PADRONIZAÇÃO DE MODELO DE IMUNOCOMPROMETIMENTO SUSTENTADO EM *GALLERIA MELLONELLA* INDUZIDO POR GLICOCORTICÓIDES

João Pedro de Paiva[2], Gustavo Matheus Laureano da Silva[2], Camila Paiva[2], Cristina del Valle Araos Graterol[2], Ana Beatriz Furtado Rodrigues[1,2], Vitor Martins de Andrade[1,2]

[1]Universidade Federal de São Paulo. Instituto de Ciência e Tecnologia, Rua Talim, 330, Vila Nair - 12231-280 - São José dos Campos - SP, Brasil.
[2]Centro Universitário Internacional - UNINTER, Rua Santa Clara, 417, Vila Adyana - 12243-630 - São José dos Campos - SP, Brasil.
joaopedropaiva2006@gmail.com, gustavomathlsilva@gmail.com, camila.paiva.gomes@alumni.usp.br, lic.cristina.araos@gmail.com, beatrizrodrigues.abfr@gmail.com, vitor.andrade@unifesp.br

Resumo
Este estudo avaliou a utilização de larvas de *Galleria mellonella* como modelo experimental de imunossupressão induzida por glicocorticoides, comparando os efeitos da solução de fosfato dissódico de dexametasona e da associação de fosfato dissódico e dipropionato de betametasona. Para isso, foram injetados 10 µL dos medicamentos na última *proleg* das larvas para avaliar a toxicidade e a contagem de hemócitos totais. Há uma nítida ausência de citotoxicidade e mortalidade, confirmando a segurança do protocolo. No tempo 0h, ambos os fármacos promoveram acentuada redução na contagem de hemócitos, contudo, aos tempos 6h e 12h, o grupo dexametasona reverteu a imunossupressão, retornando aos níveis do controle. Em contrapartida, a associação com dipropionato de betametasona sustentou e aprofundou a depleção hemocitária até o final do experimento, devido ao seu caráter lipofílico de liberação gradual e prolongada. Conclui-se que o uso da associação de betametasona possa estabelecer um modelo eficaz, seguro e duradouro de imunocomprometimento em *G. mellonella*, viabilizando sua aplicação em estudos de infecção e triagem de novos agentes antimicrobianos.
Palavras-chave: *Galleria mellonella*; Imunossupressão; Corticosteroides; Hemócitos; Dipropionato de betametasona.

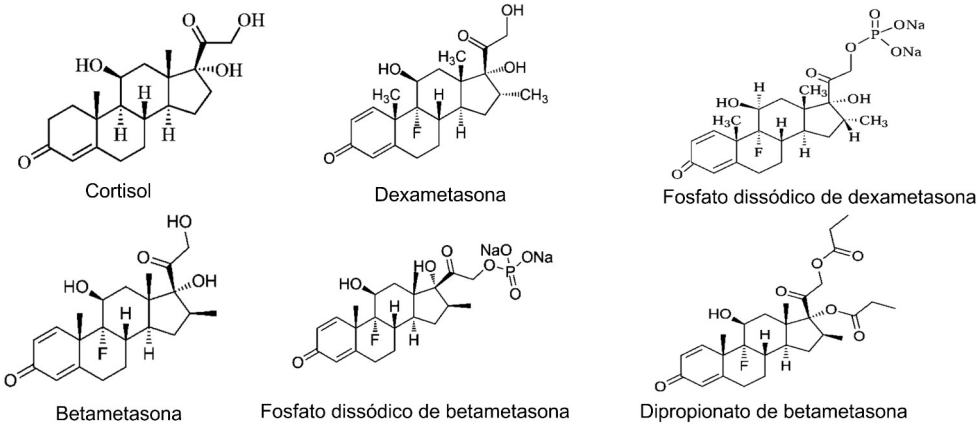
Área do Conhecimento: Ciências da Saúde; Farmácia.

