

Resposta às questões levantadas pelo autor da carta - comentário quanto à concentração de timerosal em vacinas DTP e a via de inoculação da vacina no teste de ganho de peso em camundongos empregadas no artigo de Domingos e colaboradores de 2021 incluindo considerações sobre a toxicologia do timerosal

Roseli Maria Domingos^{1,*} 

Reginaldo Assad Miller¹ 

Alexandre Pinto Corrado¹¹ 

Helena Pereira da Silva Zamith¹ 

Primeiramente gostaríamos de agradecer ao autor da carta-comentário pela afirmação de que o artigo de Domingos et al.¹ trouxe uma importante contribuição à literatura de segurança de vacinas. O teste de ganho de peso em camundongos (TGPC) para a determinação da toxicidade específica da vacina pertussis de células inteiras (VPCI) é essencial para aprovar o emprego da vacina adsorvida contra a difteria, tétano e a pertussis (DTP) nos programas de vacinação infantil.

Como comentado pelo autor da carta (Comentários sobre métodos empregados no “Teste de ganho de peso da vacina DTP”) enviada à revista *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, chamou atenção a concentração de timerosal na composição das vacinas DTP empregadas no artigo de Domingos et al.¹: “Avaliação da influência do sexo e das linhagens de camundongo NIH e BALB/cAn no teste de ganho de peso da vacina DTP”. Realmente houve um erro de digitação em relação à concentração de timerosal nas vacinas DTP empregadas no referido artigo¹. Na página 108, segunda coluna, linha 24, onde se lê: “timerosal até 20 mg e solução fisiológica tamponada pH 6,4 em quantidade suficiente para 0,5 mL” deverá ser corrigido para: “timerosal até 0,20 mg e solução fisiológica tamponada pH 6,4 em quantidade suficiente para 0,5 mL”¹. Para a correção da concentração de timerosal constante da bula da vacina DTP será solicitada, junto à revista, a publicação de uma errata.

Gostaríamos de agradecer ao autor da carta pela identificação do erro e nos desculpar com os leitores da revista pelo erro de digitação em questão ter passado despercebido pelos autores do artigo.

A outra questão levantada pelo autor da carta foi referente à via de inoculação da vacina DTP no TGPC ter sido intraperitoneal, uma vez que a aplicação clínica da vacina é por via intramuscular. A inoculação intraperitoneal da vacina DTP de células inteiras é a via preconizada no TGPC para a medida da toxicidade específica do componente pertussis de células inteiras^{2,3,4,5,6,7}. Uma correlação tem sido relatada entre os resultados do TGPC e as reações adversas em crianças^{8,9,10,11}.

O trabalho de Zuckerman¹² mencionado na carta-comentário é bem interessante e aborda como locais ideais para administração intramuscular de vacinas, o músculo deltoide ou a face ântero-lateral da coxa para otimizar a imunogenicidade e minimizar as reações adversas locais. Além da técnica correta de administração intramuscular, é importante também o emprego de agulhas de tamanhos e calibres apropriados aos pacientes^{13,14,15}.

Para se ter a certeza de que a agulha alcança o músculo e de que a vacina não penetra no tecido subcutâneo, a decisão sobre o tamanho da agulha e o local da injeção deverá ser feita individualmente para cada paciente. Deve-se levar em consideração nesta escolha também: a idade do paciente, o volume do material a ser administrado e o tamanho do músculo¹⁶.

Há uma grande variação na espessura da camada de gordura acima do músculo deltoide, sendo que as mulheres têm significativamente mais gordura subcutânea do que os

¹ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

¹¹ Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

* E-mail: roseli.domingos@incqs.fiocruz.br

Recebido: 05 maio 2022

Aprovado: 14 jul 2022

Como citar: Domingos RM, Miller RA, Corrado AP, Zamith HPS. Resposta às questões levantadas pelo autor da carta - comentário quanto à concentração de timerosal em vacinas DTP e a via de inoculação da vacina no teste de ganho de peso em camundongos empregadas no artigo de Domingos e colaboradores de 2021 incluindo considerações sobre a toxicologia do timerosal. *Vigil Sanit Debate*, Rio de Janeiro, 10(3):140-143, agosto 2022. <https://doi.org/10.22239/2317-269X.02110>



homens¹³. Poland et al.¹⁴ observaram que uma agulha padrão de 5/8 polegadas (16 mm) de comprimento não deve ter alcançado suficiente penetração para uma verdadeira injeção intramuscular no deltoide em 17% dos homens e em cerca de 50% das mulheres na população de estudo¹³. Recomenda-se, para homens pesando na faixa de 59 a 118 kg e mulheres de 60 a 90 kg, usar uma agulha de 1 polegada (25 mm). Mulheres com pesos acima de 90 kg podem necessitar uma agulha de 1,5 polegadas (38 mm) de comprimento.

