

## Análisis de virulencia de especies de *Sporothrix* (*Sporothrix schenckii*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix brasiliensis*) en larvas de *Galleria mellonella*

Cristo Sebastián Preciado-Andrade<sup>1</sup>, Daniela Mayte Montiel-Merino<sup>1</sup>, Ximena García-Campos<sup>1</sup>, Christian Leonardo Gómez-Licea<sup>1</sup>, Adrian Jauregui-Ramírez<sup>1</sup>, Magdalena Hernández-Mancilla<sup>1</sup>, Manuela Gómez-Gaviria<sup>1</sup>, Héctor Manuel Mora-Montes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato (\*hmora@ugto.mx)

### Resumen

El género de hongos *Sporothrix* se reconoce por causar graves enfermedades a hospederos mamíferos comúnmente inmunodeprimidos, hecho que lo convierte en un organismo modelo fúngico ideal para el estudio, análisis y comprensión de factores de virulencia eucarióticos. El uso de modelos invertebrados con sistema inmune innato representa una ventaja sobre las barreras bioéticas, pues reemplaza al modelo murino y permite obtener una semejanza de datos inmunológicos. Utilizando larvas de *Galleria mellonella* como modelo biológico se determinó un índice de virulencia de cepas Wild Type (WT) y múltiples aislados clínicos. En este trabajo se encontró que las cepas WT y los aislados clínicos de *S. brasiliensis* son las cepas con un mayor índice de mortalidad y por lo tanto de virulencia, seguidas de las especies *S. schenckii* y *S. globosa*. Al analizar la virulencia de las cepas, dentro de una misma especie, se determinaron los valores para *P* de 0.005, 0.001 y 0.0295 respectivamente. Así la cepa que presentó una mayor virulencia fue el aislado clínico UFTM01 de *S. brasiliensis* el cual tuvo un porcentaje de supervivencia del 0%, siendo el más virulento de entre las 10 cepas analizadas.

**Palabras clave:** *Sporothrix*; virulencia; *Galleria mellonella*; supervivencia.

### Introducción

*Sporothrix* es un género de hongos saprófitos del orden *Ophistomatales*, que actualmente cuenta con 52 especies distintas, en su estado silvestre suele encontrarse en suelo, restos vegetales, madera en descomposición e insectos (Carvalho *et al.*, 2022). Algunas especies tienen la característica de ser hongos dimórficos, donde a temperaturas entre 25°C y 30°C se mantiene su forma micelial con hifas septadas, mientras que a una temperatura ligeramente mayor de 35°C a 37°C forma levaduras, una característica que les ayuda a sobrevivir en diferentes condiciones (Sil *et al.*, 2015). Los aislados silvestres de *Sporothrix* son normalmente encontrados en asociación con materia vegetal en el suelo, a temperatura ambiente (rondando los 25°C) donde se encuentra como micelio, sin embargo rápidamente pasa a su conformación de levadura al cultivarse en un medio a la temperatura adecuada o bien al inocularse en hospederos mamíferos (Sharma *et al.*, 2022).

La esporotricosis es una enfermedad cutánea y subcutánea distribuida en todo el mundo, que afecta a humanos y otros mamíferos, especialmente gatos (Lozoya-Pérez *et al.*, 2020) y cuyo agente etiológico son hongos del género *Sporothrix*. Durante el siglo XX se consideraba que la especie primeramente descrita *S. schenckii* (Schenk 1896) era la única especie causante de la patología, sin embargo, al analizar molecular y fisiológicamente aislados clínicos caracterizados como *S. schenckii*, se encontró que éste en realidad suponía un complejo de varias especies como *S. mexicana*, *S. albicans*, *S. luriei*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* y *S. schenckii sensu stricto* (Marimon *et al.*, 2007). La esporotricosis es común en jardineros, agricultores o personas que en general están relacionadas con trabajo en cultivos vegetales. Esta enfermedad suele tener diferentes formas de infección, donde la forma cutánea es la más predominante, esta tiende a aparecer cuando hay una interacción directa de la forma saprofitica del hongo con una lesión de la piel, y está dada principalmente por las especies *S. globosa* y *S. schenckii* (Barros *et al.*, 2011). Por otro lado, la infección causada por *S. brasiliensis* es considerada una enfermedad zoonótica, ya que suele transmitirse mediante la interacción directa de mordedura o rasguño entre mamíferos, principalmente felinos (Gremião *et al.*, 2017; Echoscopes *et al.*, 2021). En ocasiones menos comunes, el contagio se puede dar fuera del contacto con la piel, al aspirar esporas que pueden implantarse en los pulmones o bien diseminarse por la vía linfática a tejido osteoarticular, meningeal (De Carolis *et al.*, 2022). Varios factores pueden afectar en las diferentes formas

clínicas de la esporotricosis, como la carga del inóculo, la virulencia de la cepa inoculada, el estado inmunitario que presente el hospedero y la profundidad de la inoculación traumática. Dado a que la esporotricosis, en la mayoría de los países, no es necesario notificarla cuando se presenta, las publicaciones sobre los casos llegan a ser escasas y hay poca información sobre su incidencia (Barros, *et al.*, 2011).

Un factor de virulencia se define como un elemento del patógeno que contribuye a dañar al hospedero, cuya ausencia provoca la reducción de la virulencia sin afectar el crecimiento o la aptitud del organismo (García-Carnero *et al.*, 2022). A pesar de que ya se dispone con la secuenciación del genoma de *S. schenckii*, *S. brasiliensis* y *S. globosa*, la información sobre los factores de virulencia de estos microorganismos es muy limitada. Sin embargo, diversas investigaciones han dilucidado la presencia de algunos factores de virulencia en *S. schenckii*, entre ellos se encuentran adhesinas como la Hsp60 y Pap1, genes implicados en la termotolerancia como Hsp90 y Sscmk1 y finalmente, proteasas como proteinasa I y II (Gómez-Gaviria *et al.*, 2023).

En todas las especies de hongos, la pared celular es la estructura fúngica que interactúa con la inmunidad del hospedero en primer término. Se ha reportado que *S. brasiliensis* es más termotolerante que las otras especies de *Sporothrix*. Sin embargo, otros factores de virulencia ya conocidos en *S. schenckii* son enzimas extracelulares, adhesinas y melanina (García-Carnero *et al.*, 2023). Por otra parte, *S. brasiliensis* presenta adaptaciones al microambiente del hospedero, mostrando características fenotípicas alteradas debido a la presión de selección, este proceso es denominado como microevolución (Correa-Junior *et al.*, 2023). Se ha demostrado por medio de distintos experimentos que *S. brasiliensis* es más virulenta que *S. schenckii*. Sin embargo, *S. brasiliensis* presenta resistencia a los antibióticos como itraconazol y miltefosina. Su resistencia a antibióticos está relacionada, entre otros factores, a su capacidad para formas biopelículas (Lopes-Bezerra *et al.*, 2018). Las distintas especies pueden presentar virulencia y formas clínicas diferentes, ya que *S. schenckii* y *S. brasiliensis* pueden provocar lesiones cutáneas profundas y diseminadas, en cambio *S. globosa* se ha descrito principalmente en infecciones linfocutáneas pero de baja virulencia.

