq, Col3 ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Coq, Col4 ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Coq, Col5 ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Coq, Col6 ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Coq, Col7 ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Coq, Col8 ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Coq, Col9 ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Coq, Col10 ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Coq, Col11 ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Mad, Col1 ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Mad, Col2Mc ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Mad, Col3Mc ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Mad, Col4Mc ...A...G...A.....T.....A.....A...G...C.....
 Mad, Col5Mc ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Mad, Col6Mc ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Po, Ver1Mc ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Po, Ver2Mc ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Po, Ver3Mc ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Piso, Ver1Mc ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....
 Piso, Ver2Mc ...A...G...A.....T.....A.....G...C.....

Apéndice 6

Alineamiento de secuencias de COI de *Paragonimus* incluidas en el presente estudio.

	10	20	30	40	50	60
Pwestermani	ttttgcctggggttgggtatcgtgagccacatttgcatgaccctgaccaacaacgattcct					
PmexE5c..a.....gg.t..t..a..t.....t.....tt...t..t..t.....t.					
PmexG1c..a.....gg.t.....a..t.....tt.a..t..t..t.....t.					
PmexG2c..a.....gg.t.....a..t.....tt.a..t..t..t.....t.					
PmexG3c..a.....gg.t.....a..t.....tt.a..t..t..t.....t.					
PmexG4c..a.....gg.t.....a..t.....tt.a..t..t..t.....t.					
PmexG5c..a.....gg.t.....a..t.....tt.a..t..t..t.....t.					
PmexG6c..a.....gg.t.....a..t.....tt.a..t..t..t.....t.					
PmexG7c..a.....gg.t.....a..t.....tt...t..t..t.....t.					
PmexE1c..a.....gg.t..t..a..t.....t.....tt...t..t..t.....t.					
PmexE2c..a.....gg.t..t..a..t.....t.....tt...t..t..t.....t.					
PmexE3c..a.....gg.t..t..a..t.....t.....tt...t..t..t.....t.					
PmexE4c..a.....gg.t..t..a..t.....t.....tt...t..t..t.....t.					
FB, Ch1C..A.....GG.T....A..T.....TT.A..T..T..T.....T.					
FB, Ch2McC..A.....GG.T....a..T.....TT.A..T..T..T.....T.					
FB, Ch3C..A.....GG.T....A..T.....TT...T..T..T.....T.					
FB, Ch4C..A.....GG.T....A..T.....TT.A..T..T..T.....T.					
FB, Ch5C..A.....GG.T....A..T.....TT...T..T..T.....T.					
FB, Ch6C..A.....GG.T....A..T.....TT.A..T..T..T.....T.					
FB, Ch7C..A.....GG.T....A..T.....TT.A..T..T..T.....T.					
FB, Ch8McC..A.....GG.T....A..T.....TT...T..T..T.....T.					
FB, Ch9McC..A.....GG.T....A..T.....TT.A..T..T..T.....T.					
FB, Ch10McC..A.....GG.T....A..T.....TT...T..T..T.....T.					
Coq, Col1A.....GG.T....A.....T.....T..A..T.....T.....T.					
Coq, Col2A.....GG.T....a.....T.....T.....T.....T.....T.					
Coq, Col3A.....GG.T....A.....T.....T..A..T.....T.....T.					
Coq, Col4A.....GG.T....A.....T.....T..A..T..T..T.....T.					
Coq, Col5A.....GG.T....a.....T.....T..A..T..T..T.....T.					
Coq, Col6A.....GG.T....A.....T.....T.....T.....T.....T.					
Coq, Col7A.....GG.T....A.....T.....T..A..T.....T.....T.					
Coq, Col8A.....GG.T....A.....T.....T..A..T.....T.....T.					
Coq, Col9A.....GG.T....A..T.....T.....T..A..T..T..T.....T.					
Coq, Col10C..A.....GG.T....A.....T.....T..A..T.....T.....T.					
Coq, Col11A.....GG.T....A..T.....T.....T..A..T..T..T.....T.					
Mad, Col1A.....GG.T....A..T.....T.....T..A..T..T..T.....T.					
Mad, Col2McA.....GG.T....a..T.....T.....T..A..T..T..T.....T.					
Mad, Col3McA.....GG.T....A.....T.....T..A..T.....T.....T.					
Mad, Col4McA.....GG.T....A.....T.....T..A..T.....T.....T.					
Mad, Col5McA.....GG.T....A.....T.....T..A..T.....T.....T.					
Mad, Col6McA.....GG.T....A..T.....T.....T..A..T..T..T.....T.					
Po, Ver1McC..A.....AG.T....A..T.....T.....TT.A.....T..T.....T.					
Po, Ver2McC..A.....AG.T....A..T.....T.....TT.A.....T..T.....T.					
Po, Ver3McC..A.....AG.T....A..T.....T.....TT.A.....T..T.....T.					
Piso, Ver1McC..A.....AG.T....A..T.....T.....TT.A.....T..T.....T.					
Piso, Ver2McC..A.....AG.T....A..T.....T.....TT.A.....T..T.....T.					

