



EFFECTO DE TIOMERSAL SOBRE EL ENCÉFALO DE *Cavia porcellus*

Thiomersal effect on brain of *Guinea pig*

Shaaron Calderón Beltrán¹, Ross Castañeda Amaranto¹, Luis Castillo Cueva¹, Sheyla Castillo López¹, Ema Castro Gutiérrez¹, Carlo Chacaltana Lozano^{1*}, Sally Colonia Figueroa¹, Carmen Silva Correa²

Recibido: 02 de junio del 2015; Aceptado: 30 de julio del 2015

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto de Tiomersal sobre el encéfalo de *Cavia porcellus*. **Material y Método:** Se trabajó con 10 especímenes machos de *Cavia porcellus* de 7 días de nacidos, los cuales fueron distribuidos al azar en dos grupos: Grupo Testigo (recibió Solución Salina Fisiológica 9‰, por vía intramuscular 20 uL a los 7 días, 9 días y 11 días de nacidos) y Grupo Problema (recibió Tiomersal en dosis de 28.4 µg/kg a los 7 días de nacidos, 21.6 µg/kg a los 9 días de nacidos y 18.4 µg/kg a los 11 días de nacidos). Se pesaron los especímenes cada semana. A los 25 días de nacidos se evaluó el peso de los animales en estudio; luego se procedió a su sacrificio y a la extracción del encéfalo para su estudio histopatológico. **Resultados:** Se observó una diferencia significativa de aumento de pesos corporales a los 25 días de nacidos en el grupo testigo ($\alpha= 0.007$), y en el estudio histopatológico se observó necrosis de las células de Purkinje y de las células granulares (capa granulosa) y desmielinización axonal en el grupo problema. **Conclusión:** Se concluye que el tiomersal tiene un efecto neurotóxico en *Cavia porcellus*.

Palabras Clave: Tiomersal; *Cavia porcellus*; encéfalo; neurotóxico.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of Thimerosal on brain of Guinea pig. **Methods:** We worked with 10 male specimens of Guinea pig 7 days old, which were randomized into two groups: Control group (received Saline Physiological 9‰ intramuscularly, 20 uL at 7 days, 9 days and 11 days old) and Problem group (received Thimerosal in doses of 28.4 ug/kg at 7 days of age, 21.6 ug/kg at 9 days old and 18.4 ug/kg at 11 days old). Every week specimens were weighed. At 25 days of age the weight and size of the animals under study was assessed; then proceeded to slaughter and extraction of the brain for histopathology. **Results:** An significant difference in weight at 25 days of age compared with control group ($\alpha= 0.007$), and observed histopathology necrosis of Purkinje cells and granule cells (granular layer), and axonal demyelination in the problem group was observed. **Conclusions:** We conclude that thimerosal has a neurotoxic effect.

Key words: Thimerosal; Guinea pig; brain; neurotoxicity.

INTRODUCCIÓN

Las vacunas previenen enfermedades que antes causaban grandes epidemias, muertes y secuelas. Son medicamentos biológicos que aplicados a personas sanas provocan la generación de anticuerpos que

actúan protegiendo ante futuros contactos con los agentes infecciosos, evitando la infección o la enfermedad, para ello toda vacuna que es envasada para multidosis, requiere la presencia de conservantes para evitar el crecimiento de bacterias que pueden

¹ Estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo – Perú.

² Docente Cátedra de Toxicología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo – Perú.

*Autor para correspondencia: cchacaltana90@gmail.com

introducir, siendo uno de ellos el tiomersal o timerosal^{1,2}.

El tiomersal, timerosal, tiosalicilato sódico de etilmercurio o mertiolato es un compuesto órgano mercurial que está presente en las vacunas. Varios productos que contienen tiomersal han sido precalificados por la Organización Mundial de Salud (OMS) y son suministrados por los organismos de adquisición de las Naciones Unidas. Dentro de las vacunas que contienen tiomersal, tenemos a las vacunas contra la difteria, el tétanos y la tos ferina (DTP), la hepatitis B, la rabia, la gripe y las infecciones por *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib) y meningococos^{3,4}.