*G. mellonella* es un organismo modelo útil para definir agentes causantes de enfermedades, examinar mecanismos de interacción molecular entre patógeno/hospedero y evaluar la eficacia de fármacos (Trevijano-Contador *et al.*, 2018). El uso de este modelo permite un fácil manejo, genera un bajo costo de producción/manutención y mantiene una población consideradamente elevada; con el objetivo de obtener un análisis estadístico confiable (García-Carnero *et al.*, 2021). *G. mellonella* se describe como una especie de insecto lepidóptero del suborden *Glossata* y clado *Dytrisia*. En la fase larvaria mantiene una forma cilíndrica y gruesa, caracterizada por un cuerpo blando dividido en 13 segmentos, en los cuales se encuentran 3 pares de patas verdaderas (segmentos torácicos) y 4 pares de protuberancias membranosas (segmentos abdominales). Su morfología microscópica está formada por: A) integumento compuesto por cutícula y epidermis, B) sistema digestivo compuesto por estomodeo, mesotereon y proctodeo, C) sistema excretor compuesto por tubos de Malpighi y órganos accesorios productores de seda y saliva, D) cuerpo graso compuesto por fosfoproteínas, y E) sistema inmune innato dividido en respuesta celular y humoral. Su ciclo de vida incluye las etapas de larva y pupa antes de la transformación final a polilla, la cual ocurre aproximadamente en un mes (Garzón *et al.*, 2022). Esta respuesta es similar a la de los mamíferos, es posible comparar la respuesta inmune efectuada por el organismo con el de los humanos en caso de una infección, en este caso fúngica. Esta homología se debe en parte en la similitud de los hemocitos presentes en la hemolinfa, con los neutrófilos humanos (Browne *et al.*, 2013), ambos al ser parte de la respuesta inmunitaria de estos organismos nos permiten comparar de forma estadística los factores de virulencia de las cepas de *Sporothrix*. Esta respuesta es llevada a cabo por los sistemas celular y humoral, encontrados en la hemolinfa como diferentes componentes moleculares transcritos tras el contacto con elementos patogénicos. El sistema celular se conforma por 6 tipos de hemocitos diferenciados (prohemocitos, plasmátocitos, células granulares, coagulocitos, esferulocitos, y enocitoides) con diferente capacidad fagocítica y de producción de compuestos antimicrobianos. Por otra parte, el sistema humoral se compone de péptidos antimicrobianos aniónicos (AP1, AP2) y catiónicos (con residuos de glicina o prolina y puentes de disulfuro), enzimas líticas (proteasas y lisozimas) y opsoninas (lipopolisacáridos, peptidoglicanos y apolipoproteínas) que actúan directamente en presencia de agentes patogénicos (Trevijano-Contador *et al.*, 2018). El objetivo de este trabajo fue analizar la diferencia de la virulencia entre especies de *Sporothrix*.

## Materiales y métodos

### Crecimiento y selección de levaduras de cepas de *Sporothrix*

Se realizaron cultivos de 15 cepas distintas del género *Sporothrix* (*S. schenckii*, *S. globosa*, *S. brasiliensis*). Algunas cepas provenían de cepas WT mientras otras cepas provenían de aislados clínicos (Tabla 1). Las levaduras fueron crecidas en tubos Falcon de 50 mL en un medio YPD (7.8 pH) (1% [p/v] de extracto de levadura, 2% [p/v] peptona, 3% [p/v] Dextrosa), incubándose en agitación a una temperatura de 37°C durante un periodo de 3 días. Con base en el crecimiento positivo de levaduras en algunas cepas se seleccionaron 10 de ellas para realizar los tratamientos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Cepas de *Sporothrix* utilizadas en este estudio

CEPAS	ETIQUETA	ORGANISMO	CRECIMIENTO LEVADURIFORME
<b>CEPAS WT DE <i>Sporothrix</i></b>			
ATCC MYA4821	341*	<i>S. schenckii</i>	Positivo
ATCC MYA4823	342*	<i>S. brasiliensis</i>	Positivo
ATCC MYA4824	343*	<i>S. brasiliensis</i>	Positivo
<b>AISLADOS CLÍNICOS</b>			
SS-399	415*	<i>S. schenckii</i>	Positivo
114500	419*	<i>S. brasiliensis</i>	Positivo
14158	420*	<i>S. brasiliensis</i>	Positivo
UFTM01	421*	<i>S. brasiliensis</i>	Positivo
212	589*	<i>S. globosa</i>	Positivo
224	590*	<i>S. globosa</i>	Positivo
ATCC MYA4820	340a*	<i>S. schenckii</i>	Positivo (con conidios y micelio)

### Aislamiento y células mononucleares humanas

Se tomó una muestra sanguínea de 40 mL de un donador sano voluntario, por medio de punción venosa en tubos con EDTA. La sangre contenida se transfirió a tubos Falcon de 50 mL nuevos y estériles, hasta llegar a un volumen de 35 mL completando hasta la marca con PBS estéril a temperatura ambiente. Seguidamente, en otro tubo Falcon de 50 mL se agregaron 15 mL de Ficoll – Histopaque a temperatura ambiente, la muestra sanguínea se adicionó lentamente en el tubo que contenía Ficoll para obtener dos fases, obteniendo en la parte inferior el Ficoll y en la superior la sangre. Posteriormente, se centrifugó a temperatura ambiente a 874 x g durante 20 minutos. Finalizada la centrifugación se recuperaron los monocitos inmediatamente, para evitar que el Ficoll fuera tóxico para las células. Las células recuperadas se colocaron en tubos Falcon y se adicionó PBS estéril y frío a 4°C, hasta obtener un volumen final de 50 mL, a continuación, se llevó a centrifugar a 4°C a 874 x g durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 5 mL de RPMI DM, se tomaron 20 µL de cada suspensión celular. Las células obtenidas se cuantificaron en la cámara de Neubauer. Estas células mononucleares fueron aisladas con el fin de “retar” a las levaduras de las cepas utilizadas en el experimento, para recuperar su virulencia previo al comienzo del tratamiento en el modelo animal utilizado.

### Interacción de monocitos con células de *Sporothrix*

Las interacciones monocitos - levadura se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 96 pozos, donde se adicionaron 400 µL del patógeno y 100 µL de monocitos. Posteriormente las placas se enrollaron en papel adherente y se incubaron por 24 horas a 37°C en incubador de CO<sub>2</sub> al 5%.

### Observación de levaduras de las cepas de *Sporothrix*

Previo a la observación de las células, se realizó la preparación de los montajes. Se realizó un montaje por cada una de las 10 cepas estudiadas en el experimento, el cual se preparó colocando 10 µL de una dilución 1:100 de PBS y cultivo de la cepa sobre un portaobjetos, luego colocando un cubreobjetos y finalmente utilizando aceite de inmersión para proceder a la observación en el microscopio.

