

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

TESIS DOCTORAL

**MODIFICACIONES DEL TIMO DE BECERROS  
TRATADOS CON CLENBUTEROL PARA EL  
CONSUMO HUMANO**

Carlos Manuel Villar Pastor

Directores:

D. José García Monterde  
D. Rafael Roldán Villalobos  
D. Mariano Toro Rojas

Córdoba, junio de 2005

TITULO: *MODIFICACIONES DEL TIMO DE BECERROS TRATADOS CON  
CLENBUTEROL PARA EL CONSUMO HUMANO*

AUTOR: *CARLOS M. VILLAR PASTOR*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2009  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---

ISBN-13: 978-84-7801-939-7  
D.L.: CO-512-2009

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**MODIFICACIONES DEL TIMO DE BECERROS  
TRATADOS CON CLENBUTEROL PARA EL  
CONSUMO HUMANO**

Trabajo presentado por el licenciado en Medicina y Cirugía  
**D. Carlos M. Villar Pastor** para optar al título de  
Doctor en Medicina

Directores:

D. José García Monterde  
D. Rafael Roldán Villalobos  
D. Mariano Toro Rojas

Córdoba, junio de 2005

**A mis Padres,  
A mi Esposa Maria Paz,  
Y a mis queridas Hijas Carla y Paula.**

# Agradecimientos

A mi director de Tesis, D. José García Monterde ya que sin su tiempo, ayuda, conocimientos, apoyo y confianza nunca podría haber finalizado con éxito este trabajo.

A mi director de tesis D. Mariano Toro Rojas por su inestimable colaboración y apoyo incondicional.

A mi director de Tesis D. Rafael Roldan Villalobos por poner a mi disposición todos los medios a su alcance para la realización de este trabajo, así como sus conocimientos y experiencia.

Al Catedrático Prof. Dr. Alfonso Blanco Rodríguez por haber confiado en mí para este trabajo y haberme orientado en el transcurso del mismo.

Al Profesor D. Emilio Artacho Pérula por dedicarme su tiempo, ayudarme, enseñarme y guiarme en los comienzos de esta tesis.

A Dña. Trinidad Medina y Dña. Jacinta Dorado, TEAP del Servicio de Anatomía Patológica del H.U. Reina Sofía, por su inestimable ayuda y amistad incondicional.

Al Servicio de Anatomía Patológica del H.U. Reina Sofía, al Departamento de Especialidades Médico-Quirúrgicas de la Facultad de Medicina y al Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba.

A todos ellos y a todos los que sin su ayuda no hubiera podido hacer este trabajo, GRACIAS.

# Indice

<i>Introducción</i>	1
<i>Revisión Bibliográfica</i>	7
<b>I. <u>Consideraciones Generales Sobre El Timo</u></b>	<b>8</b>
<b>I.1. Embriología</b>	<b>9</b>
<b>I.2. Localización</b>	<b>11</b>
<b>I.3. Características Macroscópicas</b>	<b>11</b>
<b>I.4. Características Microscópicas</b>	<b>12</b>
1° Linfocitos (Timocitos)	13
2° Células epiteliales	14
3° Otros Tipos De Células	18
4° Corpúsculos De Hassall	21
<b>I.5. Maduración de Timocitos</b>	<b>21</b>
<b>I.6. Regulación Hormonal Y Neuroendocrina</b>	<b>24</b>
<b>I.7. El Papel de la Apoptosis en la Función Tímica</b>	<b>42</b>
<b>I.8. Involución</b>	<b>46</b>
<b>I.9. Algunas Consideraciones Sobre El Timo En Los Rumiantes</b>	<b>49</b>
1° Localización	49
2° Características Macroscópicas	51
3° Evolución	55
<b>II. <u>Clenbuterol</u></b>	<b>56</b>

<b>III. <u>Dexametasona</u></b>	<b>72</b>
<b>III.1. Estructura Química y Actividad Farmacológica</b>	<b>72</b>
<b>III.2. Farmacocinética (Absorción, Transporte, Metabolismo, Excreción)</b>	<b>76</b>
<b>III.3. Efectos Farmacológicos</b>	<b>78</b>
1º Metabolismo	79
2º Acciones sobre la hematopoyesis y las células sanguíneas	82
3º Acción antiinflamatoria	87
4º Acciones sobre tejidos linfoides y respuestas inmunológicas	91
<b><i>Materiales y Métodos</i></b>	<b>94</b>
<b>I. <u>Estimación del volumen Tímico</u></b>	<b>97</b>
<b>II. <u>Procedimientos histológicos</u></b>	<b>97</b>
<b>II.1. Microscopio óptico</b>	<b>99</b>
<b>II.2. Microscopio Electrónico</b>	<b>99</b>
<b>II.3. Técnica de TUNEL</b>	<b>100</b>
<b>III. <u>Procedimientos Cuantitativos</u></b>	<b>101</b>
<b>III.1. Procedimientos cuantitativos a escala tisular</b>	<b>102</b>
1º Fracción del volumen tisular	102
<b>III.2. Procedimientos cuantitativos a escala celular</b>	<b>105</b>
1º Estimaciones morfométricas nucleares	105
2º Estimaciones estereológicas nucleares	107
<b>IV. <u>Análisis estadístico</u></b>	<b>112</b>

<b><i>Resultados</i></b>	<b>113</b>
<b>I. <u>Cambios En La Morfología Tímica</u></b>	<b>114</b>
<b>II. <u>Cambios En La Estructura Tisular</u></b>	<b>116</b>
<b>II.1. Proporción de grasa</b>	<b>116</b>
<b>II.2. Relación Corteza-Médula</b>	<b>120</b>
<b>III. <u>Poblaciones Celulares</u></b>	<b>125</b>
<b>III.1. Timocitos Normales</b>	<b>125</b>
<b>III.1.a Corteza</b>	<b>127</b>
1º Parámetros Morfométricos	<b>127</b>
2º Parámetros Esterológicos	<b>132</b>
<b>III.1.b Médula</b>	<b>135</b>
1º Parámetros Morfométricos	<b>135</b>
2º Parámetros Esterológicos	<b>140</b>
<b>III.2. Timocitos Apoptóticos</b>	<b>143</b>
<b>III.3. Células Epiteliales</b>	<b>146</b>
<b>III.3.a Corteza</b>	<b>147</b>
1º Parámetros Morfométricos	<b>147</b>
2º Parámetros Esterológicos	<b>150</b>
<b>III.3.b Médula</b>	<b>153</b>
1º Parámetros Morfométricos	<b>153</b>
2º Parámetros Esterológicos	<b>155</b>
<b>IV. <u>Datos Histopatológicos</u></b>	<b>157</b>

<b>IV.1. Microscopía óptica</b>	<b>158</b>
<b>IV.1.a</b> Grupo Control	<b>158</b>
<b>IV.1.b</b> Grupo tratado con clenbuterol	<b>162</b>
<b>IV.1.c</b> Grupo tratado con clenbuterol y dexametasona	<b>165</b>
<b>IV.2. Microscopía Electrónica</b>	<b>168</b>
<b>IV.2.a</b> Grupo Control	<b>168</b>
<b>IV.2.b</b> Grupo tratado con clenbuterol	<b>171</b>
<b>IV.2.c</b> Grupo tratado con clenbuterol y dexametasona	<b>173</b>
<b><i>Discusión</i></b>	<b>175</b>
<b><u>I.A Nivel Del Órgano</u></b>	<b>176</b>
<b><u>II.A Nivel De La Estructura</u></b>	<b>180</b>
<b><u>III.A Nivel Celular</u></b>	<b>187</b>
<b><i>Conclusiones</i></b>	<b>197</b>
<b><i>Resumen</i></b>	<b>201</b>
<b><i>Bibliografía</i></b>	<b>205</b>

# *Introducción*

---

---

Junto a la “alarma social” que se produce por el posible consumo por el hombre de animales tratados con finalizadores, y en nuestro caso con sobredosis de clenbuterol y dexametasona, nos encontramos con el hecho de que en establecimientos de alimentación, durante periodos de tiempo más o menos significativos, desaparecen o disminuye la presencia de piezas nobles de casquería como son las mollejas torácicas de vacuno, que corresponden a timos poco involucrados de animales jóvenes, y se

planteo que dicha desaparición se debía a una posible involución atrófica del Timo por acción de los agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos y corticoides (III JORNADA DE ALIMENTACION HUMANA Y ANIMAL. UNIVERSIDAD DE CORDOBA). Hecho que fue uno de los motivos principales para que el grupo de investigación del PAI CVI 218 de la Junta de Andalucía se planteó realizar estudios sobre las posibles alteraciones que acontecen en el parénquima tímico en los tratamientos con clenbuterol y también con corticoides como la dexametasona.

El clenbuterol y la dexametasona son dos sustancias farmacológicas ampliamente utilizadas en el hombre para tratar distintas enfermedades y que presentan importantes efectos secundarios y contraindicaciones a tener en cuenta en la salud humana. El clenbuterol, como agonista  $\beta_2$ -adrenérgico, a dosis terapéuticas está principalmente indicado en el tratamiento de procesos asmáticos debido a su efecto broncodilatador, pero a dosis superiores el clenbuterol presenta una acción anabolizante, favoreciendo la síntesis de proteína y disminuyendo la grasa usándose de manera ilegal como promotor del crecimiento en alimentación animal, y en menor medida como sustancia dopante en determinadas modalidades deportivas. El clenbuterol es una de las

drogas más populares, entre de las sustancias anabolizantes que se usan ilegalmente en el engorde del ganado. Se emplea ilegalmente por su capacidad de incrementar la masa muscular, incluso sin hacer ejercicio, incrementando no sólo la producción de carne, sino además mejorando su apariencia estética, revalorizando a los animales cuando concurren a concursos o exhibiciones. Para conseguir los deseados efectos anabólicos los animales son alimentados con altas dosis de clenbuterol. Aunque buena parte del clenbuterol es excretada o metabolizada, cantidades considerables son retenidas en órganos tales como hígado y músculo de gran trascendencia en el consumo humano, máxime cuando se administran hasta el momento previo al sacrificio, dando lugar a intoxicaciones alimentarias. Menos documentados, aunque no menos importantes, son los efectos de estas sustancias debido al consumo crónico debido a la ingestión de dosis subclínicas, que pasarían desapercibidos por no llegar a exteriorizar una sintomatología evidente. No existe por tanto un valor mínimo en la determinación de residuos de clenbuterol que se pueda considerarse seguro y apto para el consumo humano, estando prohibido en todas las normativas sobre alimentación animal. En el ámbito deportivo el clenbuterol es especialmente conocido en el culturismo, además de en otras

prácticas en las que la masa muscular es especialmente importante. Aunque las dosis de clenbuterol que se usan en el doping son inferiores a las que se suministran en los tratamientos anabolizantes, sus efectos tóxicos a corto plazo registrados entre atletas incluyen palpitaciones, insomnio y crepitaciones musculares. A largo plazo conducen a la destrucción de los receptores adrenérgicos y la disminución de la actividad tiroidea, haciendo al individuo incapaz de regular su metabolismo. El clenbuterol figura expresamente incluido en la lista de sustancias prohibidas en el deporte, tanto a escala nacional (Consejo Superior de Deportes) como internacional (Comité Olímpico Internacional).

Por otra parte, la dexametasona es un potente análogo sintético de los corticoides naturales. Los corticosteroides son unas hormonas producidas por nuestro organismo en la corteza de la glándula adrenal que realizan diversas funciones de gran importancia. La dexametasona se emplea para tratar los síntomas producidos por un brusco descenso de los niveles de corticoides en el organismo, por ejemplo en la enfermedad de Addison. También presenta un gran poder antiinflamatorio. Por tanto, la dexametasona será útil en enfermedades que se caracterizan por una inflamación excesiva. Los efectos adversos de este medicamento son, en general, leves, siendo

más frecuentes con dosis altas y en tratamientos prolongados. También existe un uso fraudulento de esta sustancia potencialmente peligroso para la salud humana que radica en la asociación de la dexametasona a otras sustancias finalizadoras utilizadas ilegalmente en el engorde del ganado, con el fin de enmascarar la posible detección de estos tratamientos. Estas sustancias suelen administrarse al final del periodo de engorde de los animales y acostumbran a dejar residuos de productos químicos en los alimentos que se obtienen de los animales tratados.

Los riesgos de la dexametasona son consecuencia de la amplia gama de efectos secundarios adversos que tienen los corticoides. Especialmente importantes son las consecuencias de estas sustancias sobre el sistema inmune; su efecto inmunodepresor es de los mejor documentados y varios trabajos avalan su incidencia sobre la glándula tímica provocando su involución y pérdida de funcionalidad.

### ***Objetivos***

Este trabajo de Tesis Doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación del grupo Histología e Histomorfometría de la Junta de Andalucía (CVI-218) sobre los efectos del clenbuterol en distintos sistemas orgánicos.

Nuestro objetivo directo ha sido estudiar el efecto de esta sustancia anabolizante, sola o asociada a la dexametasona, sobre la estructura funcional del timo. Como modelo animal tuvimos la oportunidad de elegir al ternero, dado que es una de las especies domésticas en la que la administración del clenbuterol como anabolizante está bien documentada, y que con mayor frecuencia esta implicada en las intoxicaciones alimentarias por estas sustancias en la especie humana.

Nuestra perspectiva es morfológica y viene condicionada por las habilidades en las que hemos sido instruidos. Las técnicas morfométricas y estereológicas añaden a nuestras observaciones la objetividad propia de los datos cuantitativos y su aplicación en la evaluación de la función del timo constituye otro de los objetivos de este trabajo.

En fin, conocer mejor la relación funcional de la glándula adrenal con el timo, a través de la acción que ejercen las sustancias adrenérgicas (en nuestro caso el  $\beta_2$ -adrenérgico, clenbuterol) y hormonas esteroideas (en nuestro caso el corticosteroide, dexametasona), es otra de las motivaciones subyacentes que justifican este trabajo.

# *Revisión Bibliográfica*

---

---

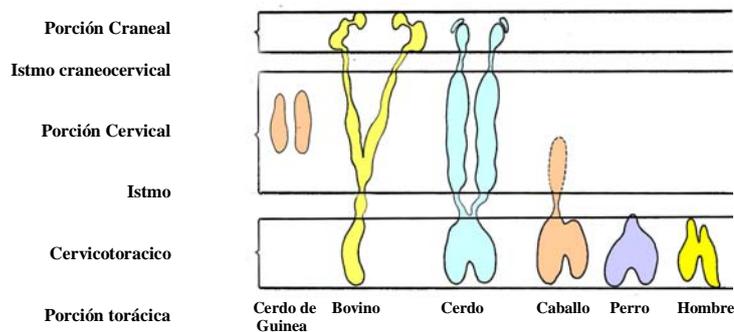
Son tres los principales protagonistas implicados en esta investigación: timo, clenbuterol y dexametasona. A continuación analizaremos en los correspondientes apartados aquellos datos y referencias previas que nos han ayudado en el planteamiento y desarrollo de esta Tesis Doctoral.

## I. Consideraciones Generales Sobre El Timo

El timo, uno de los órganos linfoides centrales, juega un papel importante en la inmunidad celular generando los linfocitos de T circulantes.

Histológicamente, es el prototipo de órgano linfoepitelial que consiste en una mezcla íntima de células epiteliales y linfocitos (Suster, 1992), así como otros tipos de la célula importantes para la función de este órgano. Avances recientes en inmunología, especialmente en el desarrollo del sistema inmune, han realzado el conocimiento sobre la función del timo.

El timo tiene un aspecto externo variable; no solamente existen variaciones en morfología en las diversas especies (Fig.1) sino que pasa por una gradual evolución hasta el inicio de la madurez sexual y después sucumbe a una involución progresiva la cuál afecta en última instancia el órgano entero.



**Figura 1:** Diagrama de la nomenclatura y posición de las distintas partes del timo en diferentes especies de mamíferos

## **I.1. Embriología.**

El epitelio tímico se origina bilateral de la tercera y probablemente cuarta bolsa branquial y en su formación contribuyen elementos derivados de estas estructuras branquiógenas. En la especie humana su desarrollo comienza en la sexta semana de gestación. Durante la octava semana, el timo primario crece caudalmente, formando dos barras epiteliales que se funden a lo largo de la línea media para ocupar su posición final dentro del mediastino anterosuperior. Hasta la novena semana gestacional, el timo embrionario permanece como un órgano puramente epitelial. Por la décima semana, las pequeñas células linfoides que se originan en el hígado fetal y el hueso comienzan a emigrar hacia el órgano epitelial (Kendall, 1991; Griffith, 1990).

La lobulación también ocurre cerca de la décima semana como resultado de la invaginación de la cápsula. La afluencia de las células de estirpe linfóide en el timo ocurre en oleadas sucesivas. Esto es un fenómeno activo que depende del estado de maduración del epitelio tímico. La diferenciación del timo en corteza y médula ocurre mientras que las células linfoides emigran. Interacciones entre el tejido epitelial y el mesénquima son necesarias para el desarrollo normal del timo.

En esta etapa de desarrollo, las células epiteliales en la periferia del lóbulo se redondean, mientras en el centro se vuelven más fusocelulares. Las células epiteliales adyacentes son conectadas por desmosomas.

Otras células mesenquimales están presentes en este momento en los tabiques y entre las células epiteliales centrales. Estas se relacionan histogenéticamente y funcionalmente con células interdigitantes del sistema retículoendotelial de regiones timo-dependientes del sistema linfático periférico. Los macrófagos colonizan el timo en la misma etapa que los progenitores linfoides. Las raras células que contienen los miofilamentos, llamadas las células del miodes, están presentes en la región central desde la octava semana. También puede ser encontrado eritroblastos, que representan el residuo de la hematopoyesis anterior en la glándula primordial.

Las estructuras tubulares pequeñas integradas por células epiteliales están presentes en la porción central del primordium. Se convierten posteriormente en los corpúsculos de Hassall (Suster, 1992).

El desarrollo de la corteza y de la médula se termina entre los 14 años y el decimosexta semanas de gestación. Esta diferenciación morfológica es acompañada por una caracterización fenotípica de las células epiteliales y de los linfocitos.

La glándula del timo crece rápidamente en la vida embrionaria y logra su peso máximo en relación al peso corporal antes del nacimiento, con una media de 15 g (Marchevsky, 1992; Rosai, 1975; Kendall, 1981, Griffith, 1990; Suster, 1992).

## **I.2. Localización.**

El timo se sitúa en el mediastino del anterosuperior (Fig. 3). Su base descansa sobre el pericardio y los grandes vasos. El polo superior de cada lóbulo se extiende dentro del cuello y queda en continuidad la parte inferior del correspondiente lóbulo tiroideo. Los polos superiores se sitúan cerca de la tráquea. El límite posterior del timo es la fascia pretraqueal, que lo separa de los grandes vasos. Anteriormente, está en contacto con la fascia cervical, músculos del cuello, esternón, cartílagos costales, y músculos intercostales. La reflexión de la pleura parietal cubre parcialmente las caras laterales de la glándula.

## **I.3. Características Macroscópicas**

El timo es un órgano en forma de pirámide integrado por la unión de dos lóbulos; cada uno está cubierto totalmente por una cápsula fibrosa (Rosai, 1975).

El timo completamente desarrollado es rosado, con la involución de la edad se vuelve amarillento, reflejando una disminución creciente de la grasa madura. La vascularización del timo deriva de las ramas de las arterias inferiores de la tiroides, de las arterias mamarias internas, y las arterias pericardiofrénicas. La inervación, deriva del nervio vago y los nervios simpáticos cervicales.

El tamaño del timo humano varía mucho. El peso del timo normal está relacionado principalmente con la edad: es más grande en relación al peso corporal en el momento del nacimiento, pesando una media de 15 g. y continúa aumentando de tamaño y peso hasta la pubertad para alcanzar un peso medio de 30 a 40 g (Rosai, 1975; Kendall, 1980; Suster, 1992).

Posteriormente, el peso tímico disminuye durante el proceso de involución con el envejecimiento y a los 60 años de la edad es de 10 a 15 g. Muchas condiciones contribuyen a la involución o al aumento del timo. Las situaciones de stress crónicas causan la involución

#### **I.4. Características Microscópicas.**

El timo está dividido en muchos lóbulos pequeños por tabiques fibrosos que se extienden desde la cápsula. Cada lóbulo mide de 0,5 a 2, milímetros y constituye la unidad estructural básica de la glándula. Cada

lóbulo se compone de dos áreas que se pueden distinguir claramente en secciones histológicas: corteza y médula.

La corteza aparece más oscura debido a su población de linfocitos, conocidos tradicionalmente como timocitos (Suster, 1992). Los timocitos están mezclados con algunas células epiteliales y mesenquimales. En cambio, la médula es más clara, debido al menor número de linfocitos y mayor cantidad de células epiteliales. Las porciones medulares son continuas de lóbulo a lóbulo, dando como resultado una configuración altamente ramificada del tallo.

### **1º Linfocitos (Timocitos).**

La corteza tímica está densamente poblada por linfocitos de varios tamaños.

Los linfoblastos grandes o protimocitos mitóticamente activos representan 10-15% de las células linfoides del timo y se encuentran predominantemente en la porción subcapsular de la corteza externa (Müller, 1986; Suster, 1992). Un gradiente de linfocitos más pequeños, menos activos mitóticamente se ven en la parte externa de la, en la corteza profunda, en la unión córtico-medular y en el interior de la médula. El término timocito fue utilizado originalmente para denominar a todos los linfocitos del timo.

Recientemente el término se ha restringido a los linfocitos T inmaduros de en el timo. En la corteza, la intensa linfopoyesis, linfolisis, y la fagocitosis activa son indicativos de una extensa linfopoyesis ineficaz (probablemente 99 % de los timocitos mueren in situ). Esto da lugar a un aspecto de cielo estrellado en el timo activo (Suster, 1992).

## **2° Células epiteliales.**

Las células epiteliales del timo forman el armazón del órgano y su función es esencial para la maduración de los linfocitos de T. Han sido divididas tradicionalmente en base de su localización en corticales y medulares. Sus características citológicas son bastante distintivas para ser reconocidas con el microscopio de luz.

Van de Wijngaert (1984) identificó seis tipos de células epiteliales tímicas basadas en sus características ultraestructurales. Características y localización morfológicas de los tipos de células epiteliales en el timo humano.

### a) Tipo 1 “subcapsular-perivascular”.

Características Morfológicas: Lamina basal, núcleo heterocromático largas cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RER), complejo de Golgi bien desarrollado, vesículas micropinocitótica.

Localización: debajo de cápsula y alrededor de capilares corteza y en la región córtico-medular

b) Tipo 2 "pálidas"

Características Morfológicas: núcleo redondo y cromático, complejo de Golgi bien desarrollado, gránulos electrón-densos y estructuras tubulares.

Localización: dispersado en corteza y médula, predominante en la corteza externa

c) Tipo 3 "intermedias "

Características Morfológicas: Espectro entre tipo 2 y tipo 4, núcleo irregular eucromático o heterocromático, cisternas dilatadas del núcleo y RER.

Localización: corteza media y profunda, médula

d) Tipo 4 "oscuras"

Características Morfológicas: núcleo de forma irregular, heterocromatínico y electrodenso, cisternas dilatadas de núcleo y RER corpúsculos y representante, corpúsculos residuales y mitocondrias hinchadas.

Localización: Corteza profunda, dispersada dentro de la médula y alrededor de los corpúsculos de Hassall.

e) Tipo 5 “Indiferenciadas”

Núcleo redondeado con algo de heterocromatina, polirribosomas, pequeños paquetes de tonofilamentos y pequeños desmosomas.

Localización: En grupos en la región córtico-medular y dispersada en médula.

f) Tipo 6 “grandes”

Características Morfológicas: Núcleo grande, redondeado, con eu- o heterocromatina, a veces RER bien formado, abundantes tonofilamentos y estructuras tubulares.

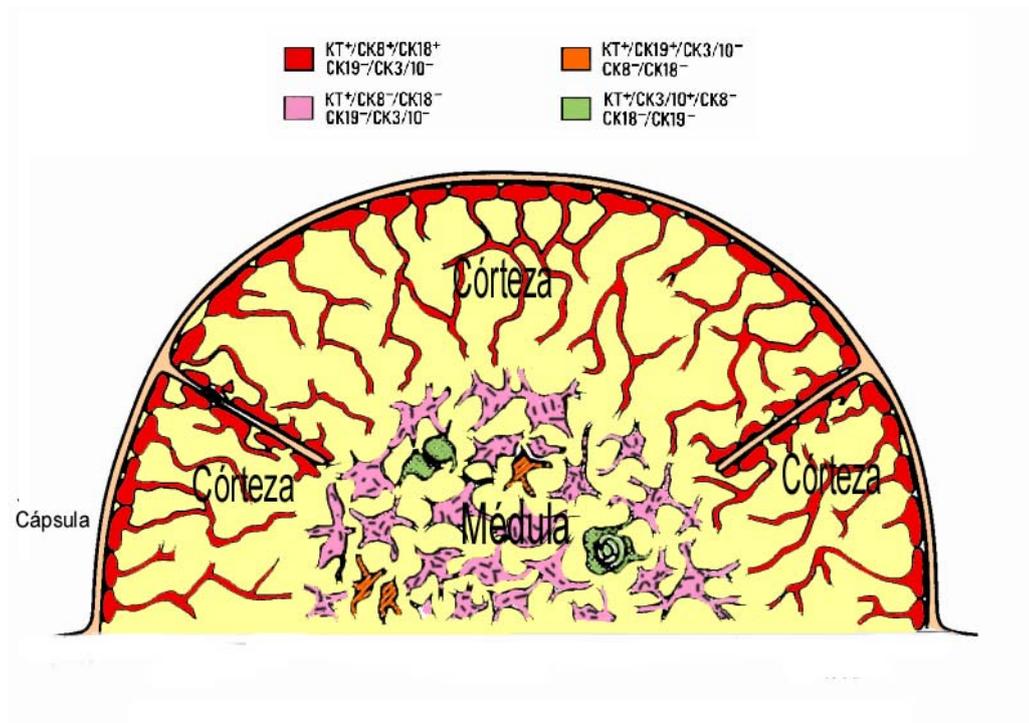
Localización: dispersas en médula, adyacentes a grandes corpúsculos Hassall, en parte de pequeños corpúsculos de Hassall.