Las vacunas para seres humanos contienen concentraciones de tiomersal desde 0,001% hasta 0,01%. El tiomersal es un compuesto constituido prácticamente en 49.6% por etilmercurio; por lo tanto, aquella vacuna conteniendo 0,01% de tiomersal como preservante, tiene 50 µg de tiomersal por dosis de 0,5 mL o aproximadamente 25 µg de etilmercurio por dosis de 0,5 mL. La gran mayoría de las vacunas pediátricas empleadas en nuestro medio utilizan las dosis más altas permitidas de etilmercurio (25 µg en cada una)^{5,6}.

La OMS considera que el mercurio es uno de los 10 productos o grupos de productos químicos con mayores repercusiones en la salud pública. La exposición al mercurio, incluso en cantidades muy pequeñas, puede causar graves problemas de salud, sobre todo en el desarrollo fetal e infantil. El mercurio puede tener efectos tóxicos en los sistemas nervioso e inmunitario, el aparato digestivo, los pulmones, los riñones, la piel y los ojos^{4,7}.

El Ministerio de Salud del Perú (MINSA), afirma que el peso promedio de un niño peruano en las diferentes edades en las que es inmunizado, tiene los niveles de máxima exposición mercurial permitidos según la Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA) y la OMS, esta etapa en la cual es vacunado y los niveles de sobreexposición correspondientes a los que es sometido hace que se empleen vacunas que contienen 25 µg de etilmercurio⁵.

El tiomersal se disocia en el organismo en etilmercurio y tiosalicilato, siendo un compuesto químico altamente inestable. Debido a su gran liposolubilidad, puede atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica y la placentaria. Puede depositarse en el sistema nervioso central, donde posteriormente se transforma en mercurio inorgánico, el cual se acumula en el cerebro. El mercurio orgánico puede también unirse al glutatión y a otras proteínas plasmáticas, como la metalotioneína. Sobre la base de la limitada información disponible, se ha concluido que los efectos nocivos del etilmercurio pueden ser similares a los del metilmercurio, otro mercurial orgánico de documentada neurotoxicidad⁵.

Por lo expuesto anteriormente, se planteó como objetivo evaluar el efecto de Tiomersal sobre el encéfalo de *Cavia porcellus*.

MATERIAL Y MÉTODO

Material:

- **Material Biológico:** Se utilizaron 10 especímenes *Cavia porcellus* machos de 90 – 140 g, de 7 días de nacidos, procedentes de un criadero de cuyes en Laredo – Trujillo.

Método:

- **Selección de los especímenes de experimentación:** Para la demostración del efecto del Tiomersal sobre el sistema nervioso se usó como modelo animal *Cavia porcellus*, escogiéndose un total 10 especímenes de 7 días de nacidos, sin exposición previa a Tiomersal. Se excluyeron a los especímenes que presentaron anomalías y/o enfermedades determinadas⁸.
- **Dosificación y administración de tiomersal:** El cálculo de las dosis se realizó en función del peso corporal y la cantidad de Tiomersal a la que está expuesto un niño desde el nacimiento hasta los 6 meses de vida. La cronología en la aplicación de las sustancias se basó en las analogías del desarrollo del sistema nervioso central y la maduración del sistema inmunológico entre humanos y murinos, incluyendo las etapas de migración neuronal y de tolerancia inmunológica⁸.

- **Distribución de los especímenes:**

Grupo I: TESTIGO Constituido por 5 especímenes a los cuales se les administró por vía intramuscular 20 µL de suero fisiológico 9‰ como dosis única a los 7 días, 9 días y 11 días de nacido con una aguja ultrafina N° 27 para insulina, al término de los cuales fueron evaluados ⁸.