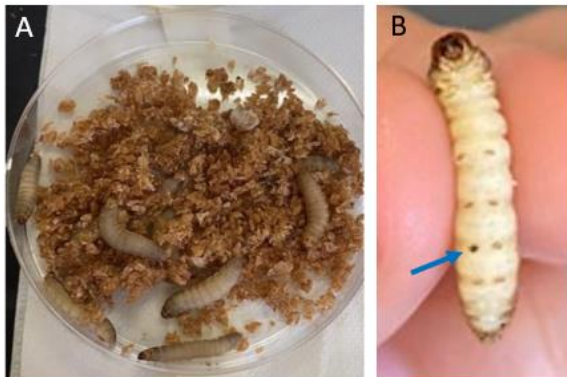
La visualización de las levaduras de las cepas de cada una de las 3 especies de *Sporothrix* se realizó con ayuda de microscopía de campo claro a 63 X utilizando el microscopio Zeiss Axioscope-40 y una cámara Axiocam MRc para poder capturar las fotos de las cepas. Este procedimiento se realizó con la finalidad de identificar la morfología microscópica de las levaduras y verificar que los cultivos no estuvieran contaminados.

#### Selección, tratamiento e inoculación de las larvas de *G. mellonella*

El procedimiento fue realizado con larvas de *G. mellonella* de tamaño mediano obtenidas del distribuidor PETMMAL® las cuales fueron alimentadas con comida preparada estéril para *G. mellonella* con una formulación de 500 g de salvado de trigo, 250 g de harina de arroz, 200 mL de glicerol y 200 mL de miel.

Los ejemplares de *G. mellonella* se agruparon en cajas Petri en grupos de 10 por cada cepa a inyectar, junto con una porción del alimento correspondiente y se mantuvieron en condiciones de temperatura ambiente y con luz escasa durante la realización del experimento.

Las larvas de *G. mellonella* se inocularon con volúmenes ajustados de PBS y de las 10 cepas retadas. La inoculación se realizó por ejemplar, donde primeramente cada uno fue desinfectado con una torunda con etanol al 70%. Posteriormente, a cada larva se le inyectaron 10  $\mu$ L de cada preparación realizada, con ayuda de una jeringa Hamilton, específicamente en la propata izquierda del penúltimo par, depositándolas en la caja Petri para su incubación (Figura 1). Cabe destacar que, el grupo de las larvas correspondiente al control fue inyectado con la misma técnica, pero únicamente con PBS. Los 10 grupos de larvas de *G. mellonella* y el control se limpiaron diariamente para evitar la formación de la fase puparia. Finalmente, se monitorearon cuántos organismos seguían vivos y muertos durante 15 días, realizando cada tratamiento por duplicado.



**Figura 1.** (A) Se muestran las condiciones de vida de los ejemplares de *G. mellonella* del experimento. (B) Con una flecha azul, se encuentra señalada la zona donde se realizó la punción para la inoculación de los organismos.

#### Conteo y calibración de células de cepas de *S. schenckii*, *S. globosa* y *S. brasiliensis*

La estimación de la concentración de levaduras se llevó a cabo con un hemocitómetro (Cámara de Neubauer). Tomando en cuenta el factor de dilución  $1 \times 10^4$ , se realizaron ajustes a la concentración con diluciones 1:1000 y 1:100 de caldo nutritivo y PBS con cada cepa de *Sporothrix* (Tabla 2).

**Tabla 2.** Cepas utilizadas de las especies de *Sporothrix* (*S. schenckii*, *S. globosa* y *S. brasiliensis*) con conteo de células en cámara de Neubauer para posterior ajuste del preinóculo.

CEPAS	CANTIDAD DE CÉLULAS	DILUCIÓN
ATCC MYA4820	43	1:100
ATCC MYA4821	50	1:100
ATCC MYA4823	102	1:100
ATCC MYA4824	14	1:100
SS-399	14	1:100
114500	64	Sin dilución
14158	76	1:100
UFTM01	12	Sin dilución
212	45	1:100
224	49	1:100

#### Análisis estadístico - Gráficas de supervivencia

Se realizaron 3 gráficas de supervivencia de los grupos de *G. mellonella*, realizando una gráfica por cada especie de *Sporothrix* utilizada (*S. schenckii*, *S. globosa* y *S. brasiliensis*), graficando la respuesta al tratamiento. Estas gráficas se realizaron con ayuda del programa Prism 10, de GraphPad® utilizando una de sus funciones llamada "gráficas de supervivencia", que utiliza un modelo de curva *Kaplan-Meier* que evalúa el porcentaje de supervivencia en función del tiempo. Se tabuló el número de individuos que perecieron en cada medición (eje y) en relación con el día en la que esta medición se realizó (eje x). El análisis no paramétrico fue realizado utilizando el análisis Log-rank de (Mantel-Cox), contando como valores significativos los resultantes de  $P > 0.05$ , y para chi cuadrada valor  $\chi^2 > df$ .

## Resultados

### Cambios relacionados a la respuesta inmune de *G. mellonella* hacia la infección por *Sporothrix*

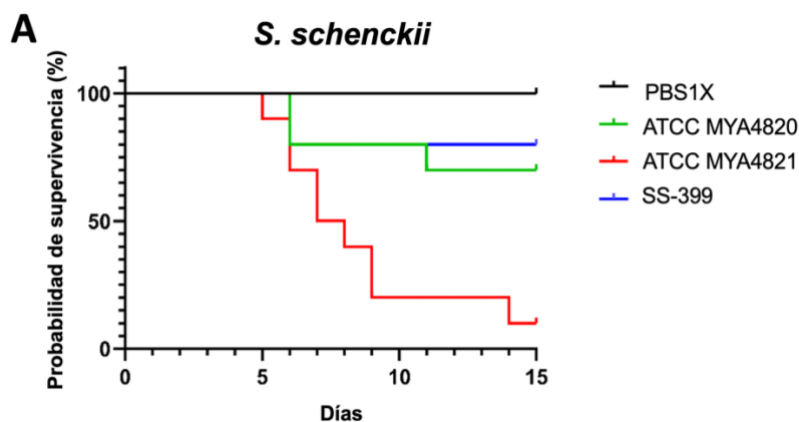
Primeramente, se observaron los cambios físicos que sufrieron los ejemplares de *G. mellonella* en respuesta a la inoculación con las distintas especies de *Sporothrix*. La virulencia en el invertebrado por parte de la levadura pudo ser fácilmente observada por la melanización que ocurría en el cuerpo de las larvas infectadas. Por una parte, las larvas sanas fueron identificadas por un color crema uniforme en su cuerpo, sin marcas oscuras correspondientes a la melanización (Figura 2A). Mientras que en las larvas infectadas con las distintas especies de *Sporothrix*, se observaron indicios de melanización, por lo general a partir del segundo día del tratamiento. Además, se pudo observar que la melanización aumentaba día con día llegando incluso a provocar que todo el cuerpo de la larva se tornara de color oscuro (Figura 2C), a diferencia de las larvas control que se inocularon únicamente con PBS (Figura 2B). También se encontraron larvas con indicios de melanización que seguían vivas durante varios días del experimento. Sin embargo, cuando la melanización se observaba en todo el cuerpo de la larva, estas ya no tenían vida. Asimismo, también es importante destacar que las larvas de *G. mellonella* en condiciones sanas suelen ser bastante activas y se observa en ellas un constante movimiento. No obstante, se pudo visualizar que los ejemplares melanizados infectados con *Sporothrix* tenían una movilidad mínima.