Los tipos 2 y 3 están caracterizadas por un especial patrón de interacción del linfocito-epitelio, demostrado por la presencia intracitoplásmica de linfocitos.

Recientes Estudios inmunohistoquímicos usando varios anticuerpos monoclonales contra diversos antígenos también han demostrado la heterogeneidad de células epiteliales tímicas.

Así se han descrito de cuatro a cinco tipos diferentes de la célula en relación a la diferente expresión de antígenos (Müller- Hermelink, 1986; Suster, 1992). Savino y Dardenne (1988) observaron una diferente expresión de varios tipos de citoqueratinas (CK) en las células epiteliales de la corteza y la médula del timo murino. Describiendo cuatro tipos de células (Fig. 2):

- 1) Célula epitelial cortical: positivo CK8 y CK18; CK19 y Negativa CK3/10).
- 2) Un subconjunto de células epiteliales medulares reactivas con solamente un anticuerpo anticitoqueratina policlonal pero no reactiva con los anticuerpos monoclonal contra CK8, CK18, CK19, CK3/10.
- 3) Otro subconjunto de células epiteliales medulares positivas para CK19 pero negativa para CK8, CK18, y CK3/10.
- 4) Células epiteliales de los corpúsculos de Hassall positivos para CK3/10 pero negativa para CK8, CK18, y CK19.



**Figura 2:** Esquema de la distribución de expresión de citoqueratinas en las células epiteliales tímicas.

En los seres humanos, la diferente expresión de diversos tipos de citoqueratinas no son tan distintivos como en el ratón. (Fukai, 1993).

### 3° Otros Tipos De Células.

Además de las células epiteliales y de los linfocitos T, el timo contiene una variedad de los tipos de la célula (Suster, 1992; Wirt ,1988.).

#### a) Los linfocitos de B

Pueden ser encontrados como folículos linfoides con centros germinales en los tabiques o dispersos en médula.

La presencia de centros germinales en los espacios perivasculares conduce a la idea de que el timo se puede dividir en dos compartimientos importantes: corteza y médula que componen el parénquima tímico verdadero, y a un compartimento extraparenquimal constituido por los espacios perivasculares del timo (Suster, 1992). Un centro germinal se encuentra en el timo de un 2 a 40% de individuos normales. Esta amplia variación se puede relacionar con un factor del muestreo o con la edad de los pacientes. Los centros germinales son especialmente comunes en niños y adolescentes.

b) Los macrófagos

Están presentes principalmente en la corteza, pero también se encuentran en la médula (Ruco, 1989). Son funcionalmente activas y muestran una fuerte actividad enzimática lisosomal. Las células del retículo interdigitantes son numerosas en la médula y en el unión córtico- medular (Kondo, 1990; Ruco ,1989).

Son positivas para la proteína S-100 y tienen poca actividad enzimática lisosomal. Ambas células expresan las moléculas de histocompatibilidad clase I y de clase II., que tienen cualidades de

células presentadoras de antígeno, y desempeñan un papel importante en la expansión clonal de los linfocitos de T.

c) Las células de Langerhans

También se han identificado dentro de la médula tímica. Eosinófilos, mastocitos, y las células plasmáticas también están presentes en los finos tabiques del tejido conectivo del timo.

d) Células mioides y estriadas

Están situadas en la médula (Griffith, 1990; Suster, 1992). Estas son prominentes en el timo de pájaros y de reptiles, pero pueden también ser encontradas en el timo humano. Están situadas en grupos pequeños adyacente a los corpúsculos de Hassall y son más frecuente en los recién nacidos. Las células de mioides son idénticas ultraestructural e inmunohistoquímicamente a las células estriadas del músculo. La histogénesis de las células del mioides sigue siendo un tema de discusión. Algunos los investigadores proponen su origen en la cresta neural (Nakamura, 1986)

#### **4º Corpúsculos De Hassall.**

Los corpúsculos de Hassall son estructuras características del timo, presentes exclusivamente en la médula y se reconocen como formaciones redondeadas queratinizadas. Están constituidos por una disposición concéntrica de las células epiteliales maduras con queratinización del centro, que se calcifica a menudo. La periferia del corpúsculo está en continuidad con las células epiteliales medulares de las cuales se deriva.

Los corpúsculos de Hassall pueden sufrir cambios secundarios como quistificación central, con la acumulación de restos celulares y de células inflamatorias (Suster, 1992). El cambio quístico marcado puede dar lugar al supuesto quiste tímico multilocular, condición que había sido considerada previamente como una anomalía congénita pero puede que sea el resultado de la ampliación quística de los corpúsculos de Hassall resultando de cambios inflamatorios adquiridos en el timo. La presencia del epitelio columnar recubriendo los quistes se pueden también relacionar con el cambio quístico de los corpúsculos de Hassall (Suster, 1992).

#### **I.5. Maduración de Timocitos.**

El timo proporciona el microambiente esencial para la expansión y la diferenciación de las subpoblaciones de linfocitos T.

El proceso de expansión de linfocitos T es un componente esencial de la compleja red inmunoreguladora y de funciones efectoras mediadas por células.

La población linfoide del timo ha demostrado poseer una marcada heterogeneidad inmunofenotípica, reflejando su diversidad funcional. El proceso de la diferenciación de la célula T comienza después de que la célula madre hematopoyética, los protimocitos, emigren desde la médula ósea al área subcapsular del timo, e implica una migración intratímica a través de un microambiente celular teórico desde la corteza a la médula (Ruco, 1992). Durante este proceso ocurren interacciones entre los timocitos en vías de desarrollo y las células epiteliales estromales tímicas. Al final de este proceso de maduración, los timocitos con fenotipos esencialmente maduros salen del timo al compartimiento linfático periférico, donde se completa su diversificación funcional.

La parte de la maduración intratímica de la de la célula T se ha dividido de una forma práctica en tres etapas (Suster, 1992; Knowles, 1992).

El timo es el órgano linfoide primario responsable de la formación del pool de células T maduras y de la inducción a la tolerancia a uno mismo. Esto se consigue gracias a la selección positiva y negativa de las células T.

Las células T que se unen solamente a moléculas de la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de uno mismo pero no a los antígenos peptídicos propios, se seleccionan positivamente. Las células T que se unen a ambas, moléculas de la clase I del CMH y antígenos propios o a ninguno, experimenta apoptosis selectiva. Este proceso ocurre durante la diferenciación, y reflejan la arquitectura altamente organizada del timo. En este sentido, el timo se puede representar como una puerta giratoria en el paso de un precursor incompetente a una célula T competente. Dos diferentes elementos fundamentales constituyen este órgano:

1. Componente fijo: células epiteliales, vasos, inervación autonómica y sensitiva, y tejido conectivo, y
2. Poblaciones de células inmunes migratorias: principalmente timocitos, pero también macrófagos y las células dendríticas (células interdigitantes), que contribuyen a la maduración de células T.

Las células madre, originadas en la médula ósea y que emigran al timo a través de la circulación sanguínea arterial, dejan el sistema vascular en la región subcapsular y córtico-medular y ocupan la corteza exterior.

Mientras que se mueven desde la corteza externa hacia la médula central en una secuencia ordenada, comienzan a expresar los marcadores superficiales de la célula T incluyendo el CD4, CD8, y TCR.

Las células T maduras abandonan el timo a través de las vénulas medulares o septos linfáticos para emigrar a los órganos linfoides secundarios periféricos (bazo, ganglios linfáticos, intestino). Estos procesos ocurren durante la vida fetal y postnatal. Mientras que la hipo-aplasia congénita del timo (Síndrome de DiGeorgés) conduce a la muerte temprana en niños, la timectomía postnatal no causa inmunodeficiencia significativa puesto que los órganos linfoides periféricos se han sembrado ya con células T competentes. Así, la expansión postnatal de las células T ocurre en los órganos extratímicos.

## **I.6. Regulación Hormonal Y Neuroendocrina.**

La producción de hormonas tímicas por las células epiteliales es supuestamente responsable de la regulación del desarrollo del linfocito -T. En la literatura se han acumulado las descripciones sobre el aislamiento, purificación, caracterización, y funcionalidad de diversas macromoléculas, algunas de las cuales se han sintetizado (Schulof, 1987). Las más conocidas son la timosina 1, timulina, timopoyetina, factor humoral tímico, y factor tímico del suero.

En algunos estudios, la producción hormonal se ha localizado en las células epiteliales corticales subcapsulares y medulares. Esto ha conducido a la sugerencia de que estos dos subtipos de células representan la porción funcional del timo (secretor o endocrino), en contraste con el epitelio no secretor de la corteza y de los corpúsculos de Hassall internos. Un estudio inmunohistoquímico usando anticuerpos contra los timosina 1y 3 demostraron la alta especificidad de estos anticuerpos para el reconocimiento de las células epiteliales normales del timo y del timoma (Hirokawa, 1988). Algunas hormonas tímicas se han utilizado para tratar a pacientes con inmunodeficiencia, y desórdenes autoinmunes (Dardeene, 1989; Schulof, 1987).

El compartimiento epitelial del timo es el elemento predominante y desempeña un papel importante en las complejas comunicaciones ínter sistemas, integrando el circuito de señales entre el timo, el sistema nervioso central y endocrino. Los péptidos secretados por las células epiteliales son abundantes, haciendo del timo un órgano endocrino y neuroendocrino. Además, los mismos linfocitos estimulan la producción de moléculas muy similares, si no idénticas a las hormonas peptídicas: hormonas adrenocorticotróficas (ACTH), endorfinas, encefalinas, tirotropina (TSH), y gonadotropina coriónica humana (hCG) (Smith, 1988).

Existen interacciones intrincadas de una naturaleza estimulante e inhibitoria entre el sistema inmune y el neuroendocrino.

Los mensajeros químicos que transmiten las señales en esta red son los neuropéptidos secretados y reconocidos por sus receptores específicos. El concepto de sustancias neuroendocrinas, definido originalmente como péptidos liberados solamente por las neuronas, ha sido ampliado en los últimos años paralelamente al hallazgo de estas sustancias en tejidos extraneurales tales como derivados de la cresta neural y tubo digestivo.

Histológicamente, las células neuroendocrinas se definen como células que secretan péptidos. Recientemente, una definición funcional más amplia, que incorpora hormonas pituitarias clásicas: Son sustancias neuroendocrinas las hormonas peptídicas secretadas por el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal-gonadal, por el sistema neuroendocrino diseminado del árbol bronquial y digestivo, por los nervios (autonómicos y sensoriales), y por los elementos epiteliales y linfocíticos del timo así como los órganos linfoides periféricos.

Se piensan que los diversos sistemas neuroendocrinos interrelacionados con el sistema inmune desempeñan un papel inmunomodulador (Tabla 1). Las interacciones neuroendocrino-inmunes son bidireccionales.

Los inmunocitos activados, incluyendo linfocitos B y T, los esplenocitos, y los monocitos producen factores que son inmunológica y biológica, pero no bioquímicamente, idénticos a las hormonas peptídicas: ACTH, endorfina, TSH y hCG (Smith, 1988).

Durante una infección, los linfocitos pueden modular la sensación del dolor, la neurotransmisión, la actividad metabólica, y las respuestas al estrés. Estas observaciones ilustran un comportamiento similar de las células neuroendocrinas y de los inmunocitos extratímicos. Los inmunocitos responden a los factores hipotalámicos liberados, Así, CRF estimula la producción de ACTH y endorfina linfocítica, que es inhibido por la dexametasona (Smith, 1986). También, la producción de IFN-gamma es regulada por la ACTH (Johnson, 1984). El factor liberador de TSH-provoca también la secreción linfocítica de TSH (Kruger, 1988). Uno debe tener presente, sin embargo, que el número de las células T maduras que recirculan en el timo es pequeño bajo condiciones normales y no se sabe si estas células secretan neuropéptidos.

La especificidad de esta señal endocrina neuroinmune es mediada por receptores de alta y baja afinidad. El receptor de ACTH está presente en las células neuroendocrinas así como en las células B y los leucocitos periféricos (Bost, 1987; Smith, 1987).

La co-expresión de ACTH y de receptores de ACTH en linfocitos activados sugiere una retroalimentación autocrina negativa: en ratas adrenalectomizadas, el estrés induce inmunosupresión (Keller ,1983). En Sangre los linfocitos T poseen receptores de opiáceos (Wybran, 1979).

HORMONA	REGULACIÓN INMUNE	REFERENCIA
<b>ACTH Glucocorticoides</b>	Atrofia tímica	Selye (1936)
<b>Bombesina</b>	Migración linfocitaria	Ruff (1985)
<b>Endorfinas</b>	mitogénesis linfoide	Hazum (1979); Gilman (1982)
	Quimitaxis linfoide y citotoxicidad	Van Epps (1984); Brown (1985)
<b>Encefalinas</b>	Quimitaxis linfoide con formación de rosetas de células T	Wybran (1979); Brown et al (1985)
<b>GH</b>	Timopoyética; Conserva células con doble positividad para CD4/CD8 dentro del timo; regenera el tejido tímico y su arquitectura en ratas vieja	Johnson (1985); Johnson (1982); Murphy (1992); Kelley (1986)
<b>LH</b>	Atrofia tímica	Greenstein (1987), (1986)
<b>OXT</b>	Estimula la oxidación de la glucosa en los timocitos de la rata; propiedades similares a la IL-2	Goren (1984)
<b>PRL</b>	Estimula la producción de la timulina por las células epiteliales tímicas	Dardenne (1989)
<b>Somatostatina</b>	Inhibe la mitogénesis	Hinterberger (1978); Payan (1984)
<b>Sustancia P</b>	Inhibe la mitogénesis linfoide	Payan (1983)
<b>Testosterona</b>	Atrofia tímica	Greenstein(1987)
<b>Vasopresina</b>	INF-gamma; Mitogénico de la médula ósea; propiedades similares a la IL-2; sinérgico junto con el CRF en el aumento de producción de ACTH por parte de los linfocitos	Hunt (1977); Johnson (1985); Smith (1986)
<b>VIP</b>	Inhibidor de la transformación linfoblástica y la migración	Ottaway(1984); Moore (1984)

Tabla 1: Modulación de la respuesta inmune por neurotransmisores.

Las células epiteliales tímicas también son moduladas funcionalmente por este amplio espectro de hormonas neuroendocrinas a dosis fisiológicas y poseen receptores específicos para ellas. Usando diversas técnicas, se han demostrado *in vitro* e *in vivo* en células epiteliales tímicas, receptores para casi todos los agentes neuroendocrinos, endocrinos, y opioides, como receptores para los glucocorticoides (Dardenne, 1986), estrógenos (Grossman, 1979), progesterona (Pearce, 1983; Sakabe, 1986), T3 (Villa Verde, 1992), GH, PRL (Ban, 1990), oxitocina y vasopresina (Elands, 1990), y agentes simpático miméticos (beta 2-adrenergicos) (Singh, 1979). La glándula del timo es sensible al efecto de las hormonas de gonadales e hipofisarias (Rouabhia, 1991; Wise y Maurer, 1991; Wise, 1992). El timo se considera como glándula endocrina, pero poco se sabe sobre la interacción del timo con otros sistemas endocrinos y aspectos del control de la función tímica. Se han identificado actualmente, numerosas hormonas con función inmunológica y los factores que afectan la función gonadal (interleuquinas, factor de necrosis tumoral, timulina).

La hormona del crecimiento y la prolactina tienen un efecto estimulante del sistema inmune a muchos niveles (Weigent y Blalock, 1990; Kelley, 1992, 1993), incluyendo el peso y la secreción tímica de timosina B4 (Wise, 1994). Debido a que las concentraciones de la hormona del

crecimiento se relacionan con el desarrollo y el crecimiento eficientes de los animales del campo, la relación entre la función tímica, los cambios de la hormona del crecimiento, y la maduración animal puede ser importante. Los receptores de la hormona de luteinizante (LH) son perceptibles en las células inmunológicas (Rouabhia, 1987), y la LH puede alterar la liberación de hormonas inmunológicas (Rouabhia, 1991; Wise, 1992).

Los receptores de la testosterona se encuentran en las células epiteliales tímicas medulares y de la unión corticomedular así como en timocitos en la corteza externa (Leposavic, 1992). Las señales hormonales recibidas, alternadamente, modulan la función de las células epiteliales tímicas en relación a la proliferación, producción de la matriz extracelular, expresión de citoqueratinas, y lo más importantemente, la secreción de la timulina. La prolactina, por ejemplo, estimula la secreción del timulina in vitro e in vivo, mientras que el bromocriptina la inhibe (Dardenne, 1989). Así, el epitelio tímico está bajo un complejo control neuroendocrino producido en las gónadas, suprarrenal, tiroides, hipófisis, hipotálamo, y posiblemente estructuras cerebrales corticales más altas (Dardenne, 1992).

Esta comunicación bidireccional entre el sistema neuroendocrino y el inmune puede ir más allá de la simple modulación homeostática.

En el animal adulto, el timo pudo regular el eje reproductivo: El embarazo induce una dramática involución del timo materno causado por los elevados niveles de esteroides sexuales, pero también por reacciones de los antígenos paternos y fetales extraños (Persike, 1940; Moreno, 1991; Kendall, 1994). Esto se atribuye a la apoptosis y al éxodo de los timocitos (Ernstroem, 1970).

La timectomía neonatal en ratones normales dio lugar a la disgenesia ovárica, que fue prevenida por la implantación del timo. La timectomía neonatal provocó cambios en morfología pituitaria con la degranulación de células acidofílica (GH y PRL) así como cambios en glándulas endocrinas periféricas (Besedovsky, 1974; Pierpaoli, 1967). Estos datos sugieren que el timo regula la liberación de hormonas hipofisarias. De hecho, los cultivos de células reticulares tímicas producen un factor que libera GH, PRL, y LH de las células hipofisarias anteriores (Spangelo, 1989). La fracción V de la timosina libera TSH, PRL, GH, y posiblemente ACTH de la hipófisis in Vitro. De igual forma, la timopoyetina estimula la secreción de las ACTH, beta-endorfina, y beta-lipotrofina de las células hipofisarias en cultivo (Kendall, 1994).

La glándula del timo regresa con edad, pero la castración puede retardar su involución (Calzolari, 1898; Henderson, 1904; Hatai, 1914;

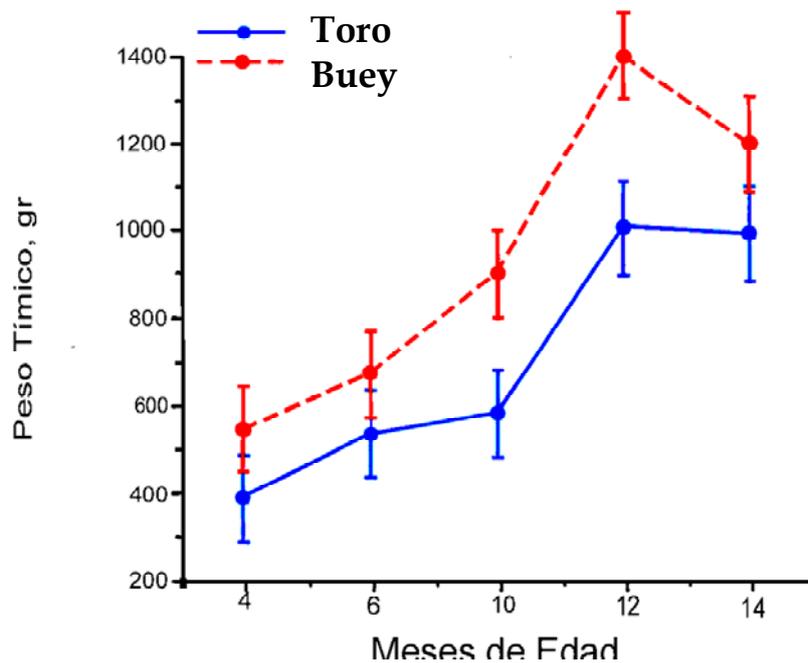
Chiodi, 1940). En la pubertad, la iniciación de la función gonadal y la secreción de esteroides pueden también afectar la función inmune (Grossman, 1984, 1985) y aceleran la involución tímica.

Los modelos convencionales de la maduración y de la función del timo (es decir, en ratones) pueden tener poco en común con los mamíferos del rumiante debido a las diferencias en época de la madurez sexual (ratas, 6-8 semanas; 1-2 años de los ganados), longitud de los ciclos de celo (ratas, 4 días; ganados, 21 días), madurez en el nacimiento (crías de rata, no muy maduras; becerro, absolutamente maduro), y la sensibilidad a las señales nocturnas, estacionales, y de las feromonas.

Los cambios más importantes en el desarrollo de la función secretora y el peso del timo en relación a la maduración y al sexo ocurren en la pubertad. (Wise, 1995). La interpretación de los cambios del peso tímico durante la madurez del ganado depende algo de cómo se presentan los datos. El timo aumenta de peso y tamaño, como otros tejidos del cuerpo, durante la fase del crecimiento, pero los diferentes sexos no crecen necesariamente en la misma proporción (Figura 3 y 4).

Cuando el peso tímico se corrigen para las diferencias en pesos corporales en las varias edades, el timo no aumenta de peso tan rápidamente en relación a los cambios del peso corporal durante el crecimiento (Figura 5).

La castración neonatal aumenta el peso del timo en una edad temprana (4 meses; Figura 3 y 4). e indica el efecto gonadal sobre la función tímica.



**Figura 3:** Representación gráfica de la relación entre el peso tímico y la edad de los animales machos normales(Toro) y castrados (Buey).

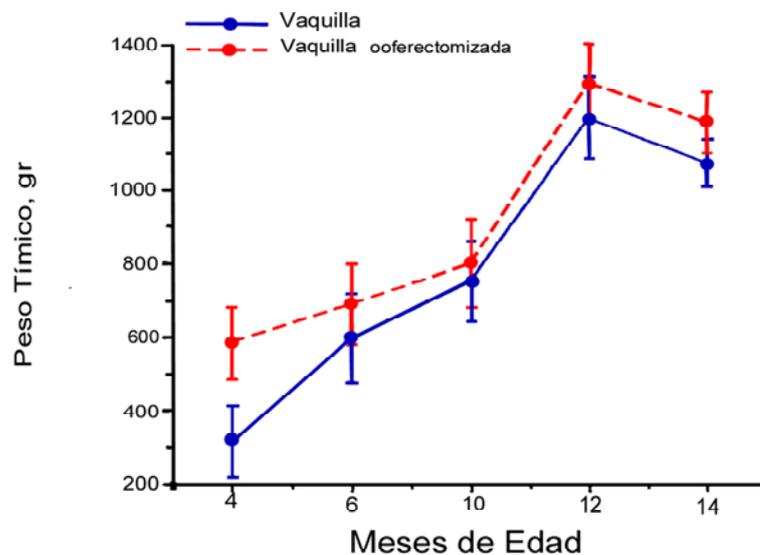
Como las diferencias entre el peso tímico y las concentraciones de timosina B4 estaban ya presentes a los 4 meses de edad, los principales efectos de la gónada deben ocurrir mucho antes que el efecto generalmente aceptado de la pubertad cuando las gónadas inician la producción de las hormonas y de los gametos (12 meses de la edad).

Los cambios del peso tímico son relativamente graduales y no disminuyen bruscamente con la pubertad, similar a la involución del timo humano (Steinmann, 1985).

La actividad endocrina gonadal es mínima a los 4 meses de edad en ganados; así, el mecanismo que implica la presencia o la ausencia de las gónadas en este periodo en relación a la alteración del peso o las concentraciones tímicas de timosina B4 es desconocido. Gran Parte de la diferenciación del sistema inmune se piensa que es debido a las diferencias de los esteroides sexuales gonadales (varones, testosterona; hembras, progesterona y estrógenos; Grossman, 1984, 1985) que retroalimentan la función tímica, que en ganados ocurre mucho antes (< 4 meses de la edad) de la pubertad. Los cambios del peso tímico en machos castrados (bueyes) (Figura 3) son muy similares a los cambios en la hembra (Figura 4). Es desconocido el porqué de las mínimas diferencias existentes en el peso tímico después de los 6 meses de la edad en las hembras y podría indicar la influencia del ovario limitando el pesos tímico en las fases posteriores a la maduración de las hembras.

La interacción de los acontecimientos hormonales que influyen la función tímica es compleja. La testosterona gonadal puede tener un efecto negativo en el peso tímico y en las concentraciones circulantes de la timosina

B4 (Pearce, 1981; Greenstein, 1986; Sabio, 1991; Wise, 1992), mientras que la hormona del crecimiento puede aumentar el pesos tímico y las concentraciones de timosina B4 (Wise, 1991, 1994).



**Figura 4:** Representación gráfica de la relación entre el peso tímico y la edad de los animales hembras normales y castradas.

Las principales diferencias entre el peso tímico de los toros y los bueyes se pueden relacionar con los aumentos de la testosterona en el desarrollo (Lunstra (1978) e Hillyer (1992)).

La disminución del peso tímico y las concentraciones de timosina B4 a los 10 meses de la edad pueden ser debido a los aumentos en la producción de testosterona que presenta un pico entre los 10-12 meses de la edad, coincidiendo con el inicio de la pubertad. Pero también, puede ser debido a

la disminución de la concentración de la hormona de crecimiento que disminuye al alcanzar el peso corporal maduro (10-12 meses de la edad); recibiendo el timo menos estímulo de la hormona de crecimiento circulante.