O calibre da agulha deve ser considerado na administração intramuscular, pois uma agulha de furo mais largo assegura a difusão da vacina sobre uma área mais ampla, consequentemente reduzindo o risco de vermelhidão e inchaço¹⁷.

Uma das causas de falhas¹³ na imunização pelas vacinas de hepatite B¹⁴, raiva e influenza¹⁵ é a injeção subcutânea destas vacinas. Comparada com a via de administração intramuscular, a injeção subcutânea de vacina de hepatite B leva a uma significativa menor taxa de soroconversão e mais rápida queda de resposta de anticorpos¹³.

As reações adversas sérias às injeções intramusculares são raras. Para 46% dos adultos que receberam pelo menos uma injeção por via intramuscular, somente 0,4% apresentaram um efeito adverso local¹⁸. Diferentemente, injeções subcutâneas podem causar abscessos e granulomas^{13,19,20}. No caso de vacinas nas quais o antígeno é adsorvido a um adjuvante de sal de alumínio, tais como: as vacinas para hepatite A, hepatite B e DTP, a via intramuscular é fortemente preferida, porque a administração superficial leva a uma aumentada incidência de reações locais como: irritação, inflamação, formação de granuloma e necrose^{14,21,22}.

Dado o interesse toxicológico do timerosal presente nas vacinas e baseados nos trabalhos referenciados na carta-comentário enviada, destacamos abaixo as suas relevantes contribuições^{23,24,25,27,28,29,30,31}.

Como mencionado na carta enviada, realmente a concentração de timerosal varia com o tipo de vacina e fabricante. Após a correção do valor da concentração de timerosal para o de 0,20 mg/0,5 mL/dose ou 200 µg/0,5 mL na vacina DTP, observa-se que a referida concentração foi cerca da metade relatada por Silva et al.²³ para a vacina DTP produzida pelo Instituto Butantan, em São Paulo, Brasil. Diferentemente, a outra vacina empregada no mesmo artigo, VA-MENGOC-BC (Finlay Institute, Havana, Cuba) contra a *Neisseria meningitidis* contém 250 µg de timerosal/dose²³.

A vacina tetravalente DTP (Instituto Butantan)/Hib (Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro) e a vacina de hepatite B (Instituto Butantan), conforme Abramczuk et al.²⁴, contém 200 µg e 50 µg de timerosal, respectivamente²⁴.

Em vacinas contendo timerosal, o etilmercúrio (EtHg), um dos metabólitos do timerosal, tem recebido atenção especial em termos toxicológicos, devido à sua presença nessas vacinas²⁵. Ao se comparar as toxicidades *in vitro* de EtHg em relação ao metilmercúrio (MeHg), observa-se que ambas as substâncias

causam significante decréscimo de viabilidade celular em células de glioma de rato C6 *in vitro*, com valores de concentração efetiva média (CE₅₀) de 5,05 e 4,83 µM, respectivamente. Embora EtHg e MeHg apresentem *in vitro* toxicidades semelhantes em células C6, os resultados não podem ser diretamente extrapolados para as condições *in vivo*²⁵. De fato, o potencial tóxico de MeHg sob condições *in vivo* é maior do que a do EtHg que pode ser uma consequência de vias metabólicas diferenciais de metabolismo e de taxas de excreção e de sua meia vida²⁶. As meias vidas inicial e final do Hg em sangue após exposição ao timerosal foram 2,1 e 8,6 dias, respectivamente, que são significativamente mais curtas do que a meia vida de eliminação do Hg após exposição ao MeHg de 21,5 dias. As concentrações de Hg total no cérebro foram significativamente mais baixas, cerca de três vezes inferiores para animais expostos ao timerosal quando comparados aos animais administrados com MeHg. Neste estudo, macacos foram administrados no dia do nascimento e na 1ª, 2ª e 3ª semanas de idade com o MeHg por via oral e com vacinas contendo timerosal pela via intramuscular para comparar a disposição sistêmica e distribuição cerebral do Hg total e Hg inorgânico. Os níveis sanguíneos totais de Hg foram determinados dois, quatro e sete dias após cada exposição e os níveis cerebrais de Hg inorgânico e total foram avaliados dois, quatro, sete ou 28 dias após a última exposição. Constatou-se que o Hg é eliminado do organismo mais rapidamente após a administração de EtHg presente nas vacinas com timerosal do que do MeHg devido à decomposição mais rápida do EtHg em relação ao MeHg acarretando o EtHg um menor risco de dano cerebral quando comparado ao MeHg²⁶.

