



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO TERATÓGENO DEL CARVACROL DURANTE LA
NEURULACIÓN DE EMBRIONES DE POLLO”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARÍA EUGENIA GONZÁLEZ PÉREZ

DIRIGIDA POR

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCO CER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2006.

BIBLIOTECA CENTRAL UAQ

No. Adq. H72351

No. Título _____

Clas IS

619.5

G643e



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO TERATÓGENO DEL CARVACROL DURANTE LA
NEURULACIÓN DE EMBRIONES DE POLLO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA

MARÍA EUGENIA GONZÁLEZ PÉREZ

DIRIGIDA POR

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODALES

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER
DIRECTOR

Dra. LAURA C. BERUMEN SEGURA
SINODAL

M. en C. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ
SINODAL

M. en C. J. SUSANA FLORES ROBLES
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 Expresión genética	2
II.2 Desarrollo del sistema nervioso	9
II.3 Carvacrol	18
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVOS	22
IV.1 General	22
IV.2 Específicos	22
V. METODOLOGÍA	23
V.1 Materiales	23
V.2 Métodos	23
V.3 Diseño experimental	24
V.3.1 Método estadístico	25
VI. RESULTADOS	27
VII. DISCUSION DE RESULTADOS	34
VIII. CONCLUSIONES	37
IX. BIBLIOGRAFÍA	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Promotor de la transcripción	2
2	Estructura del promotor	3
3	Caja TATA	4
4	RNA polimerasas	5
5	Formación de las estructuras en un huevo fecundado	10
6	Gastrulación	11
7	Formación del tubo neural	13
8	Maduración de las estructuras encefálicas	17
9	Planta de orégano	18
10	Estructura del carvacrol	19
11	Gráfica de grupo control	27
12	Embrión normal	28
13	Gráfica de 1.25 μ l de carvacrol	29
14	Gráfica de 3.1 μ l de carvacrol	30
15	Resorción	30
16	Gráfica de 6.25 μ l de carvacrol	31
17	Anencefalia	32
18	Comparación porcentual de anomalías	33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Diseño experimental	24

RESUMEN

El orégano es una planta medicinal que ha sido utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Entre los componentes del aceite esencial de orégano se encuentra el carvacrol o isopropil-*o*-cresol. El carvacrol se emplea como antiséptico y también se le atribuyen propiedades antiinflamatorias y antiespasmódicas. Los estudios toxicológicos durante el inicio de la formación del sistema nervioso son poco conocidos, por lo que es importante llevarlos a cabo, para conocer su posible participación en dicho desarrollo. En este trabajo se usaron embriones de pollo como modelo biológico, para explorar el efecto del carvacrol durante el inicio de la formación del sistema nervioso. Para llevar a cabo el estudio se realizaron experimentos preeliminares para conocer la DL₅₀ y a partir de los datos obtenidos se propuso el diseño experimental. Las dosis obtenidas en el diseño experimental se aplicaron antes de la formación de la placa neural y se observaron en el estadio 13 de acuerdo a Hamburger y Halmilton. Los embriones resultantes se midieron, se observaron y fueron sometidos a análisis estadístico para ver su significancia en relación al control. En los resultados se encontraron anomalías en el desarrollo del sistema nervioso en los embriones tratados con carvacrol, por lo que se concluye que el carvacrol tiene efectos teratógenos en los embriones de pollo.

I. INTRODUCCIÓN

Durante la expresión genética se activan genes, lo cual resulta en la formación de mRNA el cual posteriormente se traduce a proteínas. Los genes se utilizan de forma selectiva, para que al activarlos o inhibirlos produzcan o disminuyan la producción de distintas proteínas que pueden actuar como enzimas por ejemplo; la glucosa-6-fosfato. Durante el desarrollo embrionario se forma un gran número de células a partir de un huevo fecundado; a este proceso se le conoce como diferenciación celular y se lleva a cabo porque las células acumulan distintas proteínas, es decir, expresan diferentes genes. Existen cuatro etapas en las que se puede controlar la expresión génica: la primera es el control transcripcional que es considerada como la principal; la segunda etapa es la de control de procesamiento del RNA; la tercera etapa es la de control de la traducción; y la cuarta etapa es la de control de la actividad de la proteína. Los cambios en cualquiera de las etapas de la expresión genética pueden modificar el desarrollo del sistema nervioso. En este trabajo se exploraron los cambios fenotípicos inducidos por carvacrol, uno de los componentes principales del aceite esencial de orégano, durante la neurulación de embriones de pollo. En los resultados se encontraron anomalías en el desarrollo del sistema nervioso en los embriones tratados con carvacrol, por lo que se concluye que el carvacrol tiene efectos teratogénicos en los embriones de pollo.

II. ANTECEDENTES

II.1 Expresión genética

La transcripción es el mecanismo por el cual se sintetiza el mRNA (RNA mensajero), el cual se forma a partir de secuencias de DNA conocidas como genes. Para que se realice la síntesis de mRNA, se necesitan algunos elementos en particular, como son los nucleótidos que deben contener las bases A, G, C, y U. Estos nucleótidos deben estar activados, como nucleósidos trifosfatos (ATP, GTP, CTP, UTP). Además se requiere también una enzima que permita unir los nucleótidos para formar el polímero mRNA; esta enzima es la RNA polimerasa. La transcripción se modula en una región de DNA conocida como promotor, que se encuentra situada justo antes del inicio de la región donde comienza la transcripción y que consta de aproximadamente 40 pares de nucleótidos como se indica en la Figura 1. La unión de los nucleótidos entre sí se lleva a cabo mediante enlaces éster. Esta unión o ensamblaje se lleva a cabo en el sentido 5' a 3'. En este sentido es donde actúa la enzima RNA polimerasa que puede representarse como un patín que se desplaza sobre una cremallera. Las 2 hebras de DNA se van separando por ruptura de los enlaces de hidrógeno y es aquí donde se inicia la transcripción. Pero, conforme la RNA polimerasa se va desplazando a lo largo de la cadena de DNA, el mRNA recién formado se va separando. Posteriormente los enlaces de hidrógeno entre las dos hebras de DNA se vuelven a formar detrás de la RNA polimerasa y las dos hebras de DNA adquieren de nuevo su forma helicoidal (Klug y Cumming, 1999).

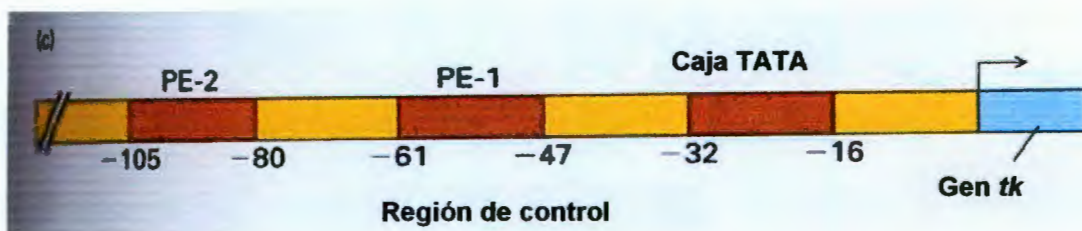


Figura 1. Promotor de la transcripción. Se encuentra situada justo antes del inicio de la región donde comienza la transcripción y que consta de aproximadamente 40 pares de nucleótidos (Kosztin, 1999).

Los factores generales de transcripción tienen que ensamblarse formando un complejo sobre el DNA del promotor con el fin de poder reclutar a la RNA polimerasa en ese lugar (Figura 2). En la primera etapa de la transcripción, el factor TFIID se une específicamente a la secuencia TATA. A continuación TFIIB se une al complejo, seguido por la RNA polimerasa (Pol II), el factor TFIIF así como los factores TFIIE y TFIIH. En presencia de ATP, TFIIH fosforila a la RNA Pol II, con lo que se activa su función y se inicia la transcripción. La RNA polimerasa I y RNA polimerasa III también requieren una serie de factores generales de transcripción.

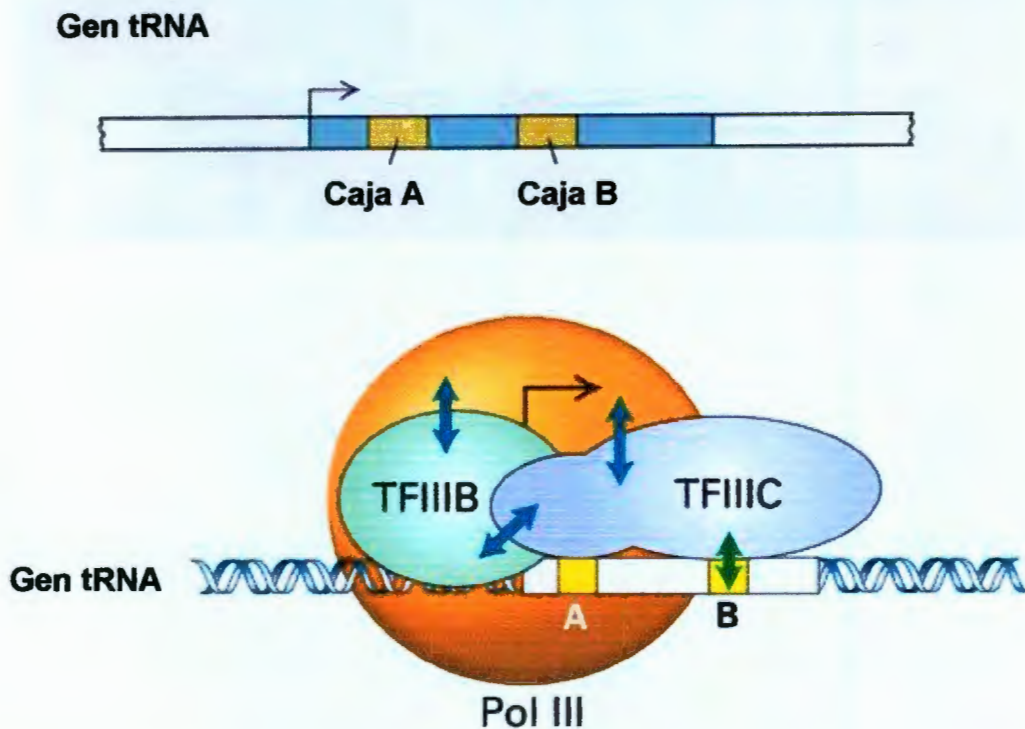


Figura 2. Estructura del promotor. Se puede observar como se unen a esta región los factores de transcripción THIIIB y TFIIC (Kosztin, 1999).

