

Lesiones pulmonares en tlacuaches (*Didelphis virginiana*) infectados naturalmente por *Paragonimus mexicanus* en Colima, México

Lung lesions in opossums (*Didelphis virginiana*) naturally infected by *Paragonimus mexicanus* in Colima, Mexico

Luis Jorge García-Márquez* José Luis Vázquez-García** David Osorio-Sarabia***
Virginia León-Régagnon*** Luis García-Prieto*** Rafael Lamothe-Argumedo***
Fernando Constantino-Casas†

Abstract

Paragonimiasis is a zoonotic disease in Mexico caused by adult digeneans of *Paragonimus mexicanus* species. Life cycle of this parasite involves two necessary intermediate hosts: a snail and a crab, and a mammal serving as the definitive host. Humans acquire the infection when eating raw or undercooked crabs infected by metacercariae. In March 2005, six opossums (*Didelphis virginiana*) were captured in Colima, Mexico. These opossums were euthanized in order to identify lesions caused by lung paragonimiasis. Infected lungs were processed and stained following the standard histological techniques. Four of the six opossums (67%) carried 25 adult parasites identified as *P. mexicanus*. The lung with the greatest number of parasites showed 13 multifocally distributed granulomas. The main histological changes were: infiltration of monocytes, lymphocytes, macrophages, plasma cells, epithelioid and giant cells, abundant neutrophils and eosinophils, as well as central necrosis of the eosinophilic granuloma. Likewise, interstitial pneumonia was observed due to the presence of eggs between the granuloma walls and alveolar spaces. This study represents the first description of the pulmonary lesions caused by *P. mexicanus* in wild mammals.

Key words: PARAGONIMIASIS, PARAGONIMUS MEXICANUS, OPOSSUMS, DIDELPHIS VIRGINIANA, HISTOPATHOLOGY, HELMINTHS

Resumen

La paragonimiasis constituye una enfermedad zoonótica con origen en México por el digeneo adulto *Paragonimus mexicanus*. El ciclo de vida de esta especie involucra dos hospederos intermediarios obligatorios: un caracol y un cangrejo, así como un mamífero que actúa como hospedero definitivo. La infección humana ocurre a través de la ingestión de carne de cangrejo cruda o insuficientemente cocida, parasitada por metacercarias. En marzo de 2005, seis tlacuaches (*Didelphis virginiana*) fueron capturados en Colima, México; fueron sacrificados con el fin de extraer los pulmones mediante necropsia para identificar las lesiones ocasionadas por el parásito. Los pulmones parasitados fueron procesados y teñidos de acuerdo con las técnicas histológicas convencionales. Cuatro de los seis (67%) hospederos resultaron infectados por 25 gusanos adultos identificados como *P. mexicanus*. En un pulmón se encontraron hasta 13 granulomas, distribuidos multifocalmente. Los principales cambios histológicos fueron: infiltración inflamatoria de monocitos, linfocitos, macrófagos, células plasmáticas, epitelioides y gigantes, con abundantes neutrófilos y eosinófilos, así como necrosis central del granuloma eosinofílico. Asimismo, se observó neumonía intersticial debido a la presencia de huevos entre las paredes del granuloma y los espacios alveolares. Este estudio representa la primera descripción de lesiones pulmonares ocasionadas por *P. mexicanus* en mamíferos silvestres.

Palabras clave: PARAGONIMIASIS, PARAGONIMUS MEXICANUS, TLACUACHES, DIDELPHIS VIRGINIANA, HISTOPATOLOGÍA, HELMINTOS.

Recibido el 6 de octubre de 2008 y aceptado el 9 de octubre de 2009.

*Centro Universitario de Investigación y Desarrollo Agropecuario, Universidad de Colima, Av. Universidad 333, Colonia Las Víboras, 28040, Colima, Colima, México.

**Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Colima, Av. Universidad 333, Colonia Las Víboras, 28040, Colima, Colima, México.