En vaquillas ooforectomizadas donde no hay efecto de retroalimentación con el timo y la hipófisis, la LH está significativamente más elevada en relación a hembras intactas y continúa aumentando con la madurez (Figura 4).

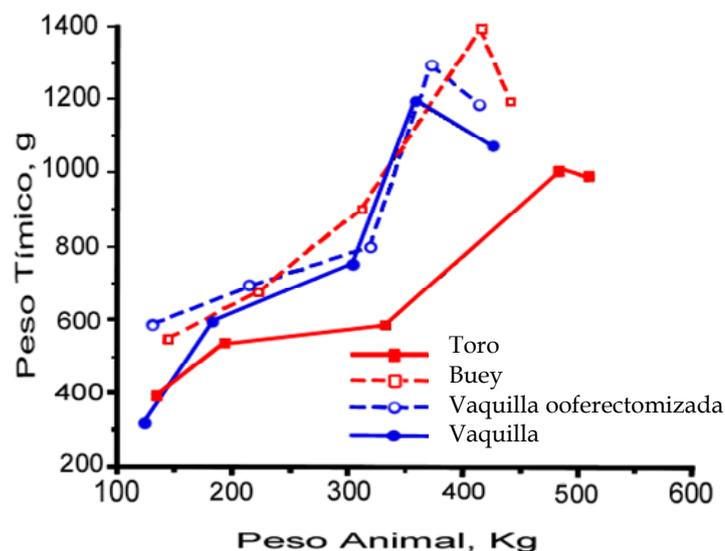
Una de las primeras funciones endocrinas identificadas del péptido tímico, timosina B4 era la liberación de GnRH (Rebar, 1981; Rebar, 1984). Junto con el aumento de la LH en hembras ooforectomizadas se observa una disminución de la timosina B4 que indican una relación inversa entre las altas concentraciones de LH y la timosina B4, posiblemente debido a la alta concentración de la LH.

El timo tiene receptores de LH (Rouabhia, 1987; Rouabhia, 1991), y hCG que pueden reducir las concentraciones de timosina B4 en los verracos (Wise, 1992). Las disminuciones de LH y de timosina B4 a los 10 meses de edad pueden ser debido a los aumentos de la testosterona o a disminución de la hormona del crecimiento en esta edad prepuberal.

Aunque es asumida originalmente que las diferencias en el peso y en la secreción tímica de timosina B4 son evidentes con la iniciación función

reproductiva gonadal en la pubertad (10-14 meses de la edad), también se ha demostrado la influencia de la función gonadal en un estadio temprano, como es el aumento del peso tímico y las concentraciones del timosina B4 desde los 4 meses de edad con la castración de los animales. El mecanismo que implica estas diferencias es desconocido mientras que la función gonadal se piensa absolutamente para ser limitada esto temprano en la maduración (nacimiento a 4 meses de la edad). (Wise, 1995).

Es evidente por tanto la importancia de la edad en el peso tímico y la influencia que poseen tanto las hormonas propias como sustancias administradas exógenamente en la función, peso y desarrollo del timo, preferentemente en la primeras etapas del desarrollo.



**Figura 5:** Representación gráfica de los cambios producidos en el peso tímico en relación al peso, sexo y castración del animal.

El timo y los órganos linfoides periféricos están ricamente inervados por fibras nerviosas simpáticas, parasimpáticas y sensoriales, que están implicadas en la función inmune: el contenido de norepinefrina del timo y el bazo disminuyen perceptiblemente durante la respuesta inmune.

En seres humanos, los mayores cambios ocurren entre los 30-50 años de la edad, cuando la corteza tímica se substituye en gran parte por grasa. Las islas de corteza activa permanecen y, bajo estímulo, pueden proliferar a cualquier edad en el adulto. La regresión tímica implica la emigración de linfocito a la periferia (Sainte-Marie, 1971), apoptosis dentro del timo y disminución de la proliferación debido a alteración de los niveles de hormonas circulantes, corticoesteroides y esteroides sexuales (Hinsull, 1977).

Hasta hace poco tiempo, la causa del inmunosenescencia se pensaba erróneamente que era exclusivamente del sistema inmune y era irreversible. Esto condujo a una teoría del envejecimiento que miró al timo como el marcapasos de la inmunosenescencia. Esta asunción ya no es válida más largo por la evidencia experimental que demuestra claramente que la involución tímica asociada a la edad no es ni intrínseca ni irreversible sino una consecuencia de las interacciones neuroendocrino-timo (Fabris, 1992).

La involución de la función del timo puede ser invertida y las células T restaurada por el aporte neuroendocrino de GH (Kelley, 1986; Murphy, 1992; Dávila, 1987), TSH (Provinciali, 1990a), T3/T4 (Scheiff, 1977; Fabris, 1982; Provinciali, 1990b),  $\beta$ -endorfina (Solomon, 1988), y análogos de LH-RH (Marchetti, 1991; Greenstein, 1987). Además, la adrenalectomía o la castración incluso en ratas viejas masculinas conducen a una recuperación drástica de la masa y de la función del timo (Comsa, 1973; Greenstein, 1986).

El compartimiento de las células epiteliales tímicas interviene en la maduración y la función de la célula T por medio de señales paracrinas, bioquímicamente el epitelio de tímico es sorprendentemente activo. La característica excepcional de las células epiteliales tímicas es la variedad de péptidos de secreción que una célula individual produce. Histológicamente, las células epiteliales tímicas tienen una configuración dendrítica, extendiendo sus prolongaciones entre los timocitos. Son positivas para las citoqueratinas (AE1/E3) (Moll, 1988) y demuestran tonofilamentos y desmosomas por microscopia electrónica (Piantelli, 1990).

Los estudios microscópicos, ultraestructurales, e inmunohistoquímicos revelaron distintos microambientes epiteliales, sugiriendo compartimientos espaciales en los cuales tiene lugar las

interacciones entre la células epiteliales y las células T (von Gaudecker, 1986; Van de Wijngaert, 1984).

Topográficamente, el epitelio tímico se puede subdividir en regiones subcortical, intracortical, de unión, medular, y de los corpúsculos de Hassall. Además de las rutas hormonales, el sistema nervioso central puede también ejercer control sobre el timo mediante inervación de los nervios autonómicos y neuropéptidos (Felten, 1992). Hammar fue el primero en demostrar las ramificaciones del nervio vago mediante una tinción de plata. Durante la 16-20 semanas de gestación, la médula del timo fetal humano contiene un rico plexo nervioso (Hammar, 1935). La inervación simpática noradrenérgica es demostrada por la detección de las enzimas dopamina hidrolasa y tirosina hidrolasa (Al-Shawaf, 1991) y la simpatectomía química con la 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Las fibras noradrenérgicas entran en la glándula en plexos alrededor de los vasos sanguíneos principales, desde los plexos varicosos subcapsulares, y terminan en la unión córtico-medular. De allí, se ramifican libremente en la médula donde se localizan la mayor parte, mientras que algunas fibras individuales penetran en la corteza (De Leeuw, 1992). Junto a la función moduladora sobre las células inmunes, la inervación adrenérgica puede también ejercer un control vasoconstrictor tímico, que a su vez, influye sobre la circulación de timocitos.

Con este fin, el estímulo de la inervación simpática estimula la salida de las células hacia la médula ósea, el bazo y los ganglios linfáticos.

Pequeños grupos de fibras adrenérgicas se encuentran adyacente a macrófagos y a mastocitos pero la significación de esto es desconocida (Felten, 1989).

Los catecolaminas pueden influenciar el desarrollo del timo in vivo. El timocitos que se convierte posee receptores beta-adrenérgicos que inhiben la proliferación de timocitos y aumentan su diferenciación cuando se estimulan (Singh, 1979). Simpatectomía química con 6-OHDA al nacimiento estimula la proliferación de timocitos (Felten, 1987) (en contraste con los linfocitos periféricos, donde se suprime la proliferación), pero al mismo tiempo causa claros aumento en la apoptosis de los timocitos corticales (Kendall, 1991).

La inervación colinérgica parasimpática no esta claramente establecida. Algunos investigadores describieron acetilcolinesterasa en vasos sanguíneos de la unión córtico-medular desde donde se ramifican dentro de la corteza (Bulloch, 1987) y la médula (Kendall, 1991), pero esto ha sido discutido por otros autores (Felten, 1989).

## **I.7. El Papel de la Apoptosis en la Función Tímica**

El conocimiento de la importancia de la apoptosis en la fisiología y patología de los mamíferos ha progresado rápidamente en los últimos años.

Lo que fueron hallazgos de laboratorio tienen, cada vez más, una relevancia clínica. La necrosis convencional siempre se ha considerado perjudicial para el organismo. La introducción de otro tipo de necrosis (Hockenbery, 1995) que pudiese estar totalmente integrada en la fisiología de los mamíferos comienza a finales del siglo XIX, cuando pioneros como Walther Fleming la reconocieron al estudiar al microscopio fenómenos involutivos normales, como los existentes en los folículos ováricos o en la mama postlactación (Staunton, 1998; Hetts, 1998; Majno, 1995). Los embriólogos pronto empezaron a explicar muchos de los cambios acontecidos durante el desarrollo del embrión gracias a esta muerte celular programada (MCP) (Majno, 1995, Jacobson, 1997; Boswan, 1996; Farber, 1994).

Los hallazgos morfológicos fueron recobrados por Kerr (Kerr, 1972; Cummings, 1997) y propusieron la denominación de apoptosis para ellos (del gr. appo-toe-sis, indicativo de la caída de las hojas de un árbol o de los pétalos de una flor) (Kerr, 1972; Davill, 1994)

A los hallazgos morfológicos siguieron los moleculares, iniciados por Sydney Brenner al estudiar el nematodo *Caenorhabditis elegans* y, posteriormente, con el descubrimiento de un patrón característico, «en escalera», al plasmar el ADN de las células apoptóticas en un gel de electroforesis (Hetts, 1998; Salomon, 1995; Driscoll, 1996; Dragovich, 1998; Savill, 1998; Ashkenazi, 1998; Bergmann, 1998). Actualmente, se conocen un gran número de sus mecanismos moleculares. Además, la MCP se ha conservado durante la evolución filogenética e incluso existe en organismos unicelulares y en las plantas (Jacobson, 1997; Ameisen, 1996; Heilein, 1998; Hochman, 1997). Los cambios morfológicos de la apoptosis se observan mejor con microscopia electrónica (Staunton, 1998; Cummings, 1997; Verhaegen, 1998). La cromatina se condensa y forma una masa semilunar, desaparecen las uniones intercelulares y las diferenciaciones de la superficie celular mientras la célula se retrae y se hace más densa. Por último, se disgrega en pequeñas porciones, conocidas como cuerpos apoptóticos, que son fagocitados sin producir fenómenos inflamatorios (Hetts, 1998).

Actualmente es posible detectar la apoptosis e incluso cuantificarla o analizar los mecanismos implicados por técnicas enzimáticas, inmunohistoquímicas, citométricas o moleculares (Soini, 1998; Peng, 1997; Leers, 1999; Gorczyca, 1998).

En el timo se produce una presentación selectiva de los antígenos a los linfocitos T inmaduros y quedan eliminados por apoptosis aquellos que son autorreactivos. Por otra parte, los linfocitos B de los centros germinales del ganglio sufren, tras el contacto con el antígeno, una mutación somática de los genes de las inmunoglobulinas. Esta interacción entre las inmunoglobulinas de superficie y el antígeno es necesaria para suprimir la apoptosis y permite a los linfocitos B con inmunoglobulinas de superficie de alta afinidad sobrevivir selectivamente y diferenciarse (Hollowood, 1998). Aquellos que reaccionan frente a autoantígenos son eliminados por linfocitos T CD4 mediante apoptosis inducida a través de la vía FasL/Fas (Abbas, 1996).

Cabe destacar que los medicamentos utilizados en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, como glucocorticoides o ciclofosfamida, inducen la apoptosis de los linfocitos (Thatt, 1997).

Aunque la importancia del timo en el desarrollo del sistema inmune es bien sabido, sigue habiendo muchos aspectos en estudio sobre los factores que regulan la formación del linfocito T. Tanto la proliferación y diferenciación como la supervivencia de las Células-T o de los timocitos se condiciona a una selección positiva y negativa con la cual se alcance una población de linfocitos de T maduros sin poner en peligro la propia tolerancia (Moll, 1997).

La diferenciación de las Células-T implica el traslado desde la corteza hacia la médula, al mismo tiempo que cambian sus receptores bajo control de varios factores (Love, 2000).

Se ha afirmado que la muerte celular programada o apoptosis está ampliamente implicada en el proceso de selección de la Célula-T (Surh y Sprent, 1994). En una selección positiva, los timocitos con la apropiada afinidad para las moléculas de histocompatibilidad se rescatan de una muerte programada, mientras que en la selección negativa los timocitos con reactividad frente a antígenos propios son inducidos hacia la apoptosis (Toyooka, 1998). Se ha considerado que una proporción importante de la gran cantidad de timocitos generados en el timo experimentan apoptosis y mueren por medio de estos dos procesos de selección tímica, en los cuales las células epiteliales reticulares parecen desempeñar un importante papel (Aguilar, 1994).

Por otra parte, la existencia de interacciones bidireccionales neuroendocrinas-inmunes mantienen la modulación de la respuesta inmune ejercida por las hormonas neuroendocrinas (Moll, 1997). Una estrecha relación entre el estrés y varias funciones inmunes, especialmente referentes al timo, han sido bien documentadas en estudios recientes (Pruett, 2000).

Se ha probado que mediadores inducido por el estrés tales como glucocorticoides y las catecolaminas tienen efectos inmunosupresores (Fujiwara, 1999). De hecho, la presencia de adrenorreceptores en las Células-T y su implicación en la señal TRC que conduce a la apoptosis del timocito ha sido confirmada por varios investigadores (Marchetti, 1994; Wajeman-chao, 1998; Miura, 2000).

Sin embargo, pocos estudios han cuantificado los efectos del agonista  $\beta$ 2-adrenérgico en la estructura tímica incluso teniendo en cuenta los trabajos de Blanco, (2000) que publicaron una involución tímica en terneros tratados con clenbuterol, y Kaminski (2000) que encontraron un aumento de la celularidad tímica en ratones tratados con salbutamol.

## **I.8. Involución**

El timo disminuye normalmente de tamaño y peso con la edad. Este proceso de involución comienza en la pubertad, en cuyo momento el órgano alcanza su peso máximo absoluto (Marchevsky, 1992; Rosai, 1975; Griffith, 1990; Suster, 1992). La involución es acompañada por un cambio gradual en las poblaciones de timocitos en relación a la diferente proporción de involución del epitelio cortical y medular y una disminución en la producción de hormonas tímicas por las células epiteliales tímicas. Sin

embargo, el timo continúa sirviendo como lugar de diferenciación y maduración de la célula T a lo largo de la vida. En el adulto joven, la pérdida del parénquima es debido sobre todo a una disminución del número de timocitos corticales, con relativa conservación de los elementos epiteliales. Con la edad avanzada, el componente epitelial se atrofia, y la glándula que formada por islas de células epiteliales fusiformes, parcialmente quistificadas, dispuestas cerca de los corpúsculos de Hassall y linfocitos pequeños dispersos en el abundante tejido adiposo. Esta disminución gradual del volumen del timo es seguida por una disminución más gradual del volumen del compartimiento periférico de linfocito T. Los cambios más llamativos al microscópico en relación a la involución se relacionan con la con la distribución, conformación arquitectural, y aspectos citológicos de las células epiteliales. Algunas de las células epiteliales tienen un aspecto fusocelular mesenquimatoso, mientras que otras se agrupan en pseudorosetas desprovistas de luz central.

El remanente tímico se compone a menudo casi exclusivamente de linfocitos, constituyendo simulando folículos linfáticos. El tejido linfoide del remanente tímico involucionado en el tejido graso, a diferencia del ganglio linfático ordinario, no tiene una cápsula. Además, con la búsqueda cuidadosa en la periferia de los nidos, uno puede encontrar las células

epiteliales circundando los nidos, representando la capa residual de células corticales subcapsulares del órgano normal. (Suster, 1992)

Aunque el timo en individuos mayores puede quedar totalmente substituido por el tejido adiposo, los remanentes tímicos microscópicos están casi siempre presentes.

Por linfopoyesis activa, el timo responde dramáticamente a los episodios de estrés severo con una pérdida de tamaño y peso. Esta involución accidental o por estrés se relacionada con una liberación repentina de corticoesteroides de la corteza suprarrenal que causa una rápida linfolisis de los timocitos corticales. Hay una prominente cariorrexis de timocitos y fagocitosis activa por macrófagos, dando lugar a un característico aspecto de cielo estrellado, confinado a la corteza (Van Baarlen ,1988).

El estrés crónico da lugar a una extensa linfolisis con una pérdida de la diferenciación córtico-medular y una acentuación de las células epiteliales, dilatación quística de los corpúsculos de Hassall, y agrandamiento de los espacios quísticos epiteliales.

Con la pérdida progresiva de timocitos, se pierde progresivamente la arquitectura lobulada y se produce la fibrosis. La inmunosupresión clínicamente significativa debido a la pérdida masiva de timocitos corticales

se puede considerar en los niños que experimentan un importante estrés, por ejemplo una lesión térmica intensa (Suster, 1992).

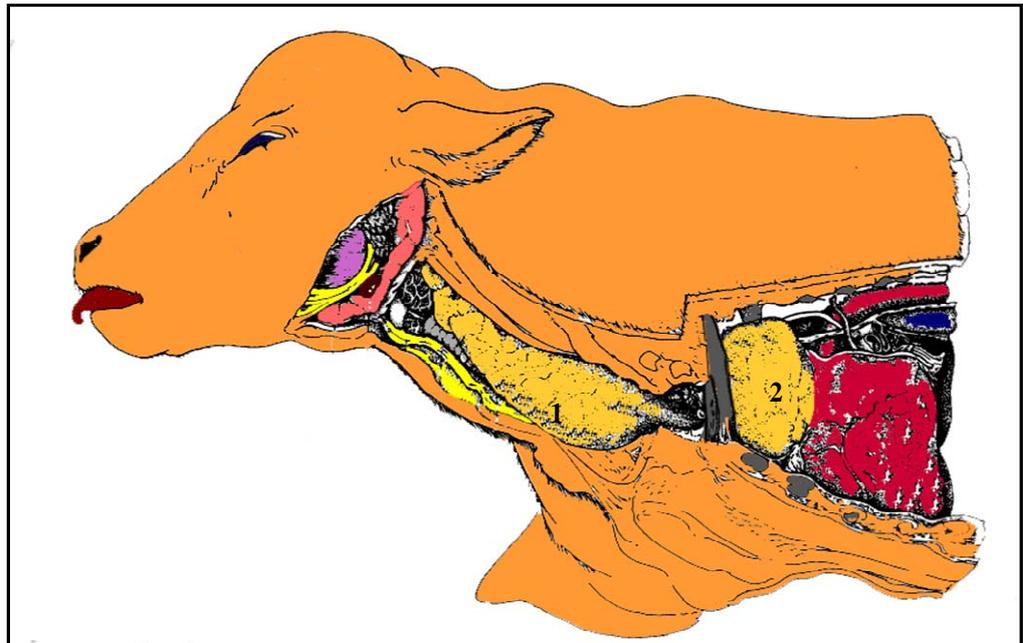
## **I.9. Algunas Consideraciones Sobre El Timo En Los Rumiantes**

### **1º Localización**

El timo es grande y lobulado y se extiende en los animales jóvenes desde la laringe hasta el pericardio. Su porción cervical está conectada con la porción torácica por medio de un estrecho istmo, ventral a la tráquea. El cuerpo descansa sobre la superficie dorsal de la tráquea y es flanqueado por las dos venas yugulares, mientras que las ramas se sitúan contra las superficies laterales del tráquea. Cranealmente se extiende hacia la glándula tiroides. La porción cervical del timo se divide en dos ramas que se adelgazan sobre las caras laterales de la tráquea, alcanzando posiblemente la laringe; el extremo craneal puede estar, o parece estar, desprendido y fragmentado y estar más estrechamente relacionado con el nódulo linfático retrofaríngeo medial y con las glándulas mandibular y paratiroides.

### a) La Parte Torácica

Se extiende asimétricamente sobre el lado izquierdo de la mitad dorsal del mediastino precardiaco. Dorsalmente se relaciona con la columna vertebral y la porción torácica del músculo del colli longus, caudalmente con el pericardio y ventralmente con el tronco braquiocefálico y sus ramas, la vena cava craneal y el lóbulo apical del pulmón derecho. Su superficie derecha descansa contra la tráquea y el esófago y es por lo tanto invisible desde la cavidad pleural derecha. Su superficie izquierda está parcialmente cubierta por la pleura. La parte torácica del timo es conectada con la parte cervical por el istmo cervicotorácico. (Fig. 6)



**Figura 6.** Representación de la localización del timo en el becerro: 1.Porción cervical.2. Porción torácica

### **b) La Porción Cervical**

Es una tira del parénquima que corre a lo largo de la izquierda de la tráquea de caudodorsal a cranioventral y esta cubierta lateral y ventralmente por el músculo esternocleidomastoideo y los músculos ventrales del hioides. En cada lado las ramas de la parte cervical son seguidas por un istmo cráneo-cervical serpenteante. (Fig. 6)

### **c) Las Ramas Craneales Derechas e Izquierdas**

Consisten en una porción retroglándular, situándose inmediatamente detrás de la glándula mandibular, y una porción sub-basilar. Ambas porciones están conectadas por un fino cordón de parénquima. Ocasionalmente se encuentran cuerpos tímicos accesorios.

## **2º Características Macroscópicas**

El timo del becerro es marcadamente lobulado. El timo de los terneros jóvenes tiene un color rosa claro o incluso ser de color rojizo, pero el color se hace más claro con la edad y su consistencia se hace más firme a medida que el tejido activo va siendo progresivamente sustituido por tejido conjuntivo con algunas células adiposas.

En la región cervical podemos distinguir un cuerpo situado caudalmente y dos cuernos que sitúan cranealmente a él.

La parte cervical es la parte más larga del timo del becerro y más o menos tiene forma de una " V ", con el punto dirigido hacia el tórax.

Estudios recientes han clarificado detalladamente la vascularización del timo de los bóvidos. El timo torácico está vascularizado por un vaso de grueso calibre procedente del tronco braquicéfalo y por una rama más delgada de la arteria torácica interna izquierda. A veces hay una fuente adicional de la arteria vertebral del tronco costocervical. El istmo cervicotorácico recibe su sangre arterial de una rama de la arteria torácica interna derecha o izquierda y una rama de la arteria cervical superficial. La parte cervical del timo recibe 2-6 arterias, dependiendo del desarrollo del órgano, tanto el lado izquierdo como el derecho. Estas ramas se originan de las arterias destinadas para la tráquea, el esófago y los músculos ventrales del cuello que se han originado de la carótida común derecha e izquierda. El istmo craneocervical y la porción retroglandular del timo craneal reciben ramas directas e indirectas de la arteria carótida común y, además, la arteria tiroidea superior. Excepcionalmente una rama de la arteria carótida o de la arteria occipital externa puede también estar implicada.

La parte subbasilar del timo craneal recibe siempre su vascularización de la arteria palatina ascendente. (Deniz, 1964).

El drenaje venoso del timo torácico es llevado a cabo principalmente por un vaso que atraviesa el tronco braquiocéfalico y termina en la vena cava superior. Venas adicionales más pequeñas se unen a las venas pericardiales, vertebrales o costocervical y las venas torácicas internas izquierdas. La sangre venosa del istmos cervicotorácico pasa a través de los tributarios de las venas torácicas internas yugulares e izquierdas y derechas internas izquierdas.

La sangre que sale del timo cervical y craneal y del istmo se unen a la vena yugular interna, ocasionalmente a la vena yugular externa o a veces a ambos vasos. Las venas tiroidea, laringea y occipital reciben las ramas que drenan la parte craneal. Los vasos sanguíneos de pequeño calibre del timo provienen de las arterias anteriormente mencionadas y sus ramas siguen el tejido conectivo que divide los lóbulos en lobulillos. Así cada arteria tímica da lugar a varias arterias lobares, éstos a su vez emiten varias arterias interlobares y finalmente se producen varias arterias lobulillares. (Deniz, 1964). Cada lóbulo tímico esta vascularizado por 1-4 arterias lobulares. Cada arteria lobulada se divide en una rama superficial delgada y rama profunda gruesa.

Las primera vasculariza la zona de unión de lóbulos vecinos opuestos mientras que la rama profunda forma un círculo arterial incompleto en la frontera entre la corteza y la médula.

Los vasos retrógrados a la corteza se presentan de este círculo que también provea la médula, aunque más escaso. Cada lóbulo de la tímicas es drenado por un sistema venoso superficial y profundo. El sistema superficial mejor desarrollado, de modo que el flujo de la sangre sea principalmente centrífugo a través de la corteza. Las venas eferentes siguen el curso de las arterias y se les da el nombre correspondientes (Deniz, 1964).

El vago, los nervios simpáticos y, posiblemente, el nervio hipogloso están implicados en la inervación del timo de los bóvidos. Los vasos linfáticos del timo drenan a los ganglios del mediastinos, cervicales y retrofaríngeo. El timo de los rumiantes pequeños es similar en forma al del buey. La parte torácica se localiza más a la izquierda en la parte dorsal del mediastino del precárdico. Su superficie izquierda está en contacto con la tráquea, el esófago y los grandes vasos. A la izquierda puede ser insinuado entre la pared torácica y el pericardio. Ventral es rodeado por el lóbulo apical del pulmón derecho.