70 80 90 100 110 120
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

Pwesterni tggtcgggtactacgggctgggtgtttgcatggggggccattgtgtgtctgggtagtgtg
 PmexE5t..t..t..t..t.a..t.....t..c..a..t.a..a..g....
 PmexG1t..t..t..t..t.a..c.....a.....t.a..a..g....
 PmexG2 .a..t..t..t..t..t.a..t.....a.....t.a..a..g....
 PmexG3t..c..t..t..t..t.a..t.....a.....t.a..a..g....
 PmexG4 .a..t..t..t..t..t.a..t.....a.....t.a..a..g....
 PmexG5 .a..t..t.....t..t.a..t.....a.....t.a..a..g....
 PmexG6t..t..t..t..t.a..t.....a.....t.a..a..g....
 PmexG7t..t..t..t..t.a..t.....a.....t.a..a..g....
 PmexE1t..t..t..t..t.a..t.....t..c..a..t.a..a..g....
 PmexE2t..t..t..t..t.a..t.....t..c..a..t.a..a..g....
 PmexE3t..t..t..t..t.a..t.....t..c..a..t.a..a..g....
 PmexE4t..t..t..t..t.a..t.....t..c..a..t.a..a..g....
 FB,Ch1 .A..T..T..T..T..T.A..T.....A.....T.A..A..G....
 FB,Ch2McT..C..T..T..T.A..T.....A.....T.A..A..G....
 FB,Ch3T..T..T..T..T.A..T.....A.....T.A..A..G....
 FB,Ch4T..C..T..T..T.A..T.....A.....T.A..A..G....
 FB,Ch5T..T..T..T..T.A..T.....G.....T.A..A..G....
 FB,Ch6 .A..T..T..T..T..T.A..T.....A.....T.A..A..G....
 FB,Ch7 .A..T..T..T..T..T.A..T.....A.....T.A..A..G....
 FB,Ch8McT..T..T..T..T.A..T.....G.....T.A..A..G....
 FB,Ch9McT..C..T..T..T.A..T.....A.....T.A..A..G....
 FB,Ch10McT..T..T..T..T.A..T.....G.....T.A..A..G....
 Coq,Col1T..C..T..T..T.A..T.....A..T..C.....A..G..G....
 Coq,Col2T..C..T..T..T.A..T.....A..T.....A..G..G....
 Coq,Col3T..C..T..T..T.A..T.....A..T.....A..G..G....
 Coq,Col4T..C..T..T..T.A..T.....A..T.....A..G..G....
 Coq,Col5T..C..T..T..T.A..T.....A..T.....A..G..G....
 Coq,Col6T..C..T..T..T.A..T.....A..T.....A..G..G....
 Coq,Col7T..C..T..T..T.A..T.....A..T.....A..G..G....
 Coq,Col8T..C..T..T..T.A..T.....A..T.....A..G..G....
 Coq,Col9T..C..T..T..T.A..T.....A..T..C.....T.A..G..G....
 Coq,Col10T..C..T..T..T.A..T.....A..T..C.....A..G..G....
 Coq,Col11T..C..T..T..T.A..T.....A..T..C.....T.A..G..G....
 Mad,Col1T..C..T..T..T.A..T.....A..T..C.....T.A..G..G....
 Mad,Col2McT..C..T..T..T.A..T.....A..T..C.....T.A..G..G....
 Mad,Col3McT..C..T..T..T.A..T.....A..T.....A..G..G....
 Mad,Col4McT..C..T..T..T.A..T.....A..T..C.....A..G..G....
 Mad,Col5McT..C..T..T..T.A..T.....A..T..C.....A..G..G....
 Mad,Col6McT..C..T..T..T.A..T.....A..T..C.....T.A..G..G....
 Po,Ver1McT..T..T..T..T.A..T.....T..C.....T.A..A..G....
 Po,Ver2McT..T..T..T..T.A..T.....T..C.....T.A..A..G....
 Po,Ver3McT..T..T..T..T.A..T.....T..C.....T.A..A..G....
 Piso,Ver1McT..T..T..T..T.A..T.....T..C.....T.A..A..G....
 Piso,Ver2McT..T..T..T..T.A..T.....T..C.....T.A..A..G....