Carneiro et al.²⁷ administraram camundongos machos suíços (6 semanas de idade; peso: 25 g), por via intramuscular (IM), com dose única de 0,8 mg de Hg/kg de peso corpóreo (20 µg de timerosal/25 g de peso corpóreo), que corresponde a uma dose 20 vezes superior à dose que uma criança de 3,5 meses de idade (5,15 kg) recebe em termos de Hg somente proveniente de vacinas contendo timerosal. Após 30 min da exposição ao timerosal, os mais altos níveis de EtHg e Hg inorgânico foram achados nos rins, acima de 70% do total de Hg por peso corpóreo do animal, enquanto o cérebro contribuiu com menos de 1,0% do total de Hg por peso do animal. Trinta dias após a exposição ao timerosal, a maior parte de Hg foi excretada, enquanto o fígado apresentou a maior parte do Hg remanescente. As meias vidas de EtHg estimadas em dias (d) foram: 8,8 d (sangue); 10,7 d (cérebro); 7,8 d (coração); 7,7 d (fígado) e 45,2 d para os rins. A cinética do timerosal (EtHg) está mais próxima ao do Hg²⁺ do que do MeHg e os rins devem ser considerados o órgão alvo em potencial para a toxicidade de EtHg²⁷.

A exposição de recém-nascidos ao EtHg de vacinas de hepatite B de três diferentes fabricantes, administradas nas primeiras 24 h após o nascimento, foi estimada a partir da análise dos registros de vacinação do hospital de Base de Porto Velho, em Rondônia, no período de 2001 a 2005²⁸. As três vacinas de hepatite B foram: a recombinante do Instituto Butantan (Brasil), com 100 µg de timerosal/mL, e as Heber-Biovac HBTM, de Cuba, e a Euvax/LC Chemical, da Coreia, ambas com 50 µg



de timerosal/mL. Considerando que vacinas contendo de 100 a 200 µg de timerosal/mL fornecem 12,5 a 25,0 µg de Hg/0,5 mL, respectivamente, segundo os fabricantes das três vacinas, assumiu-se como 12,5 e 25,0 µg de Hg/0,5 mL, a estimativa de exposição de Hg/kg de peso corpóreo medida ao nascimento. Conseqüentemente, a faixa de exposição dos recém-nascidos ao Hg foi de 4,2 a 21,1 ou 2,1 a 10,0 µg de Hg/kg de peso corpóreo para os recém-nascidos que receberam a vacina de hepatite B com a mais alta ou a mais baixa concentração de timerosal, respectivamente²⁸.

O método de cromatografia gasosa isotérmica de acoplamento mostrou-se sensível, preciso e confiável para a quantificação de EtHg em amostras de cabelo de 20 bebês (10 de cada sexo) com idade inferior a 12 meses de idade amamentados com leite humano e que receberam vacinas de hepatite B e de DTP contendo cada, 25 µg de timerosal/dose²⁹. Do total de 20 amostras de cabelo analisadas, em 15 amostras, a concentração de EtHg variou de 3,7 a 65,0 ng/g²⁹. Uma associação inversa estatisticamente significativa foi encontrada entre a concentração de EtHg no cabelo e o tempo transcorrido após a vacinação com as vacinas contendo timerosal. A via intramuscular de exposição às vacinas contendo timerosal permite que uma quantidade substancial de EtHg alcance o cabelo de bebês como tecido indicador

de armazenamento sendo, portanto, possível estimar a cinética de EtHg no cabelo após a exposição às vacinas contendo timerosal possibilitando estudos clínicos e análises forenses²⁹.

