



Descripción histológica de *Galleria mellonella*. Contribución a su implementación como modelo animal

Histological description of *Galleria mellonella*.
Contribution to its implementation as an animal model

Marcela Gómez Garzón¹, Jeannette León Enciso¹, Jefferson Parga¹, Laura Daniela Padilla¹,
Diana Peñuela Franco¹, Carlos Esteban Pinzón Ruiz¹, Didier Javier Lugo Cohetato¹

Resumen

Introducción: Las larvas de *Galleria mellonella* están siendo utilizadas como un modelo animal para estudiar enfermedades infecciosas. Para evaluar microscópicamente las interacciones hospedero-patógeno *in vivo* se requiere un correcto procesamiento histológico de las larvas que permita obtener buenos cortes para valorar los cambios que se generan durante la infección. Los investigadores requieren conocer la histología normal de la larva para determinar si el patógeno es capaz de generar enfermedad y si los nuevos tratamientos son efectivos.

Objetivo: Este estudio tuvo como objetivo presentar el procedimiento de fijación y técnica histológica de las larvas de *Galleria mellonella* que realizamos de rutina en el laboratorio Técnica Histológica de la FUCS y la descripción histológica de las larvas normales.

Métodos: Las larvas de *Galleria mellonella* fueron fijadas con 100 μ L de FAATD y se realizaron cortes transversales y longitudinales, que fueron procesados de manera automatizada en el procesador de tejidos Technicon Doble modelo 2A. Las larvas pasaron a la central de inclusión para darle una figura tridimensional al casete y finalmente realizar cortes finos en el micrótopo. Se realizó la coloración de Hematoxilina Eosina (H&E) y registro fotográfico. Se tomó hemolinfa, se extendió en láminas y se coloreó con Wright para registro fotográfico.

Resultados: Se mostraron y describieron los órganos y las estructuras normales de la larva que deben analizarse en los estudios de patogenicidad microbiana y en la evaluación de nuevas moléculas para tratamiento de infecciones.

Conclusión: El estudio histológico presentado es una herramienta que contribuye a la implementación de *Galleria mellonella* como modelo animal.

Palabras Claves: *Galleria mellonella*, Modelo Animal, Técnica histológica, Hematoxilina

Filiación de autores Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Bogotá, Colombia.

Correo de correspondencia:
mgomez@fucsalud.edu.co

Recepción: 5/07/2022. Aceptación: 18/07/2022

Cómo citar este artículo: Gómez G. M., León-Enciso, J., Parga, J., Padilla, L., Peñuela, D., Pinzón, C., Lugo, D. Descripción histológica de *Galleria mellonella*. Contribución a su implementación como modelo animal. Hechos Microbiol. 2022;13(1)13-19. DOI: 10.17533/udea.hm.v13n1a02

Abstract

Introduction: *Galleria mellonella* larvae are being used as an animal model to study infectious diseases. To microscopically evaluate host-pathogen interactions in vivo, an appropriate histological processing of the larvae is required to obtain good sections to assess the changes generated during infection. Researchers need to know the normal histology of the larva in order to determine if the pathogen is capable of causing disease and if new treatments are effective.

Objective: This study aimed to present the fixation procedure and histological technique of *Galleria mellonella* larvae routinely performed in the Histological Technique Laboratory of the FUCS and the histological description of normal larvae.

Methods: *Galleria mellonella* larvae were fixed with 100 μ L of FAATD, and transverse and longitudinal sections were made, which were processed automatically in the Technicon Doble model 2A tissue processor. The larvae went to the embedding center to give the cassette a three-dimensional figure and finally to fine cuts in the microtome. Hematoxylin Eosin (H&E) staining and photographic record were performed. Hemolymph was taken, spread on slides, and colored with Wright for photographic recording.

Results: We show and describe the normal organs and structures of the larvae that should be analyzed in studies of microbial pathogenicity and the evaluation of new molecules for the treatment of infections.

Conclusion: The histological study presented is a tool that contributes to the implementation of *Galleria mellonella* as an animal model.