	130	140	150	160	170	180

Pwesterni	tgtggggcgc	catcacatg	tccatggtt	gggttgggat	gtcaagactg	ctgttttctttagtt
PmexE5	.t..a..a.....t.....t.....t.....t.....t.....c.....t.....					
PmexG1	.t..a..a.....t.....t.....t.....c.....t.....t.....g..t.....					
PmexG2	.t..a..a.....t.....t.....t.....c.....t.....t.....g..t.....					
PmexG3	.t..a..a.....t.....t.....t.....c.....t.....t.....g..t.....					
PmexG4	.t..a..a.....t.....t.....t.....c.....t.....t.....g..t.....					
PmexG5	.t..a..a.....t.....t.....t.....c.a.....t.....t.....g..t.....					
PmexG6	.t..a..a.....t.....t.....t.....c.....t.....t.....g..t.....					
PmexG7	.t..a..a.....t.....t.....t.....c.....t.....t.....g..t.....					
PmexE1	.t..a..a.....t.....t.....t.....a.....t.....t.....c.....t.....					
PmexE2	.t..a.....t.....t.....t.....a.....t.....t.....c.....t.....					
PmexE3	.t..a..a.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....c.....t.....					
PmexE4	.t..a..a.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....c.....t.....					
FB,Ch1	.T..A..A.....T.....T.....T.....C.....T.....T.....G..T.....					
FB,Ch2Mc	.T..A..A.....T.....T.....T.....C.....T.....T.....G..T.....					
FB,Ch3	.T..A..A.....T.....T.....T.....C.....T.....T.....G..T.....					
FB,Ch4	.T..A..A.....T.....T.....T.....C.A.....T.....T.....G..T.....					
FB,Ch5	.T..A..A.....T.....T.....T.....C.....T.....T.....G..T.....					
FB,Ch6	.T..A..A.....T.....T.....T.....C.....T.....T.....G..T.....					
FB,Ch7	.T..A..A.....T.....T.....T.....C.....T.....T.....G..T.....					
FB,Ch8Mc	.T..A..A.....T.....T.....T.....C.....T.....T.....G..T.....					
FB,Ch9Mc	.T..A..A.....T.....T.....T.....C.A.....T.....T.....G..T.....					
FB,Ch10Mc	.T..A..A.....T.....T.....T.....C.....T.....T.....G..T.....					
Coq,Col1	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Coq,Col2	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Coq,Col3	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Coq,Col4	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Coq,Col5	.T..A.....T.....T.....T.....C.....T.....T.....G..T.....C.					
Coq,Col6	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Coq,Col7	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Coq,Col8	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Coq,Col9	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Coq,Col10	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Coq,Col11	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Mad,Col1	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Mad,Col2Mc	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Mad,Col3Mc	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Mad,Col4Mc	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Mad,Col5Mc	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Mad,Col6Mc	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Po,Ver1Mc	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Po,Ver2Mc	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Po,Ver3Mc	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Piso,Ver1Mc	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					
Piso,Ver2Mc	.T..A.....T.....T.....T.....T.....T.....G..T.....C.					

