

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Factos e Artifícios do Timerosal nas Vacinas

Mariana Fernandina Sobrinho de Magalhães Cardoso

Monografia orientada pelo Doutor Vasco Rui Veloso Neves Branco,
Investigador Júnior.

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2021

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Factos e Artíficios do Timerosal nas Vacinas

**Mariana Fernandina Sobrinho de Magalhães
Cardoso**

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pelo Doutor Vasco Rui Veloso Neves Branco,
Investigador Júnior.

2021

Resumo

O timerosal, amplamente usado em vacinas, é um tiossalicilato de etilmercúrio, que após inoculação origina tiossalicilato de sódio e etilmercúrio. Por muitos anos, o timerosal foi usado como conservante em vacinas infantis e, por isso, quase todos os humanos, que sofreram, pelo menos, uma inoculação com vacinas contendo timerosal, foram expostos ao etilmercúrio. A partir de 1998, após a publicação do artigo de *Andrew Wakefield* no *The Lancet* sobre a ligação causal entre a vacina antisarampo, parotidite epidémica e rubéola (VASPR) e o aparecimento de transtorno do desenvolvimento em crianças, isto é, autismo, começou a gerar-se um clima de desconfiança em torno das vacinas que contêm timerosal, tendo-se levantado a hipótese de este composto contribuir para o desenvolvimento de alterações neurocognitivas associadas ao autismo. Assim, a discussão de factos e artifícios da utilização de timerosal como conservante em vacinas, focada na sua toxicidade e procurando esclarecer as polémicas existentes, é o principal objetivo deste trabalho. Deste modo, foram consultadas as bases de dados, como a PubMed e Google Scholar, para identificar e analisar artigos publicados entre 1996 e 2021, adotando algumas palavras-chave (tanto em língua portuguesa como em língua inglesa) como, por exemplo: “timerosal”; “etilmercúrio”; “autismo”; “polémica com o timerosal” e “toxicidade do etilmercúrio”, para localização de artigos acerca deste tema. Desta pesquisa, resultou a consulta de cerca de 290 artigos, dos quais foram selecionados 170 para integrar este trabalho. Numa análise refinada, com base em critérios de aceitação e de exclusão, foram selecionados artigos que contemplavam estudos epidemiológicos que versavam sobre a associação entre o timerosal em vacinas e o autismo. Este trabalho permitiu concluir que até à data não foi estabelecida qualquer relação epidemiológica causal entre a administração de timerosal em vacinas e o aparecimento de autismo em crianças, o que é reforçado pela demonstração de que a toxicocinética do etilmercúrio torna, também, essa relação ainda mais improvável.

Palavras-chave: Timerosal; Etilmercúrio; Autismo; Vacinas.

Abstract

Thimerosal, widely used in vaccines, is an ethylmercury thiosalicylate, which after inoculation is broken down to ethylmercury and sodium thiosalicylate. For many years, thimerosal has been used as a preservative in childhood vaccines, and as a result, almost all humans who have undergone at least one inoculation with thimerosal-containing vaccines have been exposed to ethylmercury. Since 1998, after the publication of Andrew Wakefield's article in *The Lancet*, about the causal link between the measles, epidemic mumps and rubella vaccine (MMR) and the onset of developmental disorder in children, that is autism, a climate of mistrust began to be generated around vaccines containing thimerosal, and it was hypothesized that this compound contributed to the development of neurocognitive alterations associated with autism. Thus, the discussion of facts and artifacts of the use of thimerosal as a preservative in vaccines, focused on its toxicity and seeking to clarify the existing controversies, is the main objective of this work. So, databases such as PubMed and Google Scholar were consulted to identify and analyze articles published between 1996 and 2021, adopting some keywords (both in Portuguese and in English) such as: "thimerosal"; "ethylmercury"; "autism"; "controversy with thimerosal" and "ethylmercury toxicity" to locate articles on this topic. This research resulted in the consultation of about 290 articles, of which 170 were selected to integrate this work. In a refined analysis, based on acceptance and exclusion criteria, articles were selected that included epidemiological studies about the association between thimerosal in vaccines and autism. This work allowed us to conclude that no causal epidemiological relationship has been established between the administration of thimerosal in vaccines and the onset of autism in children, which is reinforced by the demonstration that the toxicokinetics of ethylmercury also makes this relationship even more unlikely.

Keywords: Thimerosal; Ethylmercury; Autism; Vaccines.

Agradecimentos

Primeiro que tudo, queria agradecer ao Professor Doutor Vasco Branco por todo o tempo, ajuda e paciência dispensados para a realização desta monografia, por todos os conselhos e confiança que depositou em mim. Estarei eternamente agradecida.

Um obrigado especial às minhas queridas amigas Cristiana Santos, Rita Rosado, Joana Serrudo, Joana Ferreira, Jéssica Grilo, Ana Soares, Marta Favita e Ana Margarida Bagorro pelo seu apoio constante, amizade e cumplicidade em todo o processo de realização desta monografia. Por serem as únicas que me fazem rir muito, mas também por entenderem o meu esforço em conseguir, por vezes, conjugar o estágio e a monografia com tudo o resto, e, também por serem um grupo de amigas incrível.

Para a minha família, um obrigado por entenderem o que é ser uma estudante de Ciências Farmacêuticas, passar horas a ler 20 artigos e livros para só conseguir escrever 2 linhas que se leem em 5 segundos. Obrigada por me apoiarem sempre quando eu preciso e por esclarecerem as minhas dúvidas. Obrigada por me darem coragem para continuar e conseguir alcançar os meus objetivos. Sem vocês, nada disto teria sido possível.

A todos, um enorme agradecimento.

Abreviaturas

AAP – Academia Americana de Pediatria

ADME – Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

ARE - Elemento de resposta antioxidante

As – Arsénio

BHE – Barreira Hemato-encefálica

Ca – Cálcio

CCGSV – Comité Consultivo Global sobre Segurança de Vacinas

CDC – Centro de Controlo e Prevenção de Doenças

Cd – Cádmio

CHMP – Comité de Medicamentos de Uso Humano

Cr – Crómio

Cys-S-HgCH₃ – MeHg-cisteína

DTPa – Vacina contra a difteria, tétano e tosse convulsa

EMA – Agência Europeia do Medicamento

EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

EtHg – Etilmercúrio

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos

GI – Gastrointestinal

GPx – Glutathione peroxidase

GS – Glutamina sintetase

GSH – Glutathione

Hg – Mercúrio

Hg⁰ – Vapor de mercúrio

Hg²⁺ - Hg inorgânico

Hib – Vacina contra a doença invasiva por *Haemophilus influenzae* serotipo b

IM – Intramuscular

iNOS – Óxido Nítrico Sintase

IOM – Instituto de Medicina Americano

KCl – Cloreto de potássio

KH₂PO₄ – Fosfato monopotássico

MeHg – Metilmercúrio

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

mL – Mililitros

Na₂HPO₄ – Fosfato dissódico

NaCl – Cloreto de sódio

NO – Óxido Nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

Pb – Chumbo

PM – Peso Molecular

PNUMA – Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente

PNV – Plano Nacional de Vacinação

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

S – Enxofre

SA – Substância ativa

Sec – Selenocisteína

SeH – Selenotiol

SNS – Serviço Nacional de Saúde

TCV – Vacina contendo Timerosal

TEA – Transtorno do espectro do autismo

Trx – Tiorredoxina

TrxR – Tiorredoxina redutase

UE – União Europeia

µg – Microgramas

µM – Micromolar

UL – Universidade de Lisboa

USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos

VASPR – Vacina antisarampo, parotidite epidémica e rubéola

VHB – Vacina contra a Hepatite B

Índice

1	Introdução	11
1.1	Mercúrio.....	11
2	Objetivos	16
3	Materiais e Métodos.....	17
4	Resultados e Discussão	19
4.1	Estrutura e propriedades do timerosal e etilmercúrio	19
4.1.1	Toxicocinética do etilmercúrio	20
4.1.2	Mecanismos moleculares de toxicidade do etilmercúrio	25
4.1.2.1	Depleção de glutatona.....	26
4.1.2.2	Inibição do sistema da Tiorredoxina.....	27
4.1.2.3	Transporte de glutamato	28
4.1.2.4	Funções celulares que dependem do cálcio	29
4.2	Uso do timerosal nas vacinas e os seus efeitos	31
4.3	Factos e Artifícios do Uso de Timerosal nas Vacinas	36
4.3.1	Timerosal nas Vacinas: uma possível causa para o desenvolvimento de Autismo?.....	37
4.3.2	Estudos in vivo e epidemiológicos com TCVs	39
5	Conclusão e Perspetivas futuras.....	44
	Referências Bibliográficas	46

Índice de Figuras:

Figura 1- Classificação e propriedades dos diferentes tipos de mercúrio (adaptado de Genchi et al.).....	13
Figura 2 - Resultado da pesquisa na PubMed com a palavra-chave (em inglês) "timerosal vacina".....	17
Figura 3 - Estruturas químicas do EtHg e MeHg.....	19
Figura 4 - Dissociação do timerosal em tiosalicilato e etilmercúrio	20
Figura 5 - Modelo toxicocinético do Hg (adaptado de Ramirez et al.).....	21
Figura 6 - Esquema do metabolismo do EtHg no músculo, após inoculação de timerosal (adaptado de Dórea et al.). Para melhor compreensão, a figura demonstra o metabolismo, omitindo algumas etapas de transferência, bem como, as trocas	

envolvendo os grupos tióis do fluido intersticial e a transformação de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-Hg}^+$ em Hg^{2+}	22
Figura 7 - Fórmula química do complexo MeHg-cisteína e do complexo EtHg-cisteína, comparando com a metionina (adaptado de Clarkson et al.).....	23
Figura 8 - Sobreposição entre o sistema da glutatona e da tiorredoxina (Adaptado de Lu, J et al.)	27
Figura 9 - Mecanismo de neurotoxicidade após exposição ao EtHg (adaptado de Souza et al.)	31

Índice de Tabelas:

Tabela 1- Propriedades físico-químicas do Hg.....	12
Tabela 2 - Concentração de timerosal e de Hg nas vacinas (adaptado de CDC).....	34

1 Introdução

Historicamente, o mercúrio e os seus compostos têm sido um dilema, pois, se por um lado têm várias propriedades úteis, por outro, são bastante tóxicos. (1)

A preocupação com o timerosal surge de potenciais exposições durante a infância a vacinas contendo este composto como conservante na formulação, em países onde a vacinação obriga a várias administrações de vacinas.

Assim, o desafio que atualmente enfrentamos é o de desmistificar o que se diz sobre a toxicidade e efeitos do mercúrio nas vacinas (neste caso, do timerosal), pelo que se torna importante estudar a sua toxicidade para, desse modo, podermos aproveitar as suas potencialidades e minimizar os riscos, pondo de lado o que pode ser prejudicial para a saúde humana.

1.1 Mercúrio

Existem 23 elementos químicos que possuem funções fisiológicas conhecidas, dos quais, 12 são metais. Sabe-se que os metais são essenciais para a manutenção da homeostase celular do nosso corpo, porém, tudo o que for excessivo pode levar a algum efeito adverso, e, como tal, desencadear graves patologias. (2)

Em particular, a exposição a metais, como o mercúrio (Hg), que não têm funções biológicas no nosso organismo, pode levar a sérios problemas de saúde. (3) O seu símbolo químico – Hg – derivado do latim *hydrargyrum* significa água prateada, (4,5) visto ser o único metal pesado, líquido à temperatura e pressão ambiente, inodoro, de cor branca prateada e com baixa solubilidade em água e lípidos. (6)

Na Tabela 1 podemos observar algumas propriedades físico-químicas do Hg: (7,8)

Tabela 1- Propriedades físico-químicas do Hg

Número atômico	80
Massa molar	200,59
Ponto de Fusão	-39,0 °C
Ponto de Ebulição	356,9 °C
Tensão superficial (25°C)	484 cm ⁻¹
Resistência elétrica (20°C)	95,76 μΩ cm
Densidade relativa	13,6 g cm ⁻³ (água=1)

Nesta sequência, as principais propriedades que o diferenciam dos outros metais são a sua baixa resistência elétrica, alta tensão superficial, condutividade térmica e grande facilidade de formação de ligações com outros metais, originando amálgamas e podendo promover o desenvolvimento de compostos tóxicos. (9,10)

Devido à sua alta densidade e taxa de expansão térmica, que é constante durante as variações de temperatura, o Hg é utilizado há vários séculos em barômetros, manômetros, termômetros, (5,11) sendo, também, utilizado na produção eletrolítica de cloreto de sódio e na medicina como desinfetante. (8)

Apesar disso, ele é um dos contaminantes mais perigosos do meio ambiente, (12) sendo considerado pela EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) e pela OMS (Organização Mundial de Saúde), o composto tóxico que mais preocupa a saúde humana, pois: *“Muitos produtos químicos podem, quando usados corretamente, contribuir significativamente para a melhoria da qualidade de vida, saúde e bem-estar. Mas outros produtos químicos são altamente perigosos e podem afetar negativamente a nossa saúde e meio ambiente quando usados de maneira inadequada, como, por exemplo, o Hg”*. (13,14)

No ambiente podemos encontrá-lo de diversas formas, existindo num grande número de espécies químicas, sobre a forma de sais óxidos ou compostos alquilados, onde cada uma delas possui diferentes estados de oxidação (0, +1, +2), solubilidade, reatividade e toxicidade, comportando-se, conseqüentemente, de forma diferente. (4,8,11) Assim, as suas espécies químicas mais significativas podem ser classificadas conforme demonstrado na figura 1: (11,12,15–17)

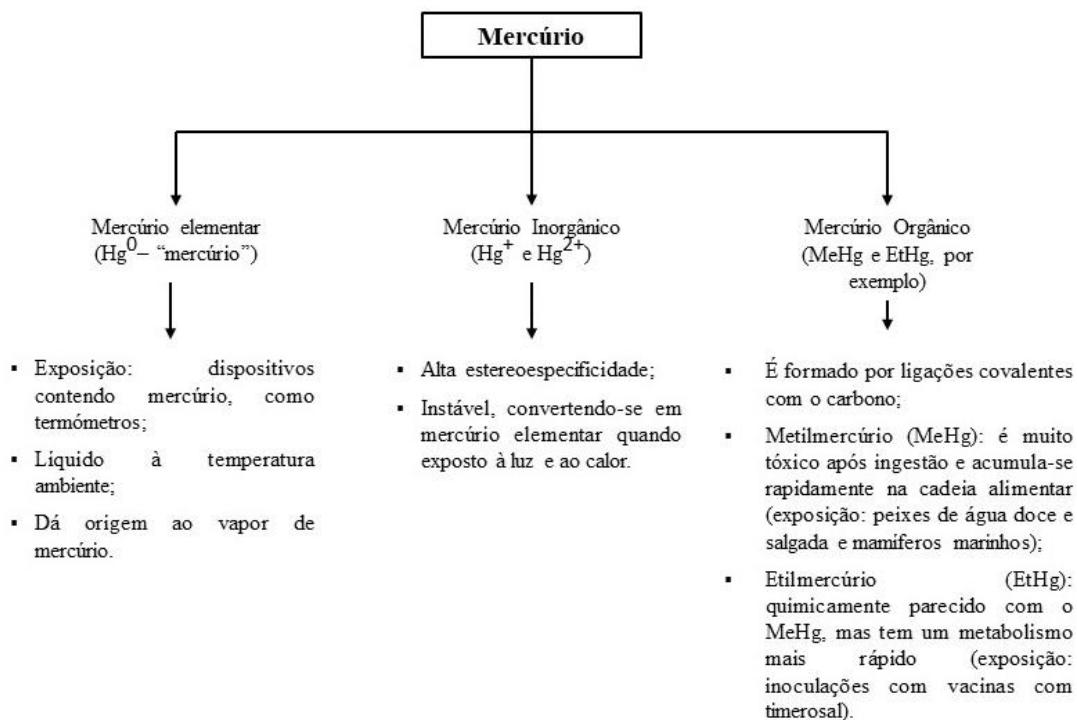


Figura 1- Classificação e propriedades dos diferentes tipos de mercúrio (adaptado de Genchi et al.)