Segundo Tall et al.³⁰, as proporções de timerosal em vacinas podem variar na faixa de 0,003 a 0,010% (m/v) ou 30 a 100 µg/mL. Como exemplos foram citadas as vacinas de hepatite B e a tríplice bacteriana (DTP) nas quais a concentração de timerosal é de cerca de 50 µg/dose de 0,5 mL. O método analítico empregando como nanosondas fotoluminescentes CdTe *quantum dots* (QD) foi validado para a quantificação direta de timerosal em vacinas de difteria e tétano (DT), DTP e hepatite B podendo ser aplicado no controle de qualidade do timerosal com vantagens, por ser simples, de fácil implementação e sem processamento prévio da amostra³⁰.

Cunha et al.³¹ concluíram que o uso de vacinas contendo timerosal (três doses de hepatite B, duas doses da tríplice viral e três doses da tetravalente, totalizando, no máximo, oito doses) administradas de acordo com o esquema vacinal nos anos de 2009 a 2013 não está associado com o desenvolvimento motor, cognitivo e de linguagem de crianças entre 2 e 3 anos de idade. Os dados de vacinação das crianças foram obtidos a partir dos registros de imunização de crianças.

REFERÊNCIAS

1. Domingos RM, Miller RA, Corrado AP, Zamith HPS. Avaliação da influência do sexo e das linhagens de camundongo NIH e BALB/cAn no teste de ganho de peso da vacina DTP. *Vigil Sanit Debate*. 2021;9(1):106-16. <https://doi.org/10.22239/2317-269X.01438>
2. World Health Organization - WHO. Expert committee on biological standardization: fifty-sixth report. Geneva: World Health Organization; 2007[acesso 15 mar 2022]. Disponível em: http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/whole_cell_pertussis/Annex%20%20whole%20cell%20pertussis.pdf?ua=111
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Farmacopeia Brasileira. 5a ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010.
4. European Pharmacopoeia Commission - EPC. European pharmacopoeia: diphtheria, tetanus and pertussis (whole cell) vaccine (adsorbed). 8a ed. Paris: European Pharmacopoeia Commission; 2013.
5. World Health Organization - WHO. Mouse weight gain test (MWGT): manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. Geneva: World Health Organization; 2013[acesso 16 mar 2022]. Disponível em: <http://www.who.int/vaccines-documents>
6. British Pharmacopoeia Commission - BPC. British pharmacopoeia: diphtheria, tetanus and pertussis (whole cell) vaccine (adsorbed). London: British Pharmacopoeia Commission; 2017.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Farmacopeia Brasileira. 6a ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2019.
8. Cohen H, van Ramshorst JD, Drion EF. Relation between toxicity tests in mice and reactions in children using four lots of quadruple vaccine (DTP-polio). Proceedings from 21st International Symposium, Organized by the Permanent Section of Microbiological Standardization, London, October 1967. London: Karger; 1969[acesso 16 mar 2022]. Disponível em: <https://www.karger.com/Book/Toc/217536>
9. Butler NR, Voyce MA, Burland WL, Hilton ML. Advantages of aluminium hydroxide adsorbed combined diphtheria, tetanus, and pertussis vaccine for the immunisation of infants. *Br Med J*. 1969;1(5645):663-6. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5645.663>
10. Hilton ML, Wurland WL. Pertussis-containing vaccines: the relationship between laboratory toxicity tests and reactions in children. Proceedings from 25th International Symposium, Organized by the Permanent Section of Microbiological Standardization, Bilthoven, April 1969. London: Karger; 1970[acesso 18 mar 2022]. Disponível em: <https://www.karger.com/Book/Home/217540>
11. Perkins FT, Sheffield F, Miller CL, Skegg JL. The comparison of toxicity of pertussis vaccines in children and mice. Proceedings from 25th International Symposium, Organized by the Permanent Section of Microbiological Standardization, Bilthoven, April 1969. London: Karger; 1970[acesso 20 mar 2022]. Disponível em: <https://www.karger.com/Book/Home/217540>