KeyWords: *Galleria mellonella*, Animal Model, Histological technic, Hematoxylin

Introducción

Estudiar la virulencia de agentes infecciosos, en laboratorios, requiere alternativas al uso de animales que aseguren la reducción en el número de individuos utilizados, minimicen el dolor y la angustia, y disminuyan los costos de mantenimiento. El uso de insectos como modelos de infección ha sido una opción valiosa, gracias a que son susceptibles a muchos microorganismos, poseen un sistema de defensas antimicrobianas com-

plejo que genera información homologable sobre el proceso de interacción hospedero-patógeno y, finalmente porque permite evaluar nuevas moléculas para tratamiento de infecciones, así como su toxicidad *in vivo*^(1,2).

Galleria mellonella es una especie de insecto lepidóptero del suborden Glossata y clado Ditrysia. Las larvas son usadas como modelo invertebrado en investigaciones en el áreas de inmunología y biomédica y presenta muchas ventajas como son los bajos costos de mantenimiento, la posibilidad de utilizar a gran escala y la ausencia de restricciones éticas⁽³⁾. Este insecto puede ser criado en un rango de temperaturas entre 25°C y 37°C, simulando de esta forma la temperatura corporal en la que los microorganismos causan la enfermedad en el hombre. El ciclo de vida del insecto incluye las etapas de larva y pupa antes de la transformación final a polilla, la cual ocurre aproximadamente en un mes, permitiendo obtener resultados rápidamente durante la fase larval (Fig. 1). Este invertebrado tiene un sistema de defensa celular y humoral, con la producción de péptidos antimicrobianos y hemocitos por su sistema de hemolinfa, semejando la respuesta celular que se generaría en el humano^(4,5).

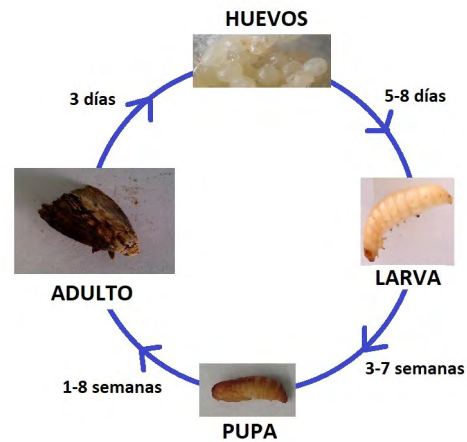


Figura 1. Ciclo de vida *Galleria mellonella*

Para comprender los resultados de los experimentos es importante conocer la anatomía e histología de este modelo invertebrado. El objetivo de este estudio fue presentar el procedimiento de fijación y el procesamiento histológico de las larvas de *G. mellonella*, procedimiento que se realiza en el laboratorio de Técnica

Histológica de la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud (FUCS), así como también, presentar la descripción histológica de larvas normales (no infectadas) y de los sitios blancos que se requieren conocer para los estudios de patogénesis microbiana, la evaluación de nuevas moléculas y su toxicidad.

Materiales y métodos

CONSIDERACIONES ÉTICAS

A pesar de que en Colombia no existe legislación que especifique el uso de los invertebrados en investigaciones, se solicitó el aval al Comité de Cuidado y Uso de Animales (CICUA). La respuesta del comité fue que hasta el momento se define que los invertebrados no sean evaluados en los comités de manejo animal, por lo tanto, no exigen a los investigadores someter a revisión los protocolos. El comité de ética de la FUCS otorgó el aval para el estudio.

Las larvas de *Galleria mellonella*, en su último estadio, fueron adquiridas de Scientia Colombia SAS, La Unión Valle, Colombia, y fueron almacenadas en oscuridad a 15°C durante dos días. Se seleccionaron larvas sanas con un peso entre 150 - 230 mg y un tamaño entre 2,0 - 2,5 centímetros.

TRATAMIENTO DE LARVAS

Las larvas sin inocular (Fig. 2A) se incubaron a 37°C durante 5 días y se procesaron para técnica histológica de la siguiente forma:

Las larvas fueron llevadas a refrigeración durante 15 minutos y se fijaron inyectando 100 µL de FAATD (Alcohol de 96° 75 mL, Formaldehído 10 mL, Ácido acético 5 mL, Dimetilsulfóxido 10 mL y Ácido tricloroacético 1g) (Fig. 2B), luego se sumergieron en el fijador FAATD durante 24h en refrigeración (Fig. 2C)⁽⁶⁾. Las larvas fueron almacenadas a 4°C durante 24h, esto permitió la fijación de los órganos internos y el bloqueo del proceso de melanización del exoesqueleto.