La región de control situada junto a la región de inicio de la transcripción, con una longitud hacia delante de aproximadamente 100 pb se denomina promotor proximal. En esta región promotora se encuentran, esencialmente, la TATA box presente en casi todos los genes, dicha región se encuentra esquematizada en la

Figura 3; así como la secuencia CCAAT y la GC, que están presentes con menor frecuencia.

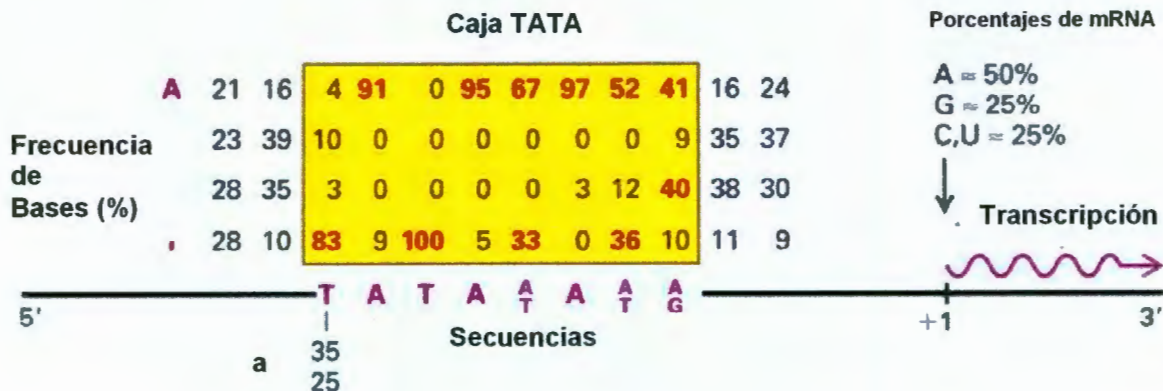


Figura 3. Caja TATA conocida así por sus secuencias de timina y adenina. Se indica como predominan las secuencias de estos nucleótidos entre el 90% y superiores (Jakubowski, 2001).

Una vez formado el complejo de inicio de la transcripción se lleva a cabo la formación del RNA mensajero, por las distintas polimerasas como: La RNA polimerasa I, para los rRNA 18S, 5, 8S, 28S. La RNA polimerasa II, para los pre-mRNA, snRNA U1, U2, U3 (Figura 4). La RNA polimerasa III, para los rRNA 5S, tRNA y snRNAU6. Las tres RNA polimerasas se encuentran en distintas regiones del núcleo de la célula: La polimerasa I en los nucleolos y la RNA polimerasa II y III en el nucleoplasma (Herskowitz, 1990).

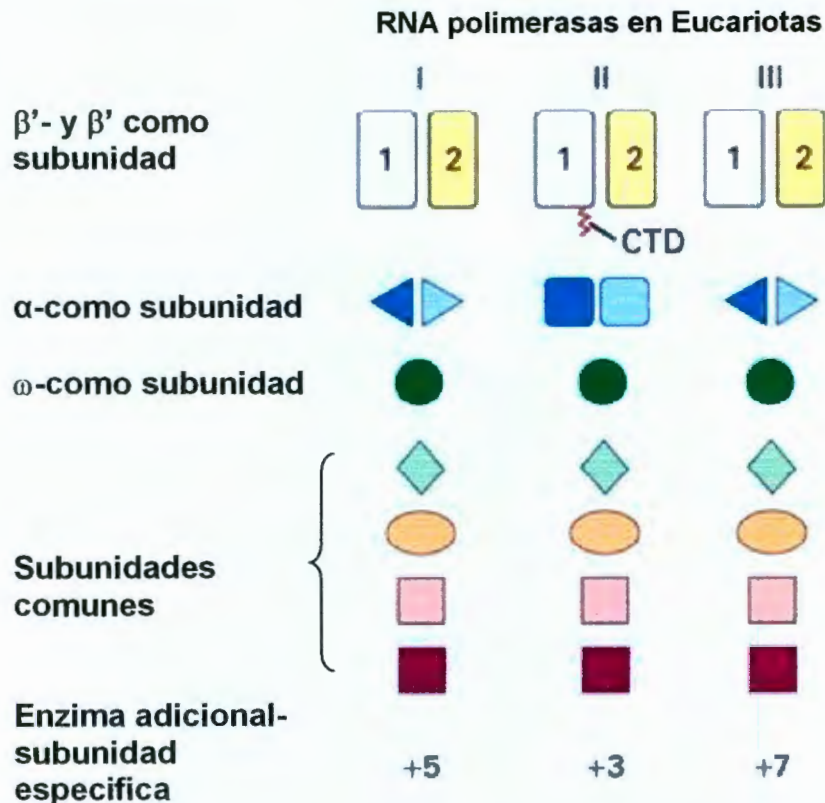


Figura 4. RNA polimerasas. En la figura se presentan cada una de las unidades que forman las RNA polimerasas así como sus enzimas específicas que puede representarse como un patín que se desplaza sobre una cremallera (Kosztin, 1999).

Una vez formado el mRNA se lleva a cabo el proceso de maduración, en el cual se adiciona una secuencia de adeninas al final de la cadena formada (aproximadamente 250 pb). La poliadenilación del mRNA le ayuda a su transporte desde el núcleo hasta el citoplasma y lo protege en el curso de la traducción (Griffits y col., 1999).

Otros cambios en la maduración del RNA es la adición a la cadena de mRNA de una caperuza constituida por un nucleótido GMP. El nucleótido GMP se coloca al inicio de la transcripción, antes de que se hayan ensamblado 30 nucleótidos. Para llevar a cabo la adición del GMP en el fosfato del extremo 5' del transcrito primario se elimina y se empalma con un GMP (que proviene de un GTP). Esta unión se

hace con el OH del grupo fosfato (enlace anhidro), lo que conlleva a que el mRNA ya no tendrá un fosfato libre en el extremo 5'. La función de la caperuza es proteger al extremo 5' de los mRNA del ataque de las enzimas (fosfatasas, nucleasas). Asimismo, la caperuza desempeña un papel importante en el inicio de la traducción en las células eucariotas. La subunidad pequeña del ribosoma se unirá desde el principio al extremo 5' de una cadena de mRNA, debido al reconocimiento de la caperuza (Klug y Cumming, 1999).

Aunque la transcripción consiste en producir RNA complementario de una hebra de DNA, no solo produce mRNA sino que produce también tRNA (RNA de transferencia) y rRNA (RNA ribosomal), los cuales son sintetizados a partir de la transcripción de un gen y que a diferencia del mRNA (el cual tiene una vida media muy corta porque está destinado a ser traducido), son estables y no son traducidos a proteínas en el ribosoma. En estos casos la transcripción no es seguida de la traducción. En las modificaciones postranscripcionales de las eucariotas, ciertos rRNA y tRNA presentan intrones que son secuencias interpuestas, intercaladas o intrusos que interrumpen el gen y que no serán traducidos, por lo que son eliminados por mecanismos diferentes a la eliminación de los intrones del mRNA (Klug y Cumming, 1999).

Un gen es una porción de DNA, a partir del cual se transcribe una cadena. Un segmento único de DNA sirve de modelo para la transcripción y dará lugar a numerosos ejemplares de mRNA que contienen toda la misma información. Un gen puede producir varios centenares de mRNA, por lo que a este nivel existe un fenómeno de amplificación muy importante, de manera que un único gen da origen a varios millares de proteínas idénticas, por lo que no es necesario que el DNA contenga millares de copias idénticas de un mismo gen (Klug y Cumming, 1999).

En las eucariotas un gen comprende:

- Exones que contienen la información (hereditaria) y que generalmente se expresan (siendo traducidos en proteínas).

- Intrones (o secuencias intercaladas) que están interpuestos en medio de la región que contiene la información. Serán transcritos pero no traducidos.

Los exones e intrones del gen son transcritos para producir una molécula larga de RNA llamada transcrito primario o precursor del mRNA (pre-mRNA). Esta fase tiene lugar en el núcleo y pueden producirse las modificaciones, para originar el transcrito secundario, es decir, la eliminación de intrones y empalme de exones (Klug y Cumming, 1999).

En el curso de la fase de maduración (llamada processing, que significa tratamiento, transformación), el pre-mRNA experimentará cortes-empalmes (splicing) para producir finalmente mRNA. La escisión es el corte para la eliminación de los intrones; el empalme es la reunión de los segmentos restantes correspondientes a los exones y que serán soldados por los extremos. La escisión es una operación delicada que debe ser muy precisa y fiable: un error de un solo nucleótido a nivel del empalme cambiaría la pauta de lectura durante la traducción y daría lugar a una proteína “falsa”. Todos los intrones de un transcrito primario empiezan por GU (esta región 5' también se llama “región donadora del empalme”) y terminan en AG (esta región 3' también es llamada “región receptora del empalme”). Otra región es la de enlace del lazo, la cual se ubica a aproximadamente -30 nucleótidos, en donde se encuentra un AMP llamado “A del enlace” (Klug y Cumming, 1999).

El mecanismo de escisión empalme puede descomponerse en dos etapas: En la primera etapa se produce una escisión a 5' del intrón, entre el final del exón y el principio del intrón. En la segunda etapa se produce una escisión a 3' del intrón, entre el final del intrón y el inicio del exón siguiente (Griffits y col., 1999).