Grupo II: PROBLEMA Constituido por 5 especímenes a los cuales se les administró vía intramuscular, Tiomersal en dosis de 28.4 µg/kg dosis única a los 7 días de nacidos, 21.6 µg/kg a los 9 días de nacidos y 18.4 µg/kg a los 11 días de nacidos, disuelto en suero fisiológico 9 ‰, al término fueron evaluados ⁸.

- **Condiciones experimentales:** Cada grupo estaba alojado en jaulas individuales con agua y alimentación *ad libitum*, bajo condiciones controladas de temperatura (24°C), humedad relativa (70%) y con un foto-período de 12h de ciclo de luz y 12h de oscuridad. El trabajo de investigación se realizó en el Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo ⁸.

- **Observaciones:** Se pesaron los animales cada 7 días desde su nacimiento, hasta antes de ser sacrificados administrando Tiopental Sódico a una dosis de 30 mg/kg/peso corporal ⁸.

- **Estudio Histopatológico:** A los 25 días del nacimiento, se evaluó el peso corporal y la talla de los animales de estudio; luego se procedió a su sacrificio y a la extracción del encéfalo, los cuales fueron pesados y posteriormente conservados en formol tamponado al 10% para su posterior estudio histopatológico ^{8,9}.

- **Análisis Estadístico:** Se utilizó la prueba T de Student para muestras independientes, con la finalidad de comparar las medias de los pesos corporales y pesos encefálicos, intergrupalmente, y se estableció un orden de relación ($\alpha=0,01$). Además se estudió comparativamente la incidencia de alteraciones cerebrales (encéfalo) entre los grupos experimentales y se estableció el grado de asociación con la exposición previa a Tiomersal.

RESULTADOS

Tabla 1: Promedio de los pesos corporales del grupo Testigo y Problema de *Cavia porcellus*

Pesos Grupos	7 días de nacidos	14 días de nacidos	21 días de nacidos	25 días de nacidos
	Testigo	128.4 ± 4.518	163.475 ± 11.445	202.625 ± 5.513
Problema	108.15 ± 10.81	131.525 ± 17.398	164.25 ± 30.804	164.25 ± 30.804

Los valores corresponden al promedio de los pesos corporales ± la desviación estándar de 5 animales de experimentación por cada grupo.

Tabla 2: Análisis T-student de los pesos corporales del grupo Testigo y Problema de *Cavia porcellus*

Grupos	Sig. ($\alpha < 0.01$)	7 días de nacidos ($\alpha < 0.01$)	14 días de nacidos ($\alpha < 0.01$)	21 días de nacidos ($\alpha < 0.01$)	25 días de nacidos ($\alpha < 0.01$)
Testigo	0.011	0.022	0.086	0.003	
Problema					

Tabla 3: Promedio los pesos del encéfalo del grupo Testigo y Problema de *Cavia porcellus*

Grupos	Promedio Pesos ± Desviación estándar
Testigo	3.375 ± 0.126
Problema	2.925 ± 0.189

Tabla 4: Análisis T-student de los pesos del encéfalo del grupo Testigo y Problema de *Cavia porcellus*

Grupos	Sig. ($\alpha < 0.01$)
Testigo	0.007
Problema	

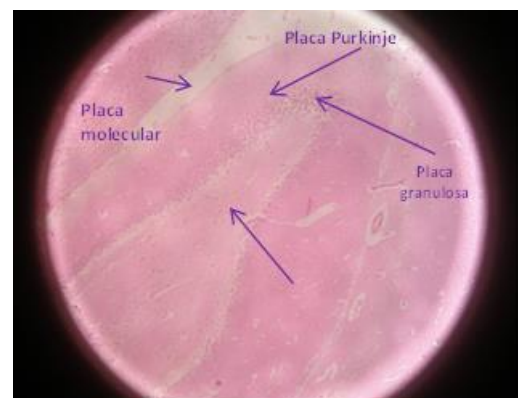


Figura 1: Corte histológico del encéfalo de *Cavia porcellus* del Grupo Testigo: Corteza cerebelosa. Prominencia encefálica situada en la pared externa de

los ventrículos laterales del cerebro (hipocampo), caracterizada por las placas de células molecular, granulosa y Purkinje que le confieren un aspecto aparentemente normal. H & E 100X.