	190	200	210	220	230	240

Pwestermani	ctgtcacgggagtgattgggata	cccacggggattaaggttttctcttgggtt	ggttc	atgc		
PmexE5	.g..t..t..t.....t..t..t.....t.....t...t					
PmexG1	.g..t..c..t.....c..t..t.....t.....t...t					
PmexG2	.g..t..c..t.....c..t..t.....t.....t...t					
PmexG3	.g..t..c..t.....c..t..t.....t.....t...t					
PmexG4	.g..t..c..t.....c..t..t.....t.....t...t					
PmexG5	.g..t..c..t.....c..t..t.....t.....t...t					
PmexG6	.g..t..c..t.....c..t..t.....t.....t...t					
PmexG7	.g..t..c..t.....c..t..t.....t.....t...t					
PmexE1	.g..t..t..t.....t..t..t.....t.....t...t					
PmexE2	.g..t..t..t.....t..t..t.....t.....t...t					
PmexE3	.g..t..t..t.....t..t..t.....t.....t...t					
PmexE4	.g..t..t..t.....t..t..t.....t.....t...t					
FB,Ch1	.G..T..C..T.....C..T..T.....T.....T...T					
FB,Ch2Mc	.G..T..C..T.....C..T..T.....T.....T...T					
FB,Ch3	.G..T..C..T.....C..T..T.....T.....T...T					
FB,Ch4	.G..T..C..T.....C..T..T.....T.....T...T					
FB,Ch5	.G..T..C..T.....C..T..T.....T.....T...T					
FB,Ch6	.G..T..C..T.....C..T..T.....T.....T...T					
FB,Ch7	.G..T..C..T.....C..T..T.....T.....T...T					
FB,Ch8Mc	.G..T..C..T.....C..T..T.....T.....T...T					
FB,Ch9Mc	.G..T..C..T.....C..T..T.....T.....T...T					
FB,Ch10Mc	.G..T..C..T.....C..T..T.....T.....T...T					
Coq,Col1T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Coq,Col2T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Coq,Col3T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Coq,Col4T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Coq,Col5T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Coq,Col6T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Coq,Col7T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Coq,Col8T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Coq,Col9T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Coq,Col10T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Coq,Col11T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Mad,Col1T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Mad,Col2McT..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Mad,Col3McT..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Mad,Col4McT..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Mad,Col5McT..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Mad,Col6McT..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Po,Ver1Mc	.G..T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Po,Ver2Mc	.G..T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Po,Ver3Mc	.G..T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Piso,Ver1Mc	.G..T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					
Piso,Ver2Mc	.G..T..T..T.....T..T..T.....T.....T...T					

