



Variabilidad genética y estructura de poblaciones de *Coccidioides* spp.

María del Rocío Reyes-Montes,* María Guadalupe Frías de León,**
Gustavo Acosta-Altamirano,** Itzel Elena Portillo-Yáñez,* Rosa Carina Soto-Fajardo,*
José Enrique Martínez-Hernández,* Esperanza Duarte-Escalante*

RESUMEN

La coccidioidomicosis es una enfermedad endémica del continente americano y es causada por los hongos *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*. Estos patógenos humanos han sido objeto de estudios epidemiológicos y han revelado variabilidad genética, así como una estructura de población recombinante, además de un sistema de reproducción sexual aún no confirmado. Esta revisión presenta un panorama general de los trabajos acerca de la variación genética y estructura de poblaciones. La diversidad genética en estas especies puede tener implicaciones importantes en la virulencia y susceptibilidad a los antifúngicos, entre otros.

Palabras clave: Diversidad genética, fenotipificación, genotipificación.

ABSTRACT

Coccidioidomycosis is a disease that is endemic to North and South America, and is caused by the fungus *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. Several studies suggest genetic variability in these fungi. There is also a recombinant reproductive system, besides a sexually system reproduction, however, this is not confirmed. This review presents an overview of the works on the genetic variability and population structure. Genetic diversity in these species may have important implications in virulence and antifungal susceptibility.

Key words: Genetic variability, phenotyping, genotyping.

INTRODUCCIÓN

Coccidioides immitis y *Coccidioides posadasii* son los agentes causales de la coccidioidomicosis, una enfermedad endémica en el continente americano.¹ Las zonas endémicas más importantes de esta micosis son el suroeste de Estados Unidos, norte de México (MX), Centroamérica y la región precordillerana de América del Sur.² Las condiciones del hábitat, descritas para el desarrollo de la fase saprobia de estos hongos, son suelos arenosos de zonas áridas, donde la precipitación pluvial es < 500 mm.³⁻⁵

La infección en humanos y otras especies de mamíferos se produce por la inhalación de artroconidios, los cuales son dispersados por el aire. Una vez en el huésped se con-

vierten en esférulas que contienen gran cantidad de endosporas y cada una de éstas es capaz de dar origen a otra esférula. En caso de enfermedad, ésta inicia con un cuadro respiratorio agudo, en general benigno, con cura espontánea; sin embargo, puede evolucionar hacia formas clínicas progresivas, que diseminan a los tejidos cutáneo, subcutáneo, visceral y óseo. Estas formas progresivas severas son causantes de una alta morbimortalidad y comúnmente están asociadas a pacientes inmunocomprometidos.⁶

En la naturaleza, las especies del género *Coccidioides* producen abundantes artroconidios a través de un mecanismo de reproducción asexual, los cuales pueden ser inhalados por huéspedes mamíferos (entre ellos, los humanos) y causar enfermedad, provocando brotes epidémicos en zonas endémicas, lo que ha conducido a examinar la variabilidad fenotípica y genotípica en poblaciones de *Coccidioides* spp. a través de la aplicación de diversas técnicas de tipificación.

Es importante señalar que los primeros estudios dirigidos a identificar la variabilidad genotípica en poblaciones

* Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

** División de Investigación, Hospital Juárez de México.

Cuadro 1. Diferencias especie-específicas entre los genomas de *C. immitis* y *C. Posadasii*.

	<i>C. immitis</i>	<i>C. posadasii</i>
Genoma (No. de contigs)	7	58
Tamaño de genoma	28.9 Mb	27 Mb
Genes (n)	10,355	7,229
Secuencias repetitivas	17%	12%
Dinucleótidos CpG*	19% más abundantes en secuencias no repetitivas	19% más abundantes en secuencias no repetitivas
Genes específicos	282	66
Regiones conteniendo genes especie-específicos	53	45
Genes expresados en regiones conteniendo genes especie-específicos	132	42

CpG: citosina-fosfato-guanina.

del género *Coccidioides* sólo consideraron la especie *C. immitis*, ya que la especie *C. posadasii* fue formalmente reconocida hasta 2002.¹

VARIABILIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA DE POBLACIONES

Uno de los primeros estudios orientados a identificar variación genética en *Coccidioides* fue a través del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), a partir de DNA obtenido de 15 aislados de pacientes en California. Los resultados mostraron un patrón RFLP similar en 13 de los 15 aislados, y un segundo patrón en los dos aislados restantes, lo que era indicativo de que los dos aislados presentaban diversidad genética con respecto al resto de los aislados.⁷

Otro estudio se realizó con aislados de *C. immitis*, obtenidos de pacientes de un hospital de Tucson, Arizona, después de un brote epidémico ocurrido en California, utilizando la técnica de amplificación al azar con oligonucleótidos arbitrarios (RAPD),⁹ además de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSPC), y secuenciación de DNA. Los resultados indicaron que aislados de diferentes pacientes tenían genotipos diferentes, hecho que por sí mismo sugería también variabilidad genética y apoyaba la existencia de un proceso de recombinación en este hongo.⁸

Por otro lado, uno de los primeros trabajos en aportar información acerca de la estructura de poblaciones de *C. immitis*, a través de la tipificación de secuencias multilocus (MLST),¹⁰ evidenció una diferenciación genética entre las tres poblaciones de *C. immitis* y sugirió un nivel muy bajo de flujo de genes entre las poblaciones.

A través de la genealogía de genes con una muestra de 17 cepas de *C. immitis*, procedentes de California, Texas,

Arizona, México y Argentina, otros autores^{11,12} probaron si la especie era recombinante en su conjunto o si existía una diferenciación geográfica en las distintas poblaciones. Para este fin compararon las genealogías de fragmentos de cinco genes nucleares identificados en *C. immitis*:

- **CHS1.** Codifica para quitina sintetasa.¹³
- **pyrG.** Codifica para la orotidina 59-monofosfato descarboxilasa (OMPD).¹⁴
- **tcrP.** Codifica para una proteína de células T reactivas con homología a la 4-hidroxi-fenil-piruvato dioxigenasa (4-hydroxi-fenil-piruvato dioxigenasa) (4-HPPD).¹⁵
- Un gene que codifica para un antígeno de pared, correspondiente a una enzima serina proteasa con homología a la quimiotripsina humana.¹⁶
- **CTS2.** Un gene para un antígeno de fijación de complemento con homología para quitinasas de bacterias.^{17,18}

La genealogía de cada uno de los cinco locus mostró una longitud mínima entre ellos, indicativa de no recombinación; sin embargo, cuando se analizó la genealogía a través de los loci, encontraron que el árbol más parsimonioso revelaba incompatibilidad, con respecto a los árboles construidos de manera individual, indicativa de recombinación en *C. immitis*. Además, llevaron a cabo un análisis de partición de varianza, el cual puso de manifiesto una subdivisión de *C. immitis* en dos taxones (Clado-California y Clado-no California), relacionados con el origen geográfico de los aislados.

Fisher y cols.,¹ a través de la selección de marcadores microsatélites analizaron 25 aislados procedentes de Bakersfield y 12 aislados clínicos del mismo lugar obtenidos durante el brote epidémico entre 1993-1994 en California; incluyeron dos representantes externos no California, uno de Arizona y un aislado de Guatemala. Además, ampliaron

los datos de variables ambientales y utilizaron un análisis estadístico retrospectivo para determinar si estos factores se correlacionaban con la epidemividad de *C. immitis*. Por medio de estos marcadores comprobaron que los 37 aislados obtenidos en Bakersfield correspondían a *C. immitis* California. Entre estos aislados hubo 34 genotipos diferentes y su estructura de población fue coherente con una población recombinante, en lugar de una población clonal.¹⁹

En un trabajo posterior¹ se aumentó el número de aislados procedentes de diversas regiones geográficas para corroborar observaciones previas, utilizando nueve loci microsatélites. Los resultados mostraron la separación de dos taxa de *Coccidioides* que correspondían a dos especies filogenéticas, apoyando hallazgos previos. Además, se corroboró que *C. posadasii* representa un clado monofilético recombinante. De esta manera, los análisis filogenéticos, utilizando polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), genes y microsatélites definieron la separación de las dos especies, para los aislados procedentes de áreas endémicas de California se reservó el nombre de *C. immitis*, y los aislados procedentes de áreas endémicas de Arizona, Texas, México y América del Sur, se denominaron *C. posadasii*.