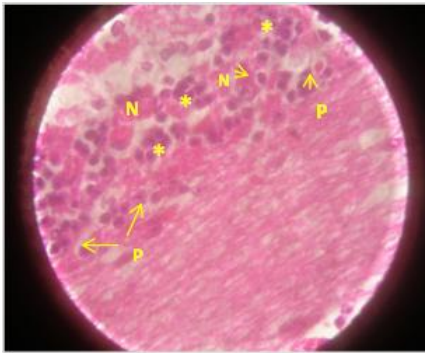


Figura 2: Corte histológico del encéfalo de *Cavia porcellus* del Grupo Testigo: Cerebelo. Capa molecular con abundante neuropilo (ovillo denso de terminales axónicos, dendritas y células gliales). La granulosa muestra la presencia de neuronas (N) y glías (*). Prominentes células de Purkinje (P). H & E 1000X.

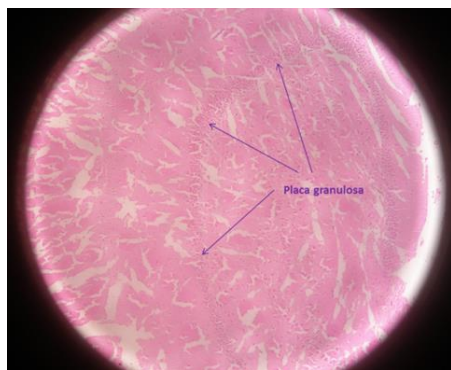


Figura 3: Corte histológico del encéfalo de *Cavia porcellus* del Grupo Problema: Cerebelo. Se pone de manifiesto la tenue tinción de la placa de células granulosas, indicativo de una densidad neuronal reducida. Efecto atribuible a la actividad neurotóxica del Tiomersal. H & E 100X.

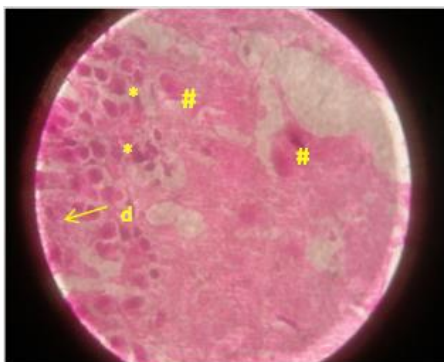


Figura 4: Corte histológico del encéfalo de *Cavia porcellus* del Grupo Problema: Cerebelo. Necrosis de células de Purkinje (#), Necrosis neuronal (*). Desmielinización axonal (d). H & E 1000X.

DISCUSIÓN

El Tiomersal es una sustancia que se usa como preservante en algunas vacunas y agentes biológico, a concentraciones desde 0,001% hasta 0,01%. Contiene 49,6% de Hg por peso. En soluciones salinas, se disocia en cloruro de etilmercurio y ácido tiosalicílico; una vez disociado, el etilmercurio tiene una altísima afinidad por los radicales sulfhidrilos (SH) que se encuentran en algunas enzimas antioxidantes, como el glutatión o las metalotioneínas (proteínas producidas por el hígado), enzimas que tienen un límite de unión al metal pesado (saturación), dejando libre al etilmercurio excedente. Esto permite aseverar que, una exposición elevada a timerosal, sobrepasaría los límites de saturación por parte de los antioxidantes naturales. Como consecuencia, el etilmercurio en exceso se uniría a los grupos SH de otras importantes proteínas estructurales y/o funcionales^{8,10}.