O mercúrio está disperso no ambiente devido a fontes naturais (atividade vulcânica, fogos florestais e radiação solar), que levam à redução de Hg em Hg metálico, facilitando a sua volatilização e dispersão atmosférica, e devido a fontes antropogénicas (pesticidas agrícolas e indústrias de papel). (18,19)

Deste modo, pode dizer-se que as vias de exposição humana ao Hg são: a via alimentar (através do consumo de peixe, especialmente espécies predadoras, onde se encontra o MeHg que conjuga facilmente com a cisteína, ficando com capacidade para atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE), a parede lipídica das células e a placenta, sendo lentamente metabolizado e excretado, e por conseguinte podendo interferir no desenvolvimento normal do feto ao nível do sistema nervoso central; (1,16) ou, através do consumo de mamíferos marinhos), via ambiental (libertação de Hg através das fontes antropogénicas, apesar desta via ser pouco importante), via ocupacional (exposição crónica) e via médica, como as amálgamas dentárias (constituídas por Hg metálico, prata, estanho, cobre e vestígios de zinco, inseridas nos espaços resultantes de cáries) e como as vacinas contendo timerosal (TCV), como conservante (constituídas por EtHg). (20) (1,21,22) No caso das amálgamas dentárias, a exposição ao Hg deve-se à libertação de pequenas partículas, através de processos como a corrosão, mastigação e

fragmentação, originando vapor de Hg, que é inalado ou deglutido quando se dissolve na saliva.(23)

Nos últimos anos, foram realizados vários estudos que permitiram aumentar o nosso conhecimento em relação ao mecanismo de toxicidade do Hg, pois sabemos que as interações com grupos sulfidril (-SH), a indução do stress oxidativo, ligação com proteínas e enzimas, e a disrupção da homeostase do ião cálcio são os mecanismos mais críticos relacionados com a sua toxicidade. (16,24–26) No entanto, alguns efeitos da exposição do ser humano a doses pequenas de Hg, a partir do consumo de peixe contaminado, das amálgamas dentárias ou do timerosal das vacinas, ainda está sujeita a debate. (27)

Importa salientar que a exposição ao MeHg é mais significativa que a exposição ao EtHg, pois o consumo de peixe é uma realidade inultrapassável. Acresce que, a exposição ao EtHg tem vindo a diminuir devido à substituição das TCV por outras formulações alternativas.(28,29)

Face ao exposto, podemos destacar que o Timerosal é um tiosalicilato de EtHg, que após inoculação origina tiosalicilato de sódio e etilmercúrio. (30) O timerosal contém 49,6% de EtHg, sendo um dos conservantes usados em vacinas inativadas (31), é um composto organomercurial e antimicrobiano, isto é, consegue impedir o crescimento microbiano ao mesmo tempo que mata os microrganismos. (32)

Em 1998, o “*The Lancet*” publicou um artigo fraudulento de Andrew Wakefield, que sugeria que a vacina antisarampo, parotidite epidémica e rubéola (VASPR) poderia levar a uma regressão comportamental e transtorno invasivo do desenvolvimento em crianças, ou seja, autismo. (33) Após este estudo, começou a criar-se um clima de desconfiança relativamente à vacinação, e em particular nas vacinas que contêm timerosal.

Desta forma, em 1999, nos Estados Unidos da América, levantaram-se várias preocupações, ao nível da saúde humana, devido ao facto de se pensar que nas vacinas, tanto na gravidez, como na vacinação pós-natal, existia uma grande exposição ao Hg. Consequentemente, a *Food and Drug Administration* (FDA) exigiu que as empresas farmacêuticas reportassem as quantidades de Hg que estavam presentes nos seus produtos, chegando-se a atribuir os efeitos de toxicidade ao EtHg, que integra o timerosal. (34–36)

Contudo, é difícil atribuir esses efeitos apenas a uma substância, pois poderão ser resultado de outras substâncias tóxicas ou de interações entre agentes químicos, demonstração que será objeto desta monografia. (37)

2 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal discutir os prós e contras da utilização de timerosal como conservante em vacinas, focando-se no conhecimento acerca da sua toxicidade e procurando esclarecer algumas polémicas e equívocos em torno deste composto, muitas das quais com base em afirmações pouco fundamentadas.

Pretende-se, então:

- Descrever os efeitos do Hg no neurodesenvolvimento humano e a sua toxicidade, focando no timerosal e no EtHg;
- Compreender o metabolismo e cinética do EtHg, comparando com o MeHg;
- Analisar o uso do timerosal nas vacinas e os seus efeitos;
- Distinguir os factos e artifícios do uso de timerosal nas vacinas e debater a sua utilização.

3 Materiais e Métodos

Esta monografia sobre “Factos e Artíficios do Timerosal nas Vacinas” foi realizada após uma pesquisa bibliográfica utilizando as seguintes bases de dados: PubMed, Google Scholar, CDC (Centro de Controlo e Prevenção de Doenças), FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos), OMS (Organização Mundial de Saúde), EPA (Agência de Proteção Ambiental), Repositório da UL (Universidade de Lisboa), EMA (Agência Europeia do medicamento), INFARMED, SNS (Serviço Nacional de Saúde) e links relacionados com artigos publicados de 1996 a 2021.

Em geral, para esta monografia, consultei cerca de 290 artigos, usando os seguintes critérios de aceitação: artigos publicados de 1996 a 2021, revisões, casos clínicos e livros, associando a estes algumas palavras-chave. A opção pelo início do estudo a partir de 1996, deve-se ao facto de ter sido a partir desta data, que surgiram as primeiras preocupações, que deram origem à polémica relativamente à toxicidade do timerosal. Neste contexto, usei como critério de aceitação o intervalo de anos associado a uma palavra-chave (em inglês) “timerosal vacina”, obtendo como resultado cerca de 620 artigos no Pubmed, concentrando-se um maior número destes artigos a partir de 1999 (após a polémica timerosal-autismo). Porém, a partir de 2010, tem vindo a decrescer, devido à diminuição da importância das TCV hoje em dia, como se pode observar na figura 2.

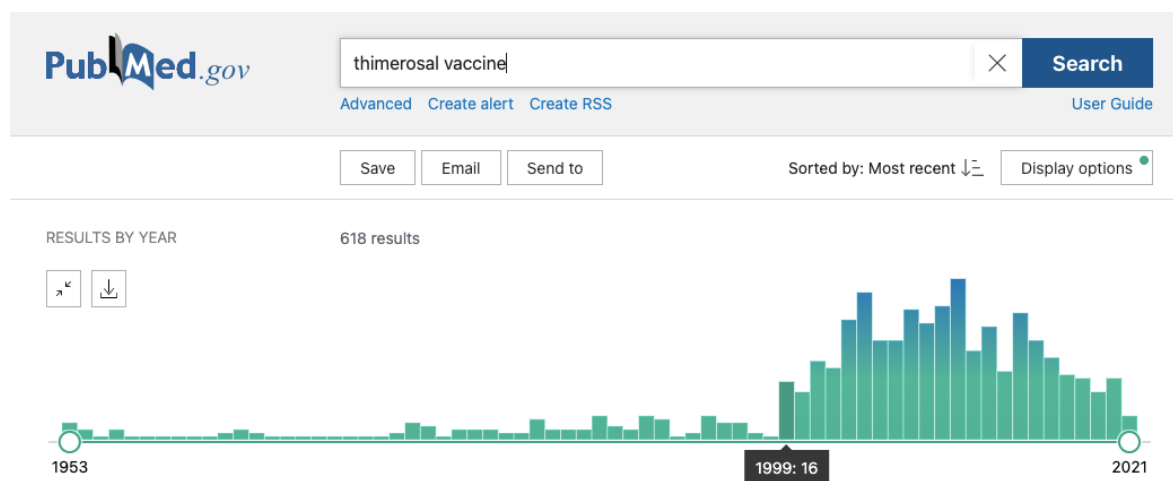


Figura 2 - Resultado da pesquisa na PubMed com a palavra-chave (em inglês) "timerosal vacina".

Do total dos 620 artigos, usei como critério de exclusão a repetição de artigos com conclusões inadequadas ao objeto de estudo deste trabalho.

Com base na informação recolhida, consultei outras bases de dados utilizando as seguintes palavras-chave (tanto em língua portuguesa como inglesa): “mercúrio”, “toxicidade do mercúrio”, “toxicidade etilmercúrio”, “timerosal”, “factos e artifícios do timerosal nas vacinas”, “mercúrio e vacina”, “factos, artifícios e timerosal”, “controvérsia com o timerosal”, “metabolismo do timerosal”, “metabolismo do etilmercúrio vs. metilmercúrio”, “bioacumulação do mercúrio”, “vias de exposição do mercúrio”, “Andrew Wakefield, vacina com timerosal”, “Andrew Wakefield e autismo”, “mercúrio como metal pesado”, “cinética do etilmercúrio”, “Absorção, distribuição, metabolismo e excreção do etilmercúrio vs metilmercúrio”, “estudos cinética etilmercúrio”, “cálcio e timerosal”, “glutamato e timerosal”, “sistema tiorredoxina – etilmercúrio vs. metilmercúrio”, “mecanismos moleculares do etilmercúrio”, “formulação das TCV”, “timerosal, formulação nas vacinas”, “polémica com timerosal”, “EMA - timerosal”, “vacina da tosse convulsa – aprovação”, “vacina timerosal formulação farmacêutica”, “vantagens do timerosal nas vacinas”, “vacinas descontinuadas timerosal”, “vacinas composição”, “função das vacinas”, “programa nacional de vacinação e timerosal”, “timerosal em Portugal”, “infarmed timerosal”, “vacinação história e timerosal”, “prevalência do uso de timerosal”, “medicamentos contendo timerosal”, “uso hoje em dia de timerosal”, “etilmercúrio e toxicidade”, “tiomersal infarmed”, “tiomersal EMA”, “comparação do uso de timerosal entre países”, “edolfene”, “tropicil top”, “polémica autismo e timerosal”, “autismo”, “transtorno do autismo – sinais e sintomas”, “autismo causas e prevalência”, “estudos autismo vs timerosal” e “envenenamento por Hg”.

4 Resultados e Discussão

4.1 Estrutura e propriedades do timerosal e etilmercúrio

A magnitude da toxicidade do Hg depende da espécie química e da sua concentração, e pode variar com a duração da exposição e estágio de vida, (1,38) podendo estar associada a dois tipos de processos: bioacumulação (processo pelo qual os organismos assimilam um contaminante mais rapidamente do que conseguem eliminá-lo, resultando num aumento da concentração no organismo, dependente do tempo) e bioamplificação (concentração aumenta com o avanço no nível trófico da cadeia alimentar), e, por isso, o Hg pode provocar riscos na saúde Humana, mesmo em baixas concentrações. (39) Assim, o processo de bioacumulação é relevante no caso do timerosal, presente nas vacinas, contudo, a bioamplificação é mais importante para a exposição ao MeHg, uma vez que, este último composto provém da ingestão de peixe predador contaminado.

A toxicidade dos compostos de Hg advém do facto de, ao entrarem no organismo serem distribuídos por vários órgãos e reagirem com diversas enzimas, inibindo a catálise de reações. (40) Por isso, os seus efeitos adversos são múltiplos, incluindo neurotoxicidade, teratogenicidade, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade, quando está presente em doses elevadas, e imunotoxicidade, em doses mais baixas. Todavia, a base molecular do desenvolvimento de toxicidade não é totalmente conhecida. (27,39)

Assim, ainda que a toxicidade do MeHg seja bem conhecida, a do EtHg é menos conhecida, pois, até há pouco tempo, considerava-se que era semelhante à do MeHg, devido às suas semelhanças químicas, como se pode observar na figura seguinte (Figura 3). (41)

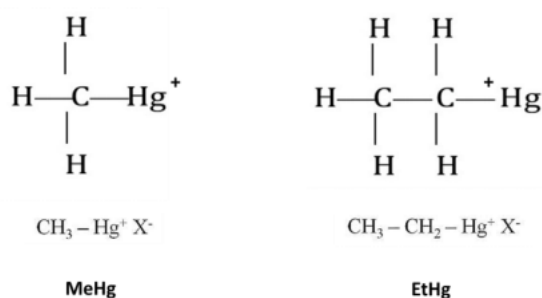


Figura 3 - Estruturas químicas do EtHg e MeHg

Como foi dito anteriormente, a principal fonte de exposição humana a EtHg resulta da inoculação de vacinas contendo tiosalicilato de EtHg, denominado de Timerosal. Este composto, após inoculação, dissocia-se em tiosalicilato de sódio e EtHg (figura 4). (30)

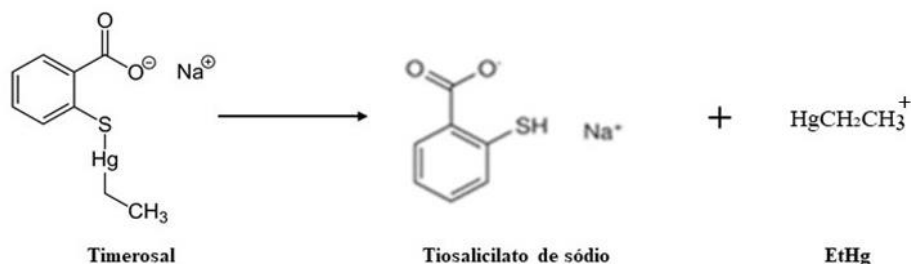


Figura 4 - Dissociação do timerosal em tiosalicilato e etilmercúrio

Deste modo, os primeiros efeitos tóxicos do EtHg foram identificados em 1870 na Alemanha, em experiências animais, tendo-se verificado que o órgão-alvo era o sistema nervoso central (SNC), sendo o sintoma mais óbvio a descoordenação motora. (42,43) A avaliação de neurotoxicidade, resultante da exposição a TCV, foi feita com base no pressuposto das relações dose-efeito e dose-resposta do MeHg serem iguais às do EtHg, tendo como consequência a remoção do timerosal das vacinas. (44)

No entanto, apesar de existirem semelhanças nos mecanismos neurotóxicos de MeHg e EtHg tem-se demonstrado que a cinética e metabolismo do EtHg difere da do MeHg. (1,25)

4.1.1 Toxicocinética do etilmercúrio

Com efeito, o seu potencial tóxico deriva das peculiaridades dos seguintes processos: absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) (45) e a compreensão da cinética e metabolismo das formas orgânicas de Hg (MeHg e EtHg), e a sua distribuição, nos tecidos, é importante para conseguir avaliar os efeitos biológicos dessas substâncias no organismo humano. (1,46)

Várias formas de Hg podem ser absorvidas e excretadas de maneiras diferentes, sendo responsáveis pela disparidade na distribuição e toxicidade, como podemos observar na figura 5 apresentada abaixo. (47)

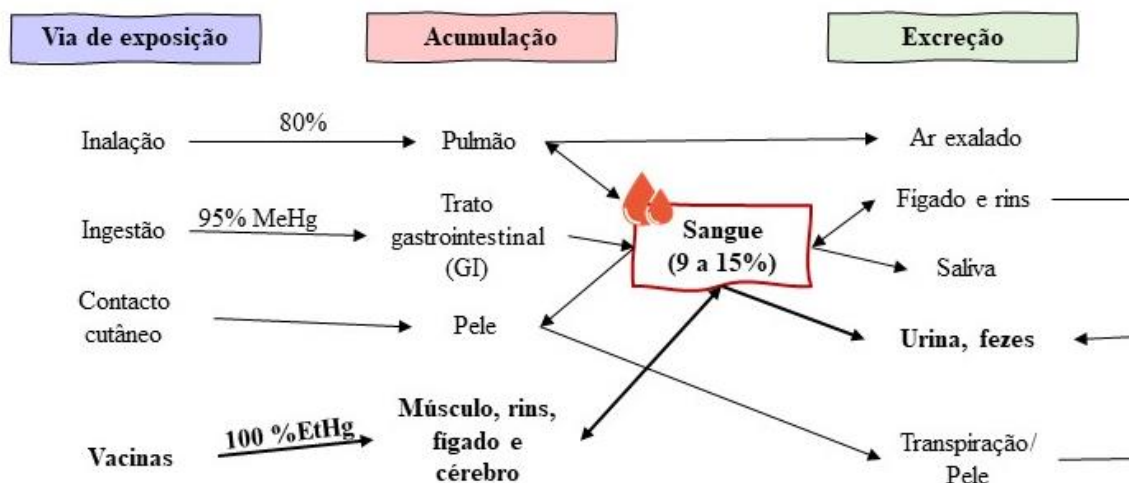


Figura 5 - Modelo toxicocinético do Hg (adaptado de Ramirez et al.)