Asimismo, los estudios realizados por diversos autores^{1,8,10-12,19} sugieren una estructura de población recombinante para ambas especies, definidas como *C. immitis* y *C. posadasii*; sin embargo, hasta la fecha el ciclo sexual continúa sin ser observado.

Recientemente se ha descrito información importante sobre el genoma de *Coccidioides* spp.,^{20,21} lo que ha confirmado la identidad de las dos especies. Sharpton, y cols.²⁰ secuenciaron los genomas de *C. posadasii* (C7359) y *C. immitis* (RS), además de otros hongos pertenecientes al orden *Onygenales*, mostrando diferencias entre *C. posadasii* y *C. immitis* (Cuadro 1). En los genomas de ambos hongos, el contenido de GC en secuencias repetitivas es de 14-15% más bajo que el contenido de GC

de las secuencias no repetitivas. Por otra parte, en *C. immitis* los dinucleótidos CpG son 19 veces más abundantes en secuencias no repetitivas que en las secuencias repetitivas. En contraste, en secuencias no repetitivas hay una frecuencia promedio de 51 dinucleótidos CpG por kilobase, y muestra que 73% de las regiones repetitivas no tienen dinucleótidos CpG, mientras que existen tramos contiguos de las ventanas de 100 kb, con una frecuencia de CpG muy baja (0.08 dinucleótidos CpG por kilobase).²⁰

Por lo que se refiere a la estructura cromosómica de *Coccidioides*, el primer estudio reportado en la literatura encaminado a conocer el número de cromosomas en este hongo y a examinar la variabilidad cromosómica entre 12 aislados clínicos, a través de la técnica de electroforesis de campo pulsado (PFGE), y de ensayos de hibridación con sondas de DNA derivadas de un fragmento conservado de un gene ribosomal y tres genes de *C. immitis*, clonados previamente, mostró la existencia de cuatro cromosomas en la mayoría de los aislados. El tamaño de los cromosomas obtenido en este estudio fue de 3.2 a 11.5 Mb. Por otro lado, con base en los tamaños moleculares promedio de las bandas de ADN cromosómico, el tamaño calculado del genoma de *C. immitis* fue de 29.0 ± 3.0 Mb.²² Sin embargo, la información más reciente sobre el genoma de estos hongos indica que tanto *C. immitis* como *C. posadasii* tienen cinco cromosomas.²⁰ Además, los autores identificaron diferencias especie-específicas en la estructura cromosómica en secuencias homólogas < 500 pb. Por otro lado, de los 23.8 Mb de las secuencias no repetitivas en *C. immitis*, el 22.3 Mb (93.5%) presenta homología con el genoma de *C. posadasii*, con una identidad promedio de secuencias de 98.3% entre los aislados estudiados. Por lo tanto, 1.5 Mb de DNA no repetitivo de *C. immitis* carece de similitud significativa con *C. posadasii*. Un análisis recíproco confirmó las secuencias homólogas de 22.3 Mb, e identificó 1.1 Mb de DNA no repetitivo de *C. posadasii* que está ausente en *C. immitis*. Las secuencias de ambos hongos muestran que a pesar de tener un tamaño similar al de otros ascomicetos filamentosos, los genomas de los *Onygenales* son inusuales en su número de cromosomas, pues mientras que la mayoría de los ascomicetos filamentosos tienen entre siete y ocho cromosomas, los genomas de *C. immitis* y *C. posadasii* sólo tienen cinco.²⁰

Por otro lado, la secuenciación de genomas de 18 aislados de *C. immitis* y *C. posadasii*, incluyendo dos aislados secuenciados previamente,²⁰ mostró que el tamaño estimado para los genomas fue desde 25.45 a 28.95 Mb, y aportó nueva información acerca de la composición de sus genomas (Cuadros 2 y 3).²¹

Cuadro 2. Composición de los genomas de 18 aislados de *C. immitis* y *C. Posadasii*.