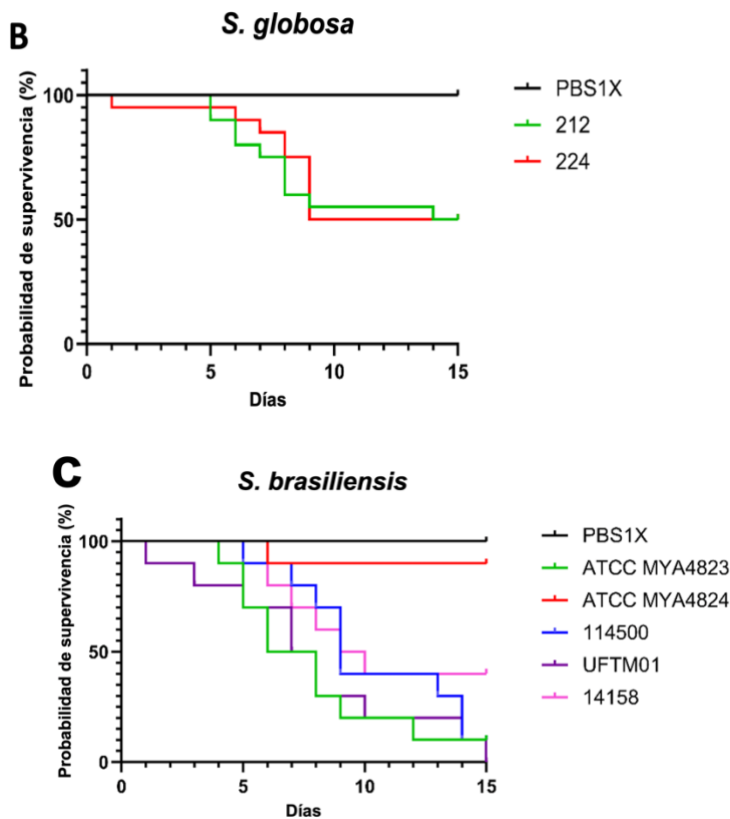


**Figura 2.** (A) Se observa una larva de *G. mellonella* sin inocular. En este punto, la larva no se observa melanizada debido a que no ha sido sometida a estrés, ni infección. (B) Se presentan dos ejemplares de *G. mellonella* correspondientes al control, con 8 días de haber sido inoculados con 10  $\mu$ L de PBS cada una; el de la izquierda se observa desde vista dorsal y el de la derecha desde vista ventral. No se visualizan cambios significativos de melanización en los ejemplares. (C) Se visualizan dos ejemplares de *G. mellonella* correspondientes a la cepa ATCC MYA4820 de *S. schenckii*, con 8 días de haber sido inoculados con 10  $\mu$ L de la preparación de la levadura con PBS; el de la izquierda se observa desde vista dorsal y el de la derecha desde vista ventral. En ambas larvas se observa una melanización significativa, la cual nos indica una respuesta a la infección por *Sporothrix*.

Comparación de la virulencia entre *S. schenckii*, *S. globosa* y *S. brasiliensis* de acuerdo a la mortalidad de *G. mellonella*

Después de 24 horas de haber inoculado a las larvas con las diferentes especies de *Sporothrix*, se comenzaron a registrar los ejemplares vivos y muertos en cada grupo de 10 larvas de las 10 cepas de *Sporothrix* estudiadas. Las larvas en su mayoría fueron registradas como muertas cuando presentaron las siguientes características: a) ausencia de signos vitales, b) melanización completa en el cuerpo de la larva, c) nula respuesta al tacto y d) cese del ciclo de vida del organismo.





**Figura 3.-** Gráficas de supervivencia modeladas a partir de la curva Keplen-Meier, que ejemplifica la supervivencia de los ejemplares de *G. mellonella* en función del tiempo, tabulando los ejemplares que perecieron en cada punto de medición, realizando una medición en cada día del experimento, del día 1 al día 15. **(A)** Gráfica de supervivencia de las cepas de *S. schenckii*: ATCC MYA4820, ATTCC MYA4821, SS-399. **(B)** Gráfica de supervivencia de las cepas de *S. globosa*: 212 y 224. **(C)** Gráfica de supervivencia de las cepas de *S. brasiliensis*: ATCC MYA4823, ATCC MYA4824, 114500, UGTM01 y 14158.

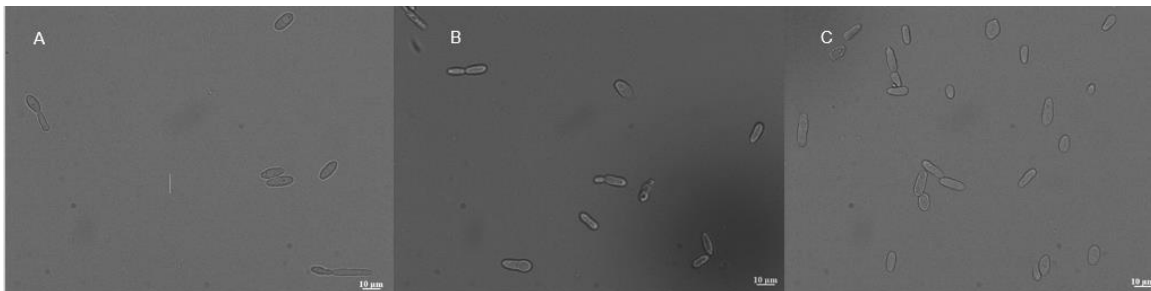
En la Figura 3 se presentan los resultados obtenidos en forma de gráficas de supervivencia de las larvas infectadas con las diferentes especies de *Sporothrix*. En primer lugar, se ilustra la mortalidad de *S. schenckii* (Figura 3A), en la cual se comparan los resultados de las 3 cepas de dicha especie entre sí, y el control. Se puede observar que la cepa ATCC MYA4821 presentó el menor porcentaje de probabilidad de supervivencia, la cual corresponde a una cepa Wild Type que comenzó a ocasionar la muerte de los organismos desde el día 5, en las cepas restantes, la infección comenzó a provocar muertes hasta el día 6 del experimento, por lo que en la gráfica (Figura 3A) se puede visualizar que la cepa ATCC MYA4821 tuvo una probabilidad de supervivencia de 10% el día final del experimento. Mientras que ATCC MYA4820 tuvo una probabilidad de supervivencia de 70%, y la cepa SS-399 tuvo una probabilidad de 80%, siendo el valor más alto de supervivencia en la comparación de estas 3 cepas de *S. schenckii*. En esta especie sí se encuentra una diferencia significativa entre las cepas del experimento debido a que el valor de  $P$  calculado es 0.0001, que es menor al valor de  $P=0.05$ .