12. Zuckerman JN. The importance of injecting vaccines into muscle: different patients need different needle sizes. *BMJ*. 2000; 321(7271):1237-8. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7271.1237>
13. Poland GA, Borrud A, Jacobson RM, McDermont K, Wollan PC, Brakke D et al. Determination of deltoid fat pad thickness: implications for needle length in adult immunization. *JAMA*. 1997;277(21):1709-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05020-5>
14. Shaw Jr FE, Guess HÁ, Roets JM, Mohr FE, Coleman PJ, Mandel EJ et al. Effect of anatomic site, age, and smoking on the immune response to hepatitis B vaccination. *Vaccine*. 1989;7(5):425-30. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(89\)90157-6](https://doi.org/10.1016/0264-410x(89)90157-6)
15. Groswasser J, Kahn A, Bouche B, Hanquinet S, Perlmutter N, Hessel L. Needle length and injection technique for efficient intramuscular vaccine delivery in infants and children evaluated through an ultrasonographic determination of subcutaneous and muscle layer thickness. *Pediatrics*. 1997;100(3 Pt 1):400-3. <https://doi.org/10.1542/peds.100.3.400>
16. Kroger AT, Sumaya CV, Pickering LK, Atkinson WL. General recommendations on immunization: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 28 Jan 1994.
17. Mayon-White R, Moreton J. *Immunizing children*. 2a ed. London: Radcliffe; 1998.
18. Greenblatt DJ, Allen M. Intramuscular injection-site complications. *JAMA*. 1978;240(6):524-4.
19. Michaels L, Poole RW. Injection granuloma of the buttock. *Can Med Ass J*. 1970;102(6):626-8.
20. Haramati N, Lorans R, Lutwin M, Kaleya RN. Injection granulomas: intramuscle or intrafat? *Arch Fam Med*. 1994;3(2):146-8. <https://doi.org/10.1001/archfam.3.2.146>
21. Ipp MM, Gold R, Goldbach M, Maresky DC, Saunders N, Greenberg S, Davy T. Adverse reactions to diphtheria, tetanus, pertussis-polio vaccination at 18 months of age: effect of injection site and needle length. *Pediatrics*. 1989;83(5):679-82.
22. American Academy of Pediatrics - AAP. Report of the committee on infectious diseases. 24a ed. Washington: American Academy of Pediatrics; 1997.
23. Silva GP, Cruz AC, Milagres LG. Short-term and long-term antibody response by mice against *Neisseria meningitidis* B or diphtheria toxoid. *Braz J Med Biol Res*. 2013;46(2):148-53. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20122556>
24. Abramczuk BM, Mazzola TN, Moreno YM, Zorzeto TQ, Quintilio W, Wolf OS et al. Impaired humoral response to vaccines among HIV-exposed uninfected infants. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(9):406-9. <https://doi.org/10.1128/CVI.05065-11>
25. Zimmermann LT, Santos DB, Naime AA, Leal RB, Dórea JG, Barbosa Jr F 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*. 2013;38:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.05.015>
26. 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 Perspectives*. 2005;113(8):1015-21. <https://doi.org/10.1289/ehp.7712>
27. Carneiro MF, Souza JMO, Grotto D, Batista BL, Souza VCO, Barbosa Jr F. A systematic study of the disposition and metabolism of mercury species in mice after exposure to low levels of thimerosal (ethylmercury). *Environ Res*. 2014;134:218-27. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.07.009>
28. Dórea JG, Marques RC, Brandão KG. Neonate exposure to thimerosal mercury from hepatitis B vaccines. *Am J Perinatol*. 2009;26(7):523-7. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1215431>
29. Dórea JG, Bezerra VL, Fajon V, Horval M. Speciation of methyl- and ethyl-mercury in hair of breastfed infants acutely exposed to thimerosal-containing vaccines. *Clin Chim Acta*. 2010;412(17/18):1563-6. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.05.003>
30. Tall A, Costa KR, Oliveira MJ, Tapsoba I, Rocha U, Sales TO et al. Photoluminescent nanoprobe based on thiols capped CdTe quantum dots for direct determination of thimerosal in vaccines. *Talanta*. 2021;221. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121545>
31. Cunha GK, Matos MB, Trettim JP, Rubin BB, Avila Quevedo I, Pinheiro KAT et al. Thimerosal-containing vaccines and deficit in child development: population-based study in southern Brazil. *Vaccine* 2020;38(9):2216-20. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.12.044>

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Licença CC BY. Com essa licença os artigos são de acesso aberto que permite o uso irrestrito, a distribuição e reprodução em qualquer meio desde que o artigo original seja devidamente citado.