***Departamento de Zoología, Laboratorio de Helmintología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F. Correo electrónico: vleon@ibiologia.unam.mx

†Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

Introduction

The trematode *Paragonimus mexicanus* is distributed from Mexico to Peru.¹ The adult worm parasitizes the lungs of marsupials, like opossums (*Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum*)² and cats like the ocelot (*Herpailurus yaguaroundi*).³ The eggs are expectorated or swallowed to exit with the feces of the definitive host. The ciliated larva is released in the water, a free swimmer (miracidium), which penetrates the body wall of the first intermediate host (snails of the *Aroaephyrgus* genus)⁴ giving rise to mature sporocysts which divide asexually forming the first generation of rediae. A second generation develops within these, which gives rise to cercariae. The latter leave the snail and are ingested by the second intermediate host (crayfish of the *Pseudothelphusa* genus).⁵ Inside the crab they become naked metacercariae, lodged in the digestive gland. Man and other definitive hosts are infected through ingestion of raw crabs parasitized by metacercariae. These pierce the intestinal wall, reaching the peritoneal cavity, where young worms penetrate the diaphragm and settle in the lungs, reaching the adult stage in about 70 days postinfection. Records of this parasite in wild vertebrates in Mexico include the states of Colima, Chiapas, State of Mexico, Hidalgo, Michoacan, Nayarit, Puebla, San Luis Potosi, Tabasco, Veracruz and Yucatan.¹

Lesions caused by several species of *Paragonimus* have been currently described in their definitive, naturally or experimentally infected hosts (*Paragonimus kellicotti*;⁶⁻⁸ *Paragonimus africanus*,⁹ *Paragonimus uterobilateralis*,⁹ and *Paragonimus westermanii*).¹⁰ However, the only available study on the injuries caused by *P. mexicanus* is very general and describes the pathology caused by this trematode in humans.¹¹ Based on the above, the objective of this study was to describe the pulmonary lesions associated with the presence of *P. mexicanus* in naturally infected opossums (*D. virginiana*) from Colima, Mexico, as part of a study aimed to determine the actual and potential distribution of this worm in its intermediate and definitive hosts.

In March 2005, six opossums were captured (*D. virginiana*) using Tomahawk traps, in a spring near the town of Madrid (19 ° 04 '56"N, 103 ° 52' 27.4" W), municipality of Tecoman, Colima, Mexico. Opossums were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital. Necropsy was performed to extract the lungs searching for nodules that indicated the presence of the parasite. Distribution, shape, size, weight, color, texture, number of parasites per node and type of exudates were recorded for the infected lungs. Some parasites were processed for morphological study according to Lamothe.¹²

Introducción

El trematodo *Paragonimus mexicanus* se distribuye desde México hasta Perú;¹ el gusano adulto parasita los pulmones de marsupiales, como los tlacuaches (*Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum*)² y félidos como el tigrillo (*Herpailurus yaguaroundi*).³ Los huevos son expectorados o deglutidos para salir con las heces del hospedero definitivo; en el agua liberan una larva ciliada, libre nadadora (miracidio), que penetra la pared corporal del primer hospedero intermediario (caracoles del género *Aroaephyrgus*)⁴ dando origen a un esporocisto maduro que se divide asexualmente formando la primera generación de redias. Dentro de éstas se desarrolla una segunda generación, que da lugar a las cercarias. Estas últimas abandonan al caracol y son ingeridas por el segundo hospedero intermediario (cangrejos del género *Pseudothelphusa*).⁵ En el interior del cangrejo se transforman en metacercarias desnudas, alojadas en la glándula digestiva. El hombre y otros hospederos definitivos se infectan a través de la ingestión de cangrejos crudos parasitados por metacercarias; éstas, en el aparato digestivo, perforan la pared intestinal, llegando a la cavidad peritoneal, donde los gusanos jóvenes atraviesan el diafragma y se instalan en los pulmones, alcanzando el estado adulto en aproximadamente 70 días posinfección. Los registros de este parásito en México en vertebrados silvestres incluyen los estados de Colima, Chiapas, Estado de México, Hidalgo, Michoacán, Nayarit, Puebla, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán.¹

Actualmente se han descrito las lesiones causadas por varias especies de *Paragonimus* en sus hospederos definitivos, natural o experimentalmente infectados (*Paragonimus kellicotti*;⁶⁻⁸ *Paragonimus africanus*⁹ *Paragonimus uterobilateralis*,⁹ y *Paragonimus westermanii*).¹⁰ Sin embargo, el único estudio disponible sobre las lesiones ocasionadas por *P. mexicanus* es muy general y describe la histopatología causada por este trematodo en humanos.¹¹ Con base en lo anterior, el objetivo del trabajo fue describir las lesiones pulmonares asociadas con la presencia de *P. mexicanus* en tlacuaches (*D. virginiana*) infectados naturalmente en Colima, México, como parte de un estudio que pretende determinar la distribución real y potencial de este helminto en sus hospederos intermediarios y definitivos.