De um modo geral, o EtHg entra no organismo após uma inoculação de timerosal. De seguida, há rutura da ligação Hg-enxofre (S) e o EtHg é libertado, interagindo com proteínas com grupo SH (Prot-SH) e tióis de baixo peso molecular (cisteína ou glutatona (GSH)). O complexo EtHg-cisteína ($Cys-SHgCH_2CH_3$), estruturalmente semelhante à metionina, (48) e o complexo EtHg-GSH ($GSHgCH_2CH_3$), através de proteínas de transporte membranar ou por via de reações de troca com outras Prot-SH da membrana plasmática, conseguem sair da célula muscular para o espaço extracelular (Figura 6). No fluido intersticial, os complexos tiol-EtHg de baixo ou alto peso molecular (PM) distribuem-se rapidamente, trocando com outros complexos, e acumulando-se no rim ($K_{prot-S-HgCH_3}$), fígado ($L_{prot-S-HgCH_3}$) e cérebro ($B_{prot-S-HgCH_3}$). (46,49)

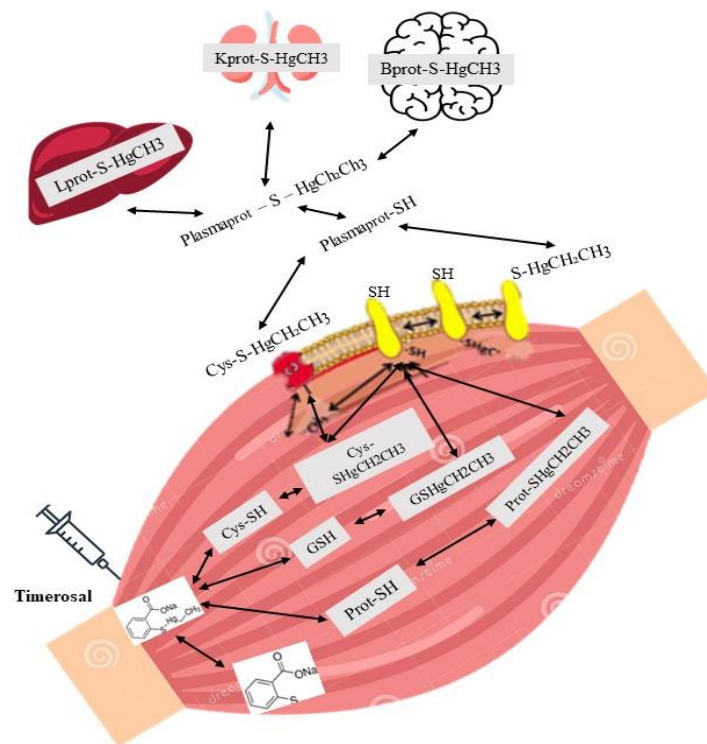


Figura 6 - Esquema do metabolismo do EtHg no músculo, após inoculação de timerosal (adaptado de Dórea et al.). Para melhor compreensão, a figura demonstra o metabolismo, omitindo algumas etapas de transferência, bem como, as trocas envolvendo os grupos tióis do fluido intersticial e a transformação de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-Hg}^+$ em Hg^{2+} .

O complexo EtHg-Cys acumula-se no cérebro de ratinhos bebês e pensa-se que, atravessa a BHE, pelo mecanismo de mimetização molecular pelo qual passa o complexo MeHg-Cys (Figura 7). Após isto, sofre desalquilação e passa a Hg^{2+} , mais rapidamente que o MeHg. A sua eliminação, também, é mais rápida que a do MeHg, sendo o tempo de semi-vida do EtHg de 3 a 7 dias, que é substancialmente menor do que o do MeHg (45 a 70 dias). A excreção do EtHg ocorre, principalmente, na urina e nas fezes. (1,39,46,47)

Desta forma, os diferentes estudos realizados ao longo dos anos, tanto em animais como em humanos, são essenciais para modelar os impactos da exposição do ser humano às formas orgânicas EtHg e MeHg. Assim, Zimmerman et al. utilizaram células do glioma de ratos para demonstrar que a absorção de EtHg-Cys nas células, foi semelhante à do complexo MeHg-Cys, permitindo-lhes concluir que as duas espécies poderão ter o mesmo mecanismo de transporte, especialmente no tecido nervoso. (50)

Em comparação, o MeHg também se liga à cisteína, formando o complexo MeHg-Cys (similar à estrutura da metionina) (Figura 7). Assim, quando a proteína de peixe é

ingerida, é, posteriormente, hidrolisada e o complexo MeHg-Cys é absorvido na parede intestinal (cerca de 95%). (1) A sua distribuição é rápida, sendo que apenas 5% permanece ligada à hemoglobina na corrente sanguínea, após 30-40h.

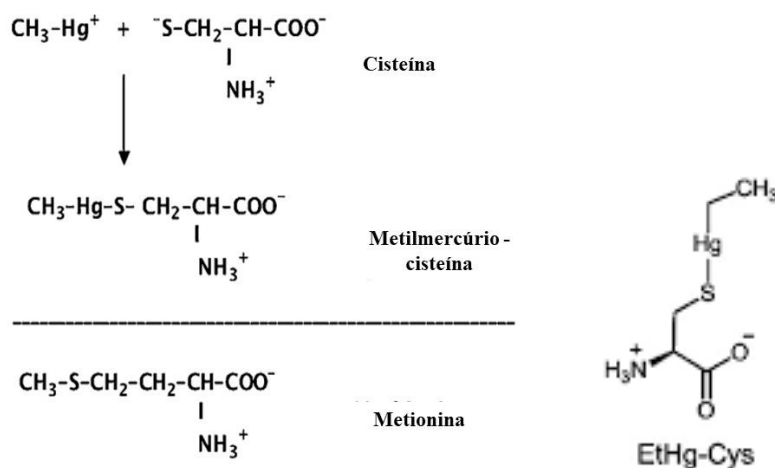


Figura 7 - Fórmula química do complexo MeHg-cisteína e do complexo EtHg-cisteína, comparando com a metionina (adaptado de Clarkson et al.)

A partir daí, é distribuído por todos os tecidos ricos em proteínas, como cérebro, rim, fígado, músculos, cabelo e unhas. (51) Como referido anteriormente, o complexo pode, por mecanismo de mimetização molecular, ultrapassar a BHE, utilizando os mesmos transportadores membranares da metionina, o que permite penetrar nas células endoteliais e, seguidamente, no SNC. No entanto, o transporte através da BHE é limitado, e, por isso, o MeHg acumula-se, durante mais tempo, no cérebro, causando neurotoxicidade. (1) Posteriormente, o MeHg é excretado nas fezes, na urina e leite materno, podendo também sofrer recirculação enterohepática. (47)

No caso da exposição de mulheres grávidas, o MeHg atravessa a placenta e, como o sangue fetal tem maior hematócrito e maior quantidade relativa de albumina, acumula-se mais facilmente, causando mais toxicidade fetal. (51,52)

Para comprovar isso, foram realizados estudos relacionados com a cinética do EtHg e do MeHg, de modo a conseguir comparar as duas cinéticas e, conseqüentemente, a sua toxicidade. Os estudos referidos usaram macacos e/ou ratos, onde inocularam timerosal todos os dias, durante 6 meses, conseguindo demonstrar que grande quantidade de EtHg se acumulava primeiro, nos rins (53) (cerca de 69%), devido à sua função fisiológica de filtração, (54) depois no fígado (menos de 25%) e em menor quantidade no cérebro

e nos músculos. (53) O facto do EtHg se acumular no cérebro (no lado basolateral das células endoteliais) (48) pode indicar que este também passa a BHE, tal como o MeHg. (54)

Além disso, Magos et al. demonstraram, também, que os ratos apresentavam maior concentração de MeHg no cérebro, pois, a acumulação deste composto, pode induzir danos graves na camada granular do cerebelo, provocando neurotoxicidade, ao contrário do EtHg. (55)

Quanto à distribuição de EtHg, Harry et al. evidenciaram que, após uma dose intramuscular (IM) de timerosal em ratos, a sua distribuição, passado 24h, no sangue, cérebro e rins foi menor (sangue – 10,7 µgHg/g; cérebro – 1,67 µgHg/g; rins – 86,1 µgHg/g), comparando com a dose de MeHg (sangue - 45 µgHg/g; cérebro – 11,4 µgHg/g; rins – 117,5 µgHg/g), pelo que existem diferenças significativas entre a distribuição e tempo de semi-vida dos dois compostos em ratos bebés e adultos. (54,56)

Adicionalmente, vários estudos sugerem que o Hg^{2+} pode ter um papel importante após a exposição a EtHg ou MeHg, uma vez que ocorre desalquilação. (25)

Desses estudos faz parte o de Zareba et al, que analisou, em ratos, as diferenças entre o EtHg e MeHg, descobrindo que os animais expostos ao EtHg apresentavam menor concentração de Hg total, nos tecidos renais e cérebro, mas maior concentração de Hg^{2+} nos rins e fígado, comparando com os animais expostos ao MeHg. (57) Este estudo verificou que 6 horas após administração de timerosal, o EtHg é largamente metabolizado em Hg^{2+} , acumulando-se nos rins, confirmando, assim, que os alvos do EtHg são os rins e o cérebro e que há diferentes distribuições entre as várias formas de Hg orgânico. (46,48,58,59) Apesar do tempo de permanência do EtHg, no sangue, ser menor, em comparação com o MeHg, o EtHg permanece mais tempo no cérebro dos macacos, na forma de Hg^{2+} , bioacumulando-se. (60,61)

Outro estudo semelhante realizado por Burbacher et al., usou macacos bebés *Macaca fascicularis*, que receberam a TCV no momento do nascimento e na 1ª, 2ª e 3ª semanas. Os resultados mostraram que as concentrações de Hg eram menores no cérebro dos macacos que receberam timerosal por via IM, comparando com os macacos que receberam uma dose equivalente de MeHg, por via oral, sendo a sua eliminação mais rápida: 22 dias para o EtHg e 60 dias para o MeHg. (41,62) Contudo, a quantidade de Hg^{2+} acumulada no cérebro era de 71% em animais expostos ao EtHg e de apenas 10%

nos animais expostos ao MeHg, pelo que se pode concluir que a exposição a EtHg provoca uma maior acumulação de Hg^{2+} no cérebro, (41,46,48) o que pode resultar da maior suscetibilidade do EtHg para sofrer desalquilação por ataque do radical OH, levando a uma maior e mais rápida metabolização a Hg^{2+} . (48,54) Este facto pode explicar a maior toxicidade do EtHg relativamente a uma dose equivalente de MeHg, pois o Hg^{2+} é mais eletrofílico e tem maior afinidade para grupos tióis. (63)

Por último, de acordo com o estudo realizado por Pichichero et al., observou-se que o EtHg tem um tempo de semi-vida muito pequeno, em comparação ao MeHg, pelo que atinge uma menor concentração no sangue. (30,58) Este estudo também analisou as concentrações de EtHg, em fezes e urina durante 1 mês, depois da inoculação da vacina, concluindo que o EtHg se eliminava principalmente por via fecal. (30) Isto poderá dever-se ao facto do EtHg ser convertido mais rapidamente a Hg^{2+} , não sofrendo, por isso, a recirculação enterohepática que o MeHg sofre. No entanto, Carneiro et al. estudaram a distribuição e excreção de EtHg e MeHg nos tecidos, concluindo que o EtHg é também eliminado pela urina, isto porque grande parte do Hg acumula-se no rim, na forma de Hg^{2+} . (54)

Em suma, existem semelhanças e diferenças na cinética de Hg após a administração oral de MeHg e injeção IM de timerosal. (41) O EtHg tem semelhanças químicas com o MeHg, uma absorção e distribuição similares no corpo, causando efeitos semelhantes no cérebro. Contudo, o EtHg é metabolizado mais rapidamente em Hg^{2+} , provocando, conseqüentemente, uma eliminação mais rápida, (com exceção no cérebro, em que a sua eliminação é mais lenta), apesar do MeHg ser mais neurotóxico. Quanto ao tempo de semi-vida, o EtHg tem menor tempo que o MeHg e, por isso, uma menor concentração no sangue, sendo mais rapidamente excretado, o que resulta numa menor toxicidade. (1,64) Para além disso, uma inoculação de TCV (0,5 mL) contém 25 μg de Hg e a ingestão de peixes de água doce e salgada, com alto teor de Hg, contém cerca de 40 μg de Hg, que é consideravelmente maior do que o Hg contido em vacinas. (65,66)

4.1.2 Mecanismos moleculares de toxicidade do etilmercúrio

Após uma inoculação de TCV, o timerosal dissocia-se e o EtHg é distribuído pelo organismo. No entanto, não se sabe muito sobre as suas concentrações de Hg em tecido humano, nem sobre o seu mecanismo de ação (1), mas sabe-se que o timerosal inibe o

sítio ativo de várias enzimas, ligando-se às Cys – que contêm grupos -SH – e à selenocisteína (Sec), presente nas selenoproteínas. (16)

4.1.2.1 Depleção de glutatona

A alta afinidade do Hg por grupos SH, tem sido sugerida como um dos mecanismos críticos na toxicidade do EtHg e MeHg. (67) O Hg tem como alvo a glutatona, que é um tripéptido e antioxidante endógeno, e contém Cys, um aminoácido com grupos SH, onde o EtHg e o MeHg se ligam. Por essa razão, os complexos com os grupos SH, servem de ligandos e asseguram o transporte de compostos de Hg até ao SNC. (68)

Como referido anteriormente, após inoculação do timerosal, o EtHg liga-se a aminoácidos como a Cys, formando o complexo EtHg-Cys, que permite o seu transporte até ao cérebro, através da BHE. De seguida, sofre desalquilação passando a Hg^{2+} , que se acumula no cérebro e rins. (69) Igualmente, o MeHg complexa com a Cys, permitindo o transporte de MeHg, pelo mecanismo de mimetização da metionina (substrato do LAT-1 - transportador bidirecional de aminoácidos no cérebro, placenta e em tumores) (50), para o cérebro através da BHE. Após a ligação de MeHg e EtHg à glutatona, ocorre diminuição dos níveis de GSH (importante na proteção de células do SNC) e aumento na produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) (por exemplo, anião superóxido e peróxido de hidrogénio). De realçar que a GSH é o cofator de enzimas como as glutatona peroxidases, que são importantes no controlo dos níveis de peróxidos nas células.