250 260 270 280 290 300
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

Pwestermani tgggtggaactcgtttgcggttttgggatcctgttttgggtgaattcttggggttatct
 PmexE5 .a.....t.....a.c.a.....gg...a.g...t.a.....t.
 PmexG1 .a.....a.....a.....gg...a.....t.a.....t.
 PmexG2 .a.....a.....a.....gg...a.....t.a.....t.
 PmexG3 .a.....a.....a.....gg...a.....t.a.....t.
 PmexG4 .a.....a.....a.....gg...a.....t.a.....t.
 PmexG5 .a.....a.....a.....gg...a.....t.a.....t.
 PmexG6 .a.....a.....a.....gg...a.....t.a.....t.
 PmexG7 .a.....a.....a.....gg...a.....t.a.....t.
 PmexE1 .a.....t.....a.c.a.....gg...a.g...t.a.....t.
 PmexE2 .a.....t.....a.c.a.....gg...a.g...t.a.....t.
 PmexE3 .a.....t.....a.c.a.....gg...a.g...t.a.....t.
 PmexE4 .a.....t.....a.c.a.....gg...a.g...t.a.....t.
 FB,Ch1 .A.....A.....A.....GG...A.....T.A.....T.
 FB,Ch2Mc .A.....A.....A.....GG...A.....T.A.....T.
 FB,Ch3 .A.....A.....A.....GG...A.....T.A.....T.
 FB,Ch4 .A.....A.....A.....GG...A.....T.A.....T.
 FB,Ch5 .A.....A.....A.....GG...A.....T.A.....T.
 FB,Ch6 .A.....A.....A.....GG...A.....T.A.....T.
 FB,Ch7 .A.....A.....A.....GG...A.....T.A.....T.
 FB,Ch8Mc .A.....A.....A.....GG...A.....T.A.....T.
 FB,Ch9Mc .A.....A.....A.....GG...A.....T.A.....T.
 FB,Ch10Mc .A.....A.....A.....GG...A.....T.A.....T.
 Coq,Col1 .A.....G.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Coq,Col2 .A.....G.....A.....C.GGA...A.G...T.G.....T.
 Coq,Col3 .A.....G.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Coq,Col4 .A.....C.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Coq,Col5 .A.....C.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Coq,Col6 .A.....G.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Coq,Col7 .A.....G.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Coq,Col8 .A.....G.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Coq,Col9 .A.....G.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Coq,Col10 .A.....G.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Coq,Col11 .A.....G.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Mad,Col1 .A.....G.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Mad,Col2Mc .A.....G.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Mad,Col3Mc .A.....G.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Mad,Col4Mc .A.....G.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Mad,Col5Mc .A.....G.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Mad,Col6Mc .A.....G.....A.....C.GG...A.G...T.G.....T.
 Po,Ver1McA.....GG...A.G...T.A.....
 Po,Ver2McA.....GG...A.G...T.A.....
 Po,Ver3McA.....GG...A.G...T.A.....
 Piso,Ver1McA.....GG...A.G...T.A.....
 Piso,Ver2McA.....GG...A.G...T.A.....