A un total de 20 larvas se les realizaron dos cortes transversales (de cabeza y cola) de 0,1 mm a 0,3 mm y a otras 20 larvas un corte del cuerpo en posición sagital dividiendo los estigmas abdominales con un grosor de 0,3 mm. Las piezas de los cortes fueron colocadas en un casete (Fig. 2D).

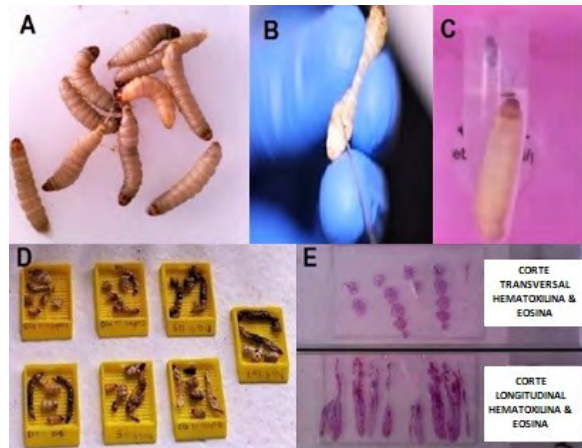


Figura 2. Manejo y procesamiento de las larvas de *Galleria mellonella*. A. Larvas sanas. B. Inoculación con fijador FAATD. C. Mantenimiento en FAATD. D. Casetes con cortes de larvas. E. Láminas histológicas coloreadas con H&E.

El procesamiento de la anatomía entomológica se llevó de manera automatizada, en el procesador de tejidos Technicon Doble modelo 2A, iniciando con deshidratación en formol salino, aclaramiento y embebido en parafina por 12 horas. Los casetes rotaron por cada recipiente durante una hora en un recipiente con formol, seis recipientes de alcoholes, tres recipientes de xiloles y dos de parafina a 60°C. Al terminar el proceso de los tejidos en el equipo automatizado, se pasó a la central de inclusión para darle una figura tridimensional al casete y, finalmente a cortes finos en el micrótom.

Se realizó la coloración de Hematoxilina Eosina (H&E), para su estudio microscópico (Fig. 2E), y se realizó registro fotográfico para la descripción de estructuras de *G. mellonella*.

RECOLECCIÓN DE LA HEMOLINFA

Para evaluar la respuesta inmunológica, larvas se llevaron a refrigeración durante 5 min. Utilizando aguja de insulina, se pinchó entre dos de los segmentos de la superficie del cuerpo y se presionó la larva hasta obtener la hemolinfa que se recogió en tubo con EDTA⁽⁷⁾, y se realizaron extendidos sobre lámina portaobjetos. Se permitió el secado de la hemolinfa a temperatura ambiente y las láminas se colorearon con Wright de la siguiente manera: se cubrió la lámina completamente con el colorante y se agregaron unas gotas de agua destilada. Con una pipeta se sopló y se dejó durante 5

minutos. Se lavó con agua corriente, se dejó secar cada lámina y se observó al microscopio en campo claro con objetivo de 100X.

Resultados y discusión

Para implementar el uso de *Galleria mellonella* como modelo animal en laboratorios de investigación, presentaremos las descripciones que se consideraron útiles para evaluar procesos infecciosos, el uso de nuevas moléculas y la toxicidad. El proceso histológico al que se sometieron las larvas permitió obtener cortes de muy buena calidad y las imágenes fotográficas serán un referente para los investigadores.

ASPECTOS MACROSCÓPICOS DE LAS LARVAS

Las larvas de *Galleria mellonella* tienen una forma cilíndrica y generalmente la parte central del cuerpo es mucho más gruesa. La cabeza es lobulosa y el cuerpo es blando y dividido en trece segmentos. En los segmentos torácicos tienen 3 pares de patas verdaderas, y en los abdominales hay cinco pares de patas falsas, que no son más que protuberancias membranosas (Fig. 3A).