	Datos promedio
Tamaño del genoma	25.45-28.95 Mb
SNPs* (687,250)	389, 250 intergénicos 58,054 intrónicos 46,791 regiones no traducidas 96,505 codificantes sinónimas 95,235 codificantes no sinónimas
Elementos repetitivos	8-21%

*SNPs: polimorfismos de nucleótido simple.

Cuadro 3. Comparación de los genomas de *C. immitis* y *C. posadasii*.

	<i>C. immitis</i>	<i>C. posadasii</i>
Cepa	RS	C735
Tamaño de genoma	28.9 Mb	27 Mb
Contigs (n)	7	58
Genes (n)	10,355	7,229
Longitud promedio de los genes	1679	2061
GC (%)	46	46.6
GC codificante (%)	49.9	49.7
GC no codificante (%)	46.2	45.8
Número promedio de intrones por gene	2.3	2.3
Número promedio de exones por gene	3.4	3.3

Los trabajos de Sharpton y cols.²⁰ y de Neafsey y cols.²¹ evidenciaron que tanto *C. immitis* como *C. posadasii* albergan una importante variación genética en sus poblaciones. Este último mostró que el grado de divergencia interespecífica se produjo en los últimos cinco millones de años, mientras que el análisis de 16 genomas adicionales²¹ reveló importantes variaciones funcionales intraespecíficas a través de la detección de SNPs y las inserciones de elementos repetitivos. En este contexto, los datos de la divergencia entre especies ha permitido inferir que entre *C. immitis* y *C. posadasii* ha ocurrido introgresión de genes.²¹

Los trabajos enfocados a estudiar la variabilidad genética de estos hongos coinciden en que éstos presentan variabilidad, lo que ha llevado a plantear la siguiente pregunta: ¿También existe alta variabilidad fenotípica en estos hongos? Sin embargo, la pregunta aún no se ha respondido con seguridad, pues dada la naturaleza de estos hongos, los trabajos al respecto son escasos. A continuación se hará una breve reseña de lo que se conoce hasta el momento.

Varios autores realizaron estudios dirigidos a identificar diferencias fenotípicas entre ambas especies, fundamentalmente a partir del reconocimiento de la especie *C. posadasii*.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE *C. IMMITIS* Y *C. POSADASII*

Los primeros trabajos en sugerir la importancia de altas concentraciones de sales para el desarrollo del hongo, realizados con aislados de *C. immitis* obtenidos de muestras de suelos superficiales de zonas endémicas, revelaron una marcada elevación de sales solubles.^{23,24}

Además, un estudio acerca de la ecología del suelo, asociado al desarrollo de *C. immitis*, demostró que todas las muestras en una zona endémica de coccidioidomicosis

eran positivas para el hongo; tenían como característica que eran suelos alcalinos con textura arenosa, y al parecer estas características fueron más importantes que el contenido orgánico del suelo en esta relación.²⁵

Por otro lado, el trabajo de Fisher y cols.¹ sugiere que la concentración de sales para el crecimiento de los hongos es importante; *C. posadasii* crece más lentamente en medios de cultivo conteniendo altas concentraciones de sal. Aunque observaron solapamientos en las tasas de crecimiento entre las dos especies y que la diferencia es significativa, por lo que este fenotipo no es suficiente para distinguir entre ambas especies.