Introdução

Os glicocorticoides são medicamentos amplamente empregados por suas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, embora o uso prolongado ou em doses elevadas possa comprometer as defesas do hospedeiro e aumentar a suscetibilidade a infecções (FAUCI; DALE; BALOW, 1976; CAIN; CIDLOWSKI, 2017). Os efeitos imunossupressores desses fármacos variam em função da dose, do tempo de exposição e do tipo celular envolvido, atuando na inibição da proliferação de linfócitos, na modulação de células apresentadoras de antígenos e na redução da migração leucocitária (FAUCI; DALE; BALOW, 1976; DISTELHORST, 2002). A duração desta resposta depende das características farmacocinéticas das formulações injetáveis: a associação de betametasona combina o fosfato dissódico, sal hidrofílico de rápida disponibilidade, ao dipropionato de betametasona, um éster apolar e lipofílico que forma um depósito de liberação lenta e prolongada (HE et al., 2011; SIMON et al., 2013). Por outro lado, a forma comercial da dexametasona apresenta apenas o fosfato dissódico, limitando sua ação ao pico rápido de solubilidade sem um componente de depósito equivalente (ACHÉ LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS, 2026). Embora betametasona e dexametasona apresentam potências equivalentes, levanta-se a hipótese de que a presença do dipropionato de betametasona promova um estado imunossupressor mais sustentado ao longo do tempo. Paralelamente, a larva de Galleria mellonella tem se consolidado como um modelo in vivo alternativo para investigações infecciosas, graças à sua fácil manipulação, baixo custo e sistema imune

inato bem caracterizado (WOJDA, 2020). A imunidade celular do inseto é fortemente dependente dos hemócitos, responsáveis por processos essenciais como fagocitose, nodulação e encapsulamento, de modo que a depleção dessas células compromete diretamente a capacidade de combate a microrganismos (WOJDA, 2020). Diante disso, o presente estudo propõe avaliar a G. mellonella como modelo experimental de imunocomprometimento induzido por glicocorticoides, comparando o fosfato dissódico de dexametasona e a associação de betametasona para verificar se a fração de ação prolongada do dipropionato de betametasona garante uma imunossupressão mais duradoura, viabilizando o estabelecimento de uma plataforma aplicável a estudos de infecção e triagem antimicrobiana.

Figura 1 - Moléculas dos medicamentos utilizados nos estudos e seu precursor (Cortisol).



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Metodologia

Para o estudo nas larvas de *G. mellonella* foram utilizados dois medicamentos comerciais contendo, a associação na suspensão injetável com 5 mg/mL de dipropionato de betametasona + 2 mg/mL de fosfato dissódico de betametasona, e a solução injetável de fosfato dissódico de dexametasona com 4 mg/ml, foram injetados 10µL de cada medicamento na última proleg da larva. Para o ensaio de toxicidade dos medicamentos, as larvas injetadas foram observadas e contadas por sete dias. No ensaio de redução de células imunes, 16 larvas foram injetadas com 10µL dos medicamentos e eutanasiadas nos tempos 0h, 6h e 12h para contagem dos hemócitos totais em câmara de Neubauer. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e comparados ao grupo controle (sem medicamento). As proporções de cada medicamento (complexo+sal), concentração do estoque e massa efetiva de cada corticoide utilizado estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Descrição, concentração e massa efetiva de corticoide utilizadas nos ensaios.

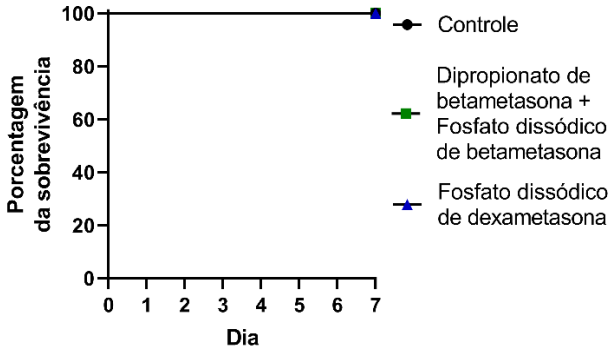
Substância (Complexo / Sal)	**Concentração do Frasco**	**Concentração Efetiva de Corticoide Livre (mg/mL)**	**Massa da Substância em 10µL (em µg)**	**Massa Efetiva de Corticoide em 10µL (µg)**
Dipropionato de betametasona + Fosfato dissódico de betametasona	5mg/mL + 2mg/mL	3,889mg/mL + 1,520mg/mL	50µg + 20µg	38,89µg + 15,20µg
Fosfato dissódico de dexametasona	4mg/mL	3,040mg/mL	40µg	30,40µg

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Resultados

A avaliação da toxicidade dos glicocorticoides administrados demonstrou que tanto a solução injetável de fosfato dissódico de dexametasona (30,40µg de corticoide livre) quanto a associação de dipropionato de betametasona + fosfato dissódico de betametasona (54,09µg de corticoide livre total) não apresentaram efeito citotóxico ou mortalidade direta para as larvas de *G. mellonella*. Conforme observado na Figura 2, a taxa de sobrevivência permaneceu em 100% ao longo dos 7 dias de monitoramento para todos os grupos experimentais (Controle, Betametasona e Dexametasona). Esse resultado confirma a segurança do modelo para ensaios imunológicos, garantindo que as alterações celulares observadas decorrem exclusivamente da ação imunomoduladora dos fármacos, e não de um processo de letalidade induzido por toxicidade aguda.