En marzo de 2005 fueron capturados seis tlacuaches (*D. virginiana*) mediante trampas del tipo Tomahawk, en un manantial cercano a la población de Madrid (19° 04' 56" N, 103° 52' 27.4" O), municipio de Tecomán, Colima, México. Los tlacuaches fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico. Se

Parasitized lungs were fixed in 10% buffered formalin, pH 7.2, embedded in paraffin, cut to a thickness of 6 μ m, then dyed with hematoxylin - eosin, PAS, and Masson trichrome.¹³ Reference worms and histological lesions were deposited in the Colección Nacional de Helminthos (CNHE), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, with catalog numbers 5998 and 5999 CNHE.

Four of six opossums (67%) were positive for *P. mexicanus*, with a mean intensity of infection of 6.25. These values were lower than previously recorded in the same host and locality: 88% prevalence and mean intensity of 12.25 and 13.9, respectively.^{14,15} The 25 adult worms collected showed the diagnostic features described for *P. mexicanus*: ovary with sensitive branches, size of oral and acetabular suckers (1.10×0.57 mm and 0.83×0.78 , respectively), as well as egg size (0.068×0.040).¹⁶ The study was based on the lungs infected with the largest number of granulomas (13) distributed multifocally: seven in the right lung (two in the cranial lobe, one in the cardiac and four in the caudal lobe) and six in the left one (two in the cranial lobe and four in the caudal). Granulomatous pneumonia was nodular (nodules: 5 to 16 mm $\times$ 4 to 17 mm width; weight: 0.1-1.1 g). Granulomas were multifocal, soft and grayish. When cut granuloma presented cavities with reddish fluid and the presence of two parasites. Interstitial pneumonia was diffuse, elastic, soft and pinkish, without the presence of exudate.

The histological description corresponded to multifocal eosinophilic granuloma, distributed on the lung parenchyma, forming well-defined areas with thick walls of fibrous connective tissue. Within the granuloma and between spaces, ducts and alveolar walls of the periphery, there was an infiltration of mononuclear inflammatory cells: monocytes, lymphocytes, macrophages, plasma cells, epithelioid cells and giant cells, plus polymorphonuclears; neutrophils and numerous eosinophils.

The adult parasite was found in the center of the granuloma. Its body had thick tegument with spines distributed at its periphery. Oral sucker, acetabulum and muscular pharynx were observed within the parenchyma. The vitellogenic glands were distinguished laterally and distributed throughout the parenchyma. Central necrosis and dystrophic mineralization were observed in some granulomas.

Operculated and yellowish eggs of the parasites were observed inside and on the walls of granulomas as well as in alveolar spaces and ducts nearby, along with a heavy infiltration of neutrophils and eosinophils.

Other changes were observed in the walls, ducts and alveolar spaces, such as congestion, hemorrhage, edema, macrophages with heme pigment and the

les aplicó la necropsia para extraer los pulmones en busca de nódulos que indicaran presencia del parásito. Para los pulmones infectados se registró la distribución, forma, tamaño, peso, color, consistencia, número de parásitos por nódulo y tipo de exudados. Algunos parásitos fueron procesados para su estudio morfológico de acuerdo con Lamothe.¹² Los pulmones parasitados se fijaron con formol amortiguado al 10%, con pH 7.2; se incluyeron en parafina, se cortaron a un espesor de 6 μ m, finalmente se tiñeron con hematoxilina-eosina, PAS, y tricrómica de Masson.¹³ Ejemplares de referencia y cortes histológicos de las lesiones fueron depositados en la Colección Nacional de Helminthos (CNHE), del Instituto de Biología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, con números de catálogo CNHE 5998 y 5999.