En las eucariotas existen los snRNA (small nuclear RNA, RNA pequeño nuclear) que desempeñan un papel importante en las escisiones empalmes y presentan las particularidades siguientes:

- Son pequeñas moléculas formadas por 100-300 nucleótidos aproximadamente.
- Están situadas en el núcleo de las células.
- Son ricas en uracilo.
- Actúan en forma de complejos con proteínas.

La eliminación de los intrones se efectúa en el núcleo. El empalme de exones, afecta generalmente a los exones que pertenecen a un mismo transcrito primario (cis-splicing). Se cree que los intrones tienen otras funciones además de codificar proteínas que eliminen los intrones. Se ha observado en algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que un intrón situado en un gen de rRNA codifica una endonucleasa que permite que el DNA de otras cepas sea cortado y reciba un intrón (Griffits y col., 1999).

Una vez concluida tanto la transcripción, que es el proceso en el cual se lleva a cabo el principal control de la expresión genética, como la maduración del mRNA, se continúa con las siguientes etapas para llevar a cabo la traducción y con ello la formación de las nuevas proteínas (Griffits y col., 1999).

II.2 Desarrollo del sistema nervioso

Los cambios en la expresión genética en cualquiera de los pasos mencionados, pueden alterar el desarrollo del sistema nervioso. En aves el desarrollo del sistema nervioso inicia en el cromosoma W (gallina) el cual fue descubierto por J. Frederic en 1961 (Figura 5). Las aves tienen un número elevado de cromosomas, frecuentemente entre 70 y 90 y numerosos cromosomas pequeños ("micro cromosomas") (John, 1994).

Las células de los organismos que se reproducen sexualmente tienen un doble juego de cromosomas formado por pares, cada uno de cuyos miembros proviene de uno de sus progenitores. Durante la división celular normal o mitosis las células resultantes conservan estos pares de cromosomas. En cambio, en las células

germinales y como consecuencia de las dos divisiones celulares llamadas meiosis, se originan cuatro gametos o células sexuales, cada una de las cuales contiene la mitad del número de cromosomas de la célula original, debido a que tiene solo uno de los miembros de cada uno de los pares de cromosomas. En las células germinales (espermatocitos u ovocitos), los cromosomas desarrollan una serie de procesos: se aparean (sinapsis cromosómica), intercambian partes de segmentos (recombinación meiótica) y finalmente se separan (disyunción) para formar, luego de la segunda división meiótica, los gametos (espermatozoide u óvulo) (Contreras, 2000).

Los complicados procesos de intercambio de segmentos ocurren concomitantemente con la formación de una estructura proteínica especial en cada pareja de cromosomas; esta estructura es denominada "complejo sinaptonémico" que fue descrito por primera vez por el biólogo estadounidense Moses en 1956. Al aplicarse este procedimiento a los ovocitos de gallina, se pudo identificar a las 38 parejas de cromosomas no relacionados con el sexo (llamados autosomas), incluso a los más pequeños o microcromosomas (Contreras, 2000).

Algún tiempo después, en el mismo laboratorio se descubrió que no solo en los cromosomas comunes (somáticos) se producían intercambios de segmentos, durante la meiosis (recombinación meiótica). Los intercambios también se producen en un pequeño, segmento terminal de los cromosomas Z y W en los ovocitos de la gallina. Esto demostró por primera vez que había una zona compartida de cromatina en los cromosomas sexuales Z y W en un ave (la gallina). La zona de cromatina compartida descubierta para aves, se considera similar a lo que este mismo laboratorio había demostrado en los mamíferos, cuando años antes había comprobado la existencia de un intercambio entre los cromosomas X e Y (Contreras, 2000).

La zona donde se llevó a cabo el intercambio se le conoce con el nombre de "región pseudoautosómica". En las aves como la gallina hay también una pequeña zona "pseudoautosómica" en los cromosomas Z y W, que asegura una separación normal de ambos cromosomas sexuales durante la meiosis. Cabe destacar que esta separación requiere que exista al menos una zona de interacción entre los dos cromosomas durante la división meiótica, y esta interacción es normalmente provista por uno o más intercambios, llamados "quiasmas". Es decir que hay un quiasma en la pequeña zona terminal de los cromosomas Z y W que asegura su separación normal (Contreras, 2000).

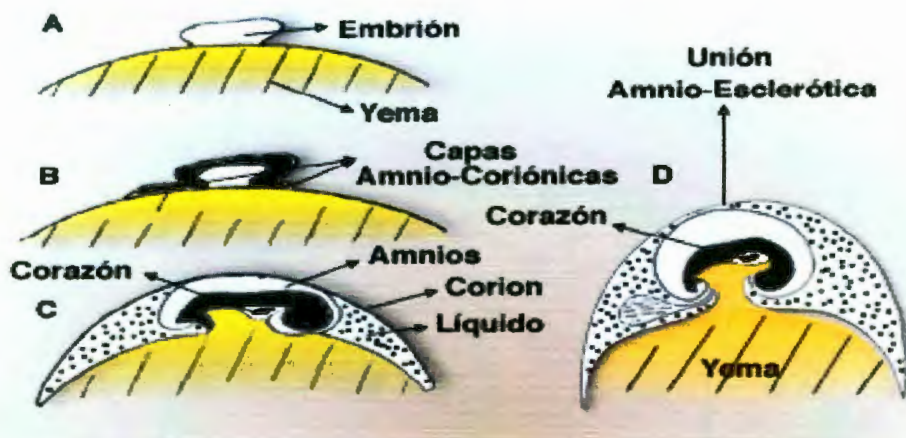


Figura 5. Formación de las distintas estructuras en un huevo fecundado. Al segundo día de incubación se comienzan a desarrollar los anexos embrionarios: El saco vitelino es la membrana que envuelve a la yema. El amnios protege al embrión de los choques y le permite moverse. El alantoides se ubica entre el amnios y el corion (Bear, 2002).

En todos los embriones de vertebrados es fundamental el proceso de la gastrulación, la invaginación del revestimiento del embrión en desarrollo que produce las tres capas germinales de los embriones: la capa externa o ectodermo; la capa intermedia (mesodermo) y la hoja interna o endodermo. La gastrulación también define la línea media y los ejes anteroposteriores de los embriones de todos los vertebrados (Contreras, 2000).

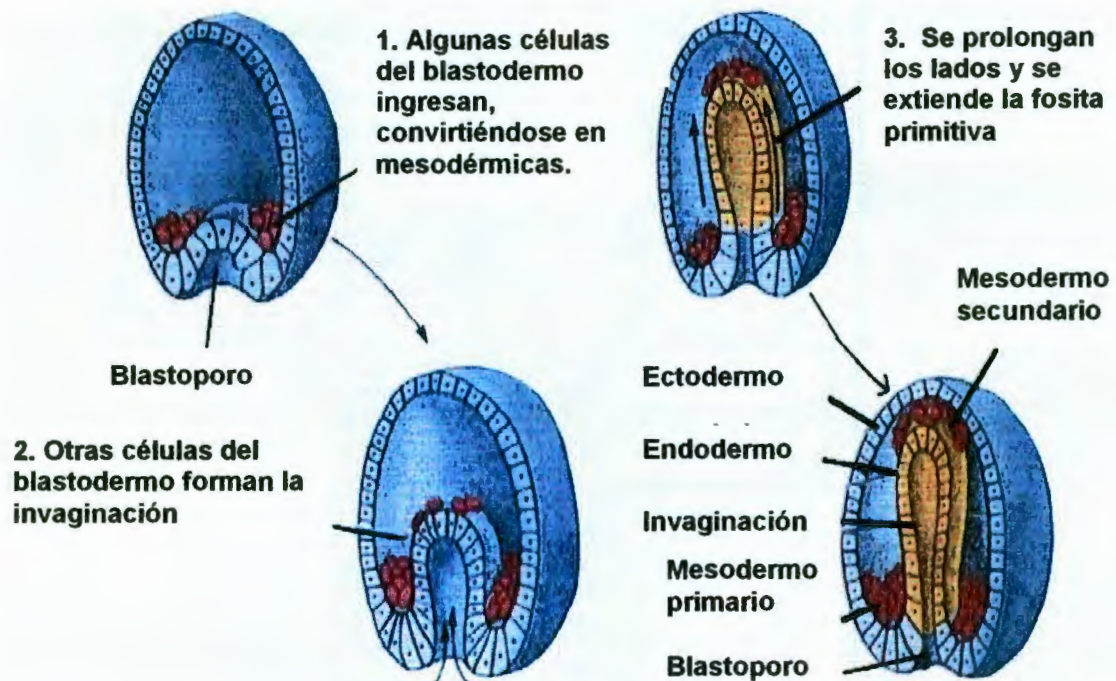


Figura 6. Gastrulación. Se muestran cada una de las estructuras por las que pasa la célula para llegar a la formación del tubo neural. Las células del ectodermo que forman primero la placa neural y luego el tubo neural, se diferencian del resto de las células ectodérmicas. En la medida que se va estructurando el tubo neural empiezan a formar la cresta neural, las células de la cresta neural se separan del ectodermo y se ubican por sobre el tubo ya formado, entre éste y la pared del ectodermo (Bear, 2002).

Una consecuencia de la gastrulación es la formación de la notocorda, un cilindro definido de células mesodérmicas que se extiende a lo largo de la línea del embrión desde adelante hacia atrás (Figura 6). La notocorda se forma a partir de una agregación de mesodermo que se invagina y se extiende hacia delante desde la indentación superficial denominada fosita primitiva, la cual después se extiende para formar la línea media primitiva. Como resultado de estos movimientos celulares durante la gastrulación, la notocorda llega a definir la línea media embrionaria. Debido a su proximidad, el ectodermo que se localiza inmediatamente por arriba de la notocorda se convierte en el sistema nervioso. Además de especificar la topografía básica del embrión y determinar la posición del sistema

nervioso naciente, la notocorda es necesaria para la diferenciación neural ulterior, la notocorda junto con la fosita primitiva envía señales inductivas al ectodermo suprayacente, que hacen que un subgrupo de células ectodérmicas se diferencien en células precursoras nerviosas (Purves, 2001).