En la gráfica de supervivencia de *S. globosa* (Figura 3B) se muestra la estimación de supervivencia de 2 cepas de *S. globosa* (212, 224) en comparación con el control inoculado sólo con PBS, este control al igual que los controles de las demás especies de *Sporothrix* no presentó ningún individuo que haya perecido. Los grupos inoculados con las levaduras de la cepa 212 fue la primera en registrar decesos (omitiendo un dato anómalo en el día 1 de la cepa 224, causado por una variable externa a la medida en el presente

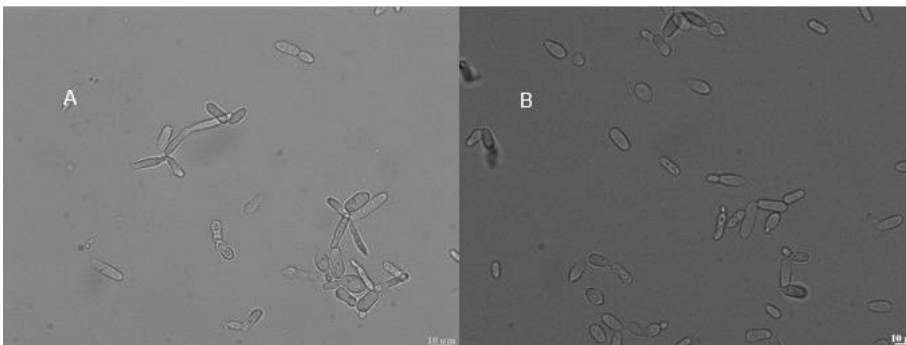
experimento), al registrar 2 en el día 5, a partir del día 6, los grupos de ambas cepas comenzaron a mostrar decesos, la cepa 212 tuvo un avance más paulatino en la tasa de mortalidad, presentando 1 deceso por día a partir del día 6, manteniendo ese progreso hasta el día 14, mientras que la cepa 224, presentó mayor porcentaje de supervivencia en los primeros 8 días que 212. Cambiando radicalmente este porcentaje a partir del día 9, donde existió una baja del 75% al 50% debido al deceso de 4 individuos en el mismo día, mismo porcentaje que fue igualado por la cepa 212 hasta el día 14 del experimento, manteniendo este porcentaje de supervivencia del 50% hasta el término del experimento. Según el análisis estadístico de las gráficas los tratamientos entre ambas cepas presentan una diferencia significativa con base a diferentes valores numéricos ya que tanto el valor  $P$  de Mantel-Cox ( $P < 0.05$ : valor  $P$  experimento = 0.0295), como el valor de chi-cuadrada ( $\chi^2 > df$ : donde valor  $\chi^2 = 4.148$ : valor  $df = 1$ ) confirman la diferencia significativa entre los porcentajes de supervivencia de ambos tratamientos.

La gráfica correspondiente a *S. brasiliensis* (Figura 3C) presenta los resultados de cinco tipos de cepas, donde se muestra el porcentaje de supervivencia por día que se comparan con el control, este al no presentar decesos, la probabilidad de supervivencia se ve constante en 100%, el grupo infectado con la cepa UFTM01 registró la muerte de un individuo desde el primer día de monitoreo, finalmente al día 15 se tuvo una probabilidad de supervivencia de 0%, siendo esta cepa la única que presentó dicho valor. Las cepas ATCC MYA4823, 114500 Y 14158 mostraron decesos al día 5, 6 y 7 respectivamente, sin embargo, la cepa 114500 al día 14 se obtuvo un valor de 10% de probabilidad de supervivencia. La cepa ATCC MYA4824 mantuvo hasta el final del experimento un valor constante de 80% de probabilidad de supervivencia. Las curvas observadas correspondientes a los clones ATCCMYA4823, 114500, UFTM01 y 14158 demuestran un valor  $P = 0.005$  comparado con un valor  $P$  de Mantel-Cox de  $P < 0.05$ , lo cual indica una tasa de supervivencia significativamente diferente.

Finalmente, se observaron mediante microscopía las células de las especies de *Sporothrix*: *S. schenckii* (Figura 4), *S. globosa* (Figura 5) y *S. brasiliensis* (Figura 6) de todas las cepas inoculadas en el modelo biológico para observar su morfología en forma de levadura, la cual es un indicativo de que la cepa es infecciosa.

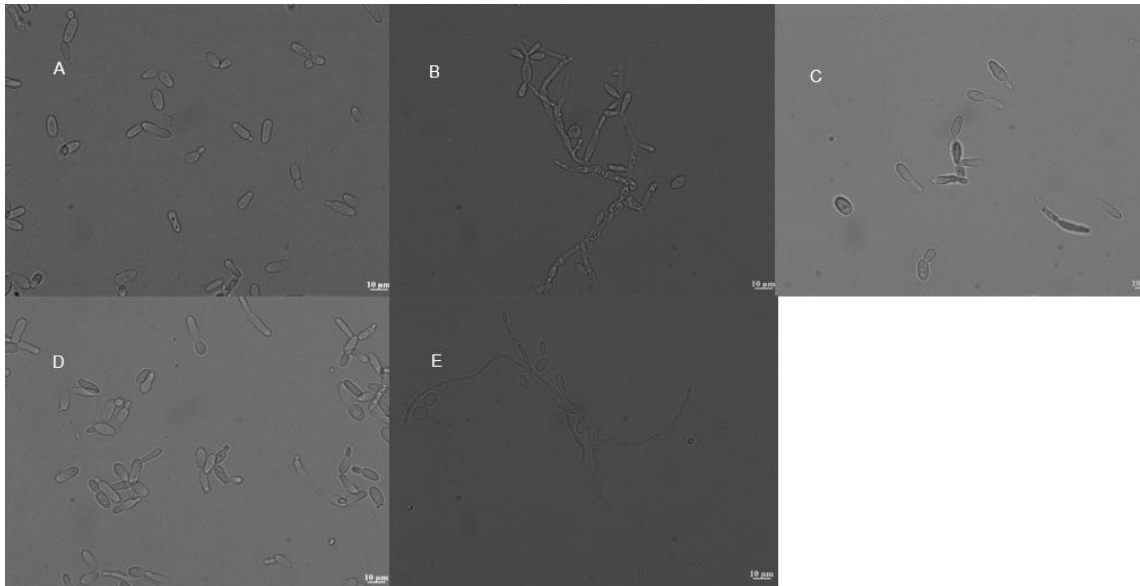


**Figura 4.** Microscopía de campo claro, aumento 63X, barra de escala 10 µm. (A) Forma infecciosa de *S. schenckii*, cepa ATCC MYA4820. (B) Forma infecciosa de *S. schenckii*, cepa ATCC MYA4821. (C) Forma infecciosa de *S. schenckii*, cepa SS-3999. Se observan levaduras elípticas de 3 cepas distintas de *S. schenckii*, en las cuales algunas células se encuentran en gemación.



**Figura 5.** Microscopía de campo claro, aumento 63 X, barra de escala 10 µm. (A) Forma infecciosa de *S. globosa*, cepa 212. Se observan células con morfología apiculada y elongada. (B) Forma infecciosa de *S. globosa*, cepa 224. Se observan características morfológicas globosas/ovoides y apiculadas. Internamente se visualizan grandes vacuolas para la mayoría de las células.