O aumento de ROS, que são moléculas muito reativas, pode danificar as células, ácidos nucleicos e proteínas, (70) e regular negativamente a atividade das enzimas redox, e consequentemente, levar a stress oxidativo, que é um mecanismo patogénico causal de diversas patologias. (55,70)

Deste modo, para avaliar se os mecanismos moleculares de toxicidade do EtHg eram iguais aos do MeHg, foram realizados diversos estudos. Migdal tentou relacionar os mecanismos de toxicidade do EtHg e do timerosal com a depleção da GSH e o aumento de ROS. Neste estudo verificou-se que a exposição ao timerosal e, consequentemente, ao EtHg provoca depleção da GSH, aumento de ROS e, também, stress oxidativo nos monócitos. (41,60,61)

Adicionalmente, num estudo de Zimmermann et al., depois da exposição aos complexos EtHg-Cys e MeHg-Cys, ocorreu uma diminuição da viabilidade das células C6 do glioma de ratos, induzindo morte celular. Observou-se, também, uma diminuição nos níveis de GSH, depois da exposição ao complexo de MeHg-Cys maior do que após exposição ao complexo de EtHg-Cys. (50)

4.1.2.2 Inibição do sistema da Tiorredoxina

Para além do sistema da glutatona existe, nas células, outro sistema antioxidante tiol dependente (Figura 8): o sistema da Tiorredoxina – maior sistema dissulfeto redutase – que é constituído pela tiorredoxina (Trx), pela selenoenzima tiorredoxina redutase (TrxR) e pelo NADPH (71) tendo como função manter as proteínas reduzidas, de modo a evitar o stress oxidativo, regular a síntese de DNA e a proliferação celular, manter a sinalização celular, entre outras. (72) Uma vez que este sistema está presente em várias vias de regulação metabólica, (73) pode ser parte integrante do mecanismo de toxicidade do EtHg.

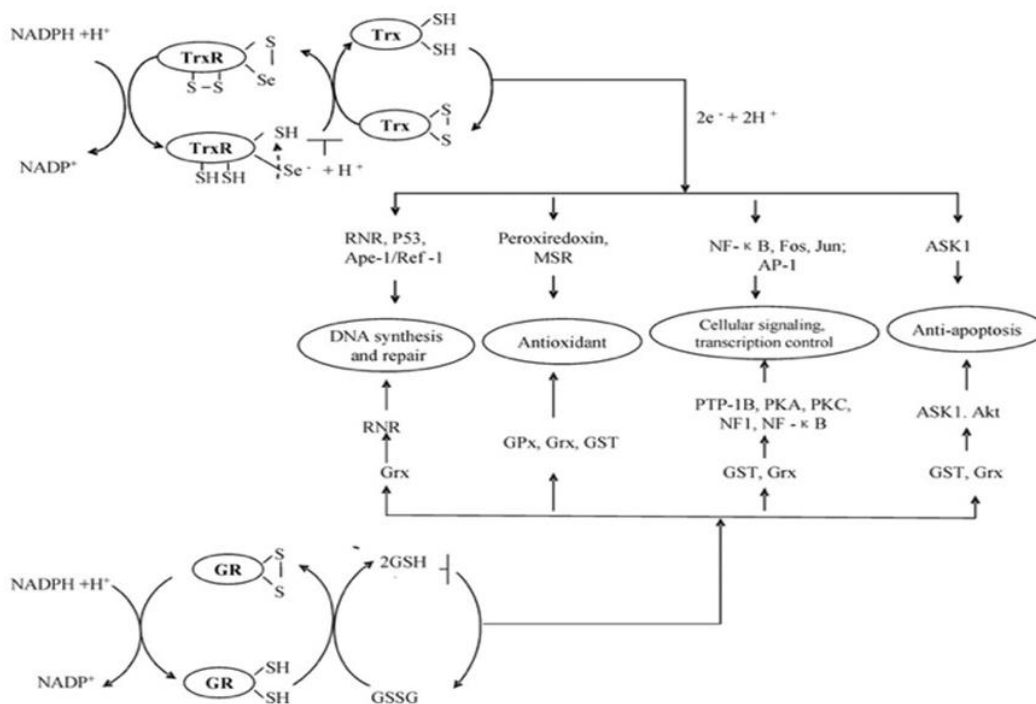


Figura 8 - Sobreposição de funções entre o sistema da glutatona e da tiorredoxina (Adaptado de Lu, J et al.)

Os compostos de Hg têm alta afinidade para os grupos selenotiol (SeH) da selenocisteína, presente em selenoproteínas (TrxR e glutathione peroxidase (GPx)), superior à afinidade para os grupos SH da Cys. (74,75)

Deste modo, a TrxR é um dos principais alvos dos compostos de Hg. Esta enzima existe em duas isoformas principais no citosol (TrxR1) e na mitocôndria (TrxR2) (71,72) e, para além da redução da Trx, tem várias funções, como redução de peróxidos e regeneração de diversos compostos. (76)

Assim, Branco et al. realizou um estudo com o objetivo de compreender a associação entre compostos de Hg e o sistema tiorredoxina. Este estudo demonstrou que, após 28 dias de exposição ao MeHg, através de peixe contaminado, a atividade da TrxR no cérebro diminuiu. Esta diminuição ocorreu antes do dano patológico, pelo que a sua inibição pode ser uma consequência da toxicidade do Hg. (73)

Uma exposição a níveis baixos (1 μ M) de MeHg e EtHg inibe a atividade da TrxR, e promove a translocação para o núcleo, do fator nuclear E2 (Nrf-2) (fator de transcrição envolvido no stress oxidativo) que se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE), na região promotora do gene da TrxR1, iniciando a sua transcrição e síntese. Para além disso, quando a atividade da TrxR diminui, ocorre um mecanismo de segurança que envolve a GSH, para manter a redução de tiorredoxina. À medida que a exposição ao MeHg e EtHg aumenta, o mecanismo de segurança é bloqueado, ocorrendo oxidação da tiorredoxina, que provoca apoptose celular. (77) Neste contexto, os sistemas redox ativos são fatores importantes no controlo da transdução do sinal redox e na regulação da produção de ROS, (76) uma vez que, os dois sistemas juntos evitam o stress oxidativo. (73) Estes sistemas são alvos de compostos de Hg no SNC, pelo que, a interrupção das vias de sinalização redox, poderá ser a causa primordial dos efeitos sobre o neurodesenvolvimento. (78–80)

4.1.2.3 Transporte de glutamato

O glutamato que é o aminoácido mais abundante do SNC e atua como principal neurotransmissor excitatório, sendo importante nalguns processos cerebrais como o desenvolvimento, memória e aprendizagem. (81) Este aminoácido não atravessa a BHE, sendo sintetizado no tecido nervoso, pois as enzimas que participam no seu metabolismo estão presentes nos neurónios. Este neurotransmissor, quando está

presente em elevadas concentrações, pode ser uma toxina capaz de provocar doenças neurodegenerativas. (82,83)

A farmacodinâmica induzida pelo timerosal no SNC é complexa, pois este pode interagir com várias proteínas e estruturas celulares, afetando diversos processos biológicos. O que se sabe é que inoculações de timerosal provocam um aumento da concentração extracelular de glutamato, podendo alterar a estimulação cerebral, levando à degeneração dos neurónios. Adicionalmente, o aumento da concentração de glutamato também pode afetar processos críticos no desenvolvimento cerebral, como apoptose, formação de sinapses, etc, contribuindo para o neurodesenvolvimento de transtornos mentais. (84)

Igualmente, o MeHg provoca uma interrupção do transporte de glutamato. (85) Este quando é libertado na fenda sináptica, via recetores NMDA, estimula o influxo de Ca^{2+} , aumentando os seus níveis. Contudo, o mecanismo pelo qual o MeHg interage com os transportadores de glutamato ainda não é conhecido, pois existem vários tipos de transportadores. Pensa-se que o MeHg e o Hg^{2+} - e possivelmente o EtHg - aumentam a libertação deste neurotransmissor e impedem a sua captação pelos astrócitos. A consequente acumulação de glutamato no terminal sináptico está associada ao défice motor e cognitivo. Assim, elevados níveis de glutamato extracelular podem causar um aumento na transmissão glutamatérgica, provocando excitotoxicidade. (61,86,87) Dentro das consequências moleculares que o aumento dos níveis de glutamato provoca, incluem-se o aumento do peróxido de hidrogénio (ou seja, ROS), diminuição da glutatona na mitocôndria, aumento da peroxidação lipídica e alterações na homeostase do cálcio. (88,89)

4.1.2.4 Funções celulares que dependem do cálcio

A homeostase do cálcio é muito importante nos processos celulares, sendo este um elemento essencial para diversas funções como a exocitose e a contração muscular. No entanto, quando o cálcio está em excesso, existem mecanismos de defesa que tentam manter a homeostase deste elemento, pois ele pode ser tóxico. (90)

Desta forma, foi demonstrado que o timerosal consegue induzir ou inibir várias funções celulares que dependem do cálcio, sendo dependentes da sua concentração. Por exemplo, baixas concentrações de timerosal (1 μM) abrem o canal de Ca InsP3 e

concentrações mais altas (100 μM) provocam um aumento da libertação de Ca no cerebelo. (61,90) Na membrana do retículo endoplasmático, o timerosal pode ativar o canal de Ca InsP3, desencadeando a libertação de Ca para o interior da célula, e resultando, conseqüentemente, num influxo de Ca extracelular, (91) o que induz stress oxidativo, neurotoxicidade e disfunção mitocondrial. (92)

Em comparação, a neurotoxicidade do MeHg está relacionada com a interrupção do transporte de glutamato, que, conseqüentemente, aumenta os seus níveis por estimulação dos recetores NMDA. Por conseguinte, ocorre aumento do influxo de Ca^{2+} , que provoca stress oxidativo e neurotoxicidade, pois um aumento dos níveis de Ca, no terminal pós-sináptico, afeta as mitocôndrias, por meio do aumento da atividade do óxido nítrico sintase (iNOS) e produção de óxido nítrico (NO), (93) levando a disfunções como: despolarização, aumento dos níveis de ROS e disfunção mitocondrial. (94) A disfunção mitocondrial também provoca aumento dos níveis de K^+ e efluxo de H^+ . (95)

Além disso, o MeHg ao ligar-se a transportadores, interfere na respiração oxidativa, diminuindo os níveis de ATP, pelo que, a disfunção mitocondrial pode estar envolvida em mecanismos de apoptose celular. (95) Esta disfunção aumenta o stress oxidativo e reduz as defesas de antioxidantes, criando graves conseqüências para a saúde. (96)

Como referido, a homeostase do Ca^{2+} tem um papel crucial nos processos de lesão celular, uma vez que, de acordo com as evidências, uma disrupção do mesmo, pode estar associada a um efeito neurotóxico.

Deste modo, após a exposição do organismo ao EtHg ou MeHg, ocorre um aumento da expressão da proteína de ligação ao Ca (a calbindina) nas células cerebrais. Posto isto, o EtHg ou MeHg promovem a elevação de Ca^{2+} , induzindo dano ou levando à apoptose celular. Por conseguinte, pode ocorrer a redução da expressão da glutamina sintetase no tecido cerebral, que induz a conversão de glutamato em glutamina, regulando a concentração de glutamato na fenda sináptica e equilibrando a sua concentração (figura 8), de modo a estar abaixo do nível que é considerado tóxico. O glutamato se estiver em concentrações elevadas passa a ser uma potente neurotoxina, induzindo lesão neuronal e, conseqüentemente, morte. (97)

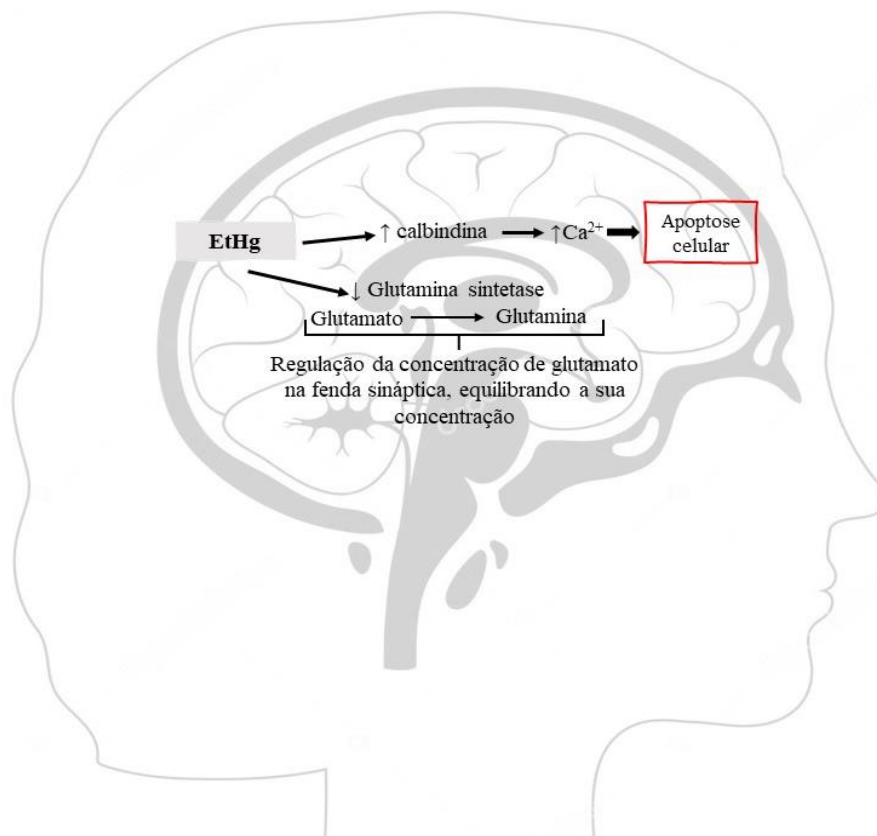


Figura 9 - Mecanismo de neurotoxicidade após exposição ao EtHg (adaptado de Souza et al.)

Posto isto, pode-se afirmar que a toxicodinâmica do EtHg é muito semelhante à do MeHg, no entanto, a farmacocinética é diferente entre os compostos, fazendo com que o MeHg seja mais tóxico.

4.2 Uso do timerosal nas vacinas e os seus efeitos

As vacinas são um meio de proteção e combate contra diversas doenças, podendo (32) ser consideradas medicamentos. No entanto, apresentam diversas diferenças comparativamente aos medicamentos clássicos, (98) sendo necessárias em situações de profilaxia, para proteger um número alargado de populações. (99)

São, geralmente, constituídas por um ou mais antigénios (partículas estranhas), por adjuvantes, que permitem uma melhor resposta imunológica, tornando-a rápida e estável, e também, por conservantes e estabilizadores. (32,100,101)

Os conservantes como, por exemplo, o timerosal, o fenol e o formaldeído, são compostos químicos utilizados nas vacinas inativadas, e em formulações biológicas,

com a finalidade de evitar o crescimento bacteriano e fúngico, principalmente em casos de contaminação acidental, que ocorre quando há repetidas punções em frascos multidose. (101,102) Estes conservantes podem estar presentes em vacinas multidose, (103) pois o transporte e distribuição são mais rápidos e eficientes, acelerando o fabrico e evitando o aumento de custos e contaminação (uma das vantagens do timerosal).