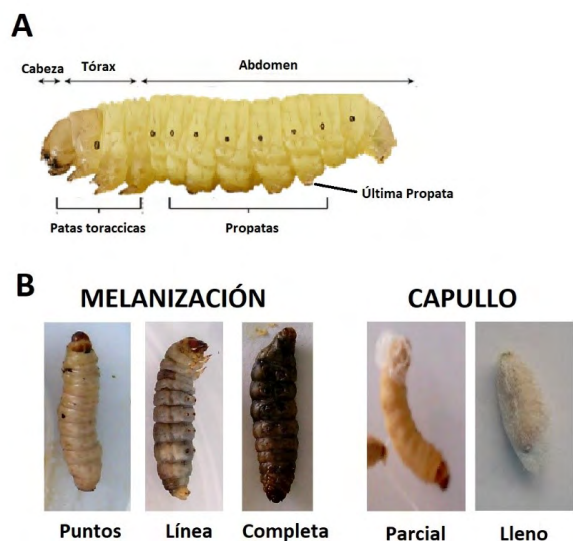


Figura 3. Características macroscópicas de las larvas de *G. mellonella*. A. Partes del cuerpo. B. Generación de melanización y de capullo que se pueden presentar durante una infección microbiana

Las larvas tienen una longitud de 2,0 a 2,5 cm y son de color crema. El color es importante porque durante los procesos de infección, las larvas sintetizan fenoloxidasa (G-difenoloxígeno-óxido reductasa), enzima capaz de oxidar los fenoles a quinonas que, posteriormente polimerizan en forma no enzimática a melanina^(1,8). Los índices de salud de las larvas propuesto por Loh JM y col⁽⁹⁾ correlacionan la melanización completa (larvas negras) con la muerte poco después. Es importante eliminar el capullo de las larvas antes de usarlas, ya que este es uno de los criterios a tener en cuenta en los índices de salud (Fig. 3B).

ASPECTOS MICROSCÓPICOS DE LAS LARVAS

Se realizaron más de 200 cortes de larvas y se realizó el registro fotográfico de los diferentes tejidos. Se generaron secuencias fotográficas para la reconstrucción topográfica de la anatomía, y así poder mostrar la larva completa con sus diferentes partes (Fig. 4A). Con el propósito de mostrar los resultados, la información está organizada en cinco secciones que corresponden a los sitios blancos de diferentes infecciones microbianas, a saber:

1. Integumento

El integumento es el límite protector externo de *G. mellonella*, este órgano evita la entrada de agentes patógenos y la salida de agua, además tiene funciones de soporte, de inserción muscular y participa en la ecdisis (muda o cambio periódico de la cutícula del exoesqueleto de insectos)⁽⁶⁾. A nivel histológico, cuenta con dos componentes: la cutícula y la epidermis (Fig. 5A).

La cutícula es la más distal, es de apariencia gruesa acelular, formada por quitina, un polisacárido nitrogenado que le confiere rigidez, proteínas, compuestos fenólicos y pigmentos⁽¹⁰⁾. Se pueden distinguir tres capas: epicutícula, exocutícula y endocutícula (Fig. 5B). Debajo de la cutícula se encuentra la epidermis, encargada de sintetizar las biomoléculas necesarias para el desarrollo de la cutícula y para realizar la ecdisis. Es una capa de células con apariencia sincitial.

2. Sistema Digestivo

El tracto digestivo se presenta como un tubo enrollado, que se extiende desde la boca hasta el ano y está

compuesto por tres regiones: estomodeo, mesotereon y proctodeo (Fig. 4).

El estomodeo o región anterior está formado por la cavidad bucal, la faringe, el esófago y el buche (Fig. 4B). En esta región se encuentra la íntima esclerotizada, revestida por una capa de células epiteliales de tipo escamoso; más allá de esta hay una gran capa de células musculares, longitudinales en su parte interna y circulares en su parte externa, y con inserciones de tejido conectivo adiposo circundante⁽¹¹⁾.