**Figura 6.** Microscopía de campo claro, aumento 63X, barra de escala 10 µm. (A) Forma infecciosa de *S. brasiliensis*, cepa ATCC MYA4823. (B) Forma infecciosa de *S. brasiliensis*, cepa ATCC MYA4824. Se observa la presencia de una hifa. (C) Forma infecciosa de *S. brasiliensis*, cepa 114500. (D) Forma infecciosa de *S. brasiliensis* cepa UFTM01. (E) Forma infecciosa de *S. brasiliensis* cepa 14158. Se observan levaduras de forma elíptica y algunas en proceso de gemación, en la cepa ATCC MYA4824 y en la cepa 14158, no completaron en su totalidad el dimorfismo a su forma levaduriforme.

## Discusión de resultados

### Comparación de virulencia entre cepas Wild Type y aislados clínicos.

Con base en los resultados obtenidos por el tratamiento a los modelos de *G. mellonella* inoculadas con levaduras retadas provenientes de diferentes cepas de *Sporothrix*, al separar los tratamientos por especie, existe una diferencia significativa entre las curvas de supervivencia, dentro de cada una de las 3 especies según el valor  $P$  ( $P < 0.05$ ): *S. schenckii* = 0.0001, *S. globosa* = 0.0295, *S. brasiliensis* = 0.005. Esto indica que cada cepa de *Sporothrix* cuenta con variaciones en la virulencia. Además de las diferencias entre las cepas, se resalta que dentro de los grupos de *S. schenckii* y *S. brasiliensis* a parte de los aislados clínicos se contaba con cepas Wild Type siendo estas: ATCC MYA4821, ATCC MYA4823 y ATCC MYA4824. En el caso de *S. schenckii* que muestra una diferencia significativa entre las cepas ( $P = 0.0001$ ) se observa una clara diferencia entre la cepa Wild Type ATCC MYA4821, en relación con las dos cepas de los aislados clínicos, ATCC MYA4820 y SS-399, (Figura 3A) debido a que la cepa WT tiene un bajo porcentaje de supervivencia del 10% mientras que las cepas provenientes de aislados clínicos cuentan con un porcentaje de 70% y 80% respectivamente, a pesar de ser una cepa naturalmente menos virulenta (Nascimento *et al.*, 2008), indicando que en el caso a estas 3 cepas de *S. schenckii*, la cepa correspondiente a WT es significativamente más virulenta, lo cual corresponde con lo reportado en la bibliografía (Mesa-Arango *et al.*, 2002).

En *S. brasiliensis* se encontró un resultado diferente con respecto a las dos cepas WT (ATCC MYA4823 y ATCC MYA4824) utilizadas, mostrando incongruencias en la virulencia entre este par, debido a que la cepa ATCC MYA4824 presentó la menor virulencia en comparación con el resto de cepas de *S. brasiliensis* al tener un porcentaje de supervivencia de 90% transcurridos los 15 días del experimento, por otro lado, la cepa Wild Type ATCC MYA4823 presentó un alto nivel de virulencia al obtener un bajo porcentaje de supervivencia de tan sólo el 10%, lo cual demuestra una diferencia significativa entre ambas cepas ( $P = 0.005$ ). La menor virulencia otorgada por ATCC MYA4824 con respecto a ATCC MYA4823, puede deberse a 2 factores, la primera siendo a que es naturalmente una cepa menos virulenta (Castro *et al.*, 2013), o bien, la diferencia morfológica encontrada en el cultivo de esta cepa observable en la figura 6B donde se observa la presencia de hifas indicando que el pre-inóculo no se encontraba en su totalidad en su forma levaduriforme (fase

infectiva), este es un factor determinante en la virulencia de las cepas (Sánchez-Alemán *et al.*, 2004), y de acuerdo con Arena López (1986) se demostró que los antígenos miceliales provocan una mejor respuesta inmunológica con respecto a los levaduriformes, lo que explicaría porque a pesar de que ambas cepas sean Wild Type, la cepa ATCC MYA4823 presenta una mayor tasa de mortalidad en comparación con ATCC MYA4824. Otro factor que podría explicar el alza en la virulencia de la cepa ATCC MYA4823, es el origen de dicha cepa, de acuerdo con el cepario ATCC MYA4823 fue aislado de una muestra subcutánea de un modelo felino, donde de acuerdo con Brito *et al.* (2007), los aislados subcutáneos presentan mayor virulencia a diferencia de otros tipos de aislados de la misma cepa al ser inoculados en modelos murinos.

Comparación de virulencia entre especies de *Sporothrix* (*S. schenckii*, *S. globosa*, *S. brasiliensis*)

Habiendo una diferencia significativa dentro de las cepas de cada uno de los grupos, se compararon los datos de virulencia entre el total de las 3 especies de *Sporothrix*. De acuerdo con lo obtenido con las 2 cepas (212 y 224) se puede caracterizar a esta especie como la menos virulenta de las 3 utilizadas, si bien se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos de ambas cepas con un valor  $P=0.0295$  ( $P<0.05$ ), los tratamientos con ambas cepas alcanzaron un plateau en el porcentaje de supervivencia en un valor de 50%. Los resultados en *S. globosa*, contrastan con lo encontrado en *S. schenckii* y *S. brasiliensis* que contaban con por lo menos una cepa que con valores inferiores al umbral del 20% en cuanto al porcentaje de supervivencia, probablemente debido a diferencias en la pared de *S. globosa* con respecto a *S. schenckii* y *S. brasiliensis*, ya que esta primera presenta mayor exposición de  $\beta$ -1,3-glucanos en su pared, a la vez que se han detectado niveles más bajos de rhamnosa, manosa así como menos *N*- y *O*-glicanos (Nava-Pérez *et al.*, 2022). De la misma forma, la alta virulencia de *S. brasiliensis*, que ronda entre el 10% y el 0% de supervivencia, en comparación con los mayores porcentajes de supervivencia de *S. globosa*, los cuales no sobrepasan por debajo del umbral del 50% reportado en este estudio, son similares a los reportados en un estudio similar realizado con un modelo animal diferente *Tenebrio molitor* (Lozoya-Pérez *et al.*, 2021), teniendo en cuenta que se utilizaron las mismas especies y concentración de levaduras de  $1 \times 10^5$  células.