Cuatro de seis tlacuaches (67%) resultaron positivos a *P. mexicanus* con intensidad promedio de infección de 6.25; estos valores fueron inferiores a los registrados previamente en el mismo hospedero y localidad: 88% de prevalencia y 12.25 y 13.9 de intensidad promedio, respectivamente.^{14,15} Los 25 gusanos adultos recolectados mostraron rasgos diagnósticos descritos para *P. mexicanus*: ovario con ramificaciones delicadas, dimensiones de las ventosas oral y acetábulo (1.10×0.57 mm y 0.83×0.78 , respectivamente), así como el tamaño de los huevos (0.068×0.040).¹⁶ El estudio se basó en los pulmones infectados con el mayor número de granulomas (fueron 13) distribuidos multifocalmente: siete en el pulmón derecho (dos en el lóbulo craneal, uno en el cardíaco y cuatro en el caudal) y seis en el izquierdo (dos en el lóbulo craneal y cuatro en el caudal). La neumonía granulomatosa fue de tipo nodular (nódulos: 5 a 16 mm $\times$ 4 a 17 mm de ancho; peso: 0.1-1.1 g). Los granulomas se distribuyeron multifocalmente, eran blandos y de color grisáceo. Al corte el granuloma presentó cavernas con líquido rojizo y presencia de dos parásitos. La neumonía intersticial fue difusa, elástica, suave y de color rosáceo, sin presencia de exudado.

La descripción histológica correspondió a granulomas eosinofílicos, distribuidos multifocalmente sobre el parénquima pulmonar, formando áreas bien delimitadas con paredes gruesas de tejido conjuntivo fibroso. Dentro del granuloma y entre los espacios, ductos y paredes alveolares de la periferia, se observó una infiltración inflamatoria de células mononucleares; monocitos, linfocitos, macrófagos, células plasmáticas, células epitelioides y células gigantes, además de polimorfonucleares, neutrófilos y abundantes eosinófilos.

En el centro del granuloma se encontró al parásito adulto; su cuerpo presentó tegumento grueso con espinas distribuidas en su periferia. Dentro del parénquima se observó la ventosa oral, el acetábulo y la

presence of a homogeneous eosinophilic material forming compactly hyaline membranes. Peribronchial and perivascular lymphoid hyperplasia were observed; bronchial hyperplasia was seen within the bronchi. Hyperplasia of type II pneumocytes along with fibroplasias and emphysema were found in the alveolar walls of the lungs.

Lesions occurred most frequently in the right caudal lobe, with seven granulomas and 14 parasites. This coincided with that observed in experimental infections in cats with *P. kellicotti*⁶ and natural human infections with *P. westermanii*.¹⁰ Microscopic lesions such as inflammatory infiltrate with neutrophils, eosinophils and macrophages along with plasma cells, and even the formation of granulomas, are changes that characterize the lesions described for other species of the same genera in natural and experimental infections in cats, bobcats, monkeys and dogs.⁶⁻¹⁰ Furthermore, alterations in alveolar spaces and walls in this study are similar to those described for natural definitive host (dogs, minks, skunks, foxes, coyotes and mice) of *P. kellicotti*¹⁷ and *P. westermanii*.¹⁸

The lesions described in this study were caused by the parasite during the stages of infection: migration, penetration, implantation, growth, maturation, secretion of substances and egg production. In this context, *Paragonimus mexicanus* produced two types of reactions in the opossum lungs: an eosinophilic granulomatous pneumonia caused by encystment of the parasite in the lung parenchyma and interstitial pneumonia due to the presence of parasite eggs among the alveolar spaces. The homogeneity of the lesions observed between different host species, including man, by the different species of *Paragonimus*, suggests that the histopathology caused by *P. mexicanus* infection in humans is very similar to the one described here, the appearance coincided with preliminary observations on this species.^{11, 19}

The symptoms caused by these injuries are dyspnea, cough and progressive weight loss. So far, the number of human cases of paragonimiasis in Mexico is relatively low compared to other Latin American countries. In Colima, Mexico, where prevalence in definitive hosts is high, it was established that 3.29% of the population of Comala, Coquimatlan and Madrid, were infected by this parasite, by using the intradermal-reaction method.²⁰⁻²²

The likely explanation for this result could be in the almost zero ingestion of raw crabs by the Mexican population, or that the symptoms can be confused with other lung conditions such as tuberculosis or histoplasmosis.²⁰

faringe musculosa. Lateralmente y distribuidas en todo el parénquima, se distinguieron glándulas vitelógenas. En algunos granulomas se observó necrosis central y mineralización distrófica.

En el interior y en las paredes de los granulomas, así como en los espacios y ductos alveolares cercanos, se observaron huevos operculados y amarillentos de los parásitos con un infiltrado de neutrófilos y abundantes eosinófilos.