### **3º Evolución**

El timo crece rápidamente durante los primeros seis o nueve meses de vida después del nacimiento, aunque alcanza su máximo tamaño relativo mucho antes. Ciertamente, involuciona después del nacimiento. El tiempo de regresión varía, de tal manera que la porción torácica del timo puede ser todavía bastante grande en animales de varios años de edad. A la larga, el istmo y la porción cervical desaparecen prácticamente por completo. Las recientes investigaciones han demostrado en fetos de bóvidos que la parte craneal está presente hasta el nacimiento. La involución comienza en el buey después de la octava semana de la vida postnatal. La parte craneal regresa primero seguida por el istmo. Entonces las ramas de la parte cervical y el cuerpo quedan separadas de modo que a esta edad puedan estar presentes cuatro regiones independientes del timo: una parte cervical anterior izquierda y una derecha, una parte cervical posterior y una parte torácica.

Cuando han desaparecido las porciones cervicales sigue estando, la parte torácica permanece como el cuerpo adiposo tímico que puede persistir durante 6 años y a veces mucho más.

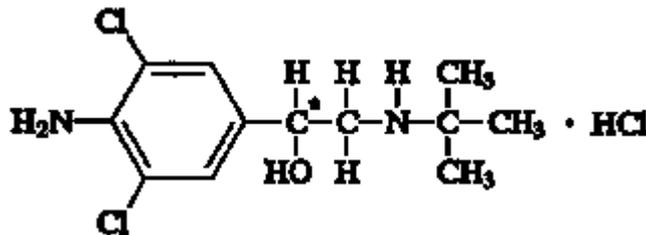
## II. Clenbuterol

Su **nombre químico** es:

4-amino-3,5-dicloro-alfa-[[[1,1-dimetiletil] amino] metil] bencenometanol

Su **fórmula molecular**:  $C_{12}H_{19}OCl_3$  (como hidrocloreto)

Su **fórmula estructural**:



El clenbuterol es un polvo cristalino, incoloro con un punto de fusión de 174 -175°C, muy soluble en agua y ligeramente soluble en cloroformo.

Su metabolismo y farmacocinética ha sido estudiada por distintos autores empleando el Carbono 14 en la posición C-2 de la molécula como radiomarcado. En relación a sus niveles plasmáticos, el Clenbuterol presenta una buena absorción después de la administración oral tanto en animales de laboratorio como en humanos. En ratas (Kopitar y Zimmer, 1973), perros, conejos (Zimmer, 1974) y humanos la máxima concentración en sangre fue alcanzada 1-4 horas después de la administración oral (Zimmer, 1976).

La absorción fue más lenta en el perro (Zimmer, 1974) y el babuino (Johnston y Jenner, 1976) con una radiactividad máxima en plasma a las 6-7 horas después de la administración oral. Las concentraciones máximas plasmáticas (0.24-1.8 µg/l) en terneros o vacas después de la administración intramuscular se alcanzaron 0.25-3 horas después, excepto en un estudio en tres vacas donde la concentración máxima se registraron a las 8 horas; siendo necesario después de la administración oral entre 6-12 horas para alcanzar su punto máximo las concentraciones (Lloyd-Evans, 1994). La vida media en plasma en ganado varia entre 16 a 105 horas dependiendo de la subpoblación estudiada (Tabla 2).

En caballos las concentraciones máximas plasmáticas (0.37-1.59 µg/l) se alcanzaron entre 1.5 y 3 horas después de su administración oral o inyección intramuscular con una vida media de entre 9 a 21.4 horas (Hawkins et Al-, 1984, Johnston y Dunsire, 1993).

Después de la administración oral del <sup>14</sup>C-Clenbuterol la radiactividad se distribuye rápidamente por todos los tejido en ratas y ratones y atraviesan la barrera placentaria del ratón (Kopitar 1969), el perro (el 0.43% de la dosis en 4 horas) (Rominger y Schrank, 1982) y el babuino (el 1.5% de dosis en 3.5 h) (Schmid, 1980).

ESTUDIO	ANIMALES	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	TEJIDOS	TIEMPO DE MUESTREO		REFERENCIA
				P.O.Hc. (h <sup>A</sup> )	M.Hg.R.G.I (days <sup>B</sup> )	
1	9 Terneros lactantes	intramuscular	P.O.Hc.M.Hg.R.G.I	0-360	1, 7, 10	Hawkins et al, 1985b
		oral		(3)		
2	9 terneros	intramuscular	P.M.Hg.R.G.I	0-(3)	0.25, 6, 10	Cameron et al, 1987
3	12 terneros	intramuscular	P.M.Hg.R.G.I		0.25, 5, 28	Hawkins et al, 1993b
4	3 vacas	intramuscular	P.O.Hc.Lc.M.Hg.R.G.I	0-240	2h, 2, 5	Hawkins et al, 1985a
		oral				
	1 vaca	oral	P.O.Hc.Lc.	0-240		Schmid & Zimmer, 1977a
		oral				
6	1 vaca	intramuscular	P.O.Hc.Lc.	0-238		Schmid & Zimmer, 1977b
		intramuscular				
7	3 vaca	oral	P.O.Hc.Lc.	0-144		Cameron & Phillips, 1987
	3 vaca	intravenosa	P.O.Hc.Lc.	0-144		
	3 vaca	intramuscular	P.O.Hc.Lc.	0-144		
	9 vaca	intramuscular	P.O.Hc.Lc.M.Hg.R.G.I	0-144	0.25, 3, 6	
8	1 vaca	intravenosa	P.O.Hc	0-96		Schmid, 1977
9	3 vaca	intramuscular	M.O.R.G.I		0.5h, 3, 6	Schmid & Zimmer, 1977c

P: Plasma; O: Orina; Hc: Heces; M: Musculo; Hg: Hígado; R: Riñón; Lc:Leche; G: Grasas; I: lugar de la inyección

**Tabla 2.** Estudios usando C14-clenbuterol en ganado.

La excreción del 14C-Clenbuterol después de la administración oral, parenteral o por inhalación se realiza principalmente por la orina (Huntingdon R. Centro, 1978).

En ocho estudios realizados sobre ganado bovino (Tabla 3), se observó que el porcentaje de la dosis excretada tras la administración de 14C-clenbuterol (vía oral, intramuscular o intravenosa) en orina, en heces y en la

leche, fue del 50-85%, el 5-30% y el 0.9-3% respectivamente, medidos durante la los días de administración, que varió entre 4 a 15 días según los estudios.

Nº estudio	Nº Ganado	Días	Músculo	Hígado	Riñón	Grasa	Lugar Inyección	Referencia
Ternero 1	3	1	0.86 ± 0.39	9.20 ± 3.33	9.09 ± 3.74	0.96 ± 0.58	0.98 ± 0.33	Hawkins et al. 1985b
	3	7	No detectado	1.39 ± 0.19	0.41 ± 0.02	ND	0.13 ± 0.16	
	3	10	No detectado	0.85 ± 0.10	0.27 ± 0.07	ND	0.08 ± 0.10	
2	3	0.25	2.17 ± 0.27	36.6 ± 9.5	38.7 ± 8.4	0.82 ± 0.42	2.49 ± 0.70	Cameron et al. 1987
	3	6	0.09 ± 0.10	7.37 ± 2.2	3.16 ± 0.5	ND	0.32 ± 0.20	
	3	10	No detectado	4.32 ± 0.5	2.15 ± 0.6	ND	0.28 ± 0.20	
3	4	0.25	0.79 ± 0.2	20.7 ± 4.8	16.1 ± 2.3	0.55 ± 0.1	1.66 ± 0.3	Hawkins et al. 1993b
	4	5	0.16 ± 0.03	3.9 ± 0.7	2.2 ± 0.5	0.12 ± 0.2	0.39 ± 0.1	
	4	28	No detectado	0.89 ± 0.1	0.46 ± 0.2	ND	0.18 ± 0.03	
Vacas 4	1	2 hours	1.45	29.8	14.7	0.58	4.79	Hawkins et al. 1985a
	1	2	0.34	8.6	3.9	0.31	3.24	
	1	5	0.19	4.4	1.4	0.35	2.92	
7	3	0.25	0.22 ± 0.14	6.26 ± 0.92	5.11 ± 1.27	0.09 ± 0.13	5.39 ± 4.13	Cameron & Phillips 1987
	3	3	0.01 ± 0.01	1.17 ± 0.47	0.42 ± 0.13	0.02 ± 0.04	0.14 ± 0.24	
	3	6	0.01 ± 0.01	0.65 ± 0.24	0.18 ± 0.09	0.02 ± 0.04	0.22 ± 0.32	
8	1	0.5 hours	0.67	8.19	8.06	0.23	130.6	Schmid & Zimmer 1977c
	1	3	0.03	1.96	0.99	0.07	0.31	
	1	6	No detectado	0.84	0.2	0.08	2.53	

**Tabla 3.** Residuos totales de radiactividad (media ± Ds µg/kg) en tejidos tras la administración de 14c-clenbuterol en ganado bovino

El perfil metabólico visto en el ganado es cualitativamente similar al visto en otros animales de laboratorio y en humanos. El Clenbuterol en el plasma (Schmid y Bucheler, 1987) y en la orina (Hawkins, 1985) representa respectivamente el 60-86% y el 22-53% de la radiactividad total. El metabolismo de clenbuterol en el riñón bovino es similar al que descrito para el hígado (Hawkins et Al, 1985, 1993) representando del 58 al 85% de la radiactividad total. El músculo y la leche completa lo que falta de la radiactividad total (Schmid, 1990).

El estudio realizado en terneros y vacas sobre el agotamiento del Residuo radiactivo en tejidos se realizó administrado  $^{14}\text{C}$ -Clenbuterol por vía i.m. y/o oral, mostrándose el resumen de los resultados de los estudios realizados en la Tabla 3. El agotamiento de los residuos totales fue más rápido en todos los tejidos comestibles de terneros y vacas.

Los resultados de los estudios 1 y 2 de la tabla 3 realizados en terneros matados entre 6, 7 o 10 días después de la última dosis, revelaron que los residuos totales en el músculo habían descendido por debajo de los límites de detección ( $0.06 \mu\text{g}/\text{kg}$  y  $0.18 \mu\text{g}/\text{kg}$  respectivamente).

En el estudio 3, los terneros recibieron la dosis de hidrocloreuro de clenbuterol el tiempo máximo requerido para el tratamiento de una afección respiratoria,  $0.8 \mu\text{g}/\text{kg}$  / dos veces al día / 10.5 días y se establece que en 28 días los residuos totales en el hígado son menos de  $1 \mu\text{g}/\text{Kg}$  y en el músculo y en el sitio de las dos últimas inyecciones es menor de  $0.2 \mu\text{g}/\text{Kg}$ .

En vacas hay tres estudios, el 4, 7 y 9. En los estudio 4 y 9 se hace referencia al equilibrio total después de dosis repetidas de hidrocloreuro clenbuterol y demuestran el rápido agotamiento de la radiactividad en el tejido para consumo humano. El estudio 7, utiliza en un total de 9 vacas de leche que recibieron la inyección de hidrocloreuro de clenbuterol recomendada para la preparación tocolítica.

Antes de 6 días, los residuos totales en el hígado eran menos de 1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ., en el músculo menos de 0.1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ., y en las muestras del sitio de la inyección era menor de 0.5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ .

Hay numerosos estudios sobre depleción en la literatura. Estos incluyen estudios que utilizan dosificaciones a dosis terapéutica recomendada para distintas afecciones y numerosos estudios en los cuales el clenbuterol es administrado en una dosis 10 veces superior a la dosis terapéutica para aumentar el crecimiento de los animales de granja. Las conclusiones generales fueron que los residuos de clenbuterol se acumulan en los ojos, pulmones, pelo y plumas, siendo encontrados los residuos más altos en el hígado y el riñón.

En un estudio se midió los residuos de clenbuterol en tejidos y fluidos orgánicos en el ganado tratado con dosis terapéutica (Elliott, 1995), detectándose durante el tratamiento en muchos tejidos y fluidos orgánicos residuos de clenbuterol, pero después de un período de 14 día de retirada eran perceptibles sólo en los ojos (27.1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), y en menor grado en pulmón y en riñón (0.3  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ). En el día 28 sólo fueron descubiertos residuos en ojos (6  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) y estos estaban todavía presentes el día 42. Los autores concluyen que no es posible distinguir entre el empleo legal e ilegal de la droga únicamente por el análisis del residuo.

Siete terneros fueron usados para estudiar la farmacocinética del clenbuterol después de una dosificación anabólica de 5 µg/Kg de peso/ dos veces al día durante 3 semanas. (Meyer y Rinke, 1991). Los análisis de concentraciones de clenbuterol en los diferentes tejidos fueron realizados por inmunoanálisis enzimático (EIA). Las muestras de tejido fueron tomadas de tres terneros durante el día anterior a la administración y a los 3.5 o 14 días después de su retirada. La tasa de eliminación de clenbuterol en el tejido pulmonar era dependiente del tiempo y las concentraciones del clenbuterol, descendiendo después de 14 días desde 76 µg/Kg a un nivel de menos de 0.8 µg/Kg, mientras que en el hígado las concentraciones clenbuterol disminuyeron de 46 µg/Kg a 0.6 µg/Kg dentro de los 14 días de la retirada.

Los niveles más altos siempre eran encontrados en el ojo: 118 µg/Kg, 57.5 µg/Kg y 15.1 µg/Kg después 0, 3.5 y 14 días de la retirada, respectivamente.

El clenbuterol es un simpático mimético, agonista de los receptores celulares de tipo β<sub>2</sub>-adrenérgicos. Provoca relajación del músculo liso y, por consiguiente, broncodilatación (Castelan, 1989; Su & Perng, 1991; Wheatley, 1982) y efecto tocolítico (Gastal, 1998). Pertenece al grupo farmacológico de los agonistas β<sub>2</sub>-adrenérgicos con los que comparte sus bien conocidas aplicaciones terapéuticas y a pesar de esto quizás, la faceta más conocida del

clenbuterol sea su aplicación como sustancia promotora de crecimiento, debido principalmente a su fácil administración, bajo coste, rapidez y potencia de acción.

Los agonistas  $\beta$ 2-adrenérgicos se utilizan por su acción broncodilatadora, tanto en medicina (Corrias, 1987; Di Gioacchino, 1987; Salvado, 1985; Yamamoto, 1990; Zain, 1987) como en veterinaria (Harkins, 2000; Kastner, 1999; Torneke, 1998; Genicot, 1995; Erichsen, 1994), para el tratamiento de diversas afecciones respiratorias y se comercializa bajo distintas presentaciones comerciales.

Su mecanismo de acción se inicia al unirse a los receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos, lo que activa la encima adenil-ciclasa y en consecuencia, incrementa la concentración intracelular del segundo mensajero cíclico adenosinamonofosfato (cAMP). A nivel del árbol bronquial estos hechos redundan en una inhibición del músculo liso al descender la concentración  $K^+$  y la actividad de la kinasa de la miosina de cadena ligera (Hopkinson, 2000; Hudman, 2000; Roets & Burvenich, 1993; Torneke, 1998).

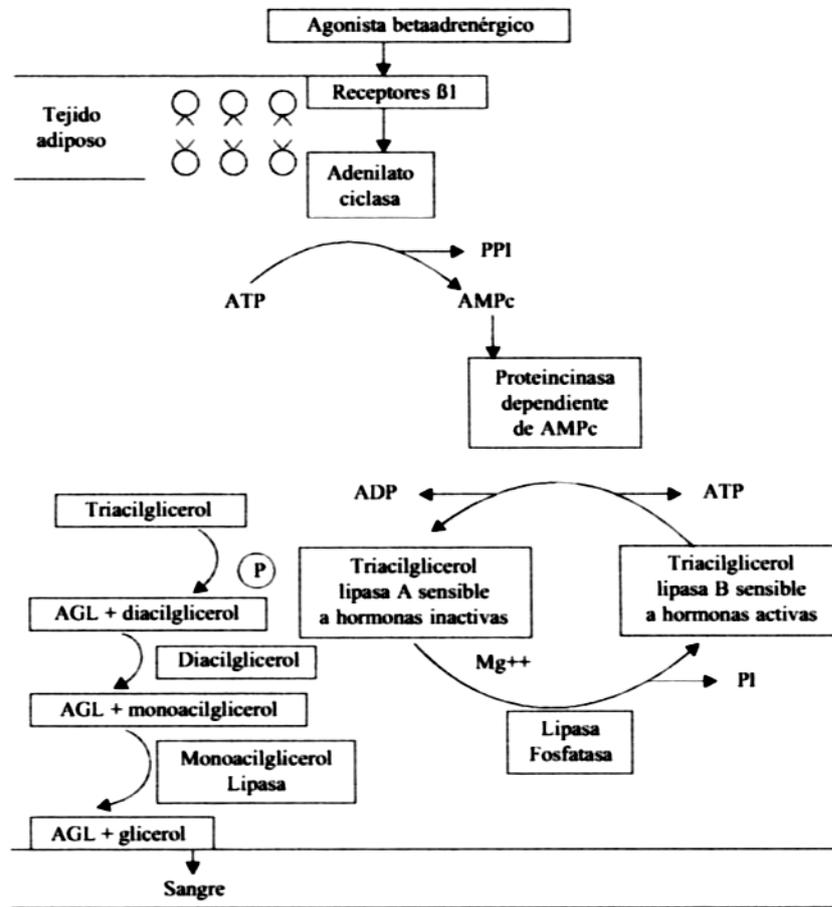
Como tocolíticos, su principal indicación es inhibir las contracciones del miométrio y facilitar la dilatación del canal genital en aquellos casos en que la obstetricia lo requiera (Bramuglia & Rubio, 2000; Gastal, 1998; Pieterse, 1995; Menard, 1994).

Posteriormente, se descubrió que a dosis diez veces superiores a las terapéuticas el clenbuterol presentaba una acción anabolizante, favoreciendo la síntesis de proteína y disminuyendo la de grasa, dando lugar a la denominación de este grupo como “agentes repartidores de energía”. Este efecto se comprobó en diferentes especies animales: vacuno (Ricks, 1984); ovino (Baker, 1984; Beerman, 1987); porcino (Jones, 1985), y pollos (Dalrymple, 1984).

Su empleo en la producción de carne ha derivado sobre todo de sus propiedades como agente repartidor, por su capacidad de repartir los nutrientes desde la grasa al músculo (Brockway, 1987; Re, 1997).

Numerosos estudios han confirmado el efecto anabolizante sobre el tejido muscular, mientras que sobre el tejido adiposo ejerce una acción marcadamente catabólica (Carter & Lynch, 1994; Spurlock, 1994; Wang, 1998; Yang & McElligott, 1989).

A nivel del tejido adiposo, estos compuestos activan los receptores beta adrenérgicos, concretamente el subtipo beta 1, activando la adenilato-ciclasa que convierte el ATP en 3'5'AMP, la cual promueve al activación de lipasas en el adiposito, para posteriormente liberar ácidos grasos a la sangre (Figura 7) (García-López, 2002).



**Figura 7.** Representación del mecanismo de acción de los betaagonistas.

Las consecuencias de la administración de clenbuterol sobre el metabolismo en general han sido ampliamente estudiadas (Blum & Flueckiger, 1988; Ge, 1999; Gojmerac, 2000; Hamano, 1999; Luthman & Jacobsson, 1993; Mersmann, 1987).

Entre las acciones reportadas destacan su efecto estimulante sobre el sistema cardiovascular y respiratorio (Hoey, 1995; Lee, 1998; Petrou, 1999; Wong, 1998; Wright, 1999), el incremento de la masa muscular (Bergen, 1989;

Byrem, 1998; Carter & Lynch, 1994; Hamano, 1998; Hamano, 1997; MacRae, 1988; Shindarska & Raicheva 1996; Williams, 1987), mientras que disminuye la masa del tejido adiposo (Bareille & Faverdin, 1996; Chwalibog, 1996; Lafontan, 1988; Petkova & Stanchev, 1996).

Sus efectos sobre la circulación sanguínea, corazón y lipólisis, han sido directamente correlacionados con la acción directa de estos agonistas sobre los receptores adrenérgicos, pero aún persisten bastantes dudas acerca del mecanismo por el que consiguen la acreción de proteínas. Por ejemplo, se conoce que el ractopamine influencia la síntesis proteica mediante la regulación pretranslacional (Grant, 1993; Helferich, 1990).

También se observó que el efecto del clenbuterol sobre la lipólisis y el corazón se realiza de forma independiente de su acción sobre la musculatura estriada, tal como se demuestra con la administración de antagonistas (Maltin, 1987; Sillence, 1993).

El tratamiento crónico con agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos inicialmente causa una hipertrofia de las fibras musculares tipo II, sin que se afecten las fibras tipo I; posteriormente existe una proliferación de células satélites hasta que la concentración de ADN recobra los niveles equivalentes del tejido antes del tratamiento (Criswell, 1996; Torgan, 1995).

Investigaciones recientes señalan el bloqueo de dos enzimas implicadas en el catabolismo y degradación de las proteínas (calpina I y II) (Higgins, 1988; Parr, 1992).

En el mercado existen otros agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos de larga acción similares al clenbuterol usados como promotores del crecimiento; entre éstos podemos destacar: el cimaterol, (Byrem, 1998; Eadara, 1989; Jones, 1985), ractopamine (Spurlock, 1994; Uttaro, 1993; Watkins, 1990; Williams, 1994), salbutamol (Hansen, 1997; Warriss, 1990). Otros agonistas tales como el brombuterol, cimbuterol, mabuterol, mapenterol, tulobuterol también han sido detectados como sustancias promotoras del crecimiento (Caloni, 1995; Groot, 1998; Haasnoot, 1998; Ramos, 1998; Sangiorgi & Curatolo, 1997).

El clenbuterol, junto con el cimaterol y la ractopamine quizás sean los agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos mas empleados y mejor estudiados en producción animal. El metabolismo del clenbuterol y sobre todo su persistencia en los productos cárnicos comestibles ha sido ampliamente estudiado, dado las consecuencias adversas que tienen la existencia de residuos estas sustancias en la sanidad alimentaria (Smith, 1998; Zalko, 1998; Brockway, 1987).

Entre estos efectos adversos destacan los derivados de una hiperestimulación del sistema cardiovascular (Hoey, 1995; Lee et al, 1998; Wong, 1998), y la interferencia sobre el sistema endocrino (Blum &

Flueckiger, 1988; Cardoso & Stock, 1998; Gojmerac, 2000; Sola, 1996). Respecto a este último aspecto ha sido especialmente estudiado el efecto del clenbuterol sobre la glándula adrenal (Blanco, 2000; Illera, 1998) donde estimula la producción de catecolaminas y estimula la respuesta de estrés. Las repercusiones de los tratamientos con clenbuterol en el sistema inmune han sido estudiadas en los trabajos de Blanco, (2000) y Spencer & Oliver (1996) encontrando que el clenbuterol tuvo un efecto negativo sobre la respuesta inmune.

Las consecuencias de la administración del clenbuterol sobre el aparato genital han sido consideradas en la hembra por los trabajos de Biolatti, 1994 y 2000, mientras que los efectos sobre el testículo apenas han sido considerados aún teniendo en cuenta los trabajos de Groot, 1998 en los que se apuntaba una disminución del tamaño testicular junto a un incremento del intersticio en ternero alimentados con dosis anabolizantes de clenbuterol. La acción del clenbuterol sobre el testículo estaría correlacionada con la presencia de receptores  $\beta_2$  adrenérgicos en este órgano. De hecho, los receptores adrenérgicos  $\beta_1$  han sido sobre todo encontrados en las células de Sertoli (Heinderl 1981; Eikvar 1993), mientras que los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  han sido detectados en las células de Leydig (Moger, 1983; Anakwe, 1984; Poyet, 1987).

Damber & Janson (1978) encontraron que la administración de catecolaminas en ratas provocaba una disminución de los niveles hemáticos de testosterona. Biswas (1979) llegó a la conclusión de que la administración crónica de nicotina disminuye la producción testicular de testosterona a través de un incremento de las catecolaminas. Para Cooke (1982) es evidente que las catecolaminas juegan un importante papel en la regulación de la producción de testosterona por parte de las células de Leydig, en lo que coincidieron los estudios posteriores de Breuiller (1988).

Los trabajos de Johnson (1981) y Dubiel (1989) en el cerdo corroboraron también en esta especie la interferencia de las catecolaminas en la producción de testosterona y calidad del esperma.

A pesar de todas estas evidencias, pocos estudios están disponibles sobre los posibles efectos de los tratamientos anabolizantes con clenbuterol sobre la estructura y función testicular, máxime teniendo en cuenta la potencial interferencia de los residuos de estos tratamientos en la espermatogénesis en la especie humana.

La preocupación por el hecho de que residuos de estas sustancias se introdujeran en la cadena alimenticia, además de las implicaciones éticas que implican el empleo agonistas adrenérgicos sobre bienestar animal llevó a la Comunidad Europea a prohibir el uso del clenbuterol como agente

promotor del crecimiento (EC Directive, 1996). No obstante, a pesar de la citada prohibición las consecuencias en la salud humana del uso del clenbuterol como anabolizantes en la alimentación animal pasó de ser una hipótesis a materializarse en varios casos de intoxicaciones en Italia (Brambilla, 2000; Sporano, 1998) y España (Bilbao, 1997; Galmes, 1995; Salleras, 1995; Martínez-Navarro, 1990). A esto hay que añadir la casuística de muestras positivas al clenbuterol que se siguen detectando en los programas de seguimiento de la presencia de residuos en los alimentos (Kellermann, 1996; Kuiper, 1998; Mitchell, 1998) y que justifican la atención que debe mantenerse por el uso ilícito de esta sustancia.