Durante el proceso denominado neurulación en la tercera semana de desarrollo, el ectodermo de la línea media que contiene estas células se hace más grueso y forma un epitelio cilíndrico definido denominado placa neural. Poco tiempo después, la placa neural comienza a doblarse hacia dentro, formando un surco neural longitudinal en la línea media flanqueado por un pliegue neural a cada lado. El surco neural se hace más profundo y los pliegues neurales se aproximan entre sí en la línea media dorsal. Al final de la tercera semana los dos pliegues comienzan a fusionarse en la región media del surco neural, formando el tubo neural (Purves, 2001).

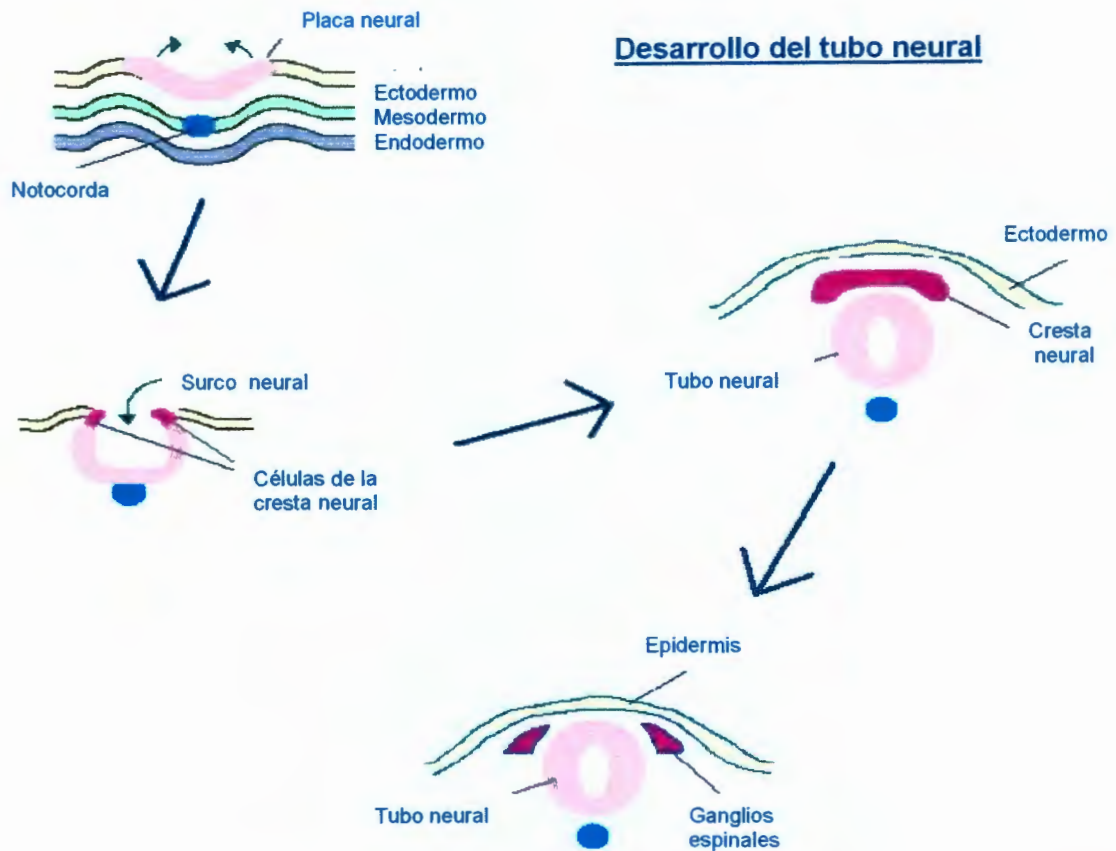


Figura 7. Formación del tubo neural. Al final de la tercera semana los dos pliegues comienzan a fusionarse en la región media del surco neural, formando el tubo neural. En la figura se muestra como es el proceso de formación del tubo neural primero la placa, la cresta y finalmente el tubo neural, que queda junto con la notocorda (Bear, 2002).

A medida que el tubo neural se cierra, es separado de la superficie ectodérmica y queda encerrado dentro del cuerpo, esta estructura da origen a todo el encéfalo y la médula espinal, como se observa en la Figura 7. Las células progenitoras del tubo neural son las células precursoras neurales. Los precursores son las células madre en división que producen otros precursores y finalmente neuroblastos que no se dividen y que se diferencian en células. Dada su proximidad con la notocorda, las células en línea media ventral del tubo neural se diferencian en una banda de células que parecen epiteliales y se denominan la placa del piso. La posición de la

placa del piso, en la línea media ventral determina la polaridad del tubo neural e influye además en la diferenciación de las células precursoras neurales.

Las señales inductivas desde la placa del piso conducen a la diferenciación de las células en la porción ventral del tubo neural, que finalmente da origen a las neuronas motoras, las cuales se encuentran así más cerca de la línea media ventral. Las células precursoras que están más alejadas de la línea media ventral con el tiempo dan origen a las neuronas sensitivas. En el límite más dorsal del tubo neural, una tercera población definida de células surge en la región donde los bordes de la placa neural plegada se unen. A causa de su localización, estos precursores se denominan células de la cresta neural. Estas células migran alejándose del tubo neural en vías específicas que las exponen a otro conjunto de señales inductivas, para que posteriormente formen las neuronas y la glia de los ganglios sensitivos y simpáticos, las células neurosecretoras de la glándula suprarrenal y el sistema nervioso entérico; así como elementos no neurales: cartilago y células pigmentarias (John, 1994).

La consecuencia principal de esos procesos: gastrulación y neurulación para el desarrollo del sistema nervioso es el surgimiento de una población de precursores neurales a partir de un subgrupo de células ectodérmicas. Se ha reconocido que este proceso depende de señales que surgen de las células en la fosita primitiva y la notocorda. Este es el resultado del control espacial y temporal de diferentes grupos de genes.(John, 1994).

Hay moléculas que modifican los patrones de expresión genética, algunas de estas moléculas son producidas por distintos tejidos embrionarios que incluyen la notocorda, la placa del piso y el propio ectodermo neural. Estas estructuras se unen a los receptores de la superficie celular, las cuales producen cascadas de señalización para genes específicos en las células ectodérmicas y constituyen los primeros pasos de la formación del sistema nervioso. Si se interrumpe el señalamiento a través de estas moléculas la formación del sistema nervioso puede verse modificada (John, 1994).

El tubo neural está organizado en unidades repetidas denominadas neurómeros. Este conocimiento condujo a la idea que el proceso de segmentación puede participar en establecer una identidad regional en el encéfalo en desarrollo. El extremo cefálico del tubo neural se diferencia y crece en tres dilataciones, llamadas vesículas primarias del encéfalo, las tres dimensiones son el prosencéfalo o cerebro anterior, el mesencéfalo o cerebro medio y el rombencéfalo o cerebro posterior (John, 1994).

Cuando la neurulación no se lleva a cabo debido a la exposición a diversas sustancias que van a proporcionar señales inapropiadas, se presentan anomalías en el sistema nervioso, entre las que se encuentran:

- a) Craneorraquisquisis o fracaso completo del cierre del tubo neural.
- b) La espina bífida que es la falta de cierre del tubo neural.
- c) La anencefalia producida por la falta absoluta de cierre del tubo neural anterior (John, 1994).

Las consecuencias de las anomalías en el tubo neural son las siguientes:

Las vértebras no se forman sobre el defecto, las paredes caudales del tubo neural se continúan con la piel de la espalda, la médula y las meninges son desplazadas a una cavidad de la espalda en forma de saco (John, 1994).

Con frecuencia hay obstrucción al líquido cefalorraquídeo, originando hidrocefalia. Se ha planteado la posibilidad de que ambas enfermedades se deban a una única alineación defectuosa en el punto en el que comienza a cerrarse inicialmente el tubo neural (John, 1994).

Poco después de la formación del tubo neural se forman los precursores de las primeras regiones encefálicas, como resultado de movimientos morfogénicos que

doblan, pliegan y contraen el tubo neural. Inicialmente el extremo anterior del tubo forma un gancho. El extremo de este bastón mas próximo a la curva más aguda, o acodadura cefálica, se ensancha para formar el encéfalo anterior, el mesencéfalo se constituye como una protusión sobre la acodadura cefálica, el encéfalo posterior se forma en el trayecto largo y relativamente recto entre la acodadura cefálica y la acodadura cervical mas caudal. La parte interna del tubo neural en desarrollo también es alterada por plegamientos y forma lo que finalmente se convertirá en los ventrículos del encéfalo maduro (John, 1994).

El encéfalo maduro contiene alrededor de 100 000 millones de neuronas y muchas más células gliales, todas generadas en el curso de solo algunos meses a partir de una población pequeña de células precursoras. Salvo por algunos casos especializados, todo el complemento neural del encéfalo adulto es producido durante una ventana temporal que se cierra antes del nacimiento; de ahí en adelante, las células precursoras desaparecen y no pueden agregar nuevas neuronas para reemplazar a las que se pierden por la edad o por la lesión. Las células precursoras están localizadas en la zona ventricular, la capa celular más interna que rodea a la luz del tubo neural. La zona ventricular es una región a la actividad mitótica extraordinaria (John, 1994).

Las células precursoras en división en la zona ventricular sufren un patrón estereotipado de movimientos celulares a medida que progresan a través del ciclo mitótico, lo que conduce a la formación de nuevas células madre o neuroblastos posmitóticos, abandonan la zona ventricular y migran hasta sus posiciones finales en el encéfalo en desarrollo (John, 1994).