El mesotereon o región media presenta una membrana peritrófica permeable de quitina y matriz glucoproteica; está revestida por una capa celular epitelial en la cual se evidencia la presencia de células columnares con microvellosidades en su parte apical (enterocitos) junto con células regenerativas (madres) dispuestas en criptas invaginadas (Fig. 4C). En la parte distal del mesotereon encontramos la musculatura de tipo circular, soportado por tejido conectivo y adyacente de tipo longitudinal⁽¹²⁾.

El proctodeo o región posterior está revestido por una íntima delgada y permeable, cubierta de una lámina delgada de células epiteliales cilíndricas que en su parte apical presenta microvellosidades y está soportada en una lámina basal, todo esto recubierto por una capa variable de músculos de tipo circular y longitudinal⁽¹¹⁾ (Fig. 4D).

3. Sistema excretor

Su órgano principal son los tubos de Malpighi carentes de íntima (Fig. 4E). Están formados por una única capa de células epiteliales cilíndricas ciliadas, soportadas sobre una membrana basal. En la parte distal de los tubos hay presencia de fragmentos de células musculares circulares y longitudinales⁽¹³⁾.

Galleria mellonella posee varios órganos accesorios, tipo glándulas, como las glándulas salivales (Fig. 4B) y glándulas productoras de seda.

Las larvas producen fibra de seda, un polímero proteínico, en las glándulas exocrinas anterior, media y posterior, que presentan forma tubular. Las glándulas posteriores (Fig. 4F) producen seda que contiene fibroínas con funciones bioadherentes y en la sección media, la seda, que contiene sericinas con funciones antimicrobianas^(14,15).

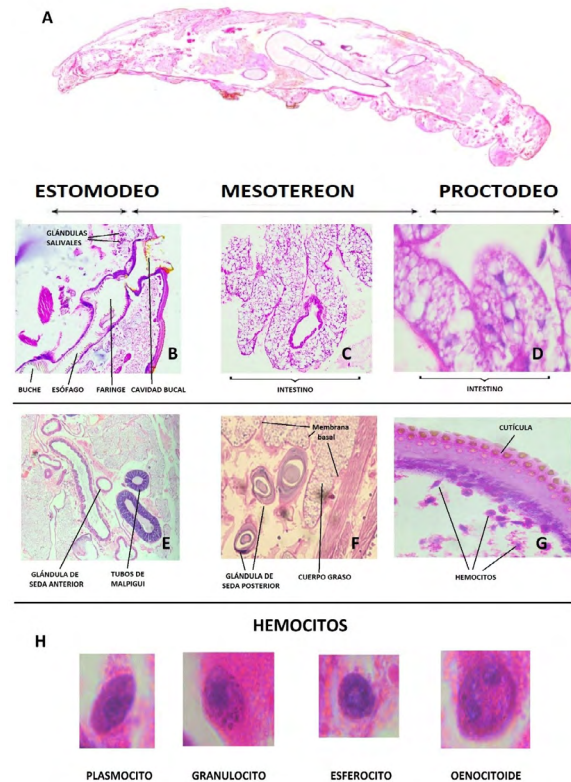


Figura 4. Características microscópicas de larva *Galleria mellonella*. A. Larva completa por reconstrucción topográfica de la anatomía microscópica. B. Estomodeo o región anterior formada por cavidad bucal, faringe, esófago y el buche, región que presenta revestimiento por una capa de células escamosas y presencia de músculo liso (longitudinal interna y circular externa). C. Mesotereon o región media que presenta membrana peritrófica, revestimiento por una capa de células columnares con microvellosidades y células regenerativas, en la parte distal presenta músculo y tejido conectivo. D. Proctodeo o región posterior revestida por células epiteliales cilíndricas con microvellosidades, lámina propia y musculo circular y longitudinal. E. Túbulos formados por una capa de células cilíndricas, glándula exocrina anterior de forma tubular. F. Glándula de seda posterior que contiene fibroínas con función bioadherente, cuerpo graso que sirve de almacenamiento de energía y síntesis de carbohidratos, lípidos y proteínas. G. Cutícula de apariencia gruesa acelular y hemocitos. H. Tipos de hemocitos presentes en hemolinfa.