La utilización de estos compuestos a dosis tan elevadas favorece la aparición de depósitos de los mismos en diferentes órganos. Estos acúmulos pueden originar intoxicaciones en las personas que consuman dichos tejidos, cuando el período de retirada del fármaco, no ha sido el suficiente como para que desaparezca totalmente de los productos destinados a consumo humano.

En la Unión Europea, la Directiva 96/22/CE establece que los  $\beta$ -agonistas sólo están autorizados para tratamientos de afecciones respiratorias en équidos criados para distintos fines de la reproducción de carne, y como tocolíticos, siempre bajo prescripción veterinaria, quedando prohibida la posesión, por parte de los ganaderos, de cualquier medicamento

que contenga dichos compuestos. Los primeros casos de intoxicación descritos en España aparecieron en Córdoba y Vizcaya en 1989 y en 1990, Martínez Navarro describió un brote de intoxicación por clenbuterol en personas que habían consumido hígado de vaca. Los síntomas, con un período de latencia de entre 30 min. y 6 h, se caracterizaban por la aparición brusca de temblores musculares, palpitaciones, taquicardia, nerviosismo, cefaleas y mialgias, dichos síntomas tenían una duración de 40 h.

En 1992 apareció un nuevo brote en Palma de Mallorca, en 1993 en Barcelona y en 1994 y 1995 en Madrid. Aunque en el año 1996 y 1997 no se han registrado intoxicaciones en personas, los datos procedentes de los controles realizados por las autoridades sanitarias dentro del PNIR publicados por la Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo reflejan que el nivel de fraude es superior a los resultados oficiales (Información Veterinaria, 16, 1997).

Además de las consideraciones ya citadas sobre el uso del clenbuterol como promotor del crecimiento en producción animal, habría también que considerar su posible administración en medicina humana ante desordenes musculares (lesiones deportivas, envejecimiento, caquexias) y en obesidad.

Lamentablemente en muchas ocasiones su aplicación desborda su legítimo uso farmacológico, por lo que no es raro encontrar al clenbuterol implicado en casos de doping deportivo (Spann & Winter, 1995; Wadler, 1994; Beckett, 1992), o complementos dietéticos para la musculación (Kintz, 2000; Delbeke, 1995).

### **III. Dexametasona**

La Dexametasona es un potente análogo sintético de los corticoides naturales, hormonas sintetizadas por la corteza adrenal, la cual está regulada por la ACTH hipofisaria, liberada de forma pulsátil y con un ritmo circadiano. Estos tienen una larga historia en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades metabólicas y de desórdenes inflamatorios. Esta variedad de usos terapéuticos refleja el amplio espectro de las acciones farmacológicas de las hormonas corticoesteroides.

#### **III.1. Estructura Química y Actividad Farmacológica**

La cortisona fue el primer corticoide utilizado por sus acciones antiinflamatorias. Sin embargo los efectos colaterales referentes a la retención de sodio, efectos metabólicos, tales como una reducción en la tolerancia a los carbohidratos, y otros indujeron a tratar de sintetizar nuevos esteroides con

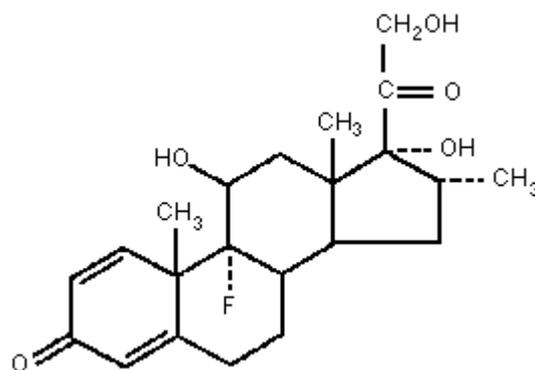
elevados efectos antiinflamatorios, y disminución de las propiedades farmacológicas indeseables.

En general se ha conseguido un incremento marcado en la actividad antiinflamatoria con una evidente disminución de las acciones sobre la retención de sodio y agua; sin embargo las acciones sobre el metabolismo hidrocarbonado y proteico parecen seguir caminos similares, paralelos. (Norton, 1965; Moskovtchenko, 1976; Lechat, 1975). Teniendo en cuenta los cuatro anillos que componen el núcleo corticoide, se han realizado varias modificaciones sintéticas o semisintéticas (Bork, 1971; Simons, 1980).

Las modificaciones más importantes en la estructura química de la hidrocortisona, tienden a incrementar la actividad antiinflamatoria y disminuir las acciones mineralocorticoides (Lechat, 1975; Moskovtchenko, 1976). Con pequeñas modificaciones aumentamos la potencia y vamos disminuyendo la acción mineralocorticoidea. La molécula de cortisol, glicosteroidal y distintas modificaciones a su estructura química son las que darán cuenta de la distinta potencia y la distinta actividad de los preparados sintéticos de glucocorticoides. Si a la estructura del cortisol le introducimos un doble enlace en posición 1 y 2 del anillo A tenemos la prednisolona, vemos que esta simple adición de un doble enlace nos va a aumentar la

potencia antiinflamatoria y a su vez va a prolongar la vida media del corticosteroide.

Si a esta estructura le adicionamos además un átomo de flúor en posición 9 del anillo B tenemos la triammanolona, aumentando todas las actividades biológicas tanto glucocorticoideas como mineralocorticoideas. Si además le introducimos en el anillo D un metilo tenemos la dexametasona o la beclometasona se elimina la capacidad de retener sodio. La Dexametasona presenta en el anillo D la metilación en C16 o la hidroxilación aumenta marcadamente la potencia antiinflamatoria. La presencia de un grupo hidroxilo en C17, en posición alfa, es indispensable para el mantenimiento de las acciones antiinflamatorias de todos los corticoides. La Dexametasona se caracteriza por la Fluoración en C19.



Estructura química de la dexametasona (C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>FO<sub>5</sub>)

En la clasificación de los glucocorticoides según potencia podemos hablar de vida media corta cuando el efecto biológico dura alrededor de 8-12 hrs, de acción intermedia cuando dura de 12-36 hrs y de acción larga cuando el efecto dura más allá de 36hrs.

a) **Acción corta:** Tenemos al cortisol y cortisona (glucocorticoides naturales). El cortisol es el glucocorticoide a partir del cual se comparan los distintos preparados sintéticos. Si tomamos como referencia el cortisol, la cortisona tendría menor efecto mineralocorticoideo y menor efecto antiinflamatorio. La cortisona tendría menor efecto mineralocorticoideo y antiinflamatorio.

b) **Acción Intermedia.** La prednisona que es el glucocorticoide más utilizado vemos que la potencia de acción es bastante alta en comparación con el cortisol 0.8, pero tiene 4 veces más potencia antiinflamatoria. rednisolona tendría los mismos parámetros respecto a la prednisona. La prednisona es inactiva, requiere metabolización hepática para activarse. La metilprednisolona que es otro glucocorticoide sintético que se utiliza ampliamente tiene menor potencia de retención de sodio que el cortisol (tiene la mitad), también tiene un poco más de potencia

antiinflamatoria con respecto a la prednisona, pero tiene la ventaja de menor efecto de retención de sodio.

c) **Acción larga.** Tenemos la dexametasona, la cual no tiene efecto de retención de Na y La potencia antiinflamatoria es 25 veces mayor respecto al cortisol.]

### **III.2. Farmacocinética (Absorción, Transporte, Metabolismo, Excreción)**

La hidrocortisona y sus congéneres, sintéticos y semisintéticos, se absorben bien cuando se los administra por vía oral (Binder, 1969). Las sales solubles de hidrocortisona, (succinato sódico), dexametasona, betametasona (fosfato sódico), y otros corticoides sintéticos también se absorben rápidamente cuando se los utiliza por vía intramuscular, llegando al torrente circulatorio en pocos minutos, pudiendo utilizarse también la vía intravenosa. Los ésteres insolubles, acetatos, y acetonida, se utilizan en suspensión acuosa, para retardar la absorción y prolongar su acción terapéutica. La aplicación local en los espacios sinoviales es también factible. En su forma tópica, los GCC, son utilizados en terapéutica dermatológica. Aunque se absorben por piel, sobre todo cuando se realizan curas oclusivas, es sumamente raro que se observen signos de hipercorticismos administrados

por esa vía. Aplicados en la conjuntiva, y sobre la córnea, ejercen acciones locales pasando además al humor acuoso. Una vez absorbidos, los GCC, circulan en plasma en dos formas: unidos a proteína (90% y más), y libre. La proteína por la que tienen mayor afinidad es la alfa globulina, llamada transcortina. Cuando la transcortina se satura, se unen a la albúmina, y también a la alfa 1 glucoproteína ácida. La Beclometasona, es un GCC de acción local, se lo utiliza exclusivamente en aerosol, vía inhalatoria, para el tratamiento crónico del asma bronquial; o en la mucosa bucal para el tratamiento de la rinitis alérgica. Su absorción a través de las mucosas respiratorias es muy escasa o nula y por lo tanto carece prácticamente de acciones sistémicas (Jonson, 1996). En la rinitis, especialmente, la beclometasona, desarrolla una acción descongestiva, posiblemente por acción directa o por su efecto permisivo, potenciando las acciones de las catecolaminas. En tratamientos crónicos, la beclometasona por su efecto inmunosupresor local, puede originar el desarrollo de infecciones a pseudomonas, o candidiasis orofaríngea, por ejemplo, cuya evolución puede ser peligrosa, por lo que debe vigilarse estrechamente al paciente en tal sentido. Todos los GCC activos tienen una doble ligadura entre C4 y C5 y un grupo cetónico en C3. La reducción de ese doble enlace y la reducción del grupo cetónico por hidroxilación da origen a los tetrahidroderivados

(Tetrahydrocortisol y Tetrahydrocortisona, para el cortisol y cortisona respectivamente). En el hígado principalmente y también en el riñón, se combinan a través del grupo hidroxilo de C3, con ácido glucurónico o sulfatos, formándose ésteres soluble que se excretan fácilmente por la orina. Los tetrahydroderivados pueden sufrir también reducción en C20, (transformándose el cortisol en cortol y la cortisona en cortolona), formando los 17-hidrocorticosteroides, que son metabolitos sin actividad corticoidea. La oxidación de los corticoides a nivel del hidroxilo del C17, origina los 17-cetoesteroides, metabolitos de nula actividad corticoidea y muy débil actividad androgénica. La vía de excreción más importante es la urinaria (Weil, 1939). Los GCC sintéticos son metabolizados y excretados en forma similar (Hogger, 2003).

### **III.3. Efectos Farmacológicos**

Como todas las hormonas esteroidales, el mecanismo de acción en los distintos órganos efectores es mediante la incorporación del esteroide al interior de la célula. El receptor es intracelular. Actualmente se han descrito 2 tipos de receptores: uno más específico para glucocorticoides (que es el receptor nº 2) y el nº 1 que es más específico para los mineralocorticoides. Una vez que se introduce a la célula el corticosteroide se une al receptor, se

activa el complejo, penetra a nivel del núcleo donde va a ejercer su acción, la cual consiste en estimular la síntesis, la transcripción del DNA con la producción de diversas enzimas. Y la enzima que se estimula va a depender de la célula donde actúa el cortocosteroide (Munck, 1964).

Los corticosteroides tienen 4 acciones farmacológicas: (Siegel, 1985)

## **1º Metabolismo**

### **a) Metabolismo de los hidratos de carbono:**

La administración de los GCC, estimula la gluconeogénesis, la glucogénesis, y eleva la glucosa y el piruvato sanguíneos (acción hiperglucemiante de los glucocorticoides) (Zicha, 1966). El incremento de la gluconeogénesis ocurre a partir de las proteínas principalmente (Ryman, 1971).

Debido al efecto antianabólico de la hidrocortisona, aumentan los aminoácidos plasmáticos, siendo desviados desde los tejidos, sobre todo músculo estriado, al hígado donde son en gran proporción transformados en glucosa. También puede ocurrir aumento del glucógeno hepático y una menor utilización periférica de la glucosa. La administración de altas dosis de GCC, por períodos de tiempo prolongado, es capaz de desencadenar un estado diabético (diabetes metacorticoidea) (Delaunay, 1997; Nicod, 2003;

Tappy, 1994), que se caracteriza por un aumento de resistencia a la insulina e inhibición de su secreción (Gremlich, 1997; Lambillotte, 1997). En los pacientes diabéticos, la administración de GCC puede agravar el cuadro clínico, por lo que el médico tratante debe proceder con cautela, utilizando los métodos de control adecuados. En el hígado, inducen la síntesis de las enzimas que intervienen en la gluconeogénesis y en el metabolismo proteico (Stalmans, 1979; Stalmans, 1987).

**b) Metabolismo proteico:**

Los GCC disminuyen la utilización de los aminoácidos para la síntesis proteica (efecto antianabólico) aumentando la desaminación y conversión de los aminoácidos en glucosa (gluconeogénesis) (Ichii, 1971). Aumenta la excreción urinaria del nitrógeno, observándose, un balance negativo del mismo.

Debido a estas alteraciones del metabolismo proteico, pueden ocurrir, como dijimos, modificaciones patológicas en el sistema muscular (miopatía y disminución de la masa muscular) (Kaminski, 1994; Rouleau, 1987), o en los huesos (osteoporosis por reducción de la matriz proteica y pérdida de calcio posterior) (Lukert, 1995; Gennari, 1985; Adams, 1981; Lukert, 1976; Suzuki, 1983; Dempster, 1989; Reid, 1988; Skosey, 1970). La movilización de

aminoácidos desde tejidos periféricos hacia el hígado, acción catabólica, puede producir efectos patológicos indeseables, que deben evaluarse. Este sería el origen de la osteoporosis que pueden provocar los GCC, por reducción de la matriz ósea proteica y pérdida consecutiva de calcio. El mismo mecanismo, movilización periférica de aminoácidos, puede originar el típico adelgazamiento de la piel, la disminución de la masa muscular (miopatía corticoidea), la atrofia linfoidea y el balance negativo de nitrógeno. Por lo tanto, los GCC estimulan la glucogénesis hepática, inhiben la síntesis periférica de proteínas y estimulan la síntesis de enzimas en el hígado como la glucosa glucosa 6 fosfatasa (Khan, 1995), fructuosa 6 difosfatasa y fosfoenol piruvato-carboxiquinasa (Levine, 1970; McMahon, 1988). Por acción de los GCC, la eliminación de ácido úrico, aumenta, pudiendo gracias a este efecto ser de utilidad en el tratamiento de la gota.

**c) Metabolismo lipídico:**

La oxidación, síntesis, movilización y depósito de la grasa, es influenciada por los GCC. La administración crónica de estos agentes produce un síndrome de hiperfunción suprarrenal o de Cushing .), que se caracteriza por alteraciones en la distribución de los lípidos, que se depositan sobre la unión cervico dorsal de la columna (jiba de búfalo), en la fosa

supraclavicular, y en la mejilla (cara de luna llena), también en hígado y en tronco; pero por otra parte disminuyen en las extremidades (Boyle, 1993; Crapo, 1979). Los GCC ejercen una acción "permisiva" en los procesos de lipólisis provocado por otras hormonas, pero tiene escasa o nula actividad lipolítica por sí mismos. Esta acción permisiva se ejerce claramente en la lipólisis de los triglicéridos, provocada por agentes adipocinéticos como las catecolaminas, por ejemplo, o péptidos de la adenohipófisis. La respuesta lipolítica al AMPc, que estos agentes estimulan, resulta influenciada por los GCC. Las células grasa de tejido subcutáneo de brazos y piernas son sensibles a los GCC y a la acción movilizadora de las catecolaminas. La lipogénesis se inhibe porque la entrada de glucosa a la célula es bloqueada por los GCC. Por otro lado el tejido subcutáneo del abdomen y de la almohadilla dorsal, sufre lipogénesis cuando se administran GCC (Laguna, 1967).

## **2º Acciones sobre la hematopoyesis y las células sanguíneas:**

Estas acciones de los GCC, se encuentran claramente interrelacionadas con sus efectos antiinflamatorios, antialérgicos, inmunosupresores, y sobre las respuestas inmunitarias.

En tal sentido serán considerados tratando de evitar repeticiones. Los GCC, producen un aumento del número de glóbulos rojos circulantes y de las células eritroides medulares. Producen también una disminución de los linfocitos, eosinófilos, monocitos, y basófilos circulantes, y un aumento de los neutrófilos.

- **Glóbulos rojos:** El efecto eritropoyético es indirecto, previa estimulación de la producción renal de la eritropoyetina por los GCC. En ratas normales infundidas por vía intravenosa continua durante 8 hs. con dexametasona, se demostró un rápido y marcado incremento del número de células eritroides de médula ósea, y de los reticulocitos circulantes. Estos efectos eritropoyéticos fueron totalmente suprimidos en ratas con nefrectomía bilateral (el riñón es el órgano primario en la producción de eritropoyetina), con ratas normales a las que previamente se les administró anticuerpos a eritropoyetina (Malgor, 1974). El efecto eritropoyético, también fue observado en cultivos de células eritroides medulares (CFUe), de 48 hs. De duración y en ratas anémicas con IRC (Malgor, 1987). Se sugiere también la existencia de una acción permisiva de los GCC, incrementando las acciones de la Eritropoyetina sobre las células eritroides, además de su acción estimulante de la producción renal de esta hormona.

- **Linfocitos:** En el hombre la administración de GCC, produce una linfocitopenia transitoria (máxima a las 4-6 horas, retornando a lo normal a las 24 horas.). Este efecto ocurre principalmente por una redistribución de los linfocitos, que pasan a otros compartimientos extravasculares, por la acción GCC, la linfocitopenia ocurre a expensas de los Linfocitos T de larga vida, que son los que sufren una redistribución y disminución, saliendo del "pool" recirculante intravascular. Por este mecanismo los GCC, desarrollan parcialmente sus acciones inmunosupresoras y previenen el rechazo de injertos, ya que la redistribución afecta a los linfocitos T sensibilizados con alloantígenos. Los GCC producen una evidente acción linfólítica, sobre tejido linfoide y linfocitos de ratas y ratones (especies corticoide-sensibles). También se ha relacionado a la dexametasona con la apoptosis de linfocitos T (Owens, 1991) y en raza murina dependientes de interleuquina 2 (Perrin-Wolff, 1996).

Las células de la leucemia linfoblástica aguda, de algunos linfomas y de otras neoplasias linfoides, sufren sin embargo una acción lítica por efecto de los GCC, resultando destruidas tal vez, por un mecanismo análogo al desencadenado sobre el tejido linfoide de los roedores. Esta acción linfólítica

de los GCC. Determina su indicación en varios procesos malignos del sistema linfóide del ser humano.

- **Monocitos-macrófagos:** Los GCC. Producen una disminución de monocitos-macrófagos. La monocitopenia es transitoria y ocurre por redistribución principalmente. Los GCC, producen también una disminución de la capacidad de adherencia de los monocitos-macrófagos, de su circulación y de su capacidad fagocitaria y de citotoxicidad. (Linden, 1994; Martinet, 1992; Standiford, 1992; Borish, 1992; Breuninger, 1993).

- **Eosinófilos:** La eosinopenia que provocan se debe también a una redistribución, pasando estas células a espacios extravasculares, como el pulmón o el bazo. En los estados alérgicos se produce una eosinofilia por un incremento de la entrada de eosinófilos desde los espacios extravasculares hacia los vasos sanguíneos y también por un aumento de salida de eosinófilos de la médula ósea. Esto ocurre por la acción de quimiotácticos que atraen eosinófilos, como el factor quimiotáctico de eosinófilos en la anafilaxia, algunas linfoquinas, factores derivados del complemento, leucotrienos y la histamina, que también posee actividad quimiotáctica para eosinófilos. Los GCC, además de provocar una redistribución, también inhiben la acumulación local de eosinófilos (Meagher, 1996) y la quimiotaxis

en general (Kita, 1991; Evans, 1990; Lamas, 1991; Wallen, 1991). También inhiben su capacidad de adherencia, la entrada desde los tejidos y la salida desde médula ósea (Van De Stolpe, 1993).

- **Basófilos:** Los GCC disminuyen el número de basófilos circulantes. Posiblemente debido a su pequeño número, se sabe poco de la cinética de los basófilos circulantes, por lo que el mecanismo de acción de los GCC sobre estas células, no ha sido aún aclarado suficientemente.

- **Neutrófilos:** Los GCC producen un aumento transitorio de neutrófilos circulantes (neutrofilia) (Malech, 1987). Ello ocurre por los siguientes mecanismos:

- Disminución de su adherencia al endotelio, impidiendo su acumulación en el área inflamada (Cronstein, 1992).

- Aumento de la salida de neutrófilos de la médula ósea hacia la circulación (Perretti, 1993).

- Prolongación de la vida media de los neutrófilos (Cox, 1995; Meagher, 1996).

- La inhibición de la acumulación de los neutrófilos en el área inflamada es posiblemente uno de los mecanismos más importantes de la acción antiinflamatoria de los GCC (Burton, 1995, Borregaard, 1987).

### **3º Acción antiinflamatoria**

Es posiblemente la acción de mayor trascendencia de los GCC y la que genera su amplia utilización la que origina su efecto beneficioso en numerosas patologías y también la que es capaz de desencadenar verdaderos desastres terapéuticos (Talar-Williams, 1994) cuando su uso es irracional o indiscriminado (Imam, 1994). La acción antiinflamatoria (Barnes, 1998; Herrlich, 2002) de los GCC es evidente a nivel Macroscópico, disminuyendo rápidamente el rubor local, el calor, el dolor y la tumefacción, signos clásicos fundamentales de la inflamación. Son también evidentes a nivel microscópico, disminuyendo la acumulación de líquidos en el área inflamada (edema), el depósito de fibrina, la dilatación capilar, la migración de leucocitos al área inflamada y la actividad fagocítica. También se inhiben, las manifestaciones tardías de la inflamación (proliferación capilar y de fibroblastos, depósito de colágeno y más tarde la cicatrización). Debe considerarse como fundamental el concepto que los GCC son agentes paliativos y nunca curativos. La inflamación es un signo o un síntoma que ocurre en respuesta a la acción etiológica de una noxa determinada. Actúan siempre sobre el efecto, la inflamación y no sobre los agentes etiológicos. De ahí que su acción sea paliativa o supresora, y no curativa. Así, los glucocorticoides pueden suprimir la inflamación que acompaña un proceso

infeccioso, pero como no actúan sobre el agente bacteriano o viral, la infección puede progresar rápidamente agravando el cuadro preexistente. De la misma manera una úlcera péptica puede avanzar significativamente y perforarse o producir una hemorragia digestiva grave, sin producir signos clínicos importantes por la acción antiinflamatoria paliativa. Estos ejemplos deben servir para inducir un manejo prudente y farmacológicamente racional de los GCC, ya que pueden ponerse en peligro la vida de los pacientes de no tenerse en cuenta ese concepto fundamental.

Mecanismo de la acción antiinflamatoria: Los efectos antiinflamatorios de los GCC, son complejos y dependen de varios efectos sobre factores humorales y celulares (Barnes, 1993; Goulding, 1993). La acción más importante de los GCC en la inflamación, posiblemente sea la capacidad de estos agentes de inhibir la movilización o el reclutamiento de neutrófilos y monocitos macrófagos en el área inflamada. Esto ocurre principalmente porque los GCC inhiben o bloquean los efectos del MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos) (Calandra, 1995), producido por los linfocitos activados (Bloom, 1966) (previamente sensibilizados a un antígeno). No inhiben la producción sino los efectos del MIF, permitiendo la migración de los macrófagos y su falta de acumulación en el sitio de la inflamación. Por otra parte los GCC inhiben la producción de PAF (factor activador de

plasminógeno) también liberado por los linfocitos activados en la inflamación. El PAF, que es una enzima, convierte el plasminógeno en plasmina o fibrinolisisina, produciendo una hidrólisis de la fibrina y posiblemente de otras proteínas, con lo que facilitan la entrada de los leucocitos al área inflamada. Al inhibir el MIF y el PAF no sólo impiden su acumulación o aglutinación, sino también el acceso directo al sitio de la inflamación. Los GCC también producen efectos, interfiriendo en el enlace o unión de diferentes factores a sus receptores celulares. Por eso, aunque la producción de factores quimiotácticos continúe normalmente, los GCC impiden la interacción entre el factor quimiotáctico específico y la célula (los neutrófilos por ejemplo). La producción de anticuerpos (Ac), principalmente Ig G, (75% del total de Igs del suero) no es afectada por los GCC. Solamente en el caso de dosis altas y durante un tiempo prolongado, puede comprometerse la síntesis de Ac por el aumento del catabolismo proteico, pero no por una acción directa. Los GCC pueden en cambio, interferir, inhibiendo la unión o el enlace del Ac o el complemento con la célula blanco y al receptor Fc para Igs. Estos receptores están en la superficie celular de linfocitos, monocitos-macrófagos y otras células. Los macrófagos que poseen receptores para Ig G, en la porción Fc, son llamados "macrófagos armados", puesto que dichos receptores constituyen el arma que tienen estas células

para desarrollar las acciones citotóxicas. En la unión de estos receptores con el Ac o el complemento, es donde se manifiestan los efectos de los GCC.