En las paredes, ductos y espacios alveolares se presentaron otros cambios, como: congestión, hemorragias, edema, macrófagos con pigmento hemático y presencia de un material eosinofílico homogéneo dispuesto compactamente formando membranas hialinas. En forma peribronquial y perivascular se registró hiperplasia del tejido linfóide; al interior de los bronquios, hiperplasia bronquial. En las paredes alveolares, hiperplasia de neumocitos tipo II, así como enfisema y fibroplasia del tejido pulmonar.

Las lesiones se presentaron con mayor frecuencia en el lóbulo caudal derecho, con siete granulomas y 14 parásitos, ello coincidió con lo observado en infecciones experimentales en gatos con *P. kellicotti*⁶ y en infecciones naturales en humanos con *P. westermanii*.¹⁰ Lesiones microscópicas, como infiltrado inflamatorio con neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, así como células plasmáticas e incluso la formación de granulomas, son cambios que caracterizan las lesiones descritas para otras especies del género en infecciones naturales y experimentales en gatos, lince, monos y perros.⁶⁻¹⁰ Asimismo, las alteraciones en los espacios y paredes alveolares en el presente estudio son similares a las registradas para hospederos definitivos naturales (perros, minks, zorrillos, zorros, coyotes y ratones) de *P. kellicotti*¹⁷ y *P. westermanii*.¹⁸

Las lesiones descritas en este estudio fueron causadas por el parásito durante las fases del proceso de infección: migración, penetración, implantación, crecimiento, maduración, secreción de sustancias y producción de huevos. En este contexto, *Paragonimus mexicanus* produjo dos tipos de reacciones en los pulmones de los tlacuaches: una neumonía granulomatosa eosinofílica ocasionada por el enquistamiento del parásito en el parénquima pulmonar y una neumonía intersticial debida a la presencia de huevos del parásito entre los espacios alveolares. La homogeneidad de las lesiones observadas entre las diversas especies de hospederos, incluyendo al hombre, por las diferentes especies de *Paragonimus*, sugiere que la histopatología producida por la infección de *P. mexicanus* en humanos es muy similar a la descrita aquí, dicho aspecto coincidió con observaciones preliminares sobre esta especie.^{11,19}

La sintomatología originada por este tipo de lesiones consiste en: disnea, tos y pérdida progresiva de peso. Hasta ahora, el número de casos humanos

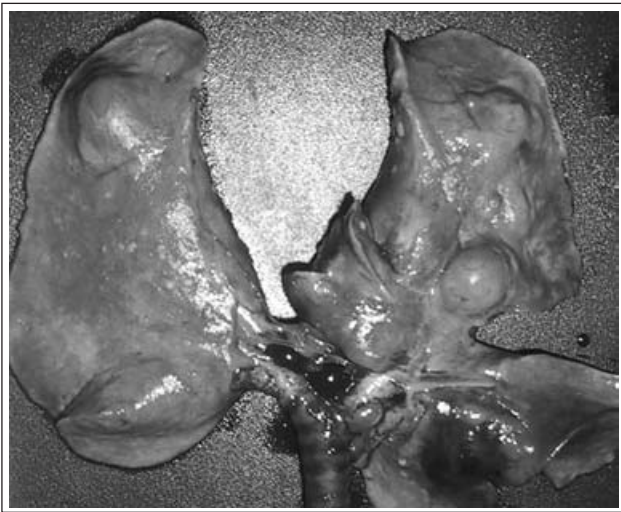


Figura 1. Pulmón de tlacuache (*Didelphis virginiana*), infectado naturalmente con *P. mexicanus*. Se observan múltiples granulomas en los lóbulos caudales, de tamaños y pesos variables, con pared delgada, color blanco-grisáceo y consistencia blanda.

Figure 1. Opossum lung (*Didelphis virginiana*), naturally infected with *P. mexicanus*. Multiple granulomas are seen in the caudal lobes of varying sizes and weights, thin-walled, gray-white and soft consistency.