Un trabajo relativamente reciente en el que estudiaron las características ecológicas de *Coccidioides spp.* de aislados obtenidos del noreste de Brasil, aportó información relevante acerca de la tipificación fenotípica de *Coccidioides spp.*²⁶ Al examen micológico los resultados mostraron colonias con textura glabra, aterciopelada o algodonosa y una cantidad importante de artroconidios. Tasas de crecimiento más lentas en los aislados crecidos en medio de cultivo con 8% de NaCl, mientras que la máxima tasa de crecimiento se obtuvo a 30 °C, a concentraciones más bajas de NaCl, con un rango de tolerancia de pH de 4.0 a 11.0. También se demostró que varios carbohidratos y fuentes de polialcoholes pueden ser eficientemente metabolizados por *Coccidioides spp.* en su forma micelial. Otras observaciones mostraron que hubo ausencia total de crecimiento, en medios suplementados con ácido L-aspártico o L-histidina. Mientras que encontraron un intenso crecimiento de los aislados cuando se incubaron sin ninguna fuente de los aminoácidos probados. También se reveló que los aislados de *Coccidioides spp.* no crecen en presencia de Tween 60 y Tween 80; sin embargo, tuvieron un crecimiento intenso en Tween 20. Otro de los resultados fue que el ácido nicotínico y los compuestos tóxicos, ácido caféico y fenol, no podían ser metabolizados por todos los



aislados probados. Todos los aislados fueron positivos para la producción de ureasa y mostraron un intenso crecimiento en medios que contenían concentraciones de cicloheximida entre 0.01 y 0.05%, pero no crecían en concentraciones de 0.1 y 0.2%.²⁶

En otros hongos se ha observado que la susceptibilidad a los antifúngicos varía de acuerdo con la especie, por lo que en un estudio en el que se compararon perfiles de susceptibilidad a antifúngicos de cepas de *C. immitis* y *C. posadasii* obtenidas de áreas endémicas y no endémicas, no se encontraron diferencias significativas.²⁷

Por otro lado, un trabajo realizado con aislados de *C. immitis* y *C. posadasii*,²⁸ reveló que las características macro y micromorfológicas, así como el tamaño de los arthroconidios correspondían a las características descritas por otros autores y no mostraron diferencias significativas entre ambas especies.^{1,26}

Aunque hasta el momento los estudios dirigidos a la fenotipificación de *C. immitis* y *C. posadasii* no han mostrado diferencias entre ambas especies, y a pesar de que ambas especies tienen etiologías similares de la enfermedad, sus secuencias de codificación durante su historia evolutiva seguramente han acumulado miles de diferencias, y cualquiera de éstas puede causar variación fenotípica importante que puede ser relevante para una futura vacuna o eficacia terapéutica, por lo que los estudios aún son insuficientes a este respecto.

CONCLUSIONES

Los trabajos enfocados a estudiar la variabilidad genética en *C. immitis* y *C. posadasii* coinciden en que ambas especies presentan gran variabilidad, a diferencia de los estudios orientados a explorar su variabilidad fenotípica, la cual hasta el momento no se ha establecido, ya que la mayoría de los estudios muestran que no hay diferencias fenotípicas entre las dos especies.

La variabilidad presente en estos hongos es importante pues pueden aparecer nuevos genotipos con mayor o menor virulencia, o aparecer genotipos resistentes a los antifúngicos, lo que puede incidir directamente en la obtención de vacunas y en la epidemiología de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Duarte-Escalante reconoce el apoyo del Programa del Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Los autores agradecen el apoyo de PAPIIT-DGAPA (IN215509-3).