Para tener un control del desarrollo corporal y cerebral de los especímenes, desde la primera semana de vida hasta los 25 días de edad, se controló el peso corporal (Tabla 1) y al ser sacrificados a los 25 días de edad se pesó el cerebro (Tabla 3). Como se observa en la Tabla 2 en el control de peso corporal a las 25 días de edad existe una variación significativa ($\alpha = 0.003$) dando como evidencia que el Tiomersal afecta en el desarrollo corporal al ser sometidas a dosis consecutivas de este compuesto organomercurial; así también en la Tabla 4 se observa una variación significativa ($\alpha = 0.007$) en el peso de los encéfalos indicando que los encéfalos del grupo experimental no desarrollaron correctamente^{8,10}.

Tal como lo indica el trabajo de Laurente y col. (Lima, 2007) recientemente se ha descrito la importancia de los canales de calcio intracitoplasmáticos de neuronas, células cerebelosas y células endoteliales capilares cerebrales (las mismas que conforman la barrera hemato-encefálica) de ratones, en el proceso de diferenciación neuronal y progresión de la neurogénesis. Precisamente, la activación de dichos canales está mediada por la oxidación coordinada de

radicales SH, sobre los cuales el timerosal ejerce un potente efecto modulador, incrementando las concentraciones de calcio citoplasmático; de esta manera, se ha señalado que este último puede alterar la fisiología de las células nerviosas, gracias a sus efectos sobre el estado de óxido-reducción, conduciendo a trastornos funcionales, depleción de glutatión y aumento del estrés oxidativo⁸.

En las Fig. 1 y Fig. 2 se observan placas de células molecular, granulosa y Purkinje en el corte histológico del encéfalo de *Cavia porcellus* del grupo testigo, que le confieren un aspecto aparentemente normal. En contraste, en la Fig 4. se observa necrosis de las células de Purkinje y de las células granulares (capa granulosa), y desmielinización axonal, así también en la Fig. 3 se observa en la placa externa de la granulosa pocas células de Purkinje sin núcleo y tinción que evidencia necrosis en los especímenes del grupo problema.

La desmielinización axonal de las grandes fibras nerviosas se debe a la carencia de vitamina B₁₂, esta afecta a los cordones laterales de la médula, al parecer el tiomersal impide la metilación de esta vitamina lo cual conlleva a una anemia perniciosa grave, ya que en el tiempo que se administró tiomersal, en el grupo experimental se observó la parálisis de miembro que es una consecuencia de la falta de vitamina B₁₂ de forma grave¹⁰.

La producción del Hg inorgánico a partir de mercurio orgánico (MeHg, etil-Hg) implicaría la producción de radicales libres. Estos radicales libres determinarían la peroxidación lipídica de la membrana celular provocando un daño en la célula¹¹.

El tiomersal en el organismo se disocia en tiosalicilato y etil-Hg, este último al igual que el metil-Hg se puede transformar en Hg elemental. El órgano blanco del Hg en su forma inorgánica es el riñón, pero el etil-Hg tiene la capacidad de dañar gravemente al SNC por su alta lipofiliidad de las células cerebrales, las neuronas son las más sensibles al daño producido por los radicales libres, lo que las hace particularmente sensible al estrés oxidativo. Sin embargo, el mecanismo

exacto responsable de la neurotoxicidad es desconocido¹¹.

Se sugiere que una de las posibles vías de producción de radicales libres inducida por el mercurio en las células nerviosas podría ocurrir a través de la activación de receptores glutamatérgicos, principalmente los de tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), los cuales permiten el paso de calcio, lo que, consecuentemente, conduce a la activación de la NOS. El mercurio, principalmente en bajas concentraciones, es capaz de promover alteraciones en la homeostasis celular del calcio generando un aumento en las concentraciones intracelulares de este ión que produce indirectamente la activación de la NOS y, con ello, el aumento de la concentración de ERO^{11,12}.