Una vez que estas regiones encefálicas primitivas que están establecidas, sufren al menos dos series de divisiones esto se muestra de una manera esquemática en la Figura 8, cada una de las cuales produce regiones encefálicas adicionales en el adulto. Así el prosencéfalo rostral forma el telencéfalo, el cual contiene los rudimentarios de la corteza cerebral, el hipocampo, los ganglios basales, los

núcleos del encéfalo anterior basal y bulbo olfatorio. La porción mas caudal del procencéfalo forma el diencefalo que contiene los rudimentos del tálamo y el hipotálamo, así como un par de evaginaciones laterales (copas ópticas) a partir de las cuales se formará la porción neural de la retina. Por ultimo, la porción rostral del rombencéfalo se convertirá en el metencéfalo mientras que la porción caudal del rombencéfalo se convierte en el mielencéfalo (John, 1994).

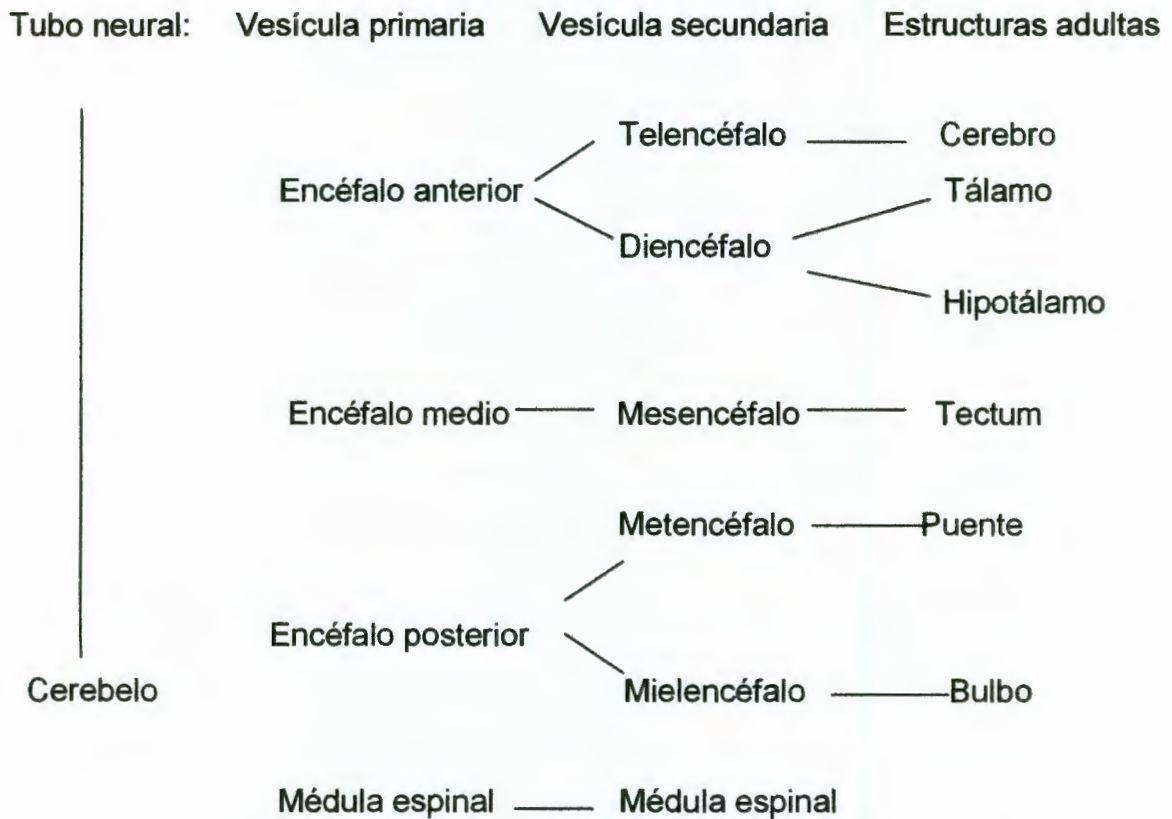


Figura 8. Maduración de las estructuras encefálicas. En donde se muestran las cuatro etapas, tubo nervioso, vesícula primaria, vesícula secundaria y estructuras adultas (Purves, 2001).

II.3 Carvacrol

La formación del sistema nervioso puede ser modificada por distintos agentes externos presentes en compuestos usados como alimentos o medicamentos. El carvacrol es uno de los componentes del aceite esencial de orégano que se cultiva por su demanda en la industria alimentaria, el sector farmacéutico, de los licores y cosmético (Figura 9). También la herboristería lo consume ampliamente, por sus propiedades tónicas, digestivas, estomacales y antiasmáticas, por lo que es importante precisar la posible participación de sus componentes en el inicio de la formación del sistema nervioso (Mervon, 1990).



Figura 9. Planta del orégano. El orégano puede presentar flores rosadas, violáceas o blancas (Mervon, 1990).

El estudio realizado para conocer la composición del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) indica que el carvacrol (Figura 10) y timol son compuestos mayoritarios del aceite esencial y presentan actividad antifúngica. En relación a su actividad mutagénica se utilizó el ensayo de Ames y los resultados sugieren que no inducen dicha actividad (Adam y col., 1998). Entre las funciones atribuidas al carvacrol (isopropil-o-cresol) está el ser considerado como un agente antioxidante, fungicida y bactericida, aunque se conoce que el timol tiene una mayor actividad para gram negativos (Aligiannis y col., 2001, Szentandrassy y col., 2003). El carvacrol también ha sido usado como antiséptico y ha llegado a considerarse

como sustituto de yodo (Schwarze y col., 2002). También se le ha encontrado actividad antileishmaniasis (Robledo y col., 2005).

El timol es otro de los componentes del aceite esencial de orégano que ha sido utilizado por su alto poder antiinflamatorio. Su actividad se atribuye a la disminución de la liberación de metabolitos inflamatorios como prostaglandinas, interleucinas y leucotrienos. Otra de las funciones atribuidas al timol es su participación en la inhibición de canales de calcio y potasio de mamíferos y en células humanas (Hikiba y col., 2005).

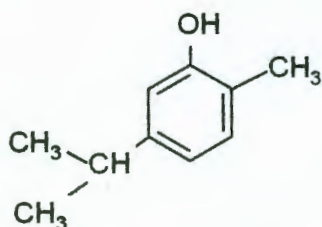


Figura 10. Estructura del carvacrol. Es uno de los principales compuestos químicos aislados del orégano, al que se le han atribuido propiedades antimicrobianas (Ultee y col., 2002).

El efecto bactericida de las distintas especies de orégano (*O. Vulgare*, *O. dictaminus*, *O.griego*) ha sido ampliamente estudiado por difusión en disco a partir de aceite esencial, aplicado a distintas bacterias gram positivas y negativas como *E.coli*, *S. aureus*, *S. thiphimurium*, *R. leguminosarum* y *Bacillus Subtilis*. Los resultados indican una variable actividad antimicrobiana dependiente de la especie de orégano del cual se obtuvo la muestra (Sivropoulou y col., 1996; Fricke y col., 1999).

Para explorar el mecanismo de acción del carvacrol se utilizaron células de *B. cereus*, que fueron crecidas en medio BHI y posteriormente fueron tratadas con carvacrol. Los resultados indicaron una disminución del ATP intracelular. Este cambio fue asociado con una diferencia de potencial de membrana. Los

experimentos realizados para comprobar la diferencia de potencial indicaron una significativa reducción de dicho potencial de membrana asociada a un incremento de la permeabilidad para iones potasio (Ultee y col., 1999).

Para explorar la genotoxicidad de los aceites esenciales de diferentes plantas medicinales entre las que se encuentra el orégano, se obtuvieron sus extractos y fueron probados en el ensayo de *Saccaromyces cerevisiae*. Los resultados indicaron que el aceite esencial de orégano presentó la más alta citotoxicidad comparada con el resto de los aceites de distintas plantas medicinales. En el mismo estudio se buscó inducción de la expresión de genes y los resultados fueron comparados con los obtenidos con metilmetanosulfonato y se encontró que todos los extractos indujeron la expresión de genes en menor proporción que la ocasionada por metilmetano sulfonato (Bakkali y col., 2005). En otro estudio para explorar los efectos citotóxicos de los compuestos fenólicos usados como anestésicos de encías, realizado en fibroblastos dentales humanos, se reportó que todos los compuestos presentaron citotoxicidad dependiendo de la concentración (Chang y col., 2000).

Los efectos en el DNA de los principales compuestos del tomillo como carvacrol, y timol fueron estudiados en linfocitos humanos. Los resultados sugieren que el carvacrol protege a los linfocitos humanos del daño al DNA inducido por mitomicina. Cuando se aplican dosis mas altas, el carvacrol induce daño al DNA por sí mismo (Avdin y Basaran, 2005).

III. HIPÓTESIS

El carvacrol, uno de los principales componentes del aceite esencial de orégano, induce cambios fenotípicos durante la neurulación de embriones de pollo.

IV. OBJETIVOS

General

Demostrar el efecto teratogéno del carvacrol durante la neurulación de embriones de pollo.

Específicos

- Realizar una curva dosis respuesta para la embriotoxicidad del carvacrol en embriones de pollo para conocer la DL_{50} .
- Explorar los cambios fenotípicos en embriones de pollo por efecto de carvacrol.
- Evaluar la frecuencia y tipo de anomalías inducidas por carvacrol.
- Analizar estadísticamente los resultados.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

Se utilizarán embriones de huevos fértiles ALPES II, como modelo biológico.

Carvacrol (Sigma 28219-7).

Una incubadora para embriones de pollo.

Material de disección para la extracción del embrión.

Microscopio estereoscopio.

Microscopio óptico con sistema de documentación para análisis de datos.