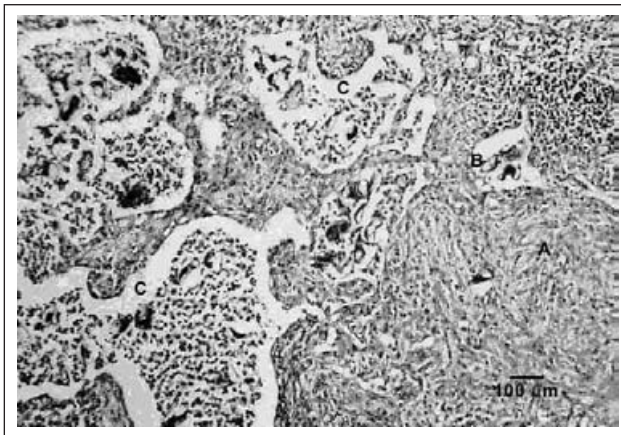


Figura 3. Pulmón de *D. virginiana* con neumonía intersticial. A) Hiperplasia de neumocitos II y fibroplasia de las paredes alveolares. B) Presencia de huevos operculados de *P. mexicanus* en los ductos y espacios alveolares. C) Infiltración de neutrófilos, eosinófilos y huevos en los espacios y paredes alveolares. H-E. Barra 100 µm.

Figure 3. *D. virginiana* lung with interstitial pneumonia. A) Type II pneumocyte hyperplasia and fibroplasia of the alveolar walls. B) Presence of operculated eggs of *P. mexicanus* in the ducts and alveolar spaces. C) Infiltration of neutrophils, eosinophils, and eggs in the alveolar spaces and walls. H-E. Bar 100 µm.

Acknowledgments

Victor Montaña Plascencia and Luis David Aguilar Romero are thanked for their help in collecting specimens and conducting histological preparations. This study was partially funded by the PAPIIT-UNAM project IN221307 and by scholarship to Virginia Leon-Regagnon by the Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico of the UNAM.

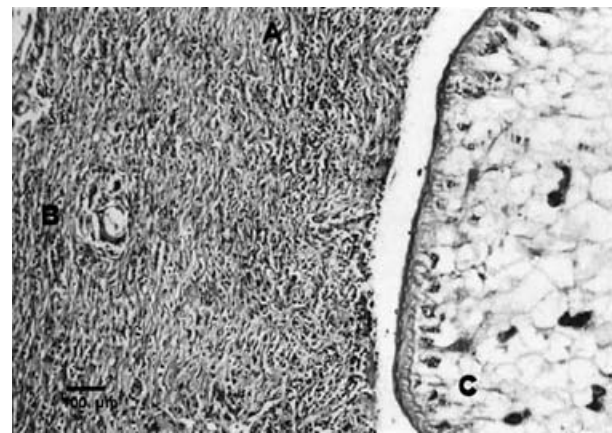


Figura 2. Pulmón de *D. virginiana* con granuloma eosinofílico. A) Cápsula gruesa de tejido conjuntivo fibroso. B) Células epitelioides y gigantes. C) *P. mexicanus* con tegumento grueso y espinoso, con glándulas vitelógenas. H-E. Barra 100 µm.

Figure 2. *D. virginiana* lung with eosinophilic granuloma. A) Thick capsule of fibrous connective tissue. B) Epithelioid and giant cells. C) *P. mexicanus* with thick and thorny tegument, with vitellogenic glands. H-E. Bar 100 µm.



Figura 4. Corte tangencial de un ejemplar adulto de *Paragonimus mexicanus* en pulmón de *Didelphis virginiana*. A) Espinas tegumentarias. B) Tegumento. C) Parénquima. D) Acetábulo. E) Glándulas vitelógenas. H-E. Barra en µm.

Figure 4. Tangential section of an adult specimen of *Paragonimus mexicanus* in *Didelphis virginiana* lungs. A) Tegumentary spines. B) Tegument. C) Parenchyma. D) Acetabulum. E) Vitellogenic glands. H-E. Bar in µm

de paragonimiasis en México es relativamente bajo en comparación con otros países de Latinoamérica; en Colima, donde la prevalencia en los hospederos definitivos es elevada, se estableció mediante el método de intradermorreacción, que 3.29% de la población de Comala, Coquimatlán y Madrid, estuvieron parasitados por este helminto.²⁰⁻²²

La explicación posible de este resultado podría ser en la casi nula ingestión de cangrejos crudos por parte de la población mexicana, o bien que la sintomatología puede confundirse con la de otros padecimientos pulmonares, como la tuberculosis o la histoplasmosis.²⁰