4. Cuerpo graso

El cuerpo graso desempeña un papel importante en el almacenamiento de energía y síntesis de carbohidratos, lípidos y proteínas en *G. mellonella*. El cuerpo graso es un componente del sistema inmunitario y la fuente de energía. Está organizado en lóbulos cubiertos con una capa de tejido conectivo en forma de membrana basal (Fig. 4G) y sus componentes son glicoproteínas y fosfolipoproteínas⁽¹⁶⁾.

5. Respuesta inmune celular

La respuesta inmune celular está mediada por células fagocíticas, llamadas hemocitos. Los hemocitos se encuentran en la hemolinfa, de forma análoga a la sangre de los mamíferos⁽¹⁷⁾. Estas células participan en los procesos de fagocitosis, encapsulación y coagulación. La mayoría circulan libremente en la hemolinfa y otros se encuentran adheridos en tejidos. En *G. me-*

llonella sobresalen 4 tipos de hemocitos (Fig. 4H) que varían según su forma y la función que cumplen^(1,18,19).

- Plasmocitos: tienen forma redonda o fusiforme (8-10 μM), cuentan con un núcleo central y un citoplasma amplio y vacuolado, encargados de la fagocitosis. Los plasmocitos contienen enzimas lisosomales y son el tipo de célula más abundante.
- Granulocitos: tienen forma redondeada o de disco (8-12 μM), su núcleo suele ser central normocrómico pequeño, rodeado de un citoplasma lleno de gránulos.
- Esferocitos: son ovalados o redondos (10-15 μM), poseen un núcleo central, en ocasiones casi imperceptible, debido a las densas inclusiones presentes en el citoplasma.
- Oenocitoides: son células grandes (12-20 μM), binucleadas, no fagocíticas que pueden contener profenoloxidasas, y el citoplasma suele ser basófilo.

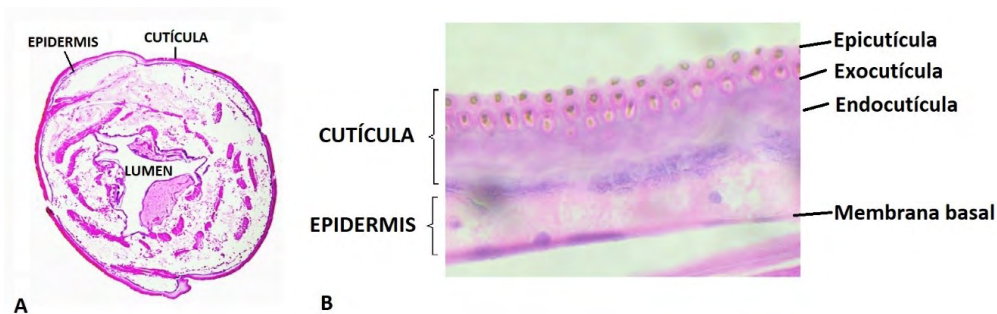


Figura 5: Tegumento de *Galleria mellonella*: cutícula y epidermis. A. Corte transversal 5X. B. Aumento 40X

Conclusiones

Los procesos de fijación y la técnica histológica utilizados permitieron realizar de manera exitosa la evaluación y descripción del modelo animal *G. mellonella*. Se identificó la anatomía entomológica y se llevó a cabo la descripción histológica de las estructuras de los órganos internos que lo conforman. Esta descripción sirve como herramienta de ayuda en la observación de cambios histopatológicos ante agentes infecciosos o nuevas sustancias que sean empleadas como objeto de investigación.

Agradecimientos: Laboratorio de Técnica Histológica de la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud

Financiamiento: Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud. Bogotá Colombia

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe conflictos de intereses.