*S. brasiliensis* y *S. schenckii* son considerados como cepas más virulentas que *S. globosa* según lo reportado en modelos murinos (Arrillaga-Moncrieff *et al.*, 2009). Dentro de los resultados encontrados en este experimento, se observa que en la Figura 3C, 3 de las cepas ATCC MYA4823, 114500 y UFTM01 arrojaron la mayor virulencia, siendo que la última presentó una letalidad total al término del experimento, mientras que las otras 2 cepas mencionadas obtuvieron una virulencia similar al ambas presentar un porcentaje de supervivencia del 10% en el tiempo del mismo registro, indicando que las 3 cepas gozan de una virulencia similar, lo cual no coincide con reportes anteriores donde las cepas UFTM01 y 114500 presentaban una virulencia inferior al compararlas con ATCC MYA4823, asimismo, la tasa de supervivencia obtenida por ATCC MYA4821 de *S. schenckii* es similar la obtenida en ATCC MYA 4823 de *S. brasiliensis*, lo cual no es equiparable a lo reportado por Castro *et al.*, 2013, al comparar estas mismas 2 cepas, donde claramente destaca la mayor virulencia general de ATCC MYA4823. A pesar de las anteriores incongruencias revisadas, los datos entre *S. schenckii* y *S. brasiliensis*, muestran una mayor virulencia general en las cepas de *S. brasiliensis* con respecto a *S. schenckii*, habiendo varias especies de *S. brasiliensis* que se acercaron a una tasa de supervivencia nula, al tiempo que sólo una cepa de *S. schenckii* (ATCC MYA4821) presentó valores de letalidad similares. El mayor número de cepas altamente virulentas de *S. brasiliensis* con respecto a *S. schenckii*, si corresponde con la bibliografía, ya que *S. brasiliensis* contiene una considerable menor cantidad de  $\beta$ -glucanos en su pared, lo cual se correlaciona con una menor detección por parte del sistema inmune del hospedero con respecto a *S. schenckii* (Villalobos-Duno *et al.*, 2021). Adicional a esta ventaja de la pared que contiene *S. brasiliensis*, también se ha encontrado una adhesina, la cual se denomina antígeno Gp70, dicho antígeno actúa como mediador de unión de las levaduras a la matriz dérmica y fibronectina del hospedero. Una alta cantidad de Gp70 corresponde a un bajo perfil de virulencia. Se reconoce que *brasiliensis* expresa una menor cantidad de Gp70, a comparación de *S. schenckii* que tendrá una mayor expresión de Gp70 (Castro *et al.*, 2013).

En los resultados obtenidos en las gráficas (Figura 3) se pudo observar que *S. brasiliensis* resultó ser más virulenta que *S. schenckii*, ya que provocó más muertes en los modelos de *G. mellonella* y por lo tanto un menor porcentaje de probabilidad de supervivencia, la diferencia de porcentaje es debido a los diversos factores de virulencia, en los cuales se incluyen las melaninas, que son generadas por polimerización oxidativa (García-Carnero *et al.*, 2022). De acuerdo con el análisis de García-Carnero *et al.*, (2022) se menciona que la melanina que es producida por la ruta DHN es de mayor cantidad y producción más rápida en *S. brasiliensis* en comparación con *S. schenckii*, y a su vez la producción de este pigmento protege a *Sporothrix* contra ciertos compuestos antimicrobianos oxidativos y contra el ataque de los macrófagos (Romero-Martínez *et al.*, 2000). También analizando las gráficas se pudo observar que la especie con menor virulencia fue *S. globosa*, debido a que su porcentaje de supervivencia fue menor en comparación con las

otras especies. Sin embargo, a pesar de que *S. globosa* tiene una menor producción de melanina, esta ayuda a prevenir la fagocitosis por los macrófagos THP-1 (García-Camero *et al.*, 2022), por lo que también resulta ser de importancia para estudios clínicos. La menor virulencia de *S. globosa* frente a las otras especies de *Sporothrix* es debida a la menor producción de melanina, la cual está directamente involucrada con la baja expresión génica de los factores proteicos TLR2 y TLR4 (Toll-like receptor) que aumentan la respuesta inflamatoria e incrementa el rango de mortalidad en el hospedero y reducen el efecto de macrófagos THP-1 (Guan *et al.*, 2021).

## Conclusiones

Se encontró una diferencia significativa entre los valores estadísticos *P* correspondientes a las curvas de supervivencia con respecto a las tres especies de *Sporothrix* analizadas, evidenciando que existe una diferencia en la tasa de mortalidad entre éstas, y presentando a *S. brasiliensis* como la más virulenta, seguida de *S. schenckii* y *S. globosa* como la de menor virulencia. De igual forma, el análisis comparativo entre cepas WT y cepas de especies específicas de *Sporothrix*, demostró una tasa de mortalidad elevada para cepas WT, hecho que comprendió una incidencia de virulencia elevada para esas cepas. Finalmente se relacionó el porcentaje de virulencia entre especies, encabezados por algunos factores de defensa molecular como melanización, glicoproteínas de la pared celular y expresión de proteínas Gp70 y TLR2 - TLR4.

## Referencias

- Arenas López, Gabina. (1986). "Obtencion y valoracion comparativa de esporotricina de la fase micelial y levaduriforme". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, UNAM. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3536881>
- Arrillaga-Moncrieff, I., Capilla, J., Mayayo, E., Marimon, R., Mariné, M., Gené, J., Cano, J., & Guarro, J. (2009). Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(7), 651–655. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02824.x>
- Barros, M. B., de Almeida Paes, R., & Schubach, A. O. (2011). *Sporothrix schenckii* and *Sporotrichosis*. *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 633–654. <https://doi.org/10.1128/CMR.00007-11>
- Brito, M. M., Conceição-Silva, F., Morgado, F. N., Raibolt, P. S., Schubach, A., Schubach, T. P., ... & Borba, C. M. (2007). Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. *Medical mycology*, 45(8), 721-729. <https://doi.org/10.1080/13693780701625131>
- Browne, N., Heelan, M., & Kavanagh, K. (2013). An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, 4(7), 597–603. <https://doi.org/10.4161/viru.25906>
- Castro, R. A., Kubitschek-Barreira, P. H., Teixeira, P. A., Sanches, G. F., Teixeira, M. M., Quintella, L. P., & Lopes-Bezerra, L. M. (2013). Differences in cell morphometry, cell wall topography and gp70 expression correlate with the virulence of *Sporothrix brasiliensis* clinical isolates. *PLoS One*, 8(10), e75656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075656>
- Clavijo-Giraldo, D. M., Matínez-Alvarez, J. A., Lopes-Bezerra, L. M., Ponce-Noyola, P., Franco, B., Almeida, R. S., & Mora-Montes, H. M. (2016). Analysis of *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. *Journal of Microbiological Methods*, 122, 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.01.014>
- Correa-Junior, D., de Andrade, I., Alves, V., Avellar-Moura, I., Rodrigues-Alves, T., de Souza Rabello, V., Almeida-Paes, R. (2023)., et al. Metabolic Plasticity and Virulence Associated Factors outbreaks of cat –to-humns transmitted aporotrichosis. *Journal of fungi*, 724. <https://doi.org/10.3390/jof9070724>
- De Carolis, E., Posteraro, B., & Sanguinetti, M. (2022). Old and New Insights into *Sporothrix schenckii* Complex Biology and Identification. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 11(3), 297. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030297>
- De Carvalho, J. A., Monteiro, R. C., Hagen, F., Camargo, Z. P., & Rodrigues, A. M. (2022). Trends in Molecular Diagnostics and Genotyping Tools Applied for Emerging *Sporothrix* Species. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), 8(8), 809. <https://doi.org/10.3390/jof8080809>
- Echoscopes A, Toscanini MA, Gisbert A, Mas J, Scarpa M, Iovannitti CA, Bendezú K, Nusblat AD, Iachini R, Cuestas ML. (2021). *Sporothrix brasiliensis*: A Review of an Emerging South American Fungal Pathogen, Its Related Disease, Presentation and Spread in Argentina. *Journal of Fungi*.; 7(3):170. <https://doi.org/10.3390/jof7030170>