V.2 Métodos

Los embriones de huevos fértiles se incubaron a una temperatura de 37°C, con una humedad relativa de 55%. En el estadio 3.5 de acuerdo a Hamburger y Hamilton, se llevó a cabo la inoculación del carvacrol (Sigma 28219-7), realizando un pequeño orificio en el cascarón con una aguja, mismo que posteriormente se cubrió con cinta canela. Una vez inoculados los embriones se incubaron nuevamente hasta el estadio 13 y se prepararon para su observación de la siguiente manera: Se eliminaron aproximadamente 5 ml de la clara para evitar daño y pérdida de embriones. Se cortó el cascarón. Se observó la yema, se exploró hasta encontrar el embrión, el cual se sujetó con unas pinzas curvas y se procedió a cortar con las microtijeras. Una vez obtenido el embrión, se colocó en solución salina fisiológica al 0.9% y se observaron sus características en el estereoscopio. A los embriones se les midió la longitud craneo-caudal, la longitud craneal, el número de somitas y se observaron las anomalías y resorpciones en cada uno de los grupos.

V. 3 Diseño experimental

Cuadro 1. El diseño experimental: De acuerdo a los resultados obtenidos en experimentos preliminares de la DL₅₀ del carvacrol en embriones de pollo, se utilizó el siguiente diseño experimental haciendo 3 series de 15 embriones como se describe a continuación.

	Cantidad de carvacrol (μ l)
Grupo control	0
Tratamiento 1	1.25
Tratamiento 2	3.1
Tratamiento 3	6.25

Todos los grupos se mantuvieron a las mismas condiciones. Finalmente, se exploraron los cambios fenotípicos con ayuda de un microscopio estereoscopio para realizar las medidas correspondientes. Posteriormente se asociaron las malfomaciones y se documentaron con un paquete computacional del microscopio óptico.

V.3.1 Método estadístico:

La cantidad de embriones que fueron manejados permitieron utilizar la prueba estadística Z para comprobar la proporción de las alteraciones en los grupos de tratamiento contra los controles y establecer las posibles diferencias en la respuesta.

$$Z = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{P * q (1/n_1 + 1/n_2)}}$$

Donde:

- P_1 = Fracción de afectados en el grupo tratado
- P_2 = Fracción de afectados en el grupo control
- P = Fracción total de afectados
- q = Fracción total de no afectados
- n_1 = población del grupo tratado
- n_2 = población del grupo control

Las partes funcionales de esta prueba estadística son:

- El conjunto de hipótesis nula H_0 ($P_1 = P_2$) y alternativa H_a ($P_1 \neq P_2$)
- El estadístico de la prueba
- La región de rechazo asociada

La región de rechazo para H_0 con nivel de error $\alpha = 0.05$ es $z > 1.06$. Al caer z en la región de rechazo se concluye que los datos presentan suficiente evidencia para decir que el porcentaje de anomalías de los tratamientos es mayor que el de los controles (Mendenhall y col., 1994).

La comparación de los tratamientos con respecto al control, no nos refleja cómo es el comportamiento de los mismos con relación a las poblaciones iniciales, utilizando la fórmula de Abbott podremos deducirlo (Ehab, 2002).

Esta corrección es utilizada en algunos procedimientos generales donde se mide el efecto de sustancias químicas en grupos tratados y se compara contra grupos control.

La formula de Abbott es:

$$\% A = \frac{m_e - m_b}{1 - m_b} * 100$$

En donde:

% A = Porcentaje de alteración corregida

m_e = alteración en el tratamiento

m_b = alteración en el control

VII. RESULTADOS

Los resultados de los experimentos de carvacrol en embriones de pollo fueron graficados para comparar el porcentaje de los embriones normales, anormales, resorciones y la suma entre embriones anormales con las resorciones.

En el grupo control se estudiaron un total de 60 embriones en 3 experimentos; los resultados observados indican un 80% de embriones normales, un 5% de resorciones, un 5% de anomalías y un 10% de la suma de resorciones y anomalías (Figura 11).

En la Figura 12 se muestra un embrión normal que son los que predominan en este grupo de embriones.

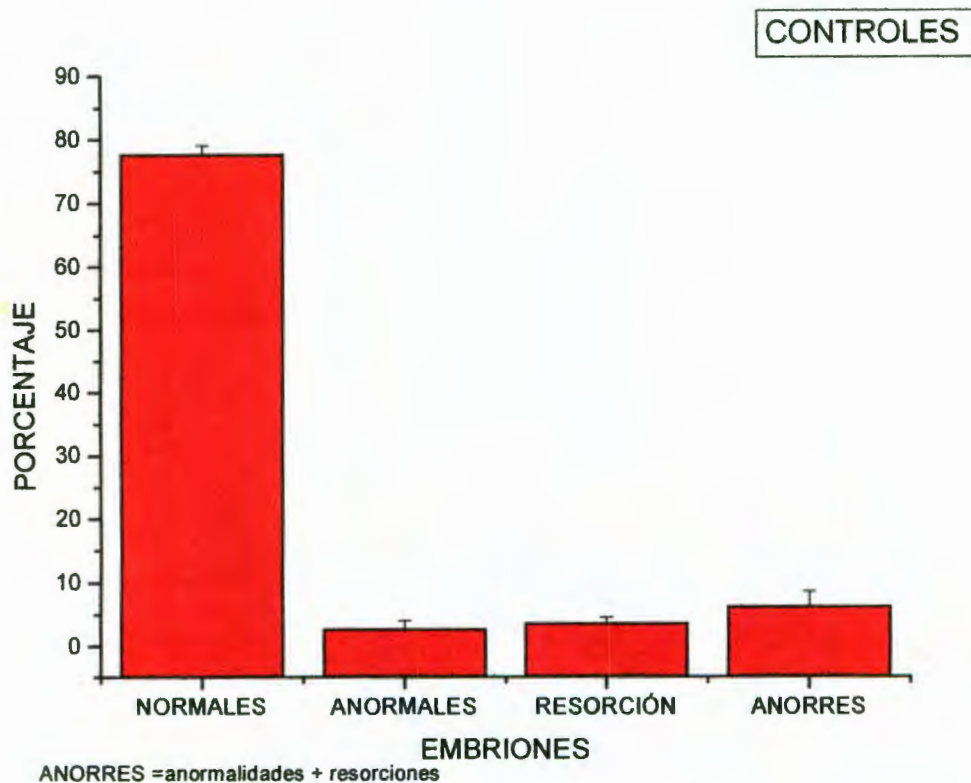


Figura 11. Grupo control. En esta gráfica y subsecuentes en el eje de las abscisas se presentan los diferentes embriones y en las ordenadas los porcentajes correspondientes obtenidos. En el grupo control se estudiaron un total de 60 embriones en tres experimentos diferentes sin tratamiento.

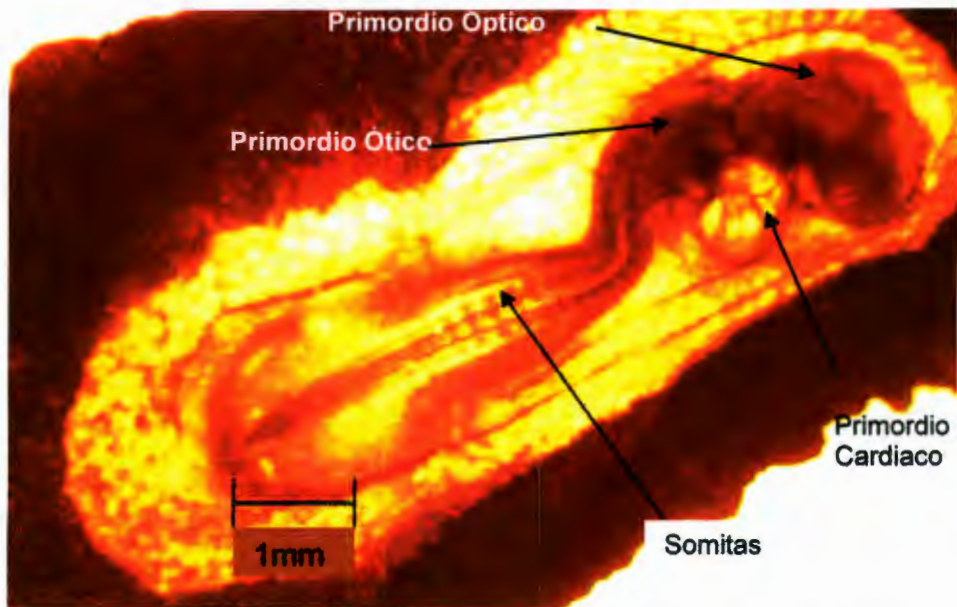


Figura 12. Embrión normal. En esta figura se muestra un embrión normal en que se ven sus somitas, y se señalan los precursores cardíaco, ótico y óptico. Tiene una longitud cráneo-caudal de 5.5mm.

En el grupo problema 1 se aplicaron 1.25 μ l de carvacrol a 60 embriones (Figura 13). En los resultados obtenidos se observa incremento en el número de resorciones sin embargo la suma de anomalías mas resorciones no presentó diferencias.

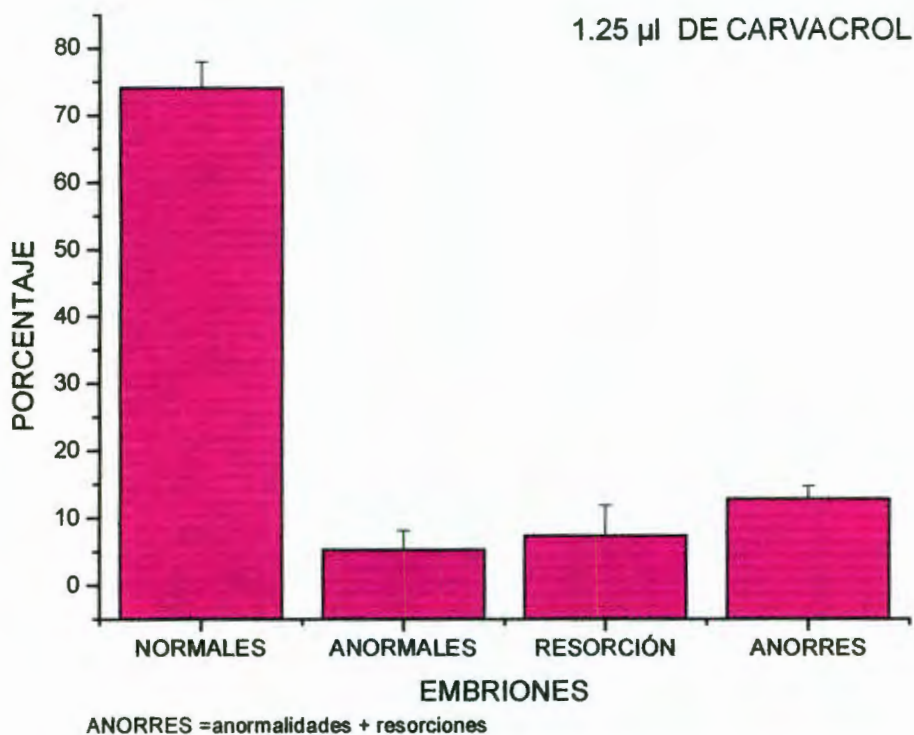


Figura 13. Gráfica de 1.25 μ l de carvacrol. Se inocularon los embriones con 1.25 μ l de carvacrol. En la gráfica se observa que el porcentaje de embriones normales y la suma de anomalías más resorciones se conserva.