Em 1927, o químico Morris Kharasch patenteou o timerosal e, em 1928, a indústria farmacêutica “Eli Lilly and Company” ajudou a Universidade de Chicago na síntese de timerosal, que mais tarde foi patentado sob o nome comercial de *Merthiolate*. Nos anos seguintes, os investigadores Lilly Powell e W.A. Jamieson realizaram testes in vitro, que demonstraram que o timerosal é 40 a 50 vezes mais eficaz que o fenol (uma alternativa), contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. Por isso, começou a ser utilizado em produtos antissépticos (sprays nasais, colírios, soluções para lentes de contacto e vacinas) para prevenir a contaminação. Por igual motivo, este conservante bactericida começou a ser usado em vacinas multidose. (104)

Desde 1930 que o timerosal é usado como conservante em concentração de 0,01%, contendo 25 µg de Hg por dose de 0,5 mL, e como aditivo para produtos biológicos em muitos medicamentos, produtos cosméticos, colírios e vacinas. (32,62,105) É usado também em situações em que há falta de recursos de conservação adequados, como é o caso da refrigeração. (62,103)

A ação antimicrobiana do timerosal deve-se à sua dissociação em EtHg e tiosalicilato de sódio, estando mais propriamente relacionada com o EtHg. (101,105) Esta propriedade permite o uso seguro de vacinas, que contêm pequenas quantidades de timerosal e, também, a possibilidade de vacinas como a da gripe, poderem estar em frascos multidose, evitando a sua contaminação e facilitando as campanhas de vacinação em massa. (106) Este composto permitiu que centenas de milhões de pessoas tivessem acesso a vacinas (107), pois é mais barato e fácil de produzir em quantidades significativas, sendo muito importante em casos de pandemia. (108)

Em certas vacinas, o timerosal pode ser adicionado logo no processo de fabrico. No entanto, quando é adicionado ao frasco multidose, pode haver uma introdução de bactérias e fungos, o que acarreta um risco de reações locais e doenças graves, podendo, em casos mais severos, provocar morte. Este risco acaba por ser mais elevado do que os riscos associados ao uso de conservantes. (100,101,109)

Desde o século XX que as TCVs começaram a ser usadas em todo o mundo. Todavia, passados alguns anos foram levantadas várias questões, sobre a segurança de alguns componentes não biológicos presentes nas vacinas, principalmente o timerosal. (110)

Deste modo, em 2004, o Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) e o INFARMED concluíram que, por precaução, deveria evitar-se ou reduzir-se o uso de timerosal e outros compostos de Hg nas vacinas e nos processos de fabrico, começando a substituir o timerosal por outro tipo de conservantes nas vacinas multidosas, o que provocou um enorme esforço na investigação. (111,112)

Desde aí que várias vacinas autorizadas na UE, Reino Unido e EUA foram retiradas, ou reduzidas as quantidades do conservante timerosal, com o intuito de diminuir a exposição a compostos organomercuriais, para conseguir atingir a meta global definida. (103,105,113) Contudo, a Agência Europeia do Medicamento (EMA) observou que, durante alguns processos de fabrico, o uso de timerosal era necessário, desde que a sua utilização fosse devidamente justificada. (113)

Dentro das TCV mais usadas, na altura da polémica com o timerosal, destacam-se as vacinas contra: a difteria, tétano e tosse convulsa (DTPa), a Hepatite B (VHB), a gripe, a raiva, a doença invasiva por *Haemophilus influenzae* serotipo b (Hib), a doença invasiva por *Neisseria meningitidis* do serogrupo C, a gripe A (H1N1) e, por fim, a doença por *Streptococcus pneumoniae*. Todas estas vacinas continham timerosal em concentrações entre 8 a 50 µg por dose, (31,32,114) pelo que não existe qualquer evidência de diminuição da sua segurança. (115)

Em Portugal, começou-se a administrar vacinas no início do século XIX, e em Outubro de 1965 criou-se o Plano Nacional de Vacinação (PNV) gratuito, acessível e universal. A partir daí foram vacinadas mais de 7 milhões de crianças e vários milhões de adultos e grávidas, a fim de controlar ou erradicar certas doenças, como, por exemplo, em 1966 a DTPa, em 1974 o sarampo, em 1987 a parotidite, em 2000 a Hib e a VHB e em 2006 a vacina meningocócica, e por conseguinte evitar centenas ou milhares de mortes. (32,116)

Hoje em dia, os compostos de Hg são utilizados raramente, sendo a prevalência do seu uso em vacinas e colírios quase nula. Porém, estes podem estar presentes na formulação, mas em quantidades diminutas, não apresentando efeitos nocivos para a saúde, exceto reações de hipersensibilidade. (106,115)

Em Portugal, as vacinas do PNV não contêm timerosal, isto é, tanto as vacinas da gripe H1N1, a vacina meningocócica e a vacina DTPa contêm quantidades residuais, menos de 0,3 µg, sendo consideradas vacinas sem timerosal. (106,117,118) Mesmo estas vacinas com timerosal em quantidades diminutas, já foram retiradas do mercado (tabela 2).

Tabela 2 - Concentração de timerosal e de Hg nas vacinas (adaptado de CDC)

Vacina	Nome Comercial	Titular de AIM	Concentração de timerosal	Hg/0,5mL
DTPa	Tripedia (descontinuada)	Sanofi Pasteur	menos de 0,3 µg	residual
Hib	Hiberix	GlaxoSmithKline	0	0
Gripe H1N1	Pandemrix (descontinuada)	GlaxoSmithKline	0,01%	25
VHB	Engerix - B	GlaxoSmithKline	0	0
HPV	Gardasil	Merck	0	0
VASPR	M-M-RVaxpro	MSD VACCINS	0	0
Meningocócia (multidose)	Menomune-A/C/Y/W-135 (descontinuada)	Sanofi Pasteur	0,01%	24,5
Pneumocócia	Pneumovax - 23	Merck	0	0

No caso da vacina DTPa (Tripedia® - aprovada em 1992 e retirada em 2013), cada dose contém o tóxico diftérico, o tóxico tetânico e o toxóide com subunidades de *Bordetella pertússis*, tendo como excipientes o alumínio, formaldeído (menos de 0,01%) e pode conter timerosal resultante do processo de fabrico (menos de 0,3 µg de Hg por dose). (119–122)

A vacina da gripe H1N1 (Pandemrix® - aprovada em 2009 e retirada em 2010) (108) é composta pelo vírus *Influenza* inativado contendo o antigénio, e pelos seguintes excipientes: polissorbato 80 (ou Tween 80), octoxinol, timerosal, cloreto de sódio (NaCl), fosfato dissódico (Na₂HPO₄), fosfato monopotássico (KH₂PO₄), cloreto de potássio (KCl), cloreto de magnésio (MgCl₂) e água para preparações injetáveis, podendo conter proteína de ovo, ovalbumina, formaldeído, sulfato de gentamicina e desoxicolato de sódio. (119,123–125)

A vacina meningocócia (Menomune® 3 – A/C/Y/W-135 – retirada em 2017) é uma vacina polissacárida combinada e indicada para prevenir a doença meningocócica

invasiva. Cada dose de vacina multidoso com 6 mL de diluente contém água destilada estéril e apirogênia, e timerosal como conservante. (126–128)

Em 2008, a Organização Mundial de Saúde, mesmo sabendo dos riscos da utilização do timerosal, defendeu o uso de timerosal nas vacinas, justificando que este é seguro e que deverá ser utilizado como conservante, uma vez que o risco de contaminação em vacinas multidoso ultrapassa o risco fictício de intoxicação por Hg. Adicionalmente, realizaram-se estudos que afirmaram que não há evidência clara de toxicidade em crianças ou adultos expostos ao timerosal (contendo EtHg) e que as vacinas que contêm essa substância não aumentam a quantidade de Hg no organismo, pois este é eliminado rapidamente, por isso não se acumula, não atingindo níveis prejudiciais à saúde humana, pelo que terá um perfil de toxicidade mais seguro que o do MeHg, que é potencialmente tóxico. (32,62,109) Esses estudos vieram, também, demonstrar que os efeitos adversos mais comuns passam por inchaço e rubor no local da injeção, podendo, muito raramente, originar alergias graves. (109) Contudo, as autoridades reguladoras da saúde (nomeadamente a EMA) e indústrias farmacêuticas conseguiram eliminar o timerosal aos poucos, tanto nos EUA como na UE, o que implicou a mudança de vacinas multidoso para unidoso, que, no último caso, não precisam do timerosal como conservante. (32) Esta opção de interditar a produção e utilização de TCVs teve um impacto negativo ao nível da acessibilidade da vacinação, principalmente em países em desenvolvimento. (129)

Todavia, o timerosal não tem sido só usado em vacinas. Nos últimos anos, ele está presente em produtos nasais e colírios (edolfene® e tropicil top®), produtos oftálmicos, como lágrimas artificiais, lentes de contacto e gotas oculares, pomadas tópicas, produtos de uso transdérmico e tintura de mertiolato® (no Brasil). Este último, deve ser utilizado para desinfetar feridas, promovendo a sua cicatrização. (106,130–132)

Quanto aos colírios, o Comité de Medicamentos para Uso Humano decidiu que estes devem ser usados sem conservantes na população pediátrica, nomeadamente em neonatos, mas quando são necessários com conservantes devem conter a dose mínima para provocar ação antimicrobiana, justificando sempre a sua utilização. Adicionalmente, deve-se promover sempre preparações oftálmicas sem Hg ou derivados, substituindo por outras alternativas como o 2-fenoxietanol ou o fenol, apesar da sua eficácia antimicrobiana e segurança não serem tão boas como a do timerosal. (107,111,117,129)

Atualmente, o Edolfene® é um dos colírios que contém timerosal, tendo como substância ativa (SA) o flurbiprofeno sódico, e como excipientes o cloreto de potássio, NaCl, citrato de sódio, ácido cítrico mono-hidratado, edetato dissódico, timerosal, água purificada, ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio. (133) Este colírio é indicado na miose (diminuição da pupila) intra e pós-operatória. (134)

O Tropicil top®, também contém, hoje em dia, este composto organomercurial e destina-se a tratar a midríase, que se caracteriza por ser a dilatação anormal da pupila. Este colírio tem como SA a tropicamida e como excipientes o ácido bórico, timerosal, propilenoglicol, água, ácido clorídrico concentrado, NaCl e hidróxido de sódio. (135)

Portanto, o uso de timerosal em produtos médicos, como em vacinas e produtos oftálmicos, tem um historial de segurança para a saúde humana. (136)

4.3 Factos e Artíficos do Uso de Timerosal nas Vacinas

Desde 1999 que se tem falado da relação entre o uso de timerosal nas vacinas, como conservante, e o aparecimento de sintomas relacionados com o autismo. Dos numerosos estudos realizados sobre este assunto, (1) algumas conclusões foram retiradas, todavia a controvérsia continua.

Antes da década de 1930, já havia dados, em animais e humanos, que comprovavam a segurança e eficácia do timerosal como conservante. (137) Desde aí, que o timerosal tem um historial de segurança e eficácia na prevenção da contaminação microbiana das vacinas, sem causar grandes efeitos adversos, para além de reações no local de injeção. (138) O timerosal foi o composto organomercurial mais promitente da indústria farmacêutica depois da 1ª Guerra Mundial. (104)

Apesar disso, na década de 1970 começaram a surgir as primeiras preocupações sobre a sua segurança, devido à alta consciencialização sobre a toxicidade dos compostos alquilados de Hg, em resultado dos episódios de envenenamento em massa com MeHg no Japão e no Iraque. Contudo, antes de 1990, nem as autoridades médicas, nem governamentais falavam da probabilidade de TCV provocarem neurotoxicidade, apesar da toxicidade do timerosal a altas doses ter sido demonstrada nessa década. (104)

4.3.1 Timerosal nas Vacinas: uma possível causa para o desenvolvimento de Autismo?

Em junho de 1998, Andrew Wakefield publicou no *The Lancet* (139) um estudo fraudulento em que alegava que 8 crianças tinham desenvolvido sintomas de autismo 1 mês após receber a VASPR, apresentando sintomas gastrointestinais e hiperplasia nodular linfoide, concluindo que a VASPR causava inflamação intestinal, levando à transferência de peptídeos para o sangue e para o cérebro, afetando o neurodesenvolvimento das crianças. (140) Já em 2010, este artigo foi retirado após confirmar-se que havia fraude nos resultados.

Contudo, rapidamente, em 1999, a polémica passou da fictícia ligação VASPR – autismo, para a relação timerosal – autismo. (141) Essa polémica assentou no facto de que as TCVs poderiam conter Hg em excesso, tendo em conta as guidelines existentes para a ingestão de MeHg. (30) Portanto, estas ligações pretendiam traduzir a seguinte afirmação: “uma “epidemia” de autismo que, aparentemente, coincidiu com a introdução da VASPR e/ou o aumento da exposição ao EtHg, devido ao aumento do número de vacinas recomendadas nos primeiros 3 anos de vida”. (142) Todavia, o timerosal nunca foi usado na VASPR, pois esta é uma vacina viva e não precisa de agentes antimicrobianos. (143)

O transtorno do espectro do autismo (TEA) consiste numa deficiência de desenvolvimento neurológico, causando dificuldades e desafios sociais, de comunicação e comportamentais significativos. (144,145) Os seus sintomas podem ser variáveis e estão associados a comportamentos repetitivos, podendo ser leves ou graves. (145) Normalmente aparece no início da infância, evolui com a idade e continua a manifestar-se para o resto da vida. (146) Vários estudos que foram realizados têm destacado a importância genética como sendo uma possível causa do TEA. (104,147–149) Além disso, o diagnóstico deste transtorno passa pelos seguintes critérios, definidos pela Associação Americana Psiquiátrica: “deficiência na comunicação social em diversos contextos e com outras pessoas; padrões repetitivos e restritos de comportamento, interesse ou atividade; presença de sintomas no período inicial de desenvolvimento; falta de funcionamento social e ocupacional; e, perturbações não desenvolvidas por deficiência intelectual ou atraso no desenvolvimento”. Todavia, estes critérios podem variar, (146) pois investigadores da década de 1970 começaram a

mudar os critérios de diagnóstico, de forma a conseguirem abranger crianças com maior deficiência intelectual e de linguagem. (104)

Ao contrário do que era alegado, os sinais e sintomas do autismo são bastante diferentes dos da neurotoxicidade por Hg, pois estes passam por alteração a nível do equilíbrio e coordenação motora, alteração sensorial, na fala e psiquiátrica, que diferem ou estão ausentes numa criança com autismo, pelo que, as preocupações acerca do timerosal ser a causa do autismo, não são biologicamente plausíveis. (140)

Tanto ambientalistas como médicos começaram a ter em atenção as exposições ambientais ao Hg, e por isso, a FDA pediu às empresas farmacêuticas que relatassem as quantidades de Hg presentes nos seus produtos e também as identificasse, através da Lei da Modernização da Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos. (140) A partir daí conseguiu-se perceber que a quantidade de EtHg nas vacinas excedeu as quantidades impostas pela FDA para o MeHg. (150)

Em 2001, não havia evidência de que uma pequena quantidade de timerosal pudesse causar danos, ainda assim, este foi removido de todas as vacinas infantis nos Estados Unidos. Assim, a preocupação hipotética de que este poderia causar problemas neurológicos, sobrepôs-se à falta de evidências de danos. No entanto, o timerosal não foi removido da vacina contra a gripe, a pedido da Academia Americana de Pediatria (AAP) e do Serviço de Saúde Pública dos EUA. (141,151) Nessa altura, Frank DeStefano (diretor do serviço de segurança do CDC) referiu que: “Se causasse autismo, a previsão seria que, uma vez que o timerosal fosse retirado das vacinas, o número de casos de autismo deveria ter estabilizado ou diminuído. Mas isso não aconteceu”. (152) Por outras palavras, a taxa de prevalência de autismo continuou a aumentar, mesmo depois de se interromper o uso de timerosal nas vacinas infantis. (142)

O facto de na altura, se verificar um aumento de casos de TEA, pode dever-se, em parte, às mudanças nos critérios de diagnóstico, que foram ocorrendo ao longo do tempo, e ao aumento da consciencialização pública e profissional, relativamente ao autismo e a outros transtornos relacionados. (149)

No entanto, a relação que se criou entre as vacinas e o autismo, mesmo não comprovada, provocou preocupação nos pais, levando a uma diminuição da taxa de vacinação infantil. A partir de 2000, o facto de existir a polémica de que o timerosal causava

autismo, originou danos legais, políticos e sociais. Na altura, pais de crianças autistas expuseram a sua situação ao Programa de Compensação de Lesões por Vacinas – usado para proteger os fabricantes de conflitos superficiais. Essas reclamações tornaram-se numa indústria rentável, pois os advogados (sem ética) procuravam possíveis vítimas para abrirem processos, obrigando os fabricantes de vacinas a retirar as vacinas do mercado, de modo a atrasar o processo de vacinação. A polémica com o timerosal foi também utilizada para efeitos políticos, pois em 2004, o Governador da Califórnia retirou as TCVs do mercado, levando outros Governadores a seguir o seu exemplo. Tanto médicos, como conselheiros governamentais que anunciaram que as vacinas não provocavam autismo, foram perseguidos e ameaçados com cartas de ódio e de morte. (153) (154)

4.3.2 Estudos in vivo e epidemiológicos com TCVs

Desde os anos 2000 que a investigação científica tem tentado demonstrar que não existe relação entre a inoculação com TCV e autismo.