Además, se asocia el aumento de la concentración intracelular de calcio y la muerte neuronal, principalmente por activación de enzimas como fosfolipasas, proteasas y endonucleasas, así como por disfunción mitocondrial.^{12,13}

CONCLUSIONES

1. El Tiomersal provocó una disminución del peso corporal y encefálico de los especímenes del grupo problema respecto al grupo testigo.
2. El Tiomersal tiene un efecto neurotóxico en *Cavia porcellus*, al evidenciarse necrosis de las células Purkinje y neuronas; así como desmielinización axonal en los especímenes del grupo problema.

Conflicto de interés

No se presentan conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zubizarreta R, Louro A. Importancia de las vacunas. 2010. [en línea] [citado el 23 de Enero del 2015]. Disponible en: http://www.fisterra.com/Salud/4vacunas/importancia_de_las_vacunas.asp
2. Beuter A, Edwards R. Manual de vacunación. 2008. [internet] [citado el 23 de Enero del 2015]. Disponible en:

- <http://www.censia.salud.gob.mx/contenidos/descargas/vacunas/ManualVacunacion2008-2009.pdf>
3. Segura M, Catalá R, Huertas C. Evaluación de la seguridad de las vacunas por su contenido en timerosal. *Pharmaceutical Care* [internet]. 2000 [Fecha de acceso: citado el 23 Enero del 2015]; 2: 432-439. Disponible en: <http://www.autismoava.orgwww.autismoava.org/archivos/Vacunas%20tiomersal%20Pharmacare%20%20Esp%202000,%202,%20432-439.pdf>
 4. OMS. Vacunas y productos biológicos-Tiomersal. [internet]. 2011. [citado el 23 de Enero del 2015]. Disponible en: http://www.who.int/immunization/newsroom/thiomersal_questions_and_answers/es/
 5. Maya L, Luna F. El timerosal y las enfermedades del neurodesarrollo infantil. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2006. Pág. 243-265.
 6. Food and Drug Administration (FDA). Administración de drogas y alimentos de los estados unidos. Timerosal en las vacunas. [internet]. 2014 [citado el 5 de febrero del 2015]. Disponible en: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/UCM096228>
 7. Fernandes B, Barros L, Peçanha F. et al. Toxic Effects of Mercury on the Cardiovascular and Central Nervous Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012; 2012:949048. doi:10.1155/2012/949048.; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3395437/>
 8. Laurente J, Remuzgo F. Efectos neurotóxicos del timerosal, a dosis de vacuna, sobre el encéfalo y el desarrollo en hámsteres de 7 días de nacidos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2007. Pág. 222-237.
 9. OECD. Guideline for the Testing of Chemicals. Neurotoxicity Study in Rodents. 1997. p. 1-15.
 10. Zambrano B. Consideraciones generales sobre el mercurio, el timerosal, y su uso en vacunas pediátricas. *Rev. Méd. Urug.* [Internet]. 2004. [citado el 07 Diciembre 2014]; 20(1): 4-11. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902004000100002&lng=es
 11. Crespo-López M, Herculano A, Corvelo T, Do Nascimento J. Mercurio y Neurotoxicidad. *REV NEUROL.* [internet]. 2005 [citado el 21 Febrero 2015] ; 40 (7): 441-447 Disponible en: http://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBsQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fpublication%2F7887504_Mercury_and_neurotoxicity%2Ffile%2F60b7d51e326ed40181.pdf&ei=18W6U3nKcyhsASpYDwDA&usg=AFQjCNGJhfRu58VWZmxljOIHL YCLPTDK7Q&bvm=bv.70138588,d.cWc
 12. Dorea J. Integrating Experimental (*In Vitro* and *In Vivo*) Neurotoxicity Studies of Low-dose Thimerosal Relevant to Vaccines. *Neurochemical Research*, [internet]. 2011. [citado el 6 Enero 2015] 6 (6): 927-938. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11064-011-0427-0>
 13. Ramírez A. Intoxicación por mercurio. *n. Fac. med.* [online]. 2008, vol.69, n.1 [citado 2015-02-09], pp. 46-51. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832008000100010&lng=es&nrm=iso >. ISSN 1025-5583.