

Alteração de biomarcadores bioquímicos após 21 dias de exposição ao timerosal e ao hidróxido de alumínio em zebrafish

Maria Eduarda de Andrade Galiciolli

dudagaliciolli@hotmail.com

Juliana Ferreira da Silva; Izonete Cristina Guiloski; Cláudia Sirlene Oliveira

Apesar das vacinas serem compostas principalmente pelo antígeno da doença infecciosa, algumas vacinas, principalmente as multidoses, possuem componentes adicionais. Dentre esses componentes, destacam-se os conservantes e adjuvantes à base de metais, como o timerosal e o hidróxido de alumínio, respectivamente (Fine; Chen, 1992; Alves; Gaspar; Ferreira, 2007; Waldman et al., 2011). O timerosal é o nome comercial de um conservante composto principalmente por etilmercúrio (EtHg), com 49,55% de Hg em peso. Desenvolvido em 1927, passou a fazer parte também da composição de cosméticos, vacinas e produtos farmacêuticos, devido às suas propriedades fungicidas e antibacterianas (Carneiro, 2014; Ramos, 2016). Já os sais de alumínio, foram incorporados como adjuvantes, devido à sua alta capacidade de melhorar e modular a imunogenicidade do antígeno na vacina (Garçon; Leroux-Roerls; Cheng, 2011; Christensen, 2016). Dessa forma, este estudo avaliou os efeitos da exposição ao timerosal e ao hidróxido de alumínio (isolados ou em mistura) em exemplares de *Danio rerio* (zebrafish) através de biomarcadores bioquímicos e quantificação de metalotioneínas. Cem peixes da espécie *D. rerio* foram divididos em quatro grupos (n=25 por grupo) e expostos ao timerosal (TMS) e/ou hidróxido de alumínio (Al) intraperitonealmente. Os grupos foram: controle (salina), TMS (7,5 mg/kg), Al (175,0 mg/kg) e TMS+Al (7,5 mg TMS/kg + 175,0 mg Al/kg). O bioensaio teve duração de 21 dias. Para determinação da dose foi realizado um teste piloto, com um n de cinco espécimes por grupo, sendo 11 grupos com concentrações determinadas a partir da soma das concentrações conhecidas utilizadas em vacinas obrigatórias para crianças de 0 a 10 anos de idade. A dose de escolha foi a maior dose que não causou mortalidade nos animais em 96h. Após 21 dias da injeção, os animais foram anestesiados com benzocaína 0,001% e eutanasiados por secção medular. O fígado, o rim e o cérebro foram retirados para a análise das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationa S-transferase (GST) e níveis de glutationa reduzida (GSH). A quantidade de metalotioneínas (MT) foi avaliada no rim e no fígado e a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi avaliada no cérebro. Este projeto foi aprovado pela CEUA do Complexo Hospitalar Pequeno Príncipe (#058-2020). Os resultados foram analisados através do Programa *GraphPad Prism 5*. Os dados foram transformados logaritmicamente e submetidos a análise estatística. Foi realizado ANOVA de uma via seguido de teste de Dunnett. O teste de Grubbs foi realizado para retirada dos *outliers*. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. A exposição ao Al (isolado e em mistura com TMS) causou aumento estatisticamente significativo nos níveis hepáticos de GSH [F (3,35) = 4,494; $p < 0,009$] quando comparado ao grupo controle. Por sua vez, a exposição ao TMS de forma isolada causou um aumento estatisticamente significativo na atividade hepática da SOD [F (3,35) = 5,430; $p < 0,0036$] e da GST [F (3,35) = 5,013; $p < 0,0054$] e uma diminuição estatisticamente significativa dos níveis renais de GSH [F (3,35) = 3,114; $p < 0,0385$] e da atividade da renal da SOD [F (3,33) = 15,51; $p < 0,0001$] quando comparados ao grupo controle. Interessantemente, os animais expostos ao TMS+Al apresentaram aumento estatisticamente significativo da atividade renal da SOD [F

(3,33) = 15,51; $p < 0,0001$]. Também se observou uma diminuição estatisticamente significativa da atividade cerebral da AChE nos animais expostos ao TMS e ao AI (de forma isolada ou em mistura) [F (3,33) = 5,030; $p < 0,0056$]. Os demais biomarcadores bioquímicos analisados não apresentaram alteração estatisticamente significativa. A exposição aos componentes de vacinas multidoses, hidróxido de alumínio e timerosal, causaram alteração em cérebro, rim e fígado de zebrafish após 21 dias de exposição. Apesar do risco da não vacinação ser maior que o risco de efeitos adversos, um melhor entendimento sobre essas reações permitirá, além de melhores diagnósticos, uma melhor seleção das vacinas utilizadas, diminuindo a desconfiança da população e aumentando a aceitação aos programas de imunização.

PALAVRAS-CHAVE: timerosal, hidróxido de alumínio, vacinas, *Danio rerio*.

REFERÊNCIAS:

ALVES, R. R., GASPAR, A., FERREIRA, M. B. **Reacções alérgicas a vacinas.** Revista Portuguesa de Imunoalergologia, v. 15, n. 6, p. 465-483, 2007.

CARNEIRO, M. F. H. **Avaliação da distribuição, metabolismo e nefrotoxicidade do timerosal – um conservante a base de mercúrio usado em vacinas – utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*.** Ribeirão preto, 2014.

CHRISTENSEN, D. **Vaccine adjuvants: why and how.** Human Vaccines & Immunotherapeutics, v. 12, n. 10, p. 2709-2711, 2016.

FINE, P. E. M., CHEN, R. T. **Confounding in Studies of Adverse Reactions to Vaccines.** American Journal of Epidemiology, v. 136, n. 2, 1992.

GARÇON, N., LEROUX-ROELS, G., CHENG, W. **Vaccine adjuvants.** Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology, v. 1, n. 1, p. 89-113, 2011.

RAMOS, A. **Estudos comparativos dos efeitos tóxicos induzidos por metil e etilmercúrio em *Saccharomyces cerevisiae*.** Santa Maria, 2016.

WALDMAN, E. V., et al. **Vigilância de eventos adversos pós-vacinação e segurança de programas de imunização.** Revista de Saúde Pública, v. 45, n. 1, p. 173-184, 2011.