Los GCC finalmente, inhiben la formación de prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs) (Dworski, 1994) y la liberación de histamina. Estos son importantes mediadores de la inflamación, el dolor y la fiebre. Los GCC inhiben la enzima Fosfolipasa A2 (Dennis, 1994), (en realidad inducen la síntesis de una proteína inhibidora de fosfolipasa A2). En la cascada metabólica que termina con la síntesis de las PGs y LTs es necesaria la acción de la fosfolipasa A2 que actúa sobre los fosfolípidos de las membranas celulares para liberar ácido araquidónico. Sobre el ácido araquidónico actúa la ciclooxigenasa para iniciar la formación de PGs (Newton, 1997) y la lipooxigenasa que inicia la síntesis de los LTs. El leucotrieno B4 (LTB4) es un potente quimiotáctico para neutrófilos. Los LTC4 y LTD4 son los componentes de la sustancia de reacción lenta en la anafilaxia (SRS -A) y son potentes vasodilatadores y broncoconstrictores. A su vez las PGs y tromboxanos son importantes mediadores del dolor y la inflamación. Al inhibirse la acción de la fosfolipasa A2 por la acción de los GCC todas estas sustancias proinflamatorias no se producen o lo hacen escasamente. Los GCC también inhiben la liberación de histamina (degranulación de los mastocitos) (Cohan, 1989).

Esta acción posiblemente sea medida por un incremento de AMPc celular que producirían los GCC (Imai , 1993 )(acción demostrada en leucocitos humanos).

Es un hecho reconocido que todo aumento de AMPc en el mastocito, disminuye la liberación de histamina. Debe también considerarse como un mecanismo suplementario, que el aumento de AMPc también puede potenciar las acciones de las catecolaminas (mediante el aumento de la expresión de adenorreceptores  $\beta_2$ ), acción ésta permisiva, opuesta a los efectos de la histamina y leucotrienos. Todos estos efectos contribuyen, sin duda, en los complejos mecanismos antiinflamatorios de los GCC y son de gran importancia para el desarrollo de sus efectos antiinflamatorios.

#### **4º Acciones sobre tejidos linfoides y respuestas inmunológicas:**

Los GCC son agentes utilizados en inmunosupresión. Son útiles en algunos trastornos inmunológicos y ayudan a evitar el rechazo inmunológico de injertos. Su mecanismo de acción es también complejo. No tienen efecto sobre la producción de Ac que juegan un rol importante en los procesos inmunológicos y alérgicos (IgG e IgE), ni alteran el título de Ac circulantes.

Tampoco inhiben la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), pero si previenen la reacción inmunológica inflamatoria que se desencadena.

El efecto global de los GCC sobre las reacciones inmunológicas consiste en inhibir las manifestaciones de hipersensibilidad retardada, inmunoreacciones mediadas por células.

Como se ha expuesto anteriormente, los GCC disminuyen la disponibilidad de linfocitos (Owens, 1991 ) y monocitos-macrófagos en las reacciones de hipersensibilidad retardada. No poseen acción lítica celular, como ocurre en otras especies animales (salvo células neoplásicas ya que los GCC poseen una acción lítica sobre ciertas células neoplásicas, principalmente en leucemias agudas linfoblásticas, linfomas y algunos otros tumores linfáticos (de Castro, 1995)), sino que impiden el reclutamiento de leucocitos hacia la zona de contacto con el antígeno sensibilizante. Tampoco impiden el desarrollo de las células inmunes o de linfocitos ante la presencia de antígenos, ni la producción de linfoquinas como MIF, MAF, PAF, etc. Se oponen en cambio a los efectos de éstos mediadores, interfiriendo en la unión de estas sustancias con sus receptores celulares de superficie específicos.

En resumen, los siguientes mecanismos de los GCC contribuyen en el desarrollo de sus efectos inmunosupresores:

- Linfocitopenia: principalmente a expensas de linfocitos T, por redistribución de los mismos (Owens, 1991).
- Interferencia en la interacción entre anticuerpo (IgG) y/o complemento con la célula blanco, por alterar el receptor celular de superficie.
- Inhibición de la liberación y/o producción de algunas linfoquinas (MIF, PAF) necesarias para el reclutamiento de las células involucradas en la reacción inflamatoria.
- Inhibición de la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos-macrófagos, inhibiéndose la capacidad fagocitaria.
- Interferencia de las interacciones celulares entre linfocito-monocito-macrófago, impidiéndose la activación de los últimos.

# *Materiales y Métodos*

---

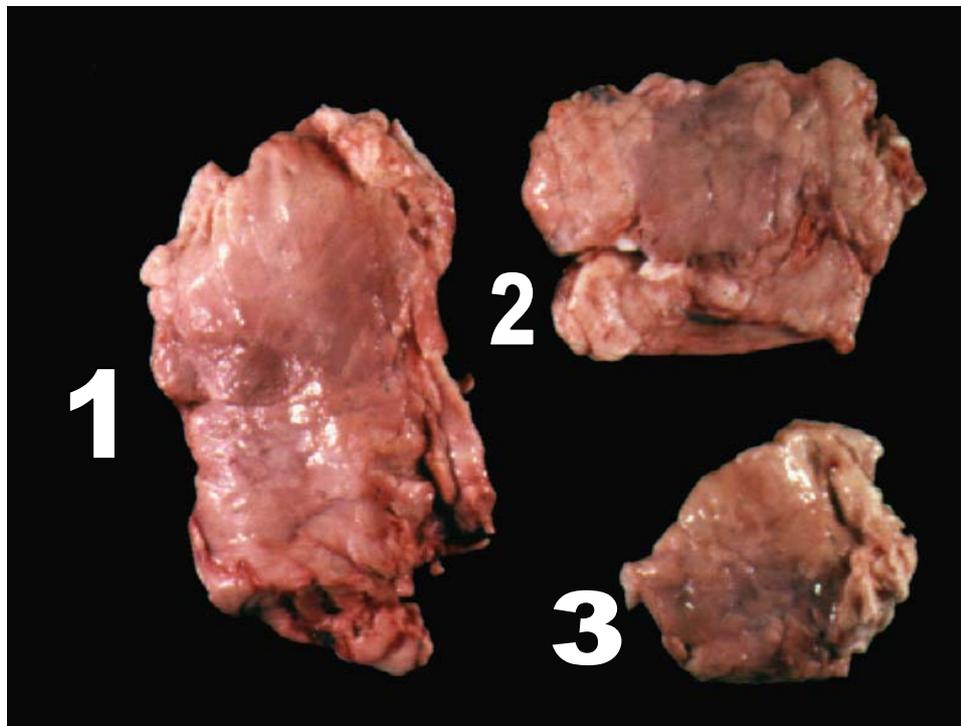
---

Este estudio fue realizado en 18 terneros machos Charolais x Retinto (de 12-14 meses de edad) asignados aleatoriamente en tres grupos experimentales:

- Grupo tratado con clenbuterol (A, n=6),
- Grupo con clenbuterol más dexametasona (B, n=6) y
- Grupo control (n=6).

Cada grupo de animales, con un buen estado de salud y sin historia anterior de enfermedad, fueron alojados en corrales independientes, y alimentados con comida comercial, paja y agua durante 8 semanas.

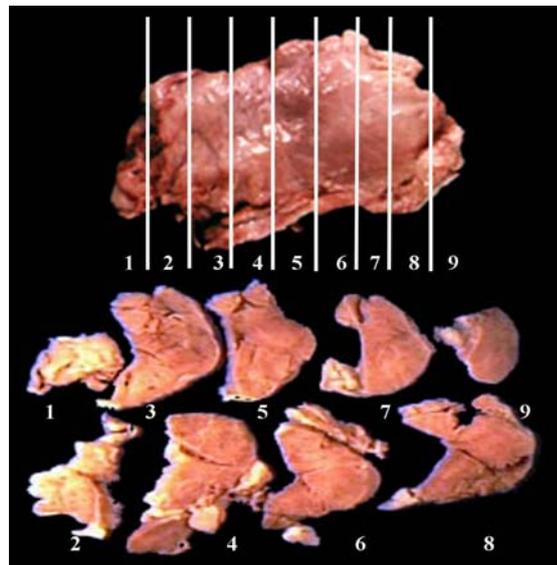
En ambos grupos tratados, el clenbuterol (sigma, St. Louis, MES, los EE.UU.) fue administrado intramuscular en una solución salina ( $20 \mu\text{g Kg.}^{-1}$  de peso corporal/día). En el grupo tratado con dexametasona (Voren, Boehringer Ingelheim GmbH, Alemania) esta fue administrada dos veces (7 y 14 días antes del sacrificio) mediante inyección intramuscular ( $2 \text{ mg}/100 \text{ Kg.}^{-1}$  del peso corporal).



**Figura 8:** Fotografías de los timos correspondientes a animales del grupo control (1), grupo clenbuterol (2) y grupo clenbuterol con dexametasona. (3).

Al final del período experimental los terneros fueron sacrificados y en un matadero autorizado, si bien, las canales de estos animales no fueron destinadas al consumo humano. Se extrajeron las porciones torácicas de los timos despreciando el resto por representar una cantidad no significativa. (Figura 8).

Inmediatamente después de la muerte, cada timo fue muestreado siendo cortado mediante un sistema de lonchas transversales (5 milímetros de grosor) a lo largo de la porción torácica del órgano. Las rebanadas se iniciaron al azar posiciones con respecto al timo y el intervalo entre las rebanadas era 45 milímetros, así que el número medio de lochasas por timo era ocho (rango 6-13). (Figura 9)



**Figura 9:** Representación del troceado del timo en rodajas (1-8) mediante secciones transversales.

## **I. Estimación del volumen Tímico.**

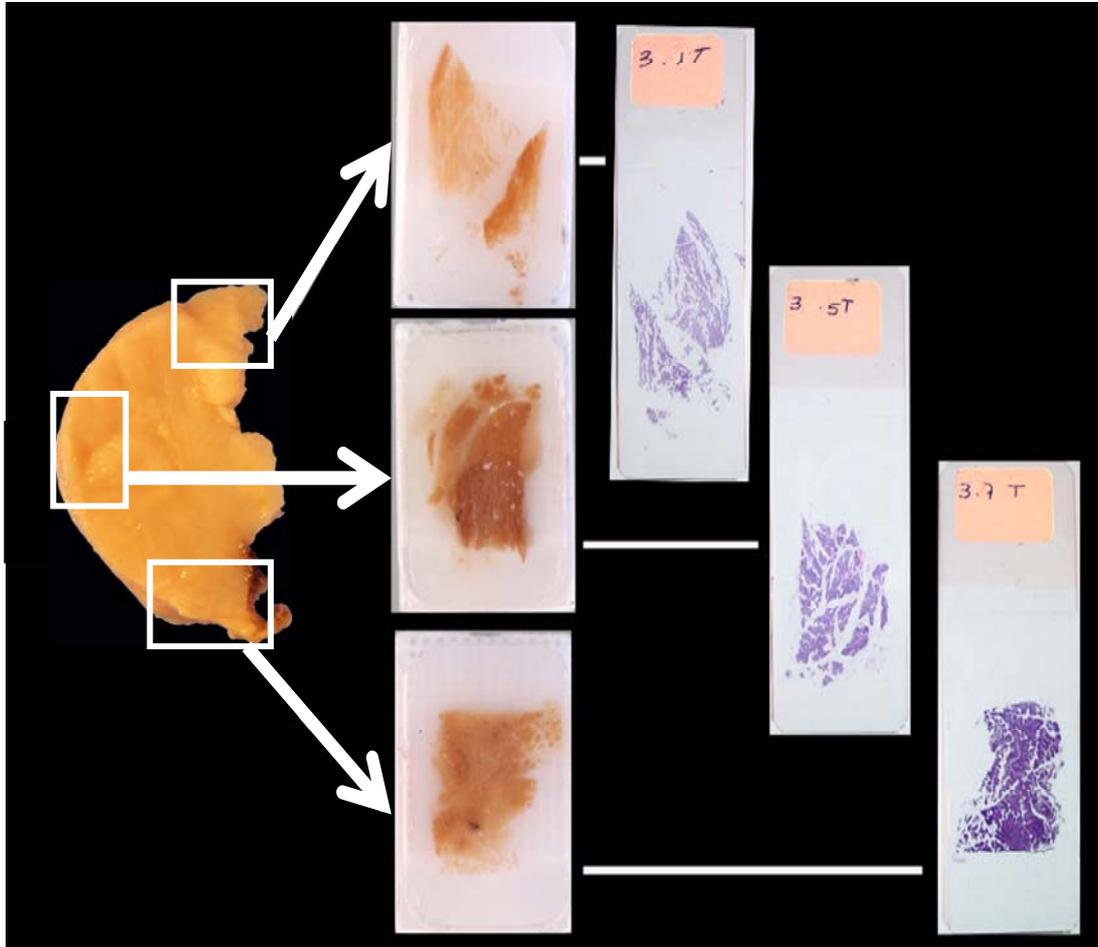
El volumen se estimó basándose en el principio de Cavalieri (1966), El volumen tímico era estimado de las áreas seccionadas transversalmente. El área fue estimada sobreponiendo un sistema test transparente de puntos sobre la cara craneal de cada loncha y contando el número de puntos que caían sobre la superficie de cada sección del órgano. El sistema test usado fue elegido previamente para asegurarse de que se estudiaran entre 80-100 puntos en el conjunto de las secciones de cada órgano. El cálculo era:

$$\text{estV} = \Sigma P(\text{thy}) \cdot a \cdot t,$$

Siendo estV es el volumen calculado,  $\Sigma P(\text{thy})$  es el número total de los puntos que recaen sobre el órgano,  $a$  es el área equivalente a un punto del test (en nuestro estudio,  $a = 1 \text{ cm}^2$ ), y  $t$  es la separación entre las cara de las secciones estudiadas (en nuestro estudio  $t = 50$  milímetros).

## **II. Procedimientos histológicos**

Para obtener los bloques necesarios para los procedimientos histológicos de cada rodaja tímica se corto al azar tres bloques de tejido de aproximadamente  $2 \times 1,5 \times 0,5 \text{ cm}$  como se esquematiza en la figura 10.



**Figura 10:** Representación esquemática de los bloques seleccionados y sus respectivos cortes histológicos.

Con el proceder antes descrito, de cada timo se obtuvieron 27 bloques aprox., de los cuales se eligieron uno de cada tres, comenzando por un número al azar 1,3,5,7 ..., por lo que fueron escogidos aproximadamente 8 bloques por timo para su procesamiento histológico.

## II.1. Microscopio óptico

Los bloques seleccionados fueron fijados en formaldehído tamponado al 10%, se deshidrataron mediante una gradación ascendente de etanol y fueron incluidos en parafina.

Las primeras secciones de cada bloque (4 $\mu$ m.) fueron teñidas con hematoxilina/eosina para su estudio estereológico e histopatológico.

## II.2. Microscopio Electrónico

De cada animal se escogieren al azar varias muestras que fueron fijadas en glutaraldehído al 4% en fosfato sódico 0,1 M, pH 7.4, durante 3 horas. Las muestras fueron posteriormente fijadas en tetroxido de osmio 1% búfer barbitol acetato, pH 7.0, deshidratado con gradientes de etanol e incluidas posteriormente resina epoxy eponaraldita.

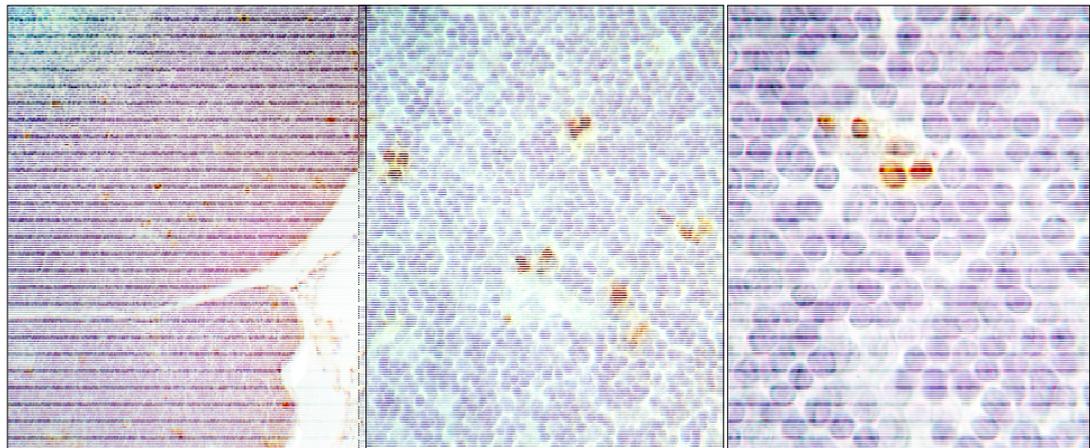


**Figura 11:** Imagen del ultramicrotomo y microscopio electrónico empleado en el presente estudio.

Las secciones fueron cortadas con el ultramicrotomo Ultracut de Reichert-Jung® y teñidos con citrato de plomo y uranil acetato y examinado en el microscopio Philips EM 280s a 80 kV.(Figura 11)

### II.3. Técnica de TUNEL

Molecular Biochemicals: In situ Cell Death Detection, POD) siguiendo los pasos recomendados por el fabricante. Después del lavado final en PBS, las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Harris, deshidratado con distintas gradaciones de alcoholes, aclarado con xileno y montado con resinas sintéticas. Los cortes fueron observados y fotografiados en un fotomicroscopio Leitz Ortholux para su estudio estereológico(Figura 12).



**Figura 12:** Imágenes histológicas de la técnica inmunohistoquímica de TUNEL a los distintos aumentos empleados, donde se muestra la tinción marrón que adquieren los timocitos apoptóticos.

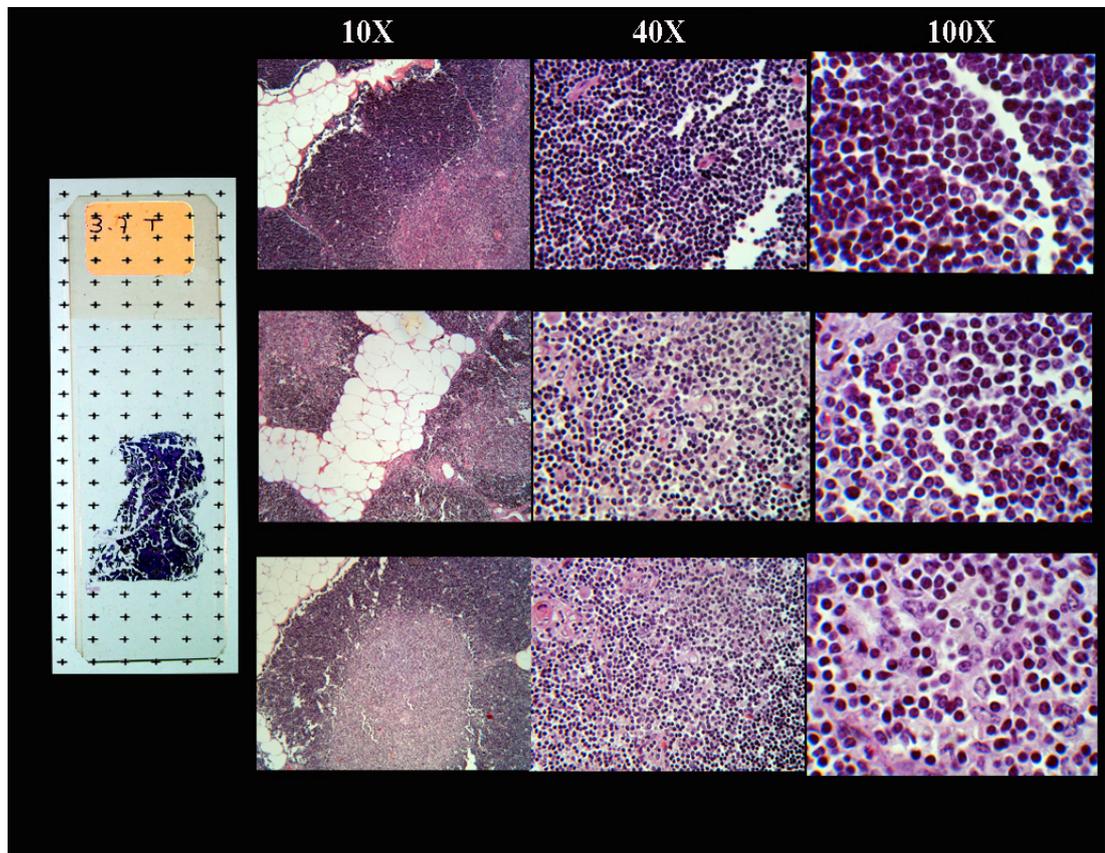
### **III. Procedimientos Cuantitativos**

El estudio cuantitativo se llevó a cabo mediante un sistema de análisis de imagen constituido por un microscopio triocular Leitz Ortholux conectado con un sistema informático digitalizador de imágenes por medio de una cámara de vídeo SONY SSC-C370P® y utilizando el programa informático Visilog 5®.

Los cortes histológicos de cada espécimen fueron muestreados de forma sistemática para seleccionar las imágenes microscópicas que fueron digitalizadas con objetivos de 10x, 40x y 100x. (Figura 12)

En cada sección se capturaron una media de 20 campos mediante la superposición de un sistema test de puntos, lo que, teniendo en cuenta el número medio de secciones por animal (8), contabilizaron una media 160 campos capturados por animal.

Las imágenes fueron almacenadas en formato de imagen digital “jpg” y numeradas consecutivamente en función del número de animal, sección y campo, para proceder posteriormente a su estudio analítico.



**Figura 12:** Esquema gráfico del estudio realizado a cada corte histológico.

### III.1. Procedimientos cuantitativos a escala tisular

#### 1º Fracción del volumen tisular.

El estudio incluyó la cuantificación de la fracción del volumen de la grasa y el parénquima tímico incluidos, mediante un sistema test integral de puntos separados regularmente, superponiendo estos sobre imágenes histológicas a bajo aumento en un monitor de color, usando el software Visilog 5®. Un subconjunto de aproximadamente 160 campos visuales

uniformemente seleccionados fueron contados por glándula. Así, fueron obtenidas las fracciones del volumen de:

$$\text{est } VV(\text{par/thy}) = \Sigma P(\text{par}) / \Sigma P(\text{thy}),$$

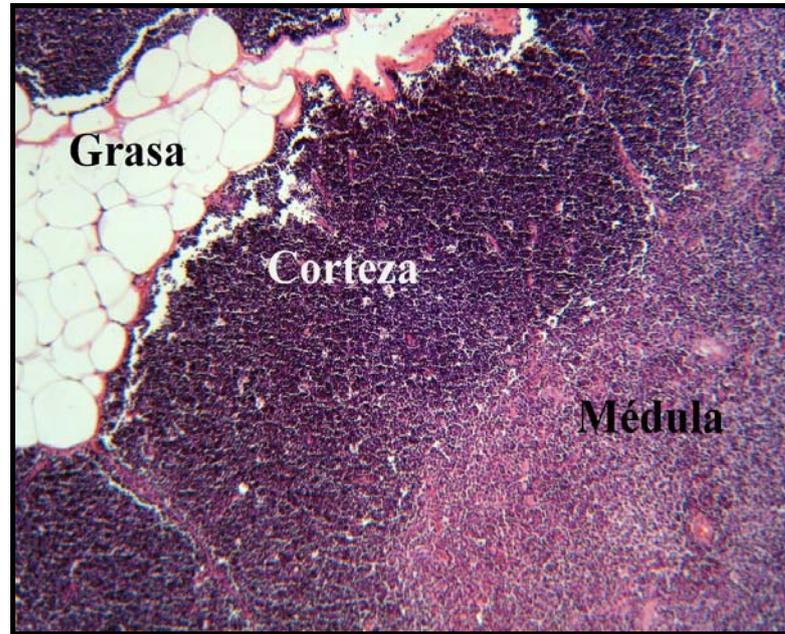
Siendo  $\text{est } VV(\text{par/thy})$  la fracción del volumen del parénquima y  $\Sigma P(\text{par})$  y  $\Sigma P(\text{thy})$  el número total de los puntos que interseccionan con el parenchyma y el timo, respectivamente.

Igualmente fueron calculadas las fracciones de volumen de la corteza y la médula del parénquima tímico

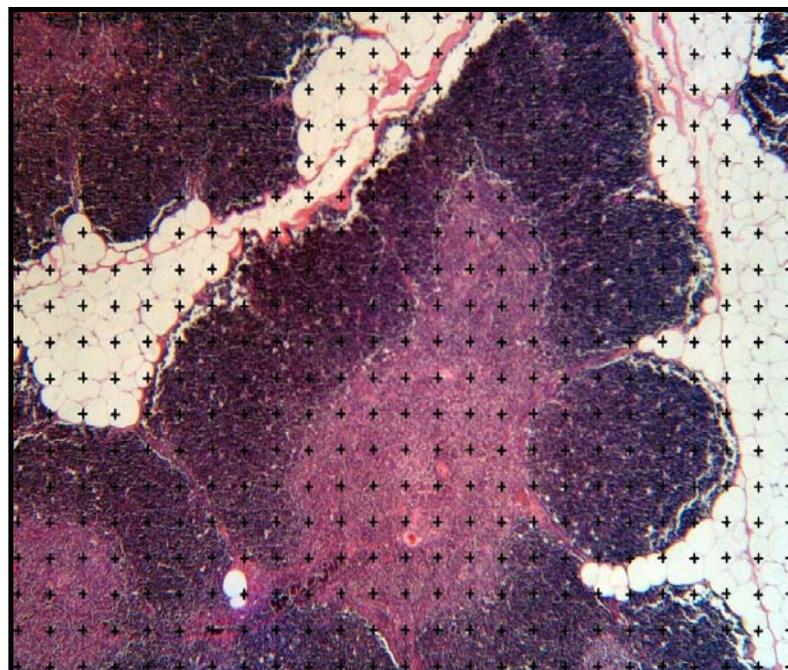
$$\text{est } V_v(\text{cort/par}) = \Sigma P(\text{cort}) / \Sigma P(\text{par}), \text{ y}$$

$$\text{est } V_v(\text{med/par}) = \Sigma P(\text{med}) / \Sigma P(\text{par}),$$

Siendo  $VV(\text{cort/par})$  y  $VV(\text{med/par})$ , son las fracciones de volumen cortical y medular, y  $\Sigma P(\text{cort})$ ,  $\Sigma P(\text{med})$ , y  $\Sigma P(\text{par})$  son el número total de los puntos que interseccionan con la corteza, la médula y el parénquima, respectivamente.