- García-Carnero, LC; Salinas-Marín, R.; Lozoya-Pérez, NE; Wrobel, K.; Wrobel, K.; Martínez-Duncker, I.; Niño-Vega, GA; Mora-Montes. (2021). The Heat Shock Protein 60 and Pap1 Participate in the *Sporothrix schenckii*-Host Interaction, *Journal of Fungi*, 7(11), 960; <https://doi.org/10.3390/jof7110960>
- García-Carnero, L. C., & Martínez-Álvarez, J. A. (2022). Virulence factors of *Sporothrix schenckii*. *Journal of Fungi*, 8(3), 318. <https://doi.org/10.3390/jof8030318>
- García-Carnero, L. C., Martínez-Duncker, I., Gómez-Gaviria, M., & Mora-Montes, H. M. (2023). Differential Recognition of Clinically Relevant *Sporothrix* Species by Human Mononuclear Cells. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 9(4), 448. <https://doi.org/10.3390/jof9040448>
- Garzón, M. G., Enciso, J. L., Parga, J., Saavedra, L. D. P., Franco, D. P., Ruiz, C. E. P., & Cohetato, D. J. L. (2022). Descripción histológica de *Galleria mellonella*: Contribución a su implementación como modelo animal. *Hechos Microbiológicos*, 13(1), 13-19. <https://doi.org/10.17533/udea.hm.v13n1a02>
- Gómez-Gaviria, M., Martínez-Álvarez, J. A., & Mora-Montes, H. M. (2023). Current Progress in *Sporothrix brasiliensis* Basic Aspects. *Journal of Fungi*, 9(5), 533. [https://doi.org/10.3390/jof905\\_0533](https://doi.org/10.3390/jof905_0533)
- Gremião, I. D. F., Miranda, L. H. M., Reis, E. G., Rodrigues, A. M., & Pereira, S. A. (2017). Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLOS Pathogens*, 13(1), <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006077>
- Guan, M. Q., Yao, L., Zhen, Y., Song, Y., Cui, Y., & Li, S. S. (2021). Melanin of *Sporothrix globosa* affects the function of THP-1 macrophages and modulates the expression of TLR2 and TLR4. *Microbial Pathogenesis*, 159, 105158. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105158>
- Kavanagh, K., & Sheehan, G. (2018). The use of *Galleria mellonella* Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. *Journal of fungi*, 4(3), 113. <https://doi.org/10.3390/jof4030113>
- Kazuo, M. A. I., Pereira, G. J., Trocoli, A. C. T., Chagas, J. P., Spadari, K. F., Fogaça, J. R., Cronemberger, A. A., Silvio, A. A., Moretti, N. S., & de Almeida, S. R. (2018). Extracellular Vesicles from *Sporothrix brasiliensis* Are an Important Virulence Factor That Induce an Increase in Fungal Burden in Experimental Sporotrichosis. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02286>
- Kordaczuk, J., Sulek, M., Mak, P., Zdybicka-Barabas, A., Śmiątek, J., & Wojda, I. (2022). Cationic protein 8 plays multiple roles in *Galleria mellonella* immunity. *Scientific Reports*, 12(1), 11737 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15929->
- Lopes-Bezerra LM, Walker LA, Niño-Vega G, Mora-Montes HM, Neves GWP, et al. (2018) Cell walls of the dimorphic fungal pathogens *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis* exhibit bilaminate structures and sloughing of extensive and intact layers. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 12(3): e0006169. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006169>
- Lozoya-Pérez, N. E., Clavijo-Giraldo, D. M., Martínez-Duncker, I., García-Carnero, L. C., López-Ramírez, L. A., Niño-Vega, G. A., & Mora-Montes, H. M. (2020). Influences of the culturing media in the virulence and cell wall of *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis*, and *Sporothrix globosa*. *Journal of Fungi*, 6(4), 323. <https://doi.org/10.3390/jof6040323>
- Lozoya-Pérez, N. E., García-Carnero, L. C., Martínez-Álvarez, J. A., Martínez-Duncker, I., & Mora-Montes, H. M. (2021). *Tenebrio molitor* as an alternative model to analyze the *Sporothrix* species virulence. *Infection and Drug Resistance*, 2059-2072. <https://doi.org/10.2147/IDR.S312553>
- Marimon, R., Cano, J., Gene, J., Sutton, D. A., Kawasaki, M., & Guarro, J. (2007). *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10), 3198–3206. doi:10.1128/jcm.00808-07. <https://doi.org/10.1128/jcm.00808-07>
- Mesa-Arango, A. C., Del Rocio Reyes-Montes, M., Pérez-Mejía, A., Navarro-Barranco, H., Souza, V., Zúñiga, G., & Toriello, C. (2002). Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of Sporotrichosis. *Journal of clinical microbiology*, 40(8), 3004–3011. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.3004-3011>
- Nascimento, R. C., Espíndola, N. M., Castro, R. A., Teixeira, P. A. C., Loureiro y Penha, C. V., Lopes-Bezerra, L. M., & Almeida, S. R. (2008). Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. *European Journal of Immunology*, 38(11), 3080–3089. <https://doi.org/10.1002/eji.200838513>

- Nava-Pérez, N., Neri-García, L. G., Romero-González, O. E., Terrones-Cruz, J. A., García-Carero, L. C., & Mora-Montes, H. M. (2022). Biological and Clinical Attributes of *Sporothrix globosa*, a Causative Agent of Sporotrichosis. *Infection and drug resistance*, 15, 2067–2090. <https://doi.org/10.2147/IDR.S362099>
- Romero-Martínez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G., & Torres-Guerrero, H. (2000). Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and immunity*, 68(6), 3696-3703. <https://doi.org/10.1128/iai.68.6.3696-3703.2000>
- Sánchez-Alemán, M. Á., Araiza, J., & Bonifaz, A. (2004). Isolation and Characterization of Wild *Sporothrix schenckii* Strains and Investigation of Sporotrichin Reactors. *Gaceta médica de México*, 140(5), 507-512. **ISSN 0016-3813**
- Sharma, B., Sharma, A. K., & Sharma, U. (2022). Sporotrichosis: a Comprehensive Review on Recent Drug-Based Therapeutics and Management. *Current dermatology reports*, 11(2), 110–119. <https://doi.org/10.1007/s13671-022-00358-5>
- Sil, A., & Andrianopoulos, A. (2015). Thermally dimorphic human fungal pathogens—Polyphyletic pathogens with a convergent pathogenicity trait. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(8). doi: [10.1101/cshperspect.a019794](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019794)
- Trevijano-Contador, N., & Zaragoza, O. (2018). Immune response of *Galleria mellonella* against human fungal pathogens. *Journal of Fungi*, 5(1), 3. <https://doi.org/10.3390/jof5010003>
- Villalobos-Duno, H. L., Barreto, L. A., Alvarez-Aular, Á., Mora-Montes, H. M., Lozoya-Pérez, N. E., Franco, B., Lopes-Bezerra, L. M., & Niño-Vega, G. A. (2021). Comparison of Cell Wall Polysaccharide Composition and Structure Between Strains of *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Frontiers in microbiology*, 12, 726958. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.726958>