Para avaliar uma possível neurotoxicidade do timerosal nas vacinas, foi realizado um estudo por Li et al., usando ratinhos com doses altas de timerosal e vacinando-os de modo a simular o esquema de vacinação das crianças nos EUA (aos 2, 4, 6 e 12 meses de idade). Neste estudo observou-se que a exposição ao timerosal não afetava o crescimento dos ratinhos. Adicionalmente, quando expostos a doses de timerosal, 5 vezes mais altas, também não se observaram efeitos significativos no comportamento social. Porém, quando tratados com doses de timerosal 10 vezes mais altas, apresentaram um certo grau de deficiência social. Assim, os resultados observados permitem concluir que, a exposição neonatal dos ratinhos ao timerosal, pode causar um défice de sociabilidade (caraterística principal do comportamento de crianças com TEA), que é dependente da dose. Contudo, é importante mencionar que a dose usada neste estudo foi 20 vezes maior da que é usada nas TCV em crianças e que em doses baixas não se observou efeito. (155)

Em humanos, o timerosal contribui, de facto, para alguma exposição de Hg em bebés, o que aliás é demonstrado pela análise das espécies de Hg presentes no cabelo, após uma inoculação com TCV. (35) Contudo, a questão-chave é, se as doses presentes nas TCV são toxicologicamente significativas, isto é, se contribuem para a acumulação de

Hg no SNC, sendo necessário realizar estudos para a desvendar. Como já foi referido, o EtHg é metabolizado e eliminado mais rapidamente do organismo, porém, é importante ressaltar que o EtHg entra no cérebro, assim como o MeHg e o Hg²⁺. (156,157)

Ao longo dos anos, foram realizadas várias revisões dos estudos epidemiológicos. Um estudo realizado por Price et al., com o objetivo de verificar se o EtHg em vacinas aumentava o risco de aparecimento de TEA, englobou 1008 crianças, das quais 256 tinham TEA e 752 não, permitindo avaliar a exposição de crianças e mães ao timerosal, para conseguir estabelecer uma relação com TEA. Deste modo, os resultados permitiram concluir que as TCVs não aumentam o risco de TEA e que ambos os grupos (com e sem timerosal) tiveram exposições semelhantes, pelo que a exposição ao EtHg em vacinas, durante a gravidez ou na infância, não se associa ao aparecimento de TEA. (158)

Passados alguns anos, a Dinamarca, a Suécia e a Califórnia deixaram de usar timerosal nas vacinas. Contudo, realizou-se um estudo com o objetivo de comparar a taxa de autismo, antes e depois da remoção de timerosal nesses países. Demonstrou-se que a prevalência de autismo aumentou nos três países, após a remoção de timerosal. Por isso, se a exposição ao timerosal tivesse uma relação causal com o autismo, esperaríamos que a prevalência diminuísse em todos os países, após a sua remoção (149) (o que não aconteceu). Portanto, pode-se concluir que os dados existentes não permitem inferir que a exposição ao timerosal é responsável pelo aumento da prevalência/taxa de autismo em crianças.

Alguns anos mais tarde, uma revisão abrangente deste estudo do Instituto de Medicina Americano (IOM), concluiu que não havia evidência suficiente de que existia uma relação causal entre TCVs e o aumento de prevalência de casos de autismo. Na verdade, o IOM chegou à conclusão de que as evidências de 2001 favoreciam a rejeição da associação entre timerosal e distúrbios do neurodesenvolvimento. (149)

Em 2003, as vacinas contendo timerosal expiraram nos EUA. No entanto, a taxa de autismo continuou a aumentar nos anos seguintes. Após isso, foram realizados diversos estudos no Reino Unido, EUA e Itália. O estudo do Reino Unido avaliou a relação entre a quantidade de timerosal recebida de vacinas nos primeiros 6 meses de vida, com várias medidas de desenvolvimento cognitivo e comportamental. (159) O estudo em

Itália comparou o desempenho neurológico 10 anos após exposição a TCV. (160) Ambos os estudos não encontraram associação entre a exposição ao timerosal em vacinas e problemas de desenvolvimento neurológico. Por isso, continuam a existir fortes evidências de que o timerosal nas vacinas não aumenta o risco de autismo ou outros distúrbios do neurodesenvolvimento. (161)

No mesmo ano, foi realizado um estudo coorte retrospectivo por Verstraeten et al. que teve como objetivo avaliar a toxicidade de TCVs em crianças. Este estudo dividiu-se em 2 fases: fase 1 – associações entre problemas de neurodesenvolvimento e exposição ao timerosal em 124.170 bebês; e fase 2 – problemas mais comuns provenientes da exposição na fase 1 em 16.717 crianças. Quanto aos resultados, na fase 1, a exposição durante 3 meses ao timerosal levou ao aparecimento de tiques; e na fase 2 não foi encontrada nenhum tipo de associação. Porém, das associações significativas encontradas, nenhuma era consistente com a relação entre TCV e distúrbios de neurodesenvolvimento. (151)

Posteriormente, em 2009, um estudo de Tozzi et al. avaliou a exposição ao timerosal, a longo prazo, para conseguir observar o desempenho neurológico ao fim de 10 anos, após a TCV. Este estudo comparou os resultados neurológicos de crianças (com menos de 1 ano de idade) que receberam duas doses de DTPa, uma contendo timerosal e a outra contendo uma alternativa, o 2-fenoxietanol. Após 10 anos, os 2 grupos foram testados e os resultados mostraram que entre os 24 resultados neurológicos avaliados, apenas 2 estão associados à exposição ao timerosal. Deste modo, como houve poucas associações encontradas entre a exposição ao timerosal e o desenvolvimento neurológico, pode-se concluir que o timerosal, nas doses administradas, não é prejudicial para a saúde humana. (160)

Mais tarde, devido à polémica com o timerosal, foram realizados 7 estudos descritivos, que concluíram que as TCV não provocam autismo. Ao mesmo tempo que se demonstrou isso, começaram a surgir outras teorias, procurando perpetuar a relação entre vacinas e autismo, como por exemplo: as crianças recebem as vacinas cedo demais e por isso há uma sobrecarga do sistema imunitário, ou então, devido à vacinação surge uma resposta autoimune patológica. Estas teorias são falácias por diversas razões: 1 – as vacinas não vão sobrecarregar o sistema imunitário; (162) 2 – múltiplas vacinações não o enfraquecem, aliás fortalecem-no; 3 – a suscetibilidade a infeções não prevenidas

por vacinas é igual entre crianças vacinadas e não vacinadas; (163) e, por último, 4 – o autismo não é uma doença auto-imune. (164) Esses estudos e a inaceitável teoria de que as vacinas sobrecarregam o sistema imunitário de uma criança rejeitam a premissa de que as vacinas causam autismo. (140)

Em 2010, o CDC realizou 9 estudos diferentes em que mostrou que, tanto a exposição pré-natal (gravidez) como a infantil, a TCV não fez aumentar o risco de TEA. (141,144)

Desde aí que muitos estudos realizados continuaram a apoiar a rejeição de uma associação entre timerosal e autismo. (143)

Um estudo epidemiológico realizado por Thompson et al. em conjunto com o CDC em 2012, teve como objetivo investigar a exposição ao timerosal entre a gravidez, nascimento e os primeiros 7 meses de idade e avaliar os resultados neurológicos passados 7 a 10 anos. Os resultados não demonstraram associações entre o timerosal e o aparecimento de deficiência intelectual, motora, comportamental e verbal. Contudo, houve uma associação entre a exposição precoce ao timerosal e o aparecimento de tiques em rapazes, mas o mesmo não se observou em raparigas. (165)

Adicionalmente, em 2014, um estudo epidemiológico caso-controlo (usando população japonesa, pois é altamente homogénea geneticamente) investigou, com mais detalhe, a relação entre a exposição à vacina VASPR e TCV e o aparecimento de TEA. Os resultados deste estudo permitiram afirmar que não houve diferenças entre o grupo controlo e o grupo que recebeu a VASPR ou a TCV e, portanto, a utilização dessas vacinas, na população infantil, não aumentam o risco de TEA. Assim, devido à preocupação que se gerou à volta do facto de as vacinas aumentarem o risco de TEA, torna-se necessário realçar que não é preciso retirá-las do mercado. (166)

Alguns anos mais tarde, foram elaborados 10 estudos epidemiológicos, que concluíram não existir uma relação causal entre a administração de TCV e aparecimento de TEA. Acresce que, alguns estudos anteriores, que apoiavam uma relação entre o timerosal e o aparecimento de TEA, demonstraram ser de baixa qualidade, apresentando falhas significativas de metodologia e, por isso, as suas conclusões revelaram-se inválidas. (167,168)

Posto isto, o Comité Consultivo Global sobre Segurança de Vacinas (CCGSV) fez uma revisão abrangente de 28 artigos sobre a segurança do timerosal, incluindo outros

estudos epidemiológicos mais robustos e de países diferentes. E, também, incluiu nessa revisão um modelo de avaliação de risco quantitativo, que é baseado no modelo farmacocinético de EtHg, que serve de base para se conseguir avaliar o risco quantitativo da toxicidade do timerosal. Este modelo permite interpretar os estudos em animais e humanos, avaliando as ligações entre a dose, os níveis no sangue e no cérebro e a sua toxicidade. A partir daí, o CCGSV concluiu que os estudos de toxicidade animal e/ou humana provaram que o EtHg não atinge níveis tóxicos no sangue e no cérebro, pelo que a associação entre o timerosal em vacinas e o aparecimento de autismo/neurotoxicidade é pouco provável. (169)

Em jeito de conclusão, mais estudos realizados reforçam a evidência de que o timerosal não é neurotóxico, sendo apenas um conservante que previne a contaminação das vacinas e que é usado há décadas. (142,170) Não obstante, a eliminação do timerosal das vacinas pode ser importante para populações que estejam expostas a Hg por outras fontes, como, através do consumo de peixe contaminado ou através da exposição a vapor de Hg, principalmente em zonas onde há extração de ouro.

5 Conclusão e Perspetivas futuras

A vacinação é um método eficaz no controlo e profilaxia de doenças, sendo considerada um dos maiores avanços da medicina. Todavia, nas últimas décadas, como consequência do aparecimento de controvérsias relacionadas com a segurança das vacinas, começou a haver um aumento da resistência à vacinação infantil, por parte dos pais. Nestas polémicas, estão envolvidos diversos componentes de vacinas (no caso particular, o timerosal), que são considerados tóxicos, permitindo perpetuar a crença de que as vacinas não são seguras.

Daí, a necessidade e a importância de realizar estudos epidemiológicos e de avaliar a toxicidade do Hg, especialmente depois da controvérsia causada pelo artigo fraudulento de Andrew Wakefield, publicado no *The Lancet* em 1998, que relacionava a inoculação de VASPR com o aparecimento de autismo nas crianças. A partir desta data, gerou-se um clima de incerteza em torno das vacinas, e, particularmente, das vacinas contendo timerosal.

Deste modo, esta dissertação pretendeu analisar os prós e contras da utilização de timerosal, como conservante, em vacinas, focando-se, no que se sabe, sobre a sua neurotoxicidade e procurando esclarecer as polémicas em torno deste composto. Para isso, recorreu-se à análise de estudos epidemiológicos, referentes à relação entre a exposição ao timerosal, presente nas vacinas infantis, e o risco de aparecimento de TEA, bem como, à avaliação do seu mecanismo de neurotoxicidade e toxicocinética.

Relativamente à toxicocinética do timerosal/EtHg é importante destacar que o EtHg tem um tempo de semi-vida de 3 a 7 dias (menor que o MeHg), distribuindo-se no cérebro e rins, e sendo eliminado após 22 dias na urina e nas fezes, período relativamente menor, comparado com o do MeHg. Quanto aos seus mecanismos de neurotoxicidade, o EtHg ao ligar-se à Cys vai acumular-se no organismo e ultrapassar a BHE, por um mecanismo de mimetização molecular. Posteriormente, este complexo desalquila e o EtHg é largamente convertido em Hg^{2+} , que se bioacumula no cérebro. O EtHg pode, também, ligar-se à glutatona provocando a diminuição dos seus níveis, importantes na proteção das células, e um aumento de ROS, danificando as células, ácidos nucleicos e proteínas. Acresce que, a exposição ao EtHg, faz aumentar a concentração de glutamato, provocando uma alteração na estimulação cerebral e degeneração dos neurónios e, conseqüentemente, défice motor e cognitivo. O EtHg

pode, ainda, provocar um aumento de calbindina e de Ca^{2+} , e oxidação da TrxR, causando apoptose celular.

Contudo, estes efeitos acontecem após a exposição a doses superiores às que resultam de uma inoculação com TCV.

Assim, a realização deste trabalho permite concluir que, de acordo com as condições em que as pesquisas foram realizadas, existem evidências suficientes que rejeitam que, a exposição ao timerosal/EtHg nas vacinas infantis, tem uma relação causal com o aparecimento de autismo e distúrbios neurológicos nas crianças, pois o aumento da prevalência de TEA pode resultar de fatores genéticos e ambientais, que não envolvem vacinas e que devem ser investigados.

No entanto, é necessário que, no futuro, se realizem mais estudos para avaliar se as TCVs não provocam qualquer tipo de neurotoxicidade. Esses estudos devem adotar critérios de diagnóstico, para o TEA, bem definidos; melhorar os registros, para que forneçam informações sobre fontes de exposição (exemplo outras fontes de mercúrio), estado psiquiátrico, poluição de metais e medicamentos durante a gravidez; e, por último, registrar as datas em que os indivíduos foram expostos às TCVs e as quantidades exatas de doses que receberam. É pois, importante que não ocorra nenhuma alteração no período de realização do estudo, que possa prejudicar ou influenciar os resultados obtidos, tendo sido esta um dos motivos de tanta polêmica.