**Figura 13:** Imagen histológica donde se detalla la estructura básica del parénquima tímico.



**Figura 14:** Corte Histológico con superposición de la plantilla empleada para selección de los puntos a capturar.

### **III.2. Procedimientos cuantitativos a escala celular**

Los estudios cuantitativos fueron realizados usando un sistema de análisis de imagen que consistía en un microscopio triocular conectado por una cámara de vídeo a color con una computadora equipada con una tarjeta de video.

Cada sección fue muestreada de manera sistemática para seleccionar las imágenes microscópicas y posterior digitalización y numeración; para este procedimiento se utilizó un objetivo de 100 x (N.A. 1,25).

Se eligió un promedio de 20 campos microscópicos por cristal en cada espécimen. Las imágenes microscópicas fueron procesadas usando el software Visilog 5®. El sistema estaba inicialmente, y regularmente, calibrado usando un cristal con un sistema cuadrulado milimétricamente de forma que cuando las imágenes fueron medidas se obtuvieron los siguientes parámetros:

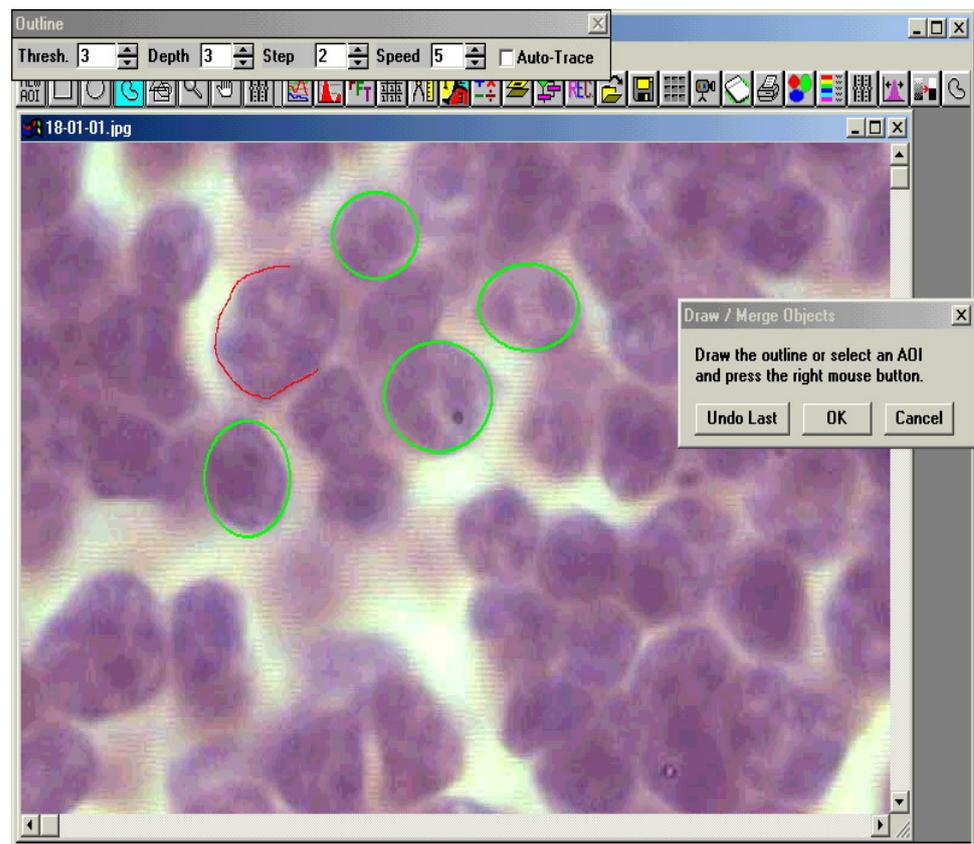
#### **1º Estimaciones morfométricas nucleares**

Los parámetros de tamaño y forma nuclear fueron obtenidos trazando el límite de los perfiles nucleares de los timocitos normales y apoptóticos con el cursor del sistema de análisis (Figura 14).

La información cuantitativa sobre los perfiles nucleares incluye el área, el perímetro y la media de los diámetros.

Dos factores de la forma también fueron estimados:

- El **factor forma FFPE** ( $4 \cdot \pi \cdot \text{área} / \text{perímetro}^2$ ) con valores de 1,00 para un círculo y  $< 1,00$  para una elipse y estructuras irregulares
- El **factor forma FFELL** (diámetro *mínimo* / *diámetro máximo*) con valores de 1,00 para un círculo y  $< 1,00$  para las estructuras elípticas.

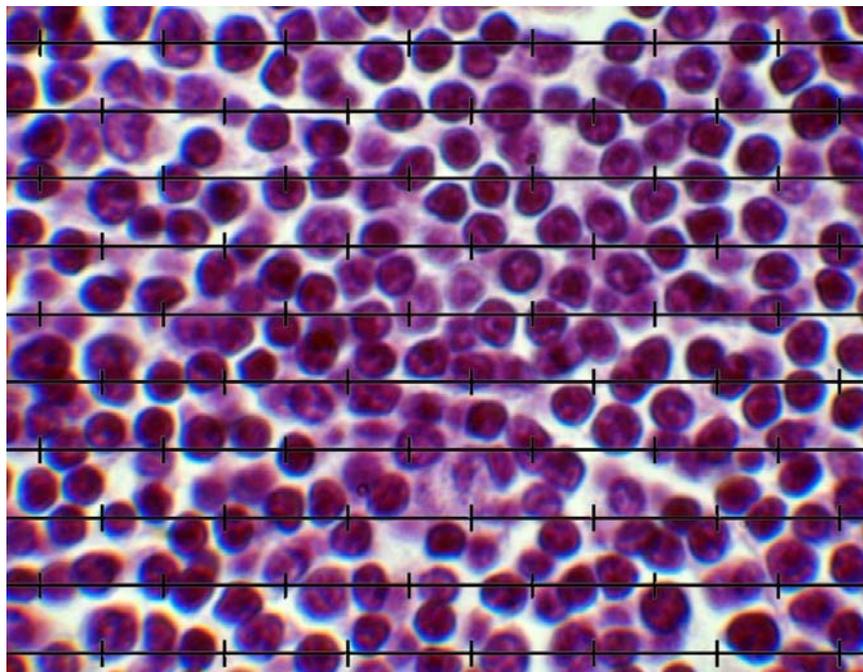


**Figura 15:** Captura de imagen del programa utilizado para la obtención de los parámetros nucleares.

## 2º Estimaciones estereológicas nucleares

### a) Estimación del volumen nuclear medio

La información tridimensional del volumen nuclear fue obtenida usando el " método de las intercepciones punto-muestreado". La valoración fue realizada usando un sistema de prueba integrado por puntos asociados a líneas paralelas, que fue superpuesto a las imágenes microscópicas histológicas (Figura 16) y a las inmunohistoquímicas de la técnica de túnel (Figura 16.1)



**Figura 16:** Imagen de un corte tímico en la que se han superpuesto una plantilla de líneas test usada para la estimación de volumen nuclear medio.

Solamente los núcleos tocados por los puntos del sistema test fueron muestreados y si un núcleo estaba en contacto por más de un punto este fue muestreado más de una vez, midiendo la longitud de la intercepción ( $l_0$ ) a través del núcleo muestreado con el cursor. Así, fue realizada una estimación imparcial del volumen nuclear medio del volumen pesado:

$$\text{Nuclear } \bar{v}_v = (\bar{l}_0)^3 \cdot \pi / 3.$$

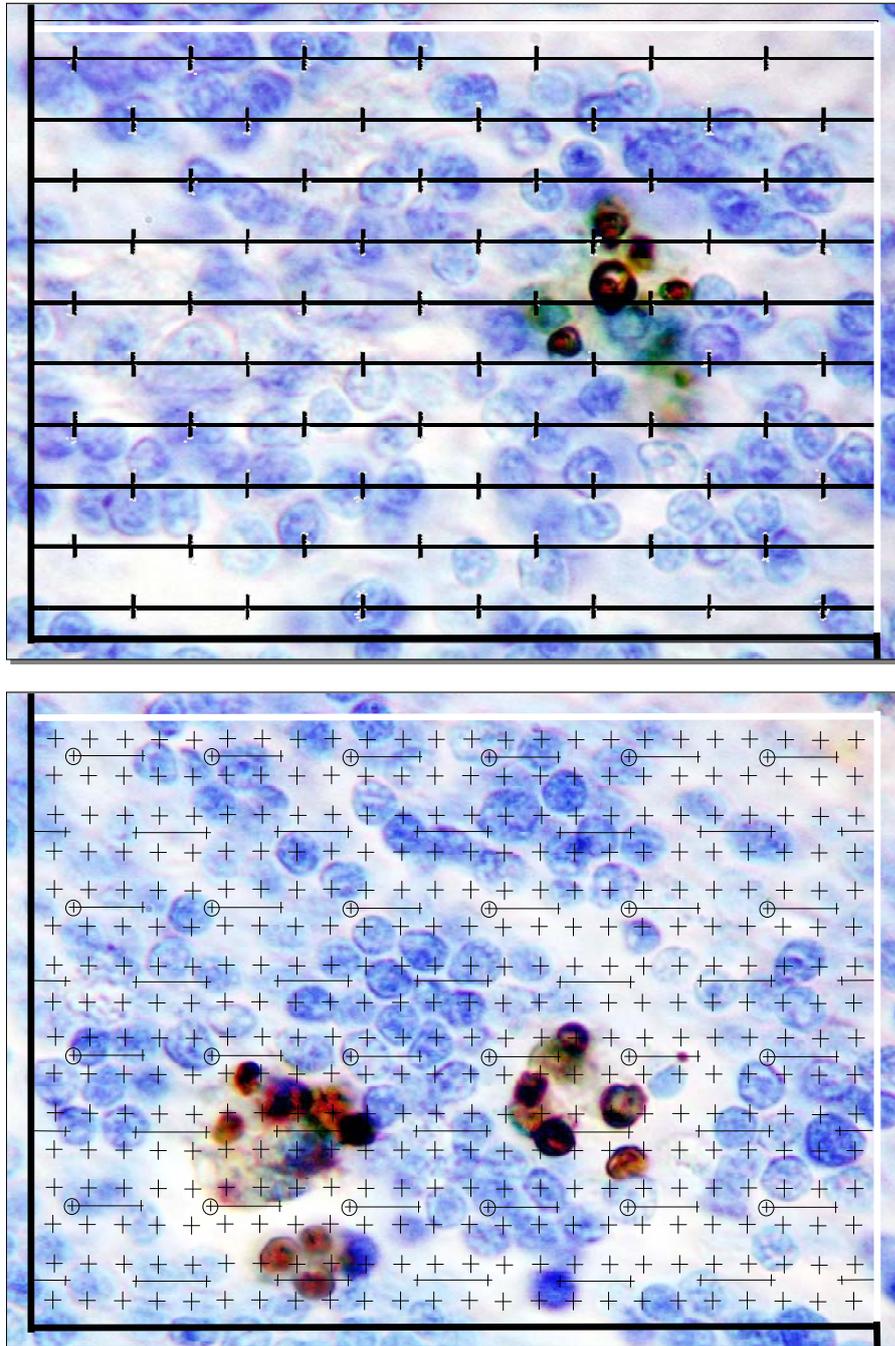
**b) Estimación de la fracción de volumen y densidad de superficie.**

El estudio estereológico también incluyó la valoración de la fracción de volumen nuclear y de la densidad de superficial nuclear.

Estos parámetros fueron obtenidos usando un sistema test integral constituido por puntos y líneas de prueba regularmente espaciados sobrepuestos en cada imagen microscópica histológica (Figura 16) e inmunohistoquímica (Figura 16.1).

El cálculo era

$$\text{est } V V (\text{nucl/tis}) = \Sigma P(\text{nucl}) / \Sigma P(\text{tis})$$



**Figura 16.1:** Imagen de un corte tímico teñido con la técnica de TUNEL en la que se han superpuesto las plantillas de líneas test usada para la realización del análisis estereológico.

Siendo  $VV(\text{nucl}/\text{tis})$  la fracción volumen nuclear, y  $\Sigma P(\text{nucl})$  y  $\Sigma P(\text{tis})$  el número total de puntos que contactan con el núcleo y el tejido, respectivamente.

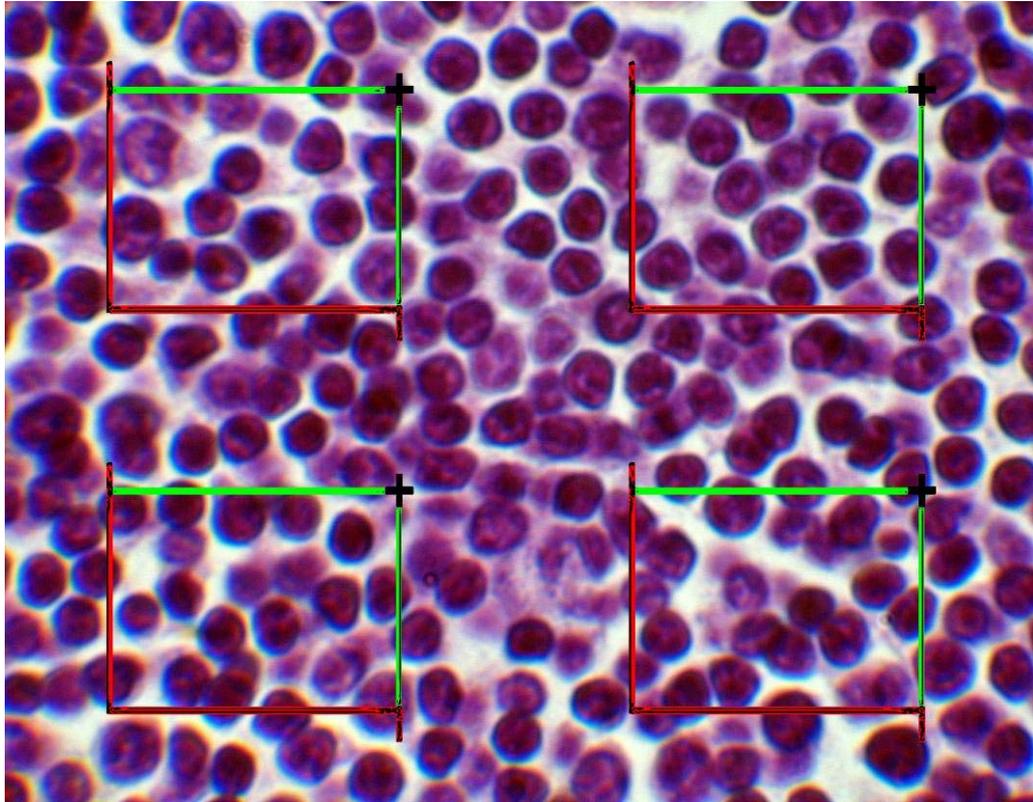
$$\text{est } S_V(\text{nucl}/\text{tis}) = 2 \cdot (p/l) \cdot \Sigma I(\text{nucl}) / \Sigma P(\text{tis})$$

Siendo  $SV(\text{nucl}/\text{tis})$  la densidad de superficie nuclear,  $(p/l)$  la longitud de la línea por puntos del sistema test (en nuestro estudio,  $p/l = 0.4 \mu\text{m}^{-1}$ ),  $\Sigma I(\text{nucl})$  número total de intersecciones entre las líneas del test y el límite del perfil nuclear y  $\Sigma P(\text{tis})$  es el número total de puntos que contactan con el tejido.

La densidad numérica de timocitos fue estimada también en corteza y médula usando un sistema test que consistía en cuatro marcos rectangulares sobrepuestos en una imagen microscópica de gran aumento tanto histológicas (Figura 17) como inmunohistoquímica (Figura 17.1), según:

$$\text{est } Q_A(\text{T-cell}/\text{cort}) = \Sigma Q(\text{T-cell}) / (\Sigma P(\text{cort}) / p)$$

$$\text{est } Q_A(\text{T-cell}/\text{med}) = \Sigma Q(\text{T-cell}) / (\Sigma P(\text{med}) / p)$$

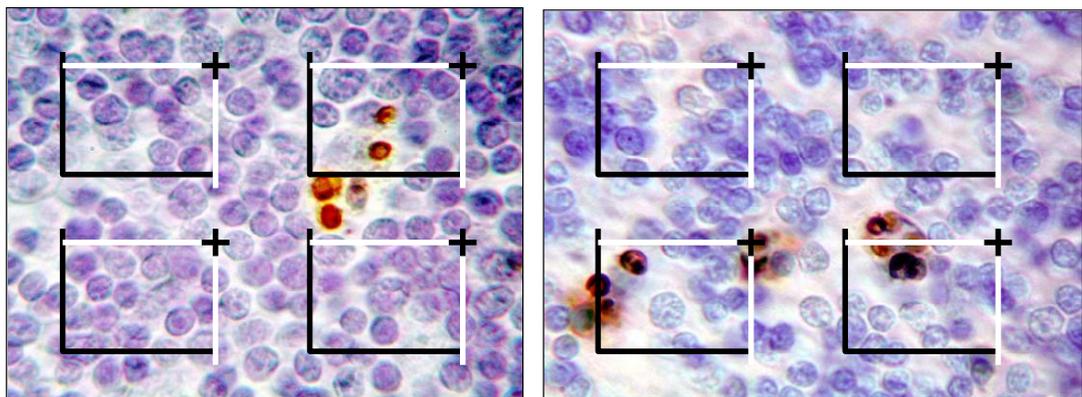


**Figura 17:** Imagen de un corte de timo en la que se han superpuesto una plantilla con cuatro áreas test usada para la estimación de la densidad numérica. Sólo se cuenta aquellos núcleos cuyos perfiles caen dentro de las áreas test y no son afectados por las líneas prohibidas (rojas).

Siendo  $Q_A(\text{T-cell/cort})$  y  $Q_A(\text{T-cell/med})$  la densidad numérica de los núcleos de los timocitos por región tímica,  $\Sigma Q(\text{T-cell})$  el número total de los perfiles nucleares de los timocitos contados dentro de los marcos rectangulares del área seleccionada,  $\Sigma P(\text{cort})$  y  $\Sigma P(\text{med})$  el número total de los puntos que interseccionan con la corteza y la médula respectivamente, multiplicado por  $a/p$  como el área se asoció a un punto del sistema test (en nuestro estudio,  $a/p = 125 \mu\text{m}^2$ ).

## IV. Análisis estadístico

Se determino la media, la desviación de estándar, y el coeficiente de variación de cada parámetro cuantitativo para cada espécimen usando el software estadístico de Windows (Statsoft, Inc©). La prueba de Kolmogorov-Smirnov fue aplicada para determinar la distribución normal de los datos para los distintos especímenes. La comparación de cada patrón cuantitativo entre las distintas regiones tímicas fue realizada usando la prueba t apareada y la comparación entre el control y los grupos de clenbuterol fue realizada usando la prueba t de student para muestras independientes. En el caso de los resultados estadísticos de timocitos apoptóticos en corteza y médula son comparados usando la t de Student para datos pareados y la comparación entre el grupo control y el tratado con clenbuterol fue realizada usando la t de Student para muestras independientes.



**Figura 17.1:** Imagen de un corte de timo teñido con la técnica de TUNEL en la que se han superpuesto una plantilla con cuatro áreas test usada para la estimación de la densidad numérica. Sólo se cuenta aquellos núcleos cuyos perfiles caen dentro de las áreas test y no son afectados por las líneas prohibidas (negras).

# *Resultados*

---

---

En el presente estudio se valoraron los cambios producidos en el timo debido al tratamiento con dos sustancias usadas ilegalmente en el engorde del vacuno. La exposición de nuestros resultados se centrará en el órgano tanto desde el punto de vista general como particular, analizando las alteraciones que sufren sus componentes tisulares y celulares.

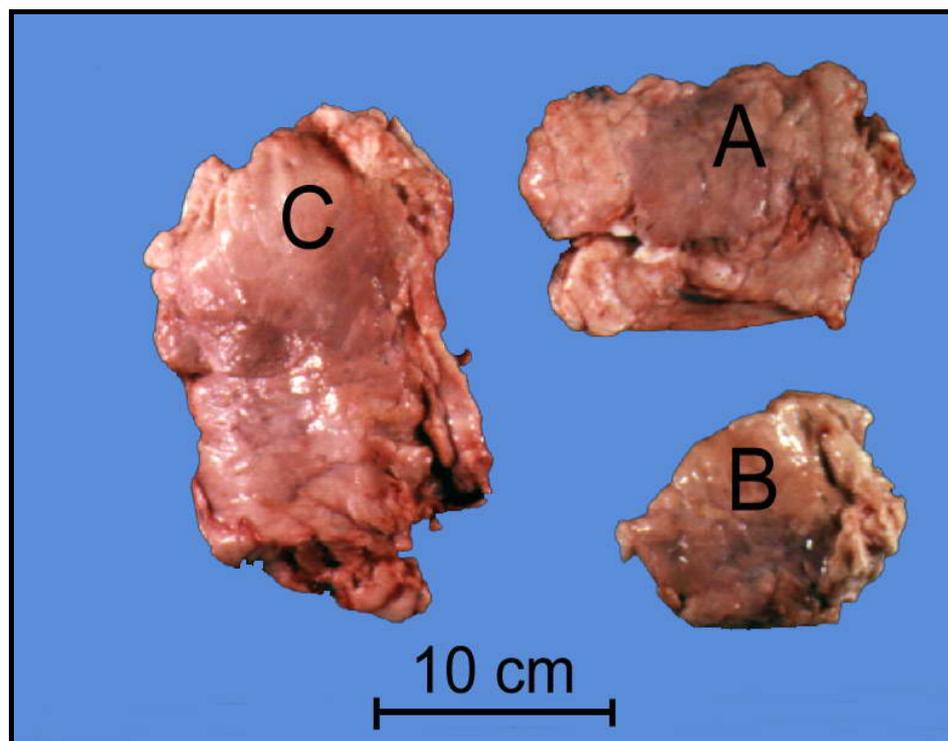
## I. Cambios En La Morfología Tímica

El volumen del parénquima tímico estimado mediante el método de Cavalieri disminuyó muy ostensiblemente en los grupos tratados en comparación con los datos obtenidos en el grupo control (Tabla 4). Así en el grupo tratado con clenbuterol el volumen del timo resultó un 30% menor que el registrado grupo control, pero mucho más severa fue la reducción (64%) del volumen tímico en los animales tratados con dexametasona, ya que la presencia de este órgano se redujo a más de la mitad del tamaño encontrado en los animales control (Fig. 18)

	Control	A	B	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (ANOVA) <sup>c</sup>		
				Control	Control	A
				Vs A	Vs B	Vs B
<b>Volumen</b>						
<b>Parénquima Tímico(cm<sup>3</sup>)</b>	1376 ± 336	969 ± 230	500 ± 174	P<0.05	P<0.001	P<0.05

**Tabla 4:** Volumen del timo en los grupos Control y tratados con clenbuterol (A) y clenbuterol + dexametasona (B)

La disminución cuantificada en el volumen del timo estuvo en consonancia con los signos de involución y atrofia que se apreciaron al observar las características macroscópicas de este órgano en los grupos tratados con estas dos sustancias anabolizantes. Así la dexametasona, y el clenbuterol en menor medida, provocaron una ostensible reducción del tamaño del timo, además de cambios en su color y consistencia, encontrándose más grisáceos y friables al compararlos con el aspecto del timo en los animales control.



**Figura 18:** Aspecto del timo en los grupo los grupos tratados(A: clenbuterol; B: Clenbuterol + dexametasona) respecto a los animales control (C).

## II. Cambios En La Estructura Tisular

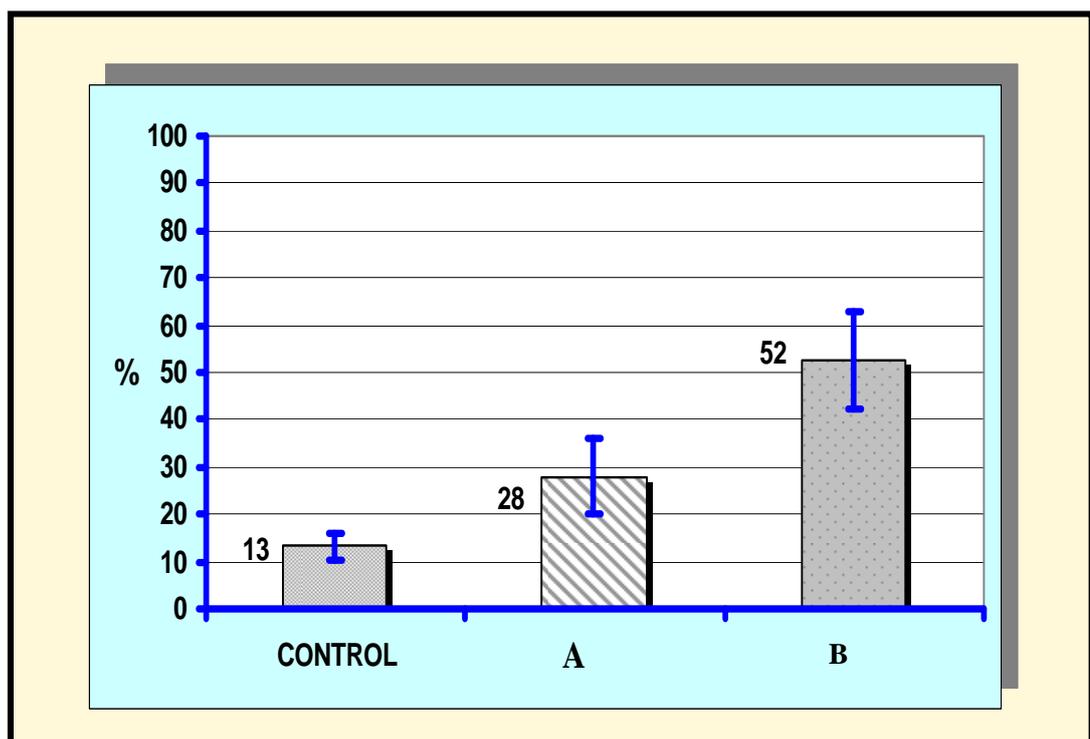
### II.1. Proporción de grasa.