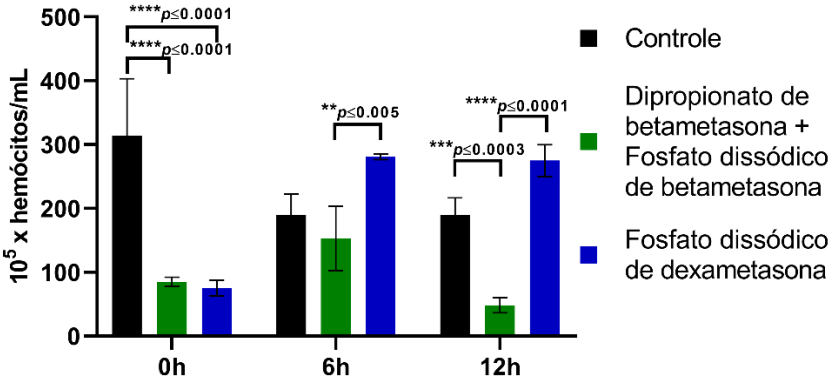
Figura 2 - Curva de sobrevivência da toxicidade dos medicamentos injetados.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A contagem total de hemócitos Figura 3 revelou perfis imunossupressores visivelmente distintos entre os tratamentos ao longo de 12 horas. No tempo 0 horas imediatamente após a aplicação, ambos os medicamentos promoveram uma acentuada redução na concentração de hemócitos circulantes em comparação ao grupo. Supomos que essa imunossupressão inicial e rápida em ambos os grupos reflete a presença das frações de alta solubilidade hidrossolúvel (fosfato dissódico de betametasona e fosfato dissódico de dexametasona), que disponibilizam prontamente a base livre ativa para atuar nos hemócitos. No intervalo de 6 horas, observou-se uma tendência de recuperação do número de hemócitos no grupo tratado com dexametasona, em contrapartida, no grupo da associação de betametasona, os níveis de hemócitos mantiveram-se contidos e demonstrando que a liberação do corticoide continuava a conter o recrutamento/proliferação hemocitária. Nossa suposição sobre a diferença fundamental na farmacocinética das formulações tornou-se evidente no tempo de 12 horas. Enquanto o grupo tratado apenas com fosfato dissódico de dexametasona reverteu completamente a imunossupressão, comparáveis ao controle, a associação de betametasona promoveu uma redução ainda mais pronunciada da população de hemócitos, caindo para o menor patamar do estudo. A redução mantida e progressiva dos hemócitos observada no grupo betametasona confirma a hipótese levantada no estudo sobre o efeito do sal hidrossolúvel versus o éster lipofílico de depósito.

Figura 3 - Contagem total de hemócitos em diferentes tempos dos grupos tratados com os medicamentos e controle.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Discussão

O uso de larvas de *G. mellonella* representa um modelo *in vivo* consolidado para investigar respostas imunes inatas e triar compostos antimicrobianos, alinhando-se aos princípios éticos dos 3Rs (WOJDA, 2020; TSAI et al., 2016). A ausência de mortalidade nos grupos tratados com os corticosteroides ao longo de 7 dias (Figura 2) valida a segurança biológica das doses testadas, confirmando que a redução celular observada decorre da modulação imunológica e não de toxicidade aguda (WOJDA, 2020). Como os hemócitos desempenham papel central na defesa celular por meio de fagocitose, nodulação e encapsulamento, a diminuição dessas células e a capacidade de combate a infecções e estabelece a base para simular cenários de imunocomprometimento (IGNASIAC et al., 2015; WOJDA, 2020).

No início, tanto a dexametasona quanto a associação de betametasona promoveram uma acentuada e significativa diminuição de hemócitos totais, reflexo da rápida biodisponibilidade gerada pelas frações solúveis de fosfato dissódico presentes em ambos os medicamentos (FAUCI; DALE; BALOW, 1976). Contudo, no grupo tratado unicamente com fosfato dissódico de dexametasona, observou-se o retorno da contagem hemocitária a patamares equivalentes ao controle nos tempos de 6h e 12h (Figura 3), provavelmente consequência da rápida depuração e metabolização desse sal altamente hidrossolúvel na hemolinfa (ACHÉ LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS, 2026; HE et al., 2011). Esse perfil de ação transitória limita o uso da dexametasona isolada quando se busca a manutenção prolongada do estado imunossuprimido (SIMON et al., 2013).