Referencias

1. LAMOTHE AR. La paragonimiasis en el continente americano. Salud P  b M  x 1985; 27:514-523.
2. LAMOTHE AR, MALEK A, MEAVE O. *Aroapyrgus alleii* Morrinson, 1946 (Gastropoda: Hydrobiidae) first intermediate host of *Paragonimus mexicanus* in Colima, Mexico. J Parasitol 1983; 69:226-228.
3. LAMOTHE AR, CABALLERO JD, LÁZARO EC. *Pseudothelphusa* (P.) *dilatata* Rathbun (Crustacea: Decapoda), segundo hospedero intermediario de *Paragonimus mexicanus* (Trem  toda). An Inst Biol Univ Nal Autón M  x 1977; 48:295-298.
4. LAMOTHE AR, CABALLERO J, PINEDA R, MEAVE O. Hallazgos de *Paragonimus mexicanus* en un nuevo hospedero y una nueva localidad en México. Univ Ciencia 1985; 2:41-45.
5. LAMOTHE AR, JAIMES B. Nota sobre un hospedero nuevo y una localidad nueva de *Paragonimus mexicanus* en México. An Inst Biol Univ Nal Autón M  x Ser Zool 1993; 64:171-172.
6. HOOVER EA, DUBEY JP. Pathogenesis of experimental pulmonary paragonimiasis in cats. Amer J Vet Res 1978; 39:1827-1832.
7. WEINA PJ, ENGLAND DM. The American lung fluke *Paragonimus kellicotti*, in cat model. J Parasitol 1990; 76:568-572.
8. SNYDER DE, HAMIR AN. Lesions associated with pulmonary parasites in bobcats (*Felis rufus*) from Arkansas. J Wildlife Dis 1991; 27:170-174.
9. RACZ P, TENNER K. Histopathological alterations in rhesus monkeys after experimental infections with African lung flukes (*Paragonimus africanus* and *Paragonimus uterobilateralis*). Tropenmed Parasitol 1977; 28:149-157.
10. CHOI WY. *Paragonimus westermani*: Pathogenesis and clinical features of infection. Arzneimittelforschung Drug Res 1984; 434:1184-1185.
11. RUIZ-HERNÁNDEZ AL. Paragonimosis. En: BECERRIL-FLORES MA, ROMERO-CABELLO R, editores. Parasitología Médica. De las moléculas a la enfermedad. México DF: McGraw-Hill, 2004:165-171.
12. LAMOTHE AR. Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos de animales silvestres. México DF: A.G.T. Editores, 1997.
13. LEE G, LUNA HT. Histological staining methods of the

Agradecimientos

Se agradece a Víctor Montaño Plascencia y Luis David Aguilar Romero su ayuda en la recolección de ejemplares y en la realización de preparaciones histológicas. Este estudio fue parcialmente financiado por el proyecto PAPIIT-UNAM IN221307 y por la beca otorgada a Virginia León-R  gagnon por el Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico de la UNAM a VLR.

Armed Forces. Institute of Pathology. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1968.

14. MIYAZAKI I, KIFUNE T, LAMOTHE AR. Taxonomical and biological studies on the lung flukes of Central America. Occas Publ Fukuoka Univ 1980; 2:1-80.
15. LAMOTHE AR. *Paragonimus mexicanus* y paragonimiasis en México y América (tesis de doctorado). México DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 1990.
16. MIYAZAKI I, ISHII Y. Studies on the Mexican lung flukes, with special reference to a description of *Paragonimus mexicanus* sp. nov. (Trematoda: Troglotrematidae). Jap J Parasitol 1968; 17:445-453.
17. PRESIDENTE JJ, RAMSDEN RO. *Paragonimus kellicotti* infection in wild carnivores in southwestern Ontario: II. Histopathologic features. J Wildlife Dis 1975; 11:364-375.
18. FUKUDA K, FUJINO T. Studies on host specificity in *Paragonimus westermani*: ultrastructural study of inflammatory reactions to the parasite in rat muscles. Int J Parasitol 1993; 23:757-763.
19. REDONDO BR. Diagnóstico integral de la paragonimiasis pulmonar. Rev Mex Patol Clin 1987; 34:209-213.
20. LAMOTHE AR.   s la paragonimiasis un problema de salud pública en México? Rev Mex Parasitol 1989; 2:19-20.
21. VELEZ I, VELÁZQUEZ LE, VELEZ ID. Morphological description and life cycle of *Paragonimus* sp. (Trematoda: Troglotrematidae): causal agent of human paragonimiasis in Colombia. J Parasitol 2003; 89:749-755.
22. YOKOGAWA M. Pathobiological studies on paragonimiasis in Mexico. Chiba, Japan: Chiba University, 1985.