En el grupo problema 2 se aplicó una concentración de carvacrol de 3.1 μ l a un total de 20 embriones para cada tratamiento en un total de 3 experimentos. Los resultados (Figura 14) indican un incremento de resorciones y anomalías de un 4% y un 6% respectivamente. Los resultados de este tratamiento comparados con el grupo control si presentó diferencia significativa al caer Z en la región de rechazo lo que se concluye que hay suficiente evidencia para decir que el porcentaje de anomalías en este tratamiento es mayor que el de los controles.

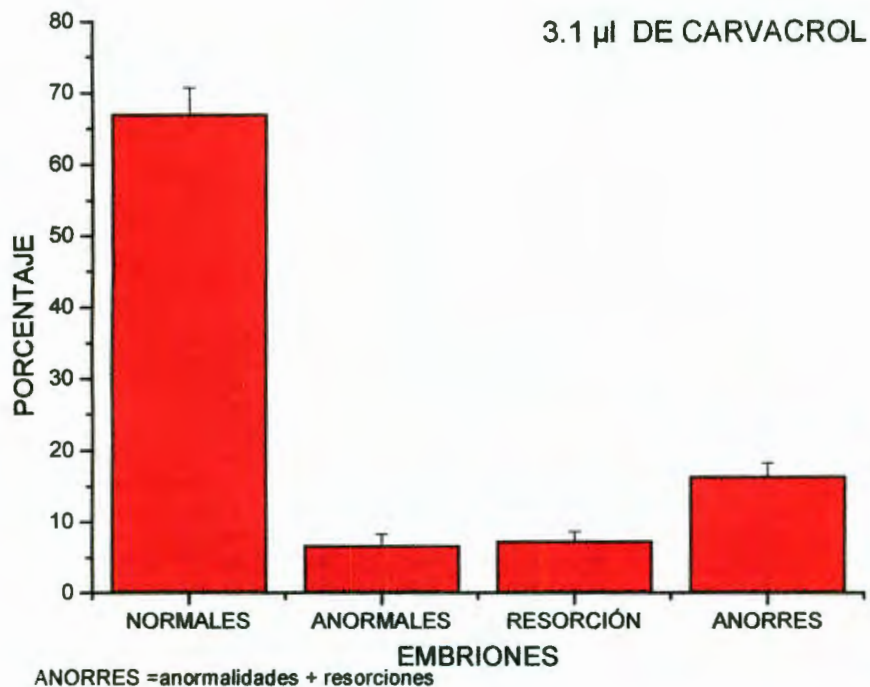


Figura 14. Gráfica de 3.1 μ l de carvacrol. En esta se muestra un 11% de incremento en las anormalidades y resorciones. En este grupo se estudiaron un total de 60 embriones en tres experimentos diferentes.

En este grupo se incrementaron notablemente las resorciones, este defecto se muestra en la Figura 15.

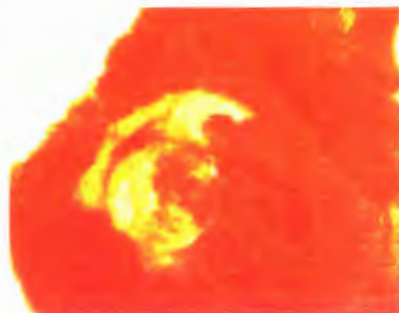


Figura 15. Resorción. En esta imagen se muestra una resorción que son los principales efectos del carvacrol en este tratamiento, la cual consiste en la ausencia de la forma normal del embrión.

En el grupo problema 3 se le aplicó una concentración de carvacrol de 6.25 μ l, la cual se les administró a una cantidad de 60 embriones en 3 experimentos. Los resultados indican un incremento en la suma de anomalías y resorciones de un 5%, obteniendo un 48% de embriones normales, un 9% para las resorciones y 17% para los anormales (Figura 16). También se puede observar que en este tratamiento hubo una disminución del porcentaje de resorciones, sin embargo el número de anomalías se incrementó.

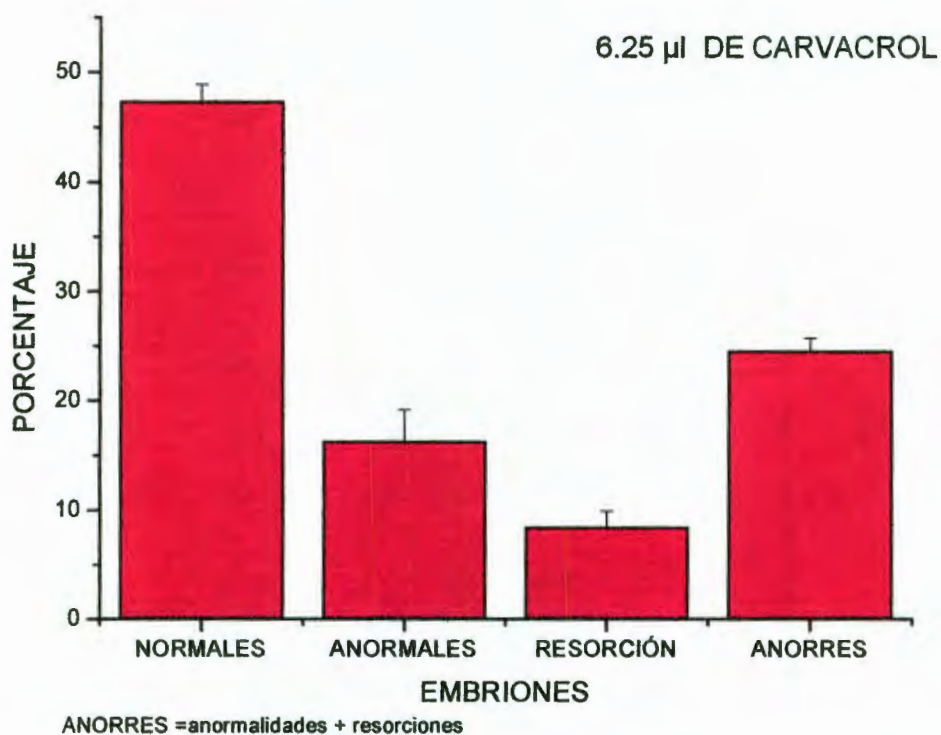


Figura 16. Grafica de 6.25 μ l de carvacrol. En la gráfica se presentan los porcentajes obtenidos en este tratamiento. Nótese la disminución de los embriones normales y el incremento de anomalías más resorciones.

En este tercer tratamiento se encontraron con mayor frecuencia la aplasia y anencefalia por encima de las resorciones. En la Figura 17 se muestra una anencefalia.

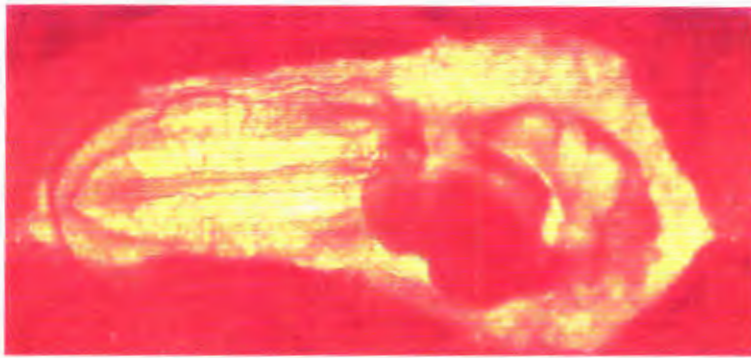


Figura 17. Anencefalia, esta es una anomalía muy común en el tratamiento de $6.25 \mu\text{l}$ de carvacrol la cual como podemos observar no tiene la parte que va a constituir la cabeza; como lo tiene el embrión normal.

Los efectos tóxicos del carvacrol obtenidos en todos los tratamientos fueron agrupados en la Figura 18 en la que se observa que las resorciones son los daños más frecuentes, seguida por la deficiencia en la formación de vesículas cerebrales.