Por outro lado, a associação contendo dipropionato de betametasona manteve e aprofundou a depleção de hemócitos até 12h, demonstrando um efeito imunossupressor duradouro provavelmente decorrente do caráter apolar e lipofílico dos grupos propionato (HE et al., 2011; SIMON et al., 2013). O dipropionato atua como um microdepósito local na larva, liberando gradualmente a betametasona ativa à medida que sofre clivagem por esterases teciduais, garantindo a supressão contínua das células imunes (SIMON et al., 2013). Dessa forma, a aplicação dessa associação contendo o éster de liberação prolongada futuramente pode se consolidar como uma técnica reprodutível para simular imunossupressão sustentada em *G. mellonella*, viabilizando estudos translacionais sobre patógenos oportunistas e a eficácia de novos fármacos antimicrobianos (TSAI et al., 2016; KULAGOWSKA et al., 2022).

Conclusão

Os resultados obtidos comprovam que as larvas de Galleria mellonella constituem um modelo experimental viável, seguro e reprodutível para a indução de imunossupressão por glicocorticoides. A total ausência de citotoxicidade e mortalidade válida a segurança biológica das doses aplicadas, garantindo que as alterações na hemolinfa decorrem exclusivamente da imunomodulação farmacológica. Conseguimos informações valiosas evidenciado que sais exclusivamente hidrossolúveis, como o fosfato dissódico de dexametasona, promovem apenas uma depleção celular

transitória, ocorrendo rápida recuperação da contagem hemocitária. Por outro lado, a utilização do corticoide apolar e lipossolúvel (dipropionato de betametasona) demonstrou ser o fator determinante para a manutenção e o aprofundamento do estado imunocomprometido ao longo do tempo. Provavelmente devido ao seu perfil lipofílico de liberação lenta a partir de um microdepósito local, o dipropionato assegura a disponibilização contínua de betametasona ativa, promovendo uma redução sustentada e duradoura da população de hemócitos por até 12 horas. Como próximos desdobramentos, o modelo padronizado será empregado para avaliar o perfil de infecção e a virulência de microrganismos oportunistas que habitualmente não causam doença em indivíduos imunocompetentes, mas que representam grave ameaça a pacientes imunossuprimidos, além de servir de plataforma para a triagem de novos agentes antimicrobianos.

Referências

ACHÉ LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS. **Decadron injetável hospitalar**: fosfato dissódico de dexametasona. São Paulo: Aché Laboratórios Farmacêuticos, 2026. Bula de medicamento.

CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 233–247, 2017. DOI: 10.1038/nri.2017.1.

COSMED INDÚSTRIA DE COSMÉTICOS E MEDICAMENTOS S.A. **Diprospan®**: dipropionato de betametasona + fosfato dissódico de betametasona: suspensão injetável. Barueri: Cosmed Indústria de Cosméticos e Medicamentos S.A., [s.d.]. Bula profissional. Disponível em: https://www.mantecorpsaude.com.br/produtos/diprospan. Acesso em: 26 ago. 2026.

DISTELHORST, C. W. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 9, n. 1, p. 6–19, 2002. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400938.

FAUCI, A. S.; DALE, D. C.; BALOW, J. E. Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations. **Annals of Internal Medicine**, v. 84, n. 3, p. 304–315, mar. 1976. DOI: 10.7326/0003-4819-84-3-304.

HE, C.; FAN, H.; TAN, J.; ZOU, J.; ZHU, Y.; YANG, K.; HU, Q. Pharmacokinetics of betamethasone and betamethasone 17-monopropionate in Chinese healthy volunteers after intramuscular injection of betamethasone phosphate/betamethasone dipropionate. **Arzneimittelforschung**, v. 61, n. 7, p. 417–420, 2011. DOI: 10.1055/s-0031-1296220.

IGNASIAC, M. et al. Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* immune response to hemocoel injection of entomopathogenic nematode cuticles. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 111–118, 2015.

KULAGOWSKA, M. et al. *Galleria mellonella* as a novel *in vivo* model to screen natural product-derived modulators of innate immunity. **Applied Sciences**, v. 12, n. 13, p. 6587, 2022. DOI: 10.3390/app12136587.

SIMON, A.; DE ALMEIDA BORGES, V. R.; CABRAL, L. M.; DE SOUSA, V. P. Development and validation of a discriminative dissolution test for betamethasone sodium phosphate and betamethasone dipropionate intramuscular injectable suspension. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 1, p. 425–434, 2013. DOI: 10.1208/s12249-012-9920-2.

TSAI, C. J. Y. et al. *Galleria mellonella* as an infection model for human pathogenic fungi. **Advances in Applied Microbiology**, v. 97, p. 223–253, 2016. DOI: 10.1016/bs.aambs.2016.08.002.

WOJDA, I. The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 44, n. 6, p. 1–15, 2020. DOI: 10.1093/femsre/fuaa026.