Referências Bibliográficas

1. Clarkson TW. The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. *Crit Rev Toxicol.* 2008;(778384761).
2. Farina M, Avila DS, Rocha JBT da, Aschner and M. Metals, Oxidative Stress and Neurodegeneration: A focus on Iron, Manganese and Mercury. *Bone.* 2013;23(1):1–7.
3. Mahbub KR, Krishnan K, Naidu R, Megharaj M. Mercury toxicity to *Eisenia fetida* in three different soils. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2017;24(2):1261–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7869-5>
4. Reis ATLP. Impacto do mercúrio na saúde humana: Aveiro como caso de estudo. Universidade de Aveiro; 2008.
5. Bank M. Mercury in the Environment : Pattern and Process. Univ Calif Press Berkeley, CA USA [Internet]. 2019;(June 2014). Available from: 978-0-520-27163-0
6. National Institute for Occupational Safety and Health. Mercury . 2019.
7. Santos HIO. Acumulação de mercúrio em diferentes tecidos do Caçãõ. Universidade de Aveiro; 2008.
8. Oliveira ALC de. Exposição Ocupacional a Mercúrio : Associação com a Atividade da Paraoxonase Humana e Vitaminas A e E. Escola Superior de Lisboa. 2013.
9. Álvarez-Caicoya J, Cosme-Torres AJ, Ortiz-Rivera EI. Compact fluorescent lamps, an anticipatory mind to mercury. *IEEE Potentials.* 2011;30(1):35–8.
10. Nunes O. Quantificação de Emissões de Mercúrio provenientes de Fontes Naturais. Universidade de Aveiro; 2009.
11. Rebelo R. Toxicidade do mercúrio e seus efeitos neurodegenerativos [Internet]. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz; 2016. Available from: <https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/12383/1/Simo, Ema Alexandra Roberto.pdf>

12. Lemos AT. Challenges in mercury speciation and fractionation in soil and sediment. Universidade de Aveiro; 2013.
13. Agency USEP. Air and Radiation. 2016.
14. Organization WH. Ten chemicals of major public health concern. 2021.
15. Registry A for TS and D. Mercury and Your Health. 2015.
16. Genchi G, Sinicropi MS, Carocci A, Lauria G, Catalano A. Mercury exposure and heart diseases. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(1):1–13.
17. Prevention C for DC. Mercury Factsheet. 2017.
18. Erik J. Tokar; Windy A. Boyd; Jonathan H. Freedman; Michael P. Waalkes. Toxic Effects of Metals. In: McGrawHill Companies, editor. *Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons*. 8^a. New York; p. 691–736.
19. Morel FMM, Kraepiel AML, Amyot M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. Vol. 29. 1998.
20. Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. The Toxicology of Mercury — Current Exposures and Clinical Manifestations. *N Engl J Med*. 2003 Oct 30;349(18).
21. Veiga A, Lopes A, Carrilho E, Silva L, Dias MB, Seabra MJ, et al. Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal. *Ministério da Econ e da Inovação*. 2009;330.
22. Schofield K. Fuel-mercury combustion emissions: An important heterogeneous mechanism and an overall review of its implications. *Environ Sci Technol*. 2008;42(24):9014–30.
23. Nur Özdabak H, Karaoğlanoğlu S, Akgül N, Polat F, Seven N. The effects of amalgam restorations on plasma mercury levels and total antioxidant activity. *Arch Oral Biol*. 2008;53(12):1101–6.
24. Yang L, Zhang Y, Wang F, Luo Z, Guo S, Strähle U. Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere*. 2020;245.
25. Bjørklund G, Dadar M, Mutter J, Aaseth J. The toxicology of mercury: Current research and emerging trends. *Environ Res [Internet]*. 2017;159(August):545–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.051>

26. Branco V, Ramos P, Canário J, Lu J, Holmgren A, Carvalho C. Biomarkers of adverse response to mercury: Histopathology versus thioredoxin reductase activity. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012.
27. Cunha S. *Interação entre Mercúrio e Sistemas Biológicos.* Universidade do Porto; 2008.
28. US Food and Drug Administration. *Thimerosal in Vaccines.* 2018.
29. Pantaleão TU, Ferreira ACF, Santos MCS, Figueiredo ÁSP, Louzada RAN, Rosenthal D, et al. Effect of thimerosal on thyroid hormones metabolism in rats. *Endocr Connect.* 2017;6(8):741–7.
30. Pichichero ME, Cernichiari E, Lopreiato J, Treanor J. Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thiomersal: A descriptive study. *Lancet.* 2002;360(9347):1737–41.
31. Organization WH. Q&A:Thiomersal [Internet]. 2021 [cited 2021 Mar 20]. Available from: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/mercury-health>
32. Monteiro AJ. *Informações sobre vacinação. Mesa do Colégio da Especialidade de Enfermagem de Saúde Infantil e Pediátrica.* Lisboa; 2011.
33. Sathyanarayana Rao T, Andrade C. The MMR vaccine and autism: Sensation, refutation, retraction, and fraud. *Indian J Psychiatry.* 2011;53(2).
34. World Health Organization. *Statement on thimerosal.* 2006.
35. Marques RC, Dórea JG, Fonseca MF, Bastos WR, Malm O. Hair mercury in breast-fed infants exposed to thimerosal-preserved vaccines. *Eur J Pediatr.* 2007;166(9):935–41.
36. Philadelphia P of. *Do Vaccines Cause Autism?* 2018.
37. Rocha AF Da. *Cádmio, chumbo, mercúrio: a problemática destes metais pesados na Saúde Pública: monografia.* 2009;63. Available from: <http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/54676>
38. Tipping E. Modelling Al competition for heavy metal binding by dissolved organic matter in soil and surface waters of acid and neutral pH. *Geoderma.* 2005;127(3-4 SPEC. ISS.):293–304.
39. Branco V, Caito S, Farina M, Teixeira da Rocha J, Aschner M, Carvalho C.

- Biomarkers of mercury toxicity: Past, present, and future trends. *J Toxicol Environ Heal - Part B Crit Rev* [Internet]. 2017;20(3):119–54. Available from: <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1289834>
40. Branco V, Canário J, Lu J, Holmgren A, Carvalho C. Mercury and selenium interaction in vivo: Effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2012;52(4):781–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.002>
 41. Burbacher TM, Shen DD, Liberato N, Grant KS, Cernichiari E, Clarkson T. Comparison of blood and brain mercury levels in infant monkeys exposed to methylmercury or vaccines containing thimerosal. *Environ Health Perspect*. 2005;113(8):1015–21.
 42. Cunha L da, Gomes AS, Coutinho FMB, Teixeira VG. Principais rotas de síntese de resinas complexantes de mercúrio. *Polímeros*. 2007;17(2):145–57.
 43. Kumar U, AG V, Shivaramu M, Kumar SA. Autopsy Study of Pattern of Splenic Injuries. *Indian Internet J Forensic Med Toxicol*. 2013;11(1):1.
 44. Laudati G, Mascolo L, Guida N, Sirabella R, Pizzorusso V, Bruzzaniti S, et al. Resveratrol treatment reduces the vulnerability of SH-SY5Y cells and cortical neurons overexpressing SOD1-G93A to Thimerosal toxicity through SIRT1/DREAM/PDYN pathway. *Neurotoxicology* [Internet]. 2019;71(November 2018):6–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.11.009>
 45. Rice KM, Jr EMW, Wu M, Gillette C, Blough ER. Environmental Mercury and Its Toxic Effects. *J Prev Med Public Heal* [Internet]. 2014;74–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.3961/jpmph.2014.47.2.74>
 46. Dórea JG, Farina M, Rocha JBT. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. *J Appl Toxicol*. 2013;(December 2012).
 47. Meadows-oliver M. Environmental Toxicants : Lead and Mercury. *J Pediatr Heal Care* [Internet]. 2012;26(3):213–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedhc.2012.02.005>
 48. Lohren H, Bornhorst J, Fitkau R, Pohl G, Galla H, Schwerdtle T. Effects on and transfer across the blood- brain barrier in vitro — Comparison of organic and

- inorganic mercury species. *BMC Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2016;1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40360-016-0106-5>
49. Zalups RK, Bridges CC. Mechanisms involved in the renal handling and toxicity of mercury. University School of Medicine; 2020.
 50. Zimmermann LT, Naime AA, Leal RB, Aschner M, Santa UF De, Catarina S, et al. Comparative study on methyl- and ethylmercury-induced toxicity in C6 glioma cells and the potential role of LAT-1 in mediating mercurial-thiol complexes uptake. *Neurotoxicology*. 2016;38:1–8.
 51. Clarkson TW, Vyas JB, Ballatori N. Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am J Ind Med*. 2007;50(10):757–64.
 52. Carocci A, Rovito N, Sinicropi MS, Genchi G. Mercury Toxicity and Neurodegenerative Effects. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2014;229.
 53. Clark B, Clarke AJ, Wood P. Tissue concentrations of mercury after chronic dosing of squirrel monkeys with thiomersal. *Toxicology*. 1975;3:171–6.
 54. Fernanda M, Carneiro H, Maria J, Souza O, Grotto D, Lemos B, et al. A systematic study of the disposition and metabolism of mercury species in mice after exposure to low levels of thimerosal (ethylmercury). *Environ Res* [Internet]. 2014;134:218–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.07.009>
 55. Clarkson TW. Mechanisms of Mercury Disposition in the Body. *Am J Ind Med*. 2007;764:757–64.
 56. Harry GJ, Harris MW, Burka LT. Mercury concentrations in brain and kidney following ethylmercury , methylmercury and Thimerosal administration to neonatal mice. *Elsevier*. 2004;154:183–9.
 57. Zareba G, Cernichiari E, Hojo R, Nitt SM, Weiss B, Mumtaz MM, et al. Thimerosal distribution and metabolism in neonatal mice: comparison with methylmercury. *J Appl Toxicol*. 2007;(June):511–8.
 58. Rodrigues JL, Serpeloni JM, Batista BL, Souza SS. Identification and distribution of mercury species in rat tissues following administration of thimerosal or methylmercury. *Arch Toxicol*. 2010;891–6.

59. Suzuki T, MT, KH. Comparative study of bodily distribution of mercury in mice after subcutaneous administration of methyl, ethyl and n-propyl mercury acetates. *Jpn J Exp Med*. 1963;
60. Dórea JG, Marques RC, Isejima C. Neurodevelopment of Amazonian infants: Antenatal and postnatal exposure to methyl- and ethylmercury. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012.
61. Migdal C, Foggia L, Tailhardat M, Courtellemont P, Haftek M, Serres M. Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling. *Toxicology*. 2010;274(1–3):1–9.
62. Organization WH. Children’s Exposure to Mercury Compounds. 2008.
63. Branco V, Coppo L, Solá S, Lu J, Rodrigues CMP, Holmgren A, et al. Impaired cross-talk between the thioredoxin and glutathione systems is related to ASK-1 mediated apoptosis in neuronal cells exposed to mercury. *Redox Biol* [Internet]. 2017;13(May):278–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.05.024>
64. Magos L, Brown AW, Sparrow S, Bailey E, Snowden RT, Skipp WR. The comparative toxicology of ethyl- and methylmercury. *Arch Toxicol*. 1985;57(4):260–7.
65. Administration F. Mercury [Internet]. FDA. 2020 [cited 2021 May 2]. Available from: <https://www.fda.gov/>
66. Eisler R. Mercury hazards to living organisms. Taylor & F. Vol. 53, *Journal of Chemical Information and Modeling*. New York; 2013. 1689–1699 p.
67. Stricks W, Kolthoff IM. Reactions between Mercuric Mercury and Cysteine and Glutathione. Apparent Dissociation Constants, Heats and Entropies of Formation of Various Forms of Mercuric Mercapto-Cysteine and -Glutathione. *J Am Chem Soc*. 1953 Nov 1;75(22).
68. Chang LW, Cockerham L. Toxic metals in the environment [Internet]. Cockerham LG, Shane B., editors. *Basic environmental toxicology*, CRC Press. 1994. 109–129 p. Available from: <https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=A3yCDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT114&dq=Toxic+metals+in+the+environment.+L.W.+Chang&ots=1LcjTemB5m&sig=v50lvpr4608MJvSZJ>

- OwtT3wJEd4&redir_esc=y#v=onepage&q=Toxic metals in the environment.
L.W. Chang&f=false
69. James SJ, Slikker W, Melnyk S, New E, Pogribna M, Jernigan S. Thimerosal neurotoxicity is associated with glutathione depletion: Protection with glutathione precursors. *Neurotoxicology*. 2005;26(1):1–8.
 70. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9–19.
 71. Silva-Adaya D, Gonsebatt ME, Guevara J. Thioredoxin system regulation in the central nervous system: Experimental models and clinical evidence. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;
 72. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2014;66:75–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
 73. Branco V, Carvalho C. The thioredoxin system as a target for mercury compounds. *BBA - Gen Subj* [Internet]. 2019;1863(12):129255. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.11.007>
 74. Branco V, Canário J, Lu J, Holmgren A, Carvalho C. Free Radical Biology & Medicine Mercury and selenium interaction in vivo: Effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2012;52(4):781–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.002>
 75. Carvalho CML, Chew E, Hashemy SI, Lu J, Holmgren A. Inhibition of the Human Thioredoxin System: A molecular mechanism of toxicity. *J Biol Chem* [Internet]. 2008;283(18):11913–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M710133200>
 76. Ostrakhovitch EA, Semenikhin OA. The role of redox environment in neurogenic development. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2013;534(1–2):44–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2012.08.002>
 77. Jebbett NJ, Hamilton JW, Rand MD, Eckenstein F. Low level methylmercury enhances CNTF-evoked STAT3 signaling and glial differentiation in cultured cortical progenitor cells. *Neurotoxicology*. 2014;38:91–100.

78. Branco V, Wang J, Carvalho C, Holmgren A, Lu J. Redox Signaling Mediated by Thioredoxin and Glutathione. *Antioxid Redox Signal*. 2017;27(13):989–1010.
79. Ballatori T, Clarkson TW. Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. *Fundam Appl Toxicol*. 1985 Oct;5(5):816–31.
80. Ralston NVC, Ralston CR, Blackwell JL, Raymond LJ. Dietary and tissue selenium in relation to methylmercury toxicity. *Neurotoxicology*. 2008;29(5):802–11.
81. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*. 1998;54(5):581–618.
82. Grewer C, Rauen T. Electrogenic glutamate transporters in the CNS: Molecular mechanism, pre-steady-state kinetics, and their impact on synaptic signaling. *J Membr Biol*. 2008;23(1):1–7.
83. Valli LG, Sobrinho J de A. Mecanismo de ação do glutamato no Sistema Nervoso Central e a relação com doenças neurodegenerativas. *Rev Neurol e Psiquiatr*. 2014;18(1):58–67.
84. Duszczuk-Budhathoki M, Olczak M, Lehner M, Majewska MD. Administration of thimerosal to infant rats increases overflow of glutamate and aspartate in the prefrontal cortex: Protective role of dehydroepiandrosterone sulfate. *Neurochem Res*. 2012;37(2):436–47.
85. Juárez BI, Martínez ML, Montante M, Dufour L, García E, Jiménez-Capdeville ME. Methylmercury increases glutamate extracellular levels in frontal cortex of awake rats. *Neurotoxicol Teratol*. 2002;24(6):767–71.
86. Aschner M, Eberle NB, Goderie S, Kimelberg HK. Methylmercury uptake in rat primary astrocyte cultures: the role of the neutral amino acid transport system [Internet]. *Brain Research*. Vol. 521. Elsevier; 1990 [cited 2021 May 3]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/000689939091546S?via%3Dihub>
87. Yuan Y, Atchison WD. Methylmercury differentially affects GABA-A receptor-mediated spontaneous IPSCs in Purkinje and granule cells of rat cerebellar slices.