310 320 330 340 350 360
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

Pwesterni t cctgttcaccataggtgggtgtgaccggcatcattctgtcctcctccataactggatagtc
 PmexE5 .t..t..t.....a..t..g..t...t...t..t..tt.a..c...t
 PmexG1 .t..t..t.....a..t..g..t...t...t..g..t..tt.a..c...t
 PmexG2 .t..t..t.....a..t..g..t...t...t..g..t..tt.a..c...t
 PmexG3 .t..t..t.....a..t..g..t...t...t..g..t..tt.a..c...t
 PmexG4 .t..t..t.....a..t..g..t...t...t..g..t..tt.a..c...t
 PmexG5 .t..t..t.....a..t..g..t...t...t..g..t..tt.a..c...t
 PmexG6 .t..t..t.....a..t..g..t...t...t..g..t..tt.a..c...t
 PmexG7 .t..t..t.....a..t..t..t...t...t..g..t..tt.a..c...t
 PmexE1 .t..t..t.....a..t..g..t...t...t..t..t..tt.a..c...t
 PmexE2 .t..t..t.....a..t..g..t...t...t..t..t..tt.a..c...t
 PmexE3 .t..t..t.....a..t..g..t...t...t..t..t..tt.a..c...t
 PmexE4 .t..t..t.....a..t..g..t...t...t..t..t..tt.a..c...t
 FB,Ch1 .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A..C...T
 FB,Ch2Mc .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A..C...T
 FB,Ch3 .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A..C...T
 FB,Ch4 .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A..C...T
 FB,Ch5 .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A..C...?
 FB,Ch6 .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A..C...T
 FB,Ch7 .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A..C...T
 FB,Ch8Mc .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A..C...T
 FB,Ch9Mc .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A..C...T
 FB,Ch10Mc .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A..C...T
 Coq,Col1 .T..T..T.....T..G.....T...T..G..T..TT.A..C...T
 Coq,Col2 .T..A..T.....T..G.....T...T..G..T..tt.A..C...T
 Coq,Col3 .T..T..T.....T..G.....T...T..g..T..TT.A..C...T
 Coq,Col4 .T..A..T.....T..G.....T...T..G..T..TT.A..C...T
 Coq,Col5 .T..A..T.....T..G.....T...T..G..T..TT.A..C...T
 Coq,Col6 .T..A..T.....T..G.....T...T..g..T..TT.A..C...T
 Coq,Col7 .T..T..T.....T..G.....T...T..T..G..T..TT.A..C...T
 Coq,Col8 .T..T..T.....T..G.....T...T..G..T..TT.A..C...T
 Coq,Col9 .T..T..T.....T..G.....T...T..G..T..TT.A..C...T
 Coq,Col10 .T..T..T.....T..G.....T...T..G..T..TT.A..C...T
 Coq,Col11 .T..T..T.....T..G.....T...T..G..T..TT.A..C...T
 Mad,Col1 .T..T..T.....T..G.....T...T..G..T..TT.A..C...T
 Mad,Col2Mc .T..T..T.....T..G.....T...T..G..T..TT.A..C...T
 Mad,Col3Mc .T..A..T.....T..G.....T...T..G..T..TT.A..C...T
 Mad,Col4Mc .T..T..T.....T..G.....T...T..G..T..TT.A..C...T
 Mad,Col5Mc .T..T..T.....T..G.....T...T..G..T..TT.A..C...T
 Mad,Col6Mc .T..T..T.....T..G.....T...T..G..T..TT.A..C...T
 Po,Ver1Mc .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A.....T
 Po,Ver2Mc .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A.....T
 Po,Ver3Mc .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A.....T
 Piso,Ver1Mc .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A.....T
 Piso,Ver2Mc .T..T..T.....A..T..G..T...T...T..G..T..TT.A.....T

370 380
.....|.....|.....|.....|.....

Pwestermani t gttgcatgatacgtgggttcgtc
PmexE5a.....c..t..a..t..t
PmexG1t..a..t..t
PmexG2t..a..t..t
PmexG3t..a..t..t
PmexG4t..a..t..t
PmexG5t..a..t..t
PmexG6t..a..t..t
PmexG7t..a..t..t
PmexE1a.....c..t..a..t..t
PmexE2a.....c..t..a..t..t
PmexE3a.....c..t..a..t..t
PmexE4a.....c..t..a..t..t
FB,Ch1T..A..T..T
FB,Ch2McT.....T..T
FB,Ch3T..A..T..T
FB,Ch4T..A..T..T
FB,Ch5 ??????????????????????????
FB,Ch6T..A..T..T
FB,Ch7T..A..T..T
FB,Ch8McT..A..T..T
FB,Ch9McT..A..T..T
FB,Ch10McT..A..T..T
Coq,Col1C.....T..A.....T
Coq,Col2C.....T..A.....T
Coq,Col3C.....T..A.....T
Coq,Col4C.....T..A.....T
Coq,Col5C.....T..A.....T
Coq,Col6C.....T..A.....T
Coq,Col7C.....T..A.....T
Coq,Col8C.....T..A.....T
Coq,Col9C.....T..A.....T
Coq,Col10C.....T..A.....T
Coq,Col11C.....T..A.....T
Mad,Col1C.....T..A.....T
Mad,Col2McC.....T..A.....T
Mad,Col3McC.....T..A.....T
Mad,Col4McC.....T..A.....T
Mad,Col5McC.....T..A.....T
Mad,Col6McC.....T..A.....T
Po,Ver1McT.....T..T
Po,Ver2McT.....T..T
Po,Ver3McT..A..T..T
Piso,Ver1McT.....T..T
Piso,Ver2McT..A..T..T