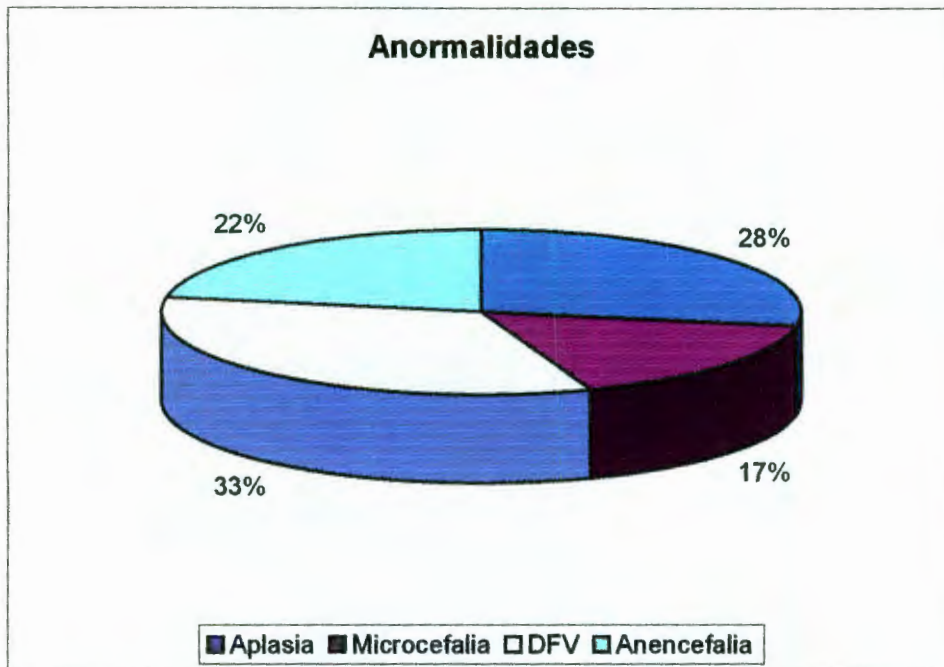


Figura 18. Comparación porcentual de las anormalidades de los tres tratamientos con carvacrol. En la gráfica se presentan los porcentajes de las anormalidades encontradas en los tratamientos y como podemos ver la más frecuente es la deficiencia en la formación de vesículas, seguida por la aplasia.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las anomalías observadas en el grupo control pueden ser asociadas a mutaciones espontáneas, las cuales se deben a diversos factores como los errores en la replicación por la falla en alguna de las enzimas polimerasas que participan en este paso y emparejamiento incorrecto, lo que es fácil que ocurra sin la necesidad de algún incentivo, en las secuencias que son repetitivas (Griffits y col., 1999).

Otra posibilidad es la planteada por García y García- Alcocer (2005), en un trabajo con embriones de pollo en el que se propone el desprendimiento de iones calcio durante la manipulación del embrión y su participación en la modulación de la expresión genética.

Los efectos del carvacrol encontrados en este trabajo son consistentes con los reportados para las células Hep-2 en las cuales existe una respuesta directamente proporcional a la dosis administrada. Es decir, los daños son mayores entre más altas sean las concentraciones. En otros trabajos proponen solo efectos benéficos de este compuesto, en base a que se aplicó carvacrol a ratas albinas masculinas por vía oral 1mM/kg y después de 24 horas se hizo el análisis en la orina. Los resultados demostraron que solo se utiliza el carvacrol necesario y el exceso es eliminado por la orina, ya sea sin cambios o conjugado con glucurónido o con sulfato (De Vincenzi y col., 2004).

Los resultados de este trabajo son consistentes con los obtenidos con altas concentraciones de carvacrol en linfocitos humanos ya que en bajas concentraciones el carvacrol tiene efectos benéficos cuando la concentración es menor o igual a 0.05 mM. En concentraciones mayores (0.1 mM) causa fracturas en los filamentos del DNA y sus efectos tóxicos superan a los ocasionados por el timol. En el análisis morfológico se observan células desdiferenciadas lo que podríamos considerar para nuestro caso como resorciones. Los efectos citotóxicos encontrados en linfocitos humanos han sido observados por otros autores en fibroblastos dentales en cuyas células se obtuvo una DL_{50} de 810mg/kg (Chang y col., 2000; Aydin y col., 2005).

Es posible que el mecanismo de acción del carvacrol en estos experimento este asociado a su efecto en las membranas biológicas en las cuales dicho compuesto fenólico aumenta la permeabilidad de los iones H^+ , K^+ y ATP obteniendo una concentración muy baja o hasta cero en el espacio intracelular. Este cambio de iones debilita a la célula lo que impide el desempeño adecuado de sus funciones y en ocasiones lleva hasta su muerte (Ultee y col., 1999).

Otra posibilidad para explicar la toxicidad del carvacrol es la supresión del canal de calcio la cual es influenciada por el anillo aromático que contiene. En cardiomiocitos caninos y humanos el efecto de estos compuestos implica interacciones celulares que da como resultado la inactivación del canal. Los efectos dañinos causados por el carvacrol al canal de calcio pueden ser reversibles, aunque son mas duraderos

que con otros compuestos derivados del fenol. La expresión genética se ve afectada por los cambios de concentración de calcio intercelular, modificando los procesos de división celular (Magyar y col., 2004).

También, los efectos de carvacrol son la inducción de daño en el DNA por 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline. Al ser evaluado en linfocitos humanos, no se observó ningún aumento de fracturas del filamento del DNA en las concentraciones debajo de 0.05 mM de carvacrol sino por el contrario parecía protegerlo de los daños genotóxicos del IQ. Pero en la concentración de 0.1 mM los daños causados por si solo fueron considerables (Aydin y col., 2005). Lo que coincide con nuestros resultados que en el primer tratamiento de 1.25 µl no hay daños significativos en comparación del grupo control pero en los dos siguiente tratamientos es notable el incremento de daño a los embriones.

IX. CONCLUSIONES

- El modelo de embriones de pollo fue sensible a los efectos embriotóxicos causados por carvacrol.
- El carvacrol induce efectos embrietales en embriones de pollo.
- Los efectos toxicológicos ocasionados por carvacrol presentaron diferencias estadísticamente significativas al compararlo con el control.
- Los efectos embrietales y embriotóxicos fueron dosis-dependiente.

X. BIBLIOGRAFÍA

Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T. Arsenakis, M. 1998. Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, *Menta Spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 46: 1739-1745.

Aliyiannis, E.K. Kalpoutzakis, E. Mitaku, S, Chinou, B. 2001. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum Species*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 49: 4168-4170.

Aydin, S., Basaran, N. 2005. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutation Research*. Vol. 2: 43-53.

Aydin, S., Basaran, A.A., Basaran, N. 2005. Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 4: 1299-1305.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. 2005. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mutation Research*. Vol. 1: 1-13.

Bear, W.C. 2002 www.afh.bio.br/nervoso/nervoso2.asp.foto.difo.uah.es/images/galleria/dib01.gif

Chang, Y., Huang, F.M., Tai, K.W., Chou, M.Y. 2000. Cytotoxic and nongenotoxic effects of phenolic compounds in human pulp cell cultures. *International Endodontic Journal*. Vol. 2: 2-15

Contreras, J., 2000. El esquema evolutivo de los cromosomas sexuales de las aves, *Ciencia Hoy*. Vol. 10: 56-60.

De Vincenzi, M., Stamatii, A., De Vincenzi, A., Silano, M. 2004. Constituents of aromatic plants. *Carvacrol*. *Fitoterapia*. Vol. 7: 801-804.

Ehab, B. 2002. www.ehansoft.com/ldline/onlinecontrol.htm

Fricke, C., Fiedler, I., Leyhousen, G., Geurtsen, W. 1999. Sesquiterpenes from *Lippia intergrifolia* Essential Oil. *Journal of Natural Products*. Vol. 62: 694-696.

- García, A.G., García, D. 2005.** Implementación del modelo de embriones de pollo para el estudio del efecto de sustancias químicas durante la neurulación. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo: 45-46.
- Griffiths, A., Gerbart, W.M., Miller, J.H., Lewontin, R.C. 1999.** Genética Moderna. 1ra. ed., Mc. Graw-Hill, España: 433-461.
- Hamburguer, V., Hamilton, H.L. 1951.** A series of normal stages in the chick embryo. *Journal of Morphology*. Vol. 88: 49-92.
- Herskowitz, I.H. 1990.** Genética. 3era. ed., CECSA, México: 327-239.
- Hikiba, H., Watanabe, E., Barrett, J.C., Tsutsui, T. 2005.** Ability of fourteen chemical agents used in dental practice to induce chromosome aberrations in Syrian hamster Embryo cells. *Journal of Pharmacological Sciences*. Vol. 1: 146-152.
- Jakubowski, D. 2001.** The language of DNA. *Science*. Vol. 294: 86-90.
- John, N. 1994,** El cerebro humano, 3ra. Ed., Mosby-Doyma, España: 14-23.
- Klug, W., Cummings, M.R., 1999.** Conceptos de Genética. 5ta. ed., Prentice Hall, España: 412-420.
- Kosztin, D.R. 1999.** Proteins of DNA. *Nucleic Acids Research*. Vol. 27: 3550-3556.
- Magyar, J., Szentandrassy, N., Banyasz, T., Fulop, L., Varro, A., Vanasi, P. 2004.** Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *Eur Journal Pharmacology*. Vol. 1: 29-36.
- Mendenhall, W., Wackerly, D. Scheaffer, R. 1994.** Estadística matemática con aplicaciones. 2da. ed., McGraw Hill, México: 399-440.
- Mervon, S.D. 1990.** In vitro comparison of the cytotoxicity of twelve endodontic materials using a new technique. *International Endodontic Journal*. Vol. 4: 203-210.
- Purves, D. 2001.** Invitación a la Neurociencia, 1era. ed., Editorial panamericana, Madrid: 23-30.
- Robledo, S., Osorio, E., Muñoz, D., Jaramillo, L.M., Restrepo. 2005.** In vitro and in vivo cytotoxicities and antileishmanial activities of thymol and hemisynthetic derivatives. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. Vol. 4: 1652-1655.

- Schwarze, T., Fiedler, I., Leyhousen, G., Geurtsen, W. 2002.** The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *International Endodontic Journal*. Vol. 11: 784-786.
- Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanokolaou, E., Kokkin, S. 1996.** Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 44: 1202-1205.
- Szentandrassy, N., Sentéis, P., Magyar, J., Csernach, L. 2003.** Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle. *BMC Pharmacology*. Vol. 3. 1471-1479.
- Ultee, E.P., Kets, E.P., Smid, E.J. 1999.** Mechanisms of action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental Microbiology*. Vol. 65: 4606-4610.
- Ultee, E.P., Bennik, M.H., Moezelaa, R. 2002.** The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental Microbiology*. Vol. 68: 1561-1568.