- J Physiol. 2003;550:191–204.
88. Peraza MA, Ayala-Fierro F, Barber DS, Casarez E, Rael LT. Effects of micronutrients on metal toxicity. *Environ Health Perspect*. 1998;106(1):203–16.
 89. Lund B-O, Miller DM, Woods JS. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. Vol. 45. New York: Elsevier; 1998.
 90. Elferink JGR. Thimerosal: A versatile sulfhydryl reagent, calcium mobilizer, and cell function-modulating agent. *Gen Pharmacol*. 1999;33(1):1–6.
 91. Bank D. Thimerosal [Internet]. Drug Bank. 2021. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11590>
 92. Geier DA, King PG, Geier MR. Mitochondrial dysfunction, impaired oxidative-reduction activity, degeneration, and death in human neuronal and fetal cells induced by low-level exposure to thimerosal and other metal compounds. *Toxicol Environ Chem*. 2009;91(4):735–49.
 93. Farina M, Aschner M, Rocha JBT. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;256(3):405–17.
 94. Dreiem A, Seegal RF. Methylmercury-induced changes in mitochondrial function in striatal synaptosomes are calcium-dependent and ROS-independent. *Neurotoxicology*. 2007;28(4):720–6.
 95. Mori N, Yasutake A, Marumoto M, Hirayama K. Methylmercury inhibits electron transport chain activity and induces cytochrome c release in cerebellum mitochondria. *J Toxicol Sci*. 2011;36(3):253–9.
 96. Sadek HA, Szweda PA, Szweda LI. Modulation of mitochondrial complex I activity by reversible Ca²⁺ and NADH mediated superoxide anion dependent inhibition. *Biochemistry*. 2004;43(26):8494–502.
 97. de Oliveira Souza VC, de Marco KC, Laure HJ, Rosa JC, Barbosa F. A brain proteome profile in rats exposed to methylmercury or thimerosal (ethylmercury). *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues* [Internet]. 2016;79(12):502–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2016.1182003>
 98. Saúde DG. Vacinas [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 15]. Available from:

- <https://www.sns24.gov.pt/guia/vacinas/>
99. Ivs I. H1N1 pandemic influenza vaccines : the role of adjuvants. Geneva; 2009.
 100. Europeia U. Componentes das vacinas [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 15]. Available from: <https://vaccination-info.eu/pt/factos-sobre-vacinas/como-funcionam-vacinas/componentes-das-vacinas>
 101. Plácido GM, Guerreiro MP. Administração de vacinas e medicamentos injetáveis por farmacêuticos. Uma abordagem prática [Internet]. Ordem dos Farmacêuticos. Lisboa; 2015. 260 p. Available from: http://www.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/articleFile1842.pdf
 102. Correia L. Vacinação - informação. PNV 2020. 2019. p. 1–108.
 103. Medicine Agency E. Thiomersal [Internet]. Vol. 44. London; 2018. Available from: <https://www.ivancatalano.eu/wp-content/uploads/2018/05/Letter.pdf>
 104. Baker JP. Mercury, vaccines, and autism: One controversy, three histories. *Am J Public Health*. 2008;98(2):244–53.
 105. Vaz AF. Utilização de tiomersal em vacinas de uso humano – Estudos recentes comprovam segurança do tiomersal em vacinas. Lisboa; 2004.
 106. Administration F and D. Thimerosal and Vaccines [Internet]. 2018 [cited 2021 Apr 27]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/thimerosal-and-vaccines>
 107. Mitkus R. A Review of Thimerosal in Vaccines. Vol. 4. 2012.
 108. Offit PA. Vaccine ingredients - Thimerosal [Internet]. 2020 [cited 2021 Apr 4]. Available from: <https://www.chop.edu/centers-programs/vaccine-education-center/vaccine-ingredients/thimerosal>
 109. Prevention DC. Thimerosal and Vaccines [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 25]. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/concerns/thimerosal/index.html>
 110. Tavares M de FM. Vacinação: Conhecimentos e atitudes da população dos bairros carenciados do Concelho do Seixal. Universidade Nova de Lisboa; 2014.
 111. Agency EM. EMEA public statement on antimicrobial preservatives in

- ophthalmic preparations for human use. London; 2009.
112. Dórea JG. Neurotoxic Metal Coexposures and Neurodevelopment. *Environ Health Perspect.* 2012;120(6):2012.
 113. Agency EM. Perspectives on alternatives to thiomersal. 2019.
 114. Europeu P. Parliamentary questions [Internet]. 2008 [cited 2021 Apr 4]. Available from: <https://www.europarl.europa.eu/sides/getAllAnswers.do?reference=E-2008-4469&language=EN>
 115. Alves R, Gaspar Â, Ferreira M. Reacções alérgicas a vacinas. *Rev Port Imunoalergologia.* 2007;15(6):465–83.
 116. Gomes M. História do PNV [Internet]. 2021 [cited 2021 Apr 5]. Available from: <http://vacinas-temp.inesting.com/programa-nacional-de-vacinacao/historia-do-pnv/#.YIf0ipBKhPY>
 117. Safety VI. Thimerosal [Internet]. 2013. Available from: www.vaccinesafety.edu
 118. Almeida A, Bastos E, Gonçalves T. Timerosal - Controvérsias e Evidências [Internet]. *Vacinas e Autismo.* 2015 [cited 2021 Apr 6]. Available from: <https://ecatbastos.wixsite.com/timerosal/instrutores>
 119. Prevention C od DC. Selected Discontinued U.S. Vaccines [Internet]. 2012. Available from: https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/appendices/B/discontinued_vaccines.pdf
 120. Prevention C for DC. Pertussis. Pink B [Internet]. 2015;(March):81–100. Available from: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/pert.pdf>
 121. Prevention C. About Diphtheria, Tetanus, and Pertussis Vaccines [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 27]. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/vaccines/dtap-tdap-vaccine.html>
 122. Microbiology C. Composition of nine DTaP vaccines evaluated in efficacy trials [Internet]. 2021 [cited 2021 Mar 27]. Available from: <https://cmr.asm.org/content/18/2/326/T4>

123. Infarmed. Pandemrix - Resumo das Características do Medicamento. 2010.
124. Pedi I, Portuguesa S, Nacional P, Janeiro D, Pneumoc I. Recomendações Sobre Vacinas: Actualização. Lisboa; 2010.
125. Prevention C. Historical Vaccine Safety Concerns [Internet]. 2020 [cited 2021 Apr 3]. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/concerns/concerns-history.html>
126. Sanofi. Summary of product characteristics - Menomune. Vol. 41. Bangkok; 2011.
127. Gayoso P. A importância da vacinação. Goiânia; 2008.
128. Offit P. A Look at Each Vaccine: Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines [Internet]. 2020 [cited 2021 Apr 9]. Available from: <https://www.chop.edu/centers-programs/vaccine-education-center/vaccine-details/diphtheria-tetanus-and-pertussis-vaccines>
129. Deschamps I, Pasteur S. Manufacturer perspectives on alternatives to thiomersal. Vol. 4. 2012.
130. Coimbra AI, Cunha L. Dermatite de Contacto Alérgica. Soc Port Alergol e Imunol Clínica [Internet]. 2007;7–8. Available from: www.spaic.pt/download_publicacoes.php?file=66
131. Nguyen HL, Yiannias JA. Contact Dermatitis to Medications and Skin Products. Clin Rev Allergy Immunol. 2019;56(1):41–59.
132. Indústria C. Merthiolate (digliconato de clorexidina). Barueri; 2017.
133. Edol. Edolfene [Internet]. 2014 [cited 2021 Apr 9]. Available from: <https://edol.pt/produto-oftalmologia/edolfene/>
134. Infarmed. Edolfene (RCM) [Internet]. Lisboa; 2018. Available from: https://edol.pt/wp-content/uploads/2019/02/Edolfene-colirio-RCM_04.2018.pdf
135. Edol. Tropicil TOP [Internet]. 2014 [cited 2021 Apr 9]. Available from: <https://edol.pt/produto-oftalmologia/tropicil-top/>
136. Wyckoff AS. Global ban on mercury grants exception to thimerosal-containing vaccines. The official news magazine of the American Academy of Pediatrics [Internet]. 2013 Jan;201212. Available from: www.aapnews.org

137. Powell HM JW. Merthiolate as a Germicide. *Am J Epidemiol* [Internet]. 1931;13(1):296–310. Available from: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a117118>
138. Administration FD. Thimerosal and Vaccines. 2018.
139. Wakefield AJ, Murch SH, Anthony A, Linnell J, Casson DM, Malik M, et al. Retracted: Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet*. 1998;351(9103):637–41.
140. Gerber JS, Offit PA. Vaccines and Autism: A Tale of Shifting Hypotheses. *Clin Infect Dis*. 2011;23(1):1–7.
141. Dan Brennan M. Do Vaccines Cause Autism? [Internet]. WebMd. 2020 [cited 2021 Mar 23]. p. 1. Available from: <https://www.webmd.com/brain/autism/do-vaccines-cause-autism>
142. Fombonne E. Thimerosal disappears but autism remains. *Arch Gen Psychiatry* [Internet]. 2008;65(1):15–6. Available from: <https://jamanetwork.com/>
143. Prevention C for DC. History of Vaccines [Internet]. The College of Physicians of Philadelphia. 2020 [cited 2021 Mar 23]. p. 1. Available from: <https://www.historyofvaccines.org/content/articles/do-vaccines-cause-autism>
144. Prevention C for DC. CDC Study (2010) on Thimerosal and Risk of Autism [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [cited 2021 Mar 18]. p. 1. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/concerns/thimerosal/study-risk-autism.html>
145. CUF. Perturbação do Espectro do Autismo [Internet]. CUF. 2021 [cited 2021 Mar 18]. p. 1. Available from: <https://www.cuf.pt/saude-a-z/perturbacao-do-espectro-do-autismo>
146. Wozniak RH, Leezenbaum NB, Northrup JB, West KL, Iverson JM. The development of autism spectrum disorders: variability and causal complexity. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci*. 2017;8(1–2):1–11.
147. Sulkes SB. Transtornos do espectro autista [Internet]. Manual MSD. 2018 [cited 2021 Mar 18]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/pediatria/distúrbios-de-aprendizagem-e-desenvolvimento/transtornos-do-espectro-autista>

148. Saúde S. Sabe o que é o autismo? [Internet]. Serviço Nacional de Saúde. 2016 [cited 2021 Mar 18]. p. 1. Available from: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2016/04/18/sabe-o-que-e-o-autismo/>
149. Stehr-Green P, Tull P, Stellfeld M, Mortenson PB, Simpson D. Autism and thimerosal-containing vaccines: Lack of consistent evidence for an association. *Am J Prev Med.* 2003;25(2):101–6.
150. Administration FD. FDA Actions Pertaining to Thimerosal in Vaccines [Internet]. FDA. 2018. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/thimerosal-and-vaccines#action>
151. Verstraeten T, Davis R, DeStefano F, Lieu T, Rhodes P, Black S, et al. Safety of Thimerosal-Containing Vaccines: A Two-Phased Study of Computerized Health Maintenance Organization Databases. *Pediatrics* [Internet]. 2004 Nov 1;112(5). Available from: <https://pediatrics.aappublications.org/content/112/5/1039.long>
152. Wessel L. Vaccine Myths. *Science* [Internet]. 2017 Jan 4;368–72. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
153. Offit PA. Thimerosal and Vaccines — A Cautionary Tale. *N Engl J Med.* 2007;357(13):1278–9.
154. Fernandes CM, Montuori C. A rede de desinformação e a saúde em risco: uma análise das fake news contidas em “As 10 razões pelas quais não deve vacinar o seu filho.” *Rev Comun Informação e Inovação em Saúde.* 2020;14(2):444–60.
155. Li X, Qu F, Xie W, Wang F, Liu H, Song S, et al. Transcriptomic analyses of neurotoxic effects in mouse brain after intermittent neonatal administration of thimerosal. *Toxicol Sci* [Internet]. 2014;139(2):452–65. Available from: <https://academic.oup.com/toxsci/article/139/2/452/2511500>
156. Branco V, Aschner M, Carvalho C. Neurotoxicity of mercury: An old issue with contemporary significance [Internet]. 1st ed. *Neurotoxicity of Metals: Old Issues and New Developments.* Elsevier Inc.; 2021. 239–262 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ant.2021.01.001>
157. Prevention C of DC. Vaccine Safety Datalink (VSD) [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [cited 2021 Apr 24]. p. 1. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/ensuringsafety/monitoring/vsd/index.html>

158. Price CS, Thompson WW, Goodson B, Weintraub ES, Croen LA, Hinrichsen VL, et al. Prenatal and Infant Exposure to Thimerosal From Vaccines and Immunoglobulins and Risk of Autism. *Pediatrics* [Internet]. 2010 Oct 1;126(4):1. Available from: <https://pediatrics.aappublications.org/content/126/4/656.long>
159. Heron J, Golding J. Thimerosal Exposure in Infants and Developmental Disorders: A Prospective Cohort Study in the United Kingdom Does Not Support a Causal Association. *Pediatrics* [Internet]. 2004 Sep 1;114(3). Available from: <https://pediatrics.aappublications.org/content/114/3/577.long>
160. Tozzi AE, Bisiacchi P, Tarantino V, De Mei B, D'Elia L, Chiarotti F, et al. Neuropsychological Performance 10 Years After Immunization in Infancy With Thimerosal-Containing Vaccines. *Pediatrics* [Internet]. 2009 Feb 1;123(2). Available from: <https://pediatrics.aappublications.org/content/123/2/475.long>
161. Destefano F, Bodenstab HM, Offit PA. Principal Controversies in Vaccine Safety in the United States. *Clin Infect Dis*. 2019;69(4):726–31.
162. Offit PA, Quarles J, Gerber MA, Hackett CJ, Marcuse EK, Kollman TR, et al. Addressing Parents' Concerns: Do Multiple Vaccines Overwhelm or Weaken the Infant's Immune System? *Pediatrics*. 2002 Jan 1;109(1).
163. Laupland KB, Davies HD, Low DE, Schwartz B, Green K, McGeer A. Invasive Group A Streptococcal Disease in Children and Association With Varicella-Zoster Virus Infection. *Pediatrics*. 2000 May 1;105(5).
164. Stratton K, Gable A, McCormick MC. Immunization Safety Review: Thimerosal-Containing Vaccines and Neurodevelopmental Disorders [Internet]. Marcus S, editor. Washington: National Academies Press (US); 2001. 1–137 p. Available from: <http://www.nap.edu/catalog/10208.html%0D>
165. Barile JP, Kuperminc GP, Weintraub ES, Mink JW, Thompson WW. Thimerosal exposure in early life and neuropsychological outcomes 7-10 years later. *J Pediatr Psychol*. 2012;37(1):106–18.
166. Uno Y, Uchiyama T, Kurosawa M, Aleksic B, Ozaki N. Early exposure to the combined measles-mumps-rubella vaccine and thimerosal-containing vaccines and risk of autism spectrum disorder. *Vaccine* [Internet]. 2015;33(21):2511–6.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.12.036>

167. Wozniak RH, Leezenbaum NB, Northrup JB, West KL, Iverson JM. The development of autism spectrum disorders: variability and causal complexity. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci* [Internet]. 2017 Jan;8(1–2). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wcs.1426>
168. Parker SK. Thimerosal-Containing Vaccines and Autistic Spectrum Disorder: A Critical Review of Published Original Data. *Pediatrics* [Internet]. 2004 Sep 1;114(3). Available from: <https://pediatrics.aappublications.org/content/114/3/793.long>
169. Organization WH. Thiomersal in vaccines [Internet]. Vol. 2011, *The Weekly Epidemiological Record*. Switzerland; 2009. Available from: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=KARDEX.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=003687>
170. National Center for Emerging C, Infectious Diseases Z. *CDC Studies on Thimerosal in Vaccines*. 2009.