Referencias

1. **Tsai CJ-Y, Loh JMS, Proft T.** Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016;7(3):214–29. DOI: 10.1080/21505594.2015.1135289
2. **Kavanagh K, Sheehan G. T** The Use of Galleria mellonella Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. *J Fungi (Basel)*. 2018;4(3):113. DOI: 10.3390/jof4030113
3. **Wojda I, Staniec B, Sulek M, Kordaczuk J.** The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. *Pathog Dis*. 2020;78(9):ftaa057. DOI: 10.1093/femspd/ftaa057
4. **Aparecida Procópio Gomes L, Alves Figueiredo LM, Luiza do Rosário Palma A, Corrêa Geraldo BM, Isler Castro KC, Ruano de Oliveira Fugisaki L, Jorge AOC, de Oliveira LD, Junqueira JC. Punica granatum L.** (Pomegranate) Extract: In Vivo Study of Antimicrobial Activity against *Porphyromonas gingivalis* in *Galleria mellonella* Model. *ScientificWorldJournal*. 2016;2016:8626987. DOI: 10.1155/2016/8626987.
5. **Cutuli MA, Petronio Petronio G, Vergalito F, Magnifico I, Pietrangelo L, Venditti N, et al.** *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. *Virulence*. 2019;10(1):527–41. DOI: 10.1080/21505594.2019.1621649
6. **Villalobos-Moreno A, Agudelo M JC, Arrieta P DM. Villalobos M. A, Agudelo M. JC, Arrieta P. DM.** *Histología de Apis mellifera Linnaeus, 1758 (hymenoptera) como aporte entomológico. Parte I: Regiones corporales, organización anatómica e integumento.* *Bol. cient. mus. hist. nat. univ. caldas*. 2010;14(2):201-14. Disponible en: <https://revistasoj.s.ucaldas.edu.co/index.php/boletincentifico/article/view/5269>
7. **Wu G, Liu Y, Ding Y, Yi Y.** Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue Cell*. 2016 Aug;48(4):297–304. DOI: 10.1016/j.tice.2016.06.007.
8. **Lu A, Zhang Q, Zhang J, Yang B, Wu K, Xie W, et al.** Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Front Physiol*. 2014;5:252. DOI: 10.3389/fphys.2014.00252
9. **Loh JMS, Adenwalla N, Wiles S, Proft T.** *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence*. 2013;4(5):419–28. DOI: 10.4161/viru.24930
10. **Salazar-Escobar JA, Villalobos-Moreno A.** Algunas notas sobre el integumento quitinoso e iridiscente en la clase Insecta (Arthropoda: Hexapoda) . *Rev. Chilena Ent.* 2021;47(3). <https://www.biotaxa.org/rce/article/view/70348>
11. **Barbosa P, Berry D, Kary C.** *Insect Histology: Practical Laboratory Techniques.* John Wiley & Sons, Ltd; 2014.
12. **Triplehorn C, Johnson N.** *Borror and DeLong's Introduction to the study of insects.* 7th ed. Thompson Brooks / Cole; 2005.
13. **Chapman RF.** *The Insects Structure and function.* Cambridge University Press; 2016.
14. **Kludkiewicz B, Kucerova L, Konikova T, Strnad H, Hradilova M, Zaloudikova A, et al.** The expansion of genes encoding soluble silk components in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2018; 106:28-38. DOI: 10.1016/j.ibmb.2018.11.003.
15. **Sehnal F, Sutherland T.** Silks produced by insect labial glands. *Prion*. 2008;2(4):145-53. DOI: 10.4161/pri.2.4.7489.
16. **Kryukova NA, Mozhaytseva KA, Rotskaya UN, Glupov V V.** *Galleria mellonella* larvae fat body disruption (Lepidoptera: Pyralidae) caused by the venom of *Habrobracon brevicornis* (Hymenoptera: Braconidae). *Arch Insect Biochem Physiol*. 2021;106(1):e21746. DOI: 10.1002/arch.21746.
17. **Ménard G, Rouillon A, Cattoir V, Donnio PY.** *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:782733. DOI: 10.3389/fcimb.2021.782733.
18. **Kavanagh K, Reeves EP.** Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*. 2004;28(1):101–12. DOI: 10.1016/j.femsre.2003.09.00
19. **Vogelweith F, Moret Y, Monceau K, Thiéry D, Moreau J.** The relative abundance of hemocyte types in a polyphagous moth larva depends on diet. *J Insect Physiol*. 2016;88:33–9. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2016.02.010