REFERENCIAS

1. Fisher MC, Koenig GL, Taylor JW. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 2002; 94: 73-84.
2. Hector RF, Laniado-Laborín R. *Coccidioidomycosis* A fungal disease of the Americas. *PloS Med* 2005; 2: e2.
3. Fisher FS, Bultman MW, Johnson SM, Pappagianis D, Zaborsky E. *Coccidioides* niches and habitat parameters in the southwestern United States. A matter of scale. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1111: 47-72.
4. Kolivras KN, Johnson PS, Comrie AC, Yool A. Environmental variability and *coccidioidomycosis* (valley fever). *Aerobiologia* 2001; 17: 31-42.
5. Kolivras KN, Comrie AC. Modeling valley fever (*coccidioidomycosis*) incidence on the basis of climate conditions. *Int J Biometeorol* 2003; 47: 87-101.
6. Laniado-Laborín R, Alcantar-Schramm JM, Cazares-Adame R. *Coccidioidomycosis*: An update. *Curr Fungal Infect Rep* 2012. Doi 10.1007/s12281-012-0084-z.
7. Zimmermann CR, Snedker CJ, Pappagianis D. Characterization of *Coccidioides immitis* isolates by restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 3040-2.
8. Burt A, Carter DA, Koenig GL, Whites TJ, Taylor JW. Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 770-3.
9. Burt A, Carter DA, White TJ, Taylor JW. DNA sequencing with arbitrary primer pairs. *Mol Ecol* 1994; 3: 523-25.
10. Burt A, Dechairo BM, Koenig GL, Carter DA, White TJ, Taylor JW. Molecular markers reveal differentiation among isolates of *Coccidioides immitis* from California, Arizona and Texas. *Mol Ecol* 1997; 6: 781-6.
11. Koufopanou V, Burt A, Taylor JW. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5478-82.
12. Koufopanou V, Burt A, Taylor JW. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis* [correction]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8414.
13. Pan S, Sigler L, Cole GT. Evidence for a phylogenetic connection between *Coccidioides immitis* and *Uncinocarpus reesii* (Onygenaceae). *Microbiol* 1994; 140: 1481-94.
14. Radford A. A fungal phylogeny based upon orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *J Mol Evol* 1993; 36: 389-95.
15. Wyckoff EE, Pishko EJ, Kirkland TN, Cole G. Cloning and expression of a gene encoding a T-cell reactive protein from *Coccidioides immitis*: homology to 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and the mammalian F antigen. *Gene* 1995; 161: 107-11.



16. Cole GT, Zhu S, Hsu L, Kruse D, Seshan KR, Wang F. Isolation and expression of a gene which encodes a wall-associated proteinase of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* 1992; 60: 416-27.
17. Johnson SM, Zimmermann CR, Pappagianis D. Amino-terminal sequence analysis of the *Coccidioides immitis* Chitinase/immunodiffusion-complement fixation protein. *Infect Immun* 1993; 61: 3090-2.
18. Pishko EJ, Kirkland TN, Cole GT. Isolation and characterization of two chitinase-encoding genes (cts1, cts2) from the fungus *Coccidioides immitis*. *Gene* 1995; 167: 173-7.
19. Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. Pathogenic clones versus environmentally driven population increase: analysis of an epidemic of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 807-13.
20. Sharpton TJ, Stajich JE, Rounsley SD, Gardner MJ, Wortman JR, Jordan VS, et al. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res* 2009; 19: 1722-31.
21. Neafsey DE, Barker BM, Sharpton TJ, Stajich JE, Park DJ, Whiston E, et al. Population genomic sequencing of *Coccidioides* fungi reveals recent hybridization and transposon control. *Genome Res* 2010; 20: 938-46.
22. Pan S, Cole GT. Electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* 1992; 60: 4872-80.
23. Egeberg RO, Elconin AE, Egeberg MC. Effect of salinity and temperature on *Coccidioides immitis* and three antagonistic soil saprophytes. *J Bacteriol* 1964; 88: 473-6.
24. Elconin AF, Egeberg RO, Egeberg MC. Significance of soil salinity on the ecology of *Coccidioides immitis*. *J Bacteriol* 1964; 87: 500-3.
25. Lacy GH, Swatek FE. Soil ecology of *Coccidioides immitis* at amerindian middens in California. *Applied Microbiol* 1974; 27: 379-88.
26. Cordeiro RA, Brillhante SN, Rocha MFG, Fachine MAB, Camara LMC, Camargo ZP, Sidrim JJC. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. from northeast Brazil. *Medical Mycology* 2006; 44: 631-9.
27. Ramani R, Chaturvedi V. Antifungal susceptibility profiles of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* from endemic and non-endemic areas. *Mycopathologia* 2007; 163: 315-19.
28. Duarte-Escalante E, Zúñiga G, Frías De León MG, Canteros C, Castañón Olivares R, Reyes-Montes MR. The molecular comparison by AFLP of *Coccidioides posadasii* isolates from Mexico and Argentina reveals low genetic differentiation. *BMC Microbiol* [En prensa 2012].

Solicitud de sobretiros:

M. en C. Esperanza Duarte-Escalante
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, Núm. 3000
C.P. 04510, México D.F.
Correo electrónico: dupe@unam.mx