La administración del clenbuterol provocó un significativo incremento del porcentaje de grasa en el timo respecto a las cifras observadas en el grupo control, lo cual se acentuó aún más en los animales en los que se incorporó el tratamiento con dexametasona.

SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (ANOVA)						
	Control	A	B	Control	Control	A
	Vs			Vs	Vs	
	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	A	B	B
Grasa (%)	13±2	27±7	52±10	P<0.05	P<0.001	P<0.001

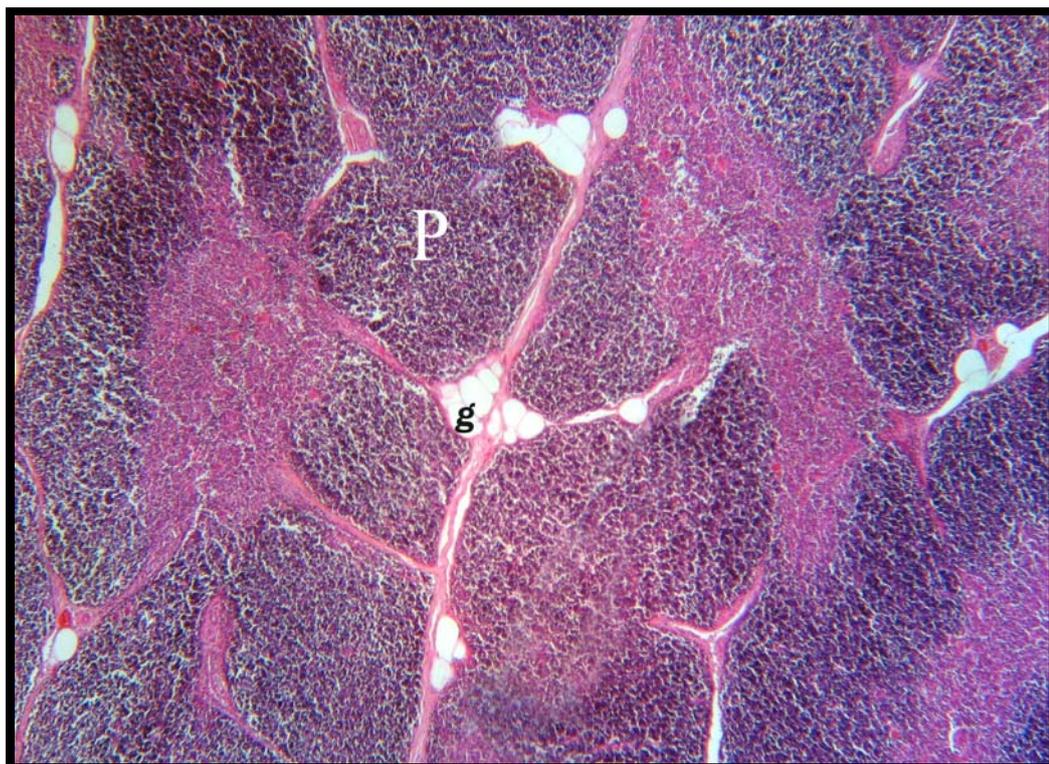
**Tabla 5:** Fracción de volumen de la grasa presente en el timo en los grupos tratados con clenbuterol (A) y clenbuterol + dexametasona (B), respecto al control(C).

La observación de los resultados que se resumen en la tabla 5 refleja como el porcentaje de grasa en el timo se incrementó un 14 % como consecuencia de la administración del clenbuterol, y aún más (39 %) cuando se incorporó la dexametasona al tratamiento anabolizantes. En algunos casos dicha sustitución llevo a alcanzar el 62 %. La figura 19 muestra gráficamente los cambios en la presencia de grasa en función de tratamiento administrado.

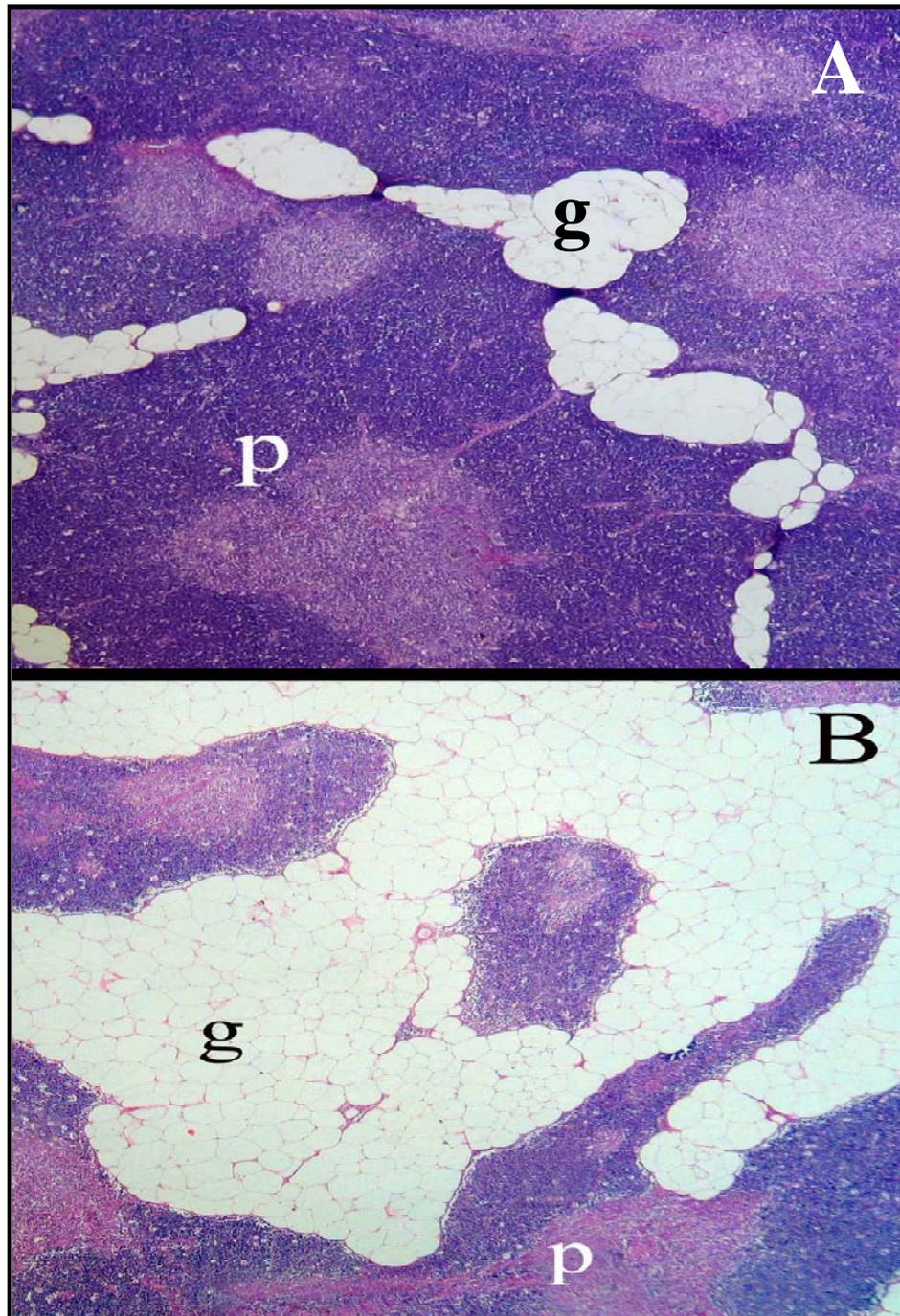


**Figura 19:** Histogramas representativos de los porcentajes de grasa (fracción de volumen) registrados en los grupos control y expuestos sustancias anabolizantes (clenbuterol: A; clenbuterol y dexametasona: B).

El incremento de la presencia de grasa fue fácilmente evidenciable en las secciones histológicas de los timos tratados, especialmente con la incorporación al tratamiento de la dexametasona, donde el parénquima tímico (p, Figura 21) quedo reducido a delgados cordones tisulares entre amplias zonas de tejido adiposos (g, Figura 21). Los cambios fueron mucho más evidentes cuando comparamos las imágenes de los timos tratados (Figura 21) con respecto al timo del grupo control (Figura 20).



**Figura 20:** Secciones histológicas del timo un animal del grupo control (H.E. x 40).p: parénquima; g: tejido adiposo.



**Figura 21:** **A:** Timo tratado con clenbuterol; **B:** Timo tratado con clenbuterol + dexametasona (H.E. x40). Nótese el incremento de la proporción de grasa (g) respecto al parénquima (p).

## **II.2. Relación Corteza-Médula.**

La fracción de volumen de la corteza y de la médula reflejan los porcentajes del parénquima tímico que ocupan ambos componentes titulares. Las cifras en el grupo control estuvieron en consonancia con la mayor extensión de la corteza respecto a la médula en condiciones normales.

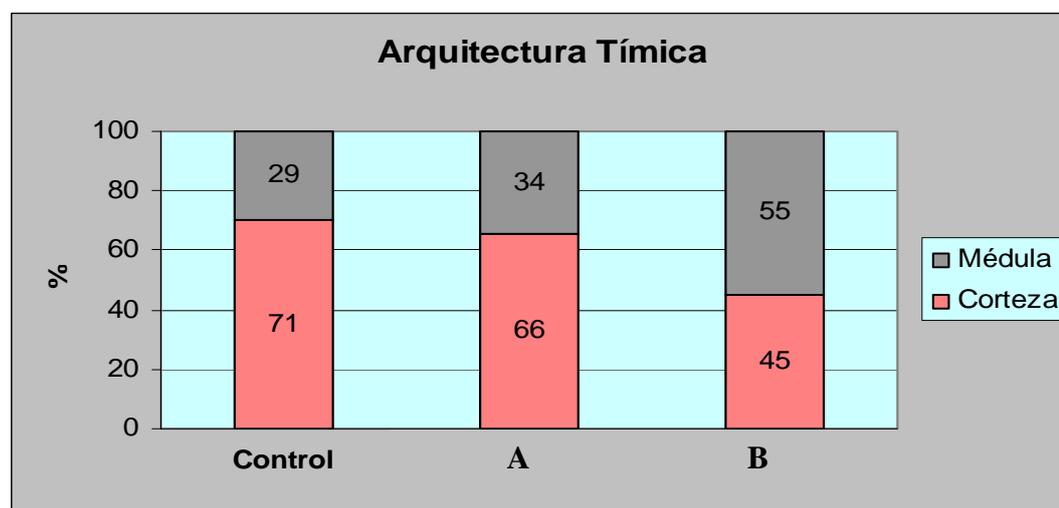
La administración del clenbuterol provocó una significativa desproporción de ambos componentes titulares respecto a las cifras del control: disminución de la corteza tímica que fue compensada con el correspondiente incremento medular.

La administración de la dexametasona determinó una notable pérdida de la corteza tímica, de tal manera que el porcentaje de médula llegó a superar al de la corteza. Los datos de estos parámetros se resumen en la tabla 6.

La figura 22 expresa gráficamente la variación de los porcentajes de los componentes titulares como consecuencia de los tratamientos administrados.

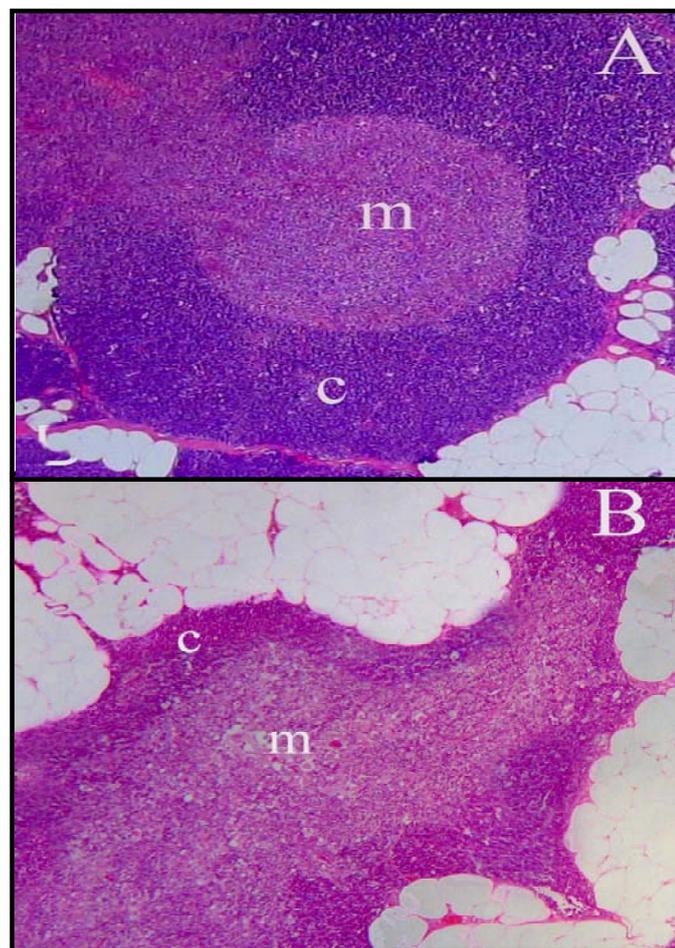
			SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (ANOVA) <sup>c</sup>					
			Control	A <sup>a</sup>	B <sup>a</sup>	Control	Control	A
			Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Vs A	Vs B	Vs B
<b>Porcentaje de Parénquima(%)</b>			<b>87±3</b>	<b>73±8</b>	<b>48±10</b>	<b>P&lt;0.05</b>	<b>P&lt;0.001</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>Fracción de Volumen Tisular</b>	<i>Vv(cort/par)</i> <sup>b</sup> (%)	70.41 ± 2.07	63.7 ± 2.21	46.32 ± 6.58	<b>P&lt;0.05</b>	<b>P&lt;0.001</b>	<b>P&lt;0.001</b>	
	<i>Vv(med/par)</i> <sup>b</sup> (%)	29.59 ± 2.07	36.3 ± 2.21	53.68 ± 6.58	<b>P&lt;0.05</b>	<b>P&lt;0.001</b>	<b>P&lt;0.001</b>	

**Tabla 6:** Fracción de volumen de componentes titulares del parénquima del timo en los grupos control, clenbuterol (A) y clenbuterol + dexametasona (B).



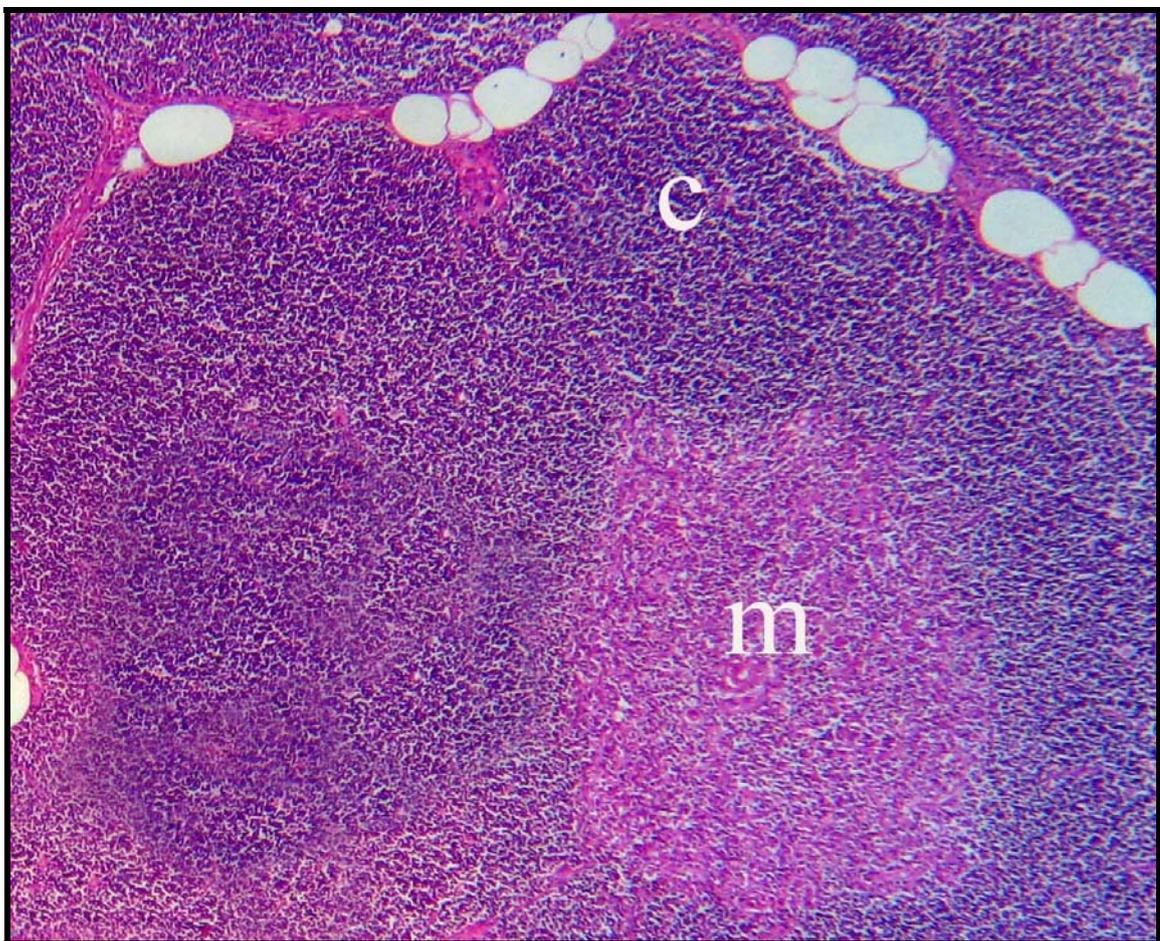
**Figura 22:** Representación gráfica de la fracción de volumen de los componentes titulares del parénquima del timo en los distintos grupos estudiados.

En la figura 23 se muestra en detalle las variaciones histológicas observadas en la proporción de los componentes del parénquima tímico. En estas se destaca la disminución en los animales tratados de la proporción de la corteza con respecto a la médula, siendo ésta más acusada en los animales del grupo B.



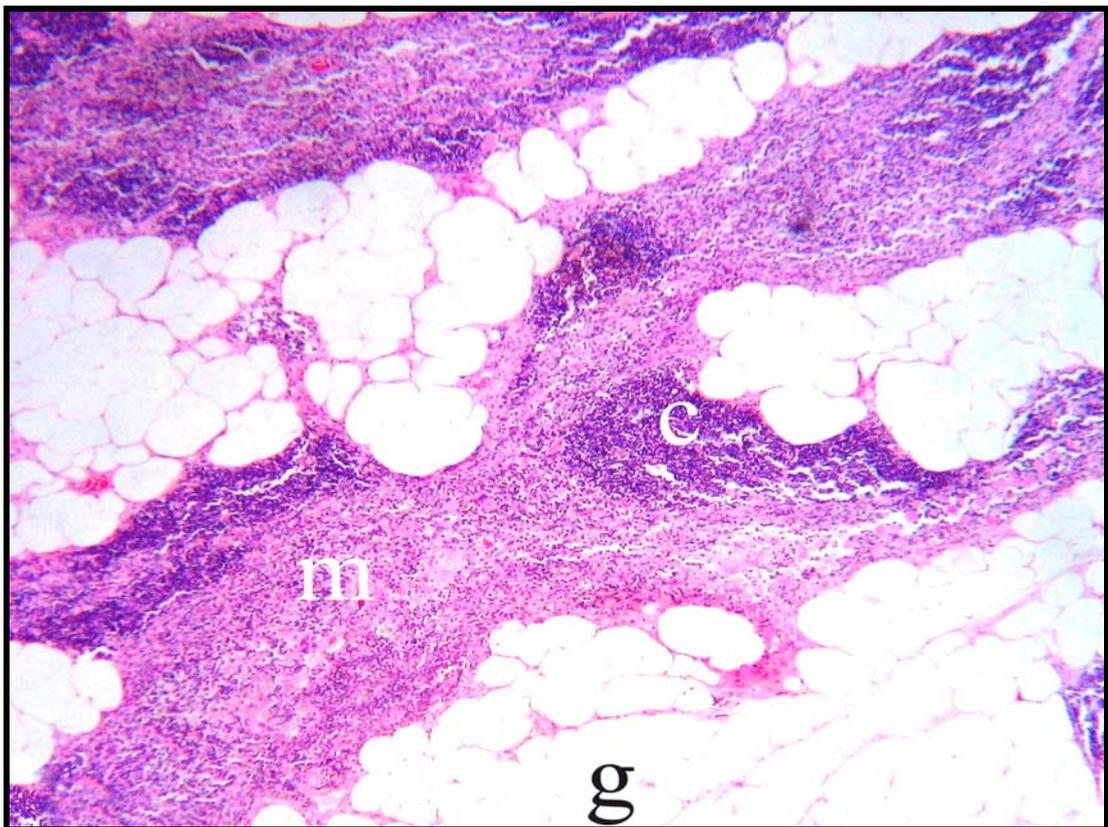
**Figura 23:** Detalle de los cambios en la proporción de los distintos componentes del parénquima tímico tras los distintos tratamientos. **A:** timo tratado con clenbuterol; **B:** timo tratado con clenbuterol + dexametasona. (H.E. x100).  
c: corteza; m: médula.

Obsérvese las alteraciones histológicas sufridas en la proporción corteza/médula sufridas por los timos tratados (figura 23), muy evidentes a simple vista, si las comparamos con las secciones histológicas del timo de un animal no tratado (Figura 24).



**Figura 24:** Detalle histológico de la proporción entre corteza y médula en timo de animales no tratados. (H.E. x100). C: corteza; m: médula.

Los cambios sufridos por el timo tanto en la relación de corteza/ médula como en la sustitución adiposa del parénquima tímico fueron más severos en los animales tratados con clenbuterol más dexametasona alcanzando en los casos más extremos una proporción de grasa del 62% quedando el parénquima reducido a delgados cordones, con una marcada disminución de la corteza en relación a la médula (Figura 25).



**Figura 25:** Sección histológica del timo tratado con clenbuterol más dexametasona que sufrió mayor distorsión arquitectural en sus componentes (H.E. x100).c: corteza; m: médula; g: tejido adiposo.

### **III. Poblaciones Celulares**

No cabe duda que la principal población a considerar en el timo está constituida por el conjunto de células linfoides en desarrollo y maduración, que constituye la principal característica funcional de este órgano. Por ello consideramos en primer lugar los datos morfométricos y esterológicos observados en los timocitos y así como sus detalles morfoestructurales en los distintos grupos de la experiencia.

Las células epiteliales constituyen otra población celular igualmente importante en la función tímica y que la interacción con los timocitos resultan fundamentales en el destino de los linfocitos.

Por ello consideramos los datos cuantitativos y descriptivos sobre los timocitos primero y sobre las células epiteliales a continuación.

#### **III.1. Timocitos Normales**

Bajo la denominación de timocitos consideramos al conjunto de linfocitos que se localiza en el timo y que se caracteriza por la presencia del receptor clonotípico de las células T (TCR).

Esta población celular experimenta en el timo unos cambios morfofuncionales trascendentales para llevar a cabo su cometido dentro del sistema inmune. Durante la maduración de los timocitos en el timo sufre un doble proceso de selección (positiva y negativa) caracterizado por la activación /inhibición de marcadores de superficie (TCR y CD). En la selección positiva sólo sobreviven aquellas células que tengan TCR capaces de reconocer MHC-I o MHC-II. Con ello se garantiza la restricción por propios haplotipo de las células T. La selección negativa implica la muerte por apoptosis de aquellas células que habiendo pasado la selección positiva posean un TCR con alta afinidad por péptidos propios enclavados en el MHC o por el propio complejo MHC. Ello tiende a garantizar la propiedad de autotolerancia por eliminación de los linfocitos T autoreactivos.

Dado que la discriminación entre las distintas subpoblaciones (linajes) de células T solo es posible mediante técnicas inmunológicas no empleadas en este estudio, nuestros resultados contemplan globalmente la población de timocitos.

Lo que sí pudimos obtener selectivamente fueron los datos a nivel de la corteza y a nivel de la médula tímica por lo que a continuación exponemos los datos morfométricos y estereológicos de los timocitos corticales y medulares.

### III.1.a Corteza

#### 1° Parámetros Morfométricos

El tamaño nuclear medio de los timocitos corticales se vio notablemente afectado por los tratamientos anabolizantes. Así mientras que en el grupo control el área nuclear media fue de  $12.64 \pm 0.72 \mu\text{m}^2$ , en el grupo tratado con clenbuterol se llegó  $15.13 \pm 2.04 \mu\text{m}^2$  y aún más ( $18.74 \pm 0.78 \mu\text{m}^2$ ) cuando el tratamiento incluyó dexametasona, es decir, el tratamiento con clenbuterol provocó un incremento del 20% de área nuclear cuadrada de los timocitos corticales, respecto al control, y cuando se incorporó dexametasona el incremento llegó a ser del 480% respecto a las cifras control. Siendo las diferencias significativas estadísticamente con un margen de confianza reflejadas en la tabla 7.

	Control	A	B
Control		0,031046	0,000012
A	0,031046		0,001688
B	0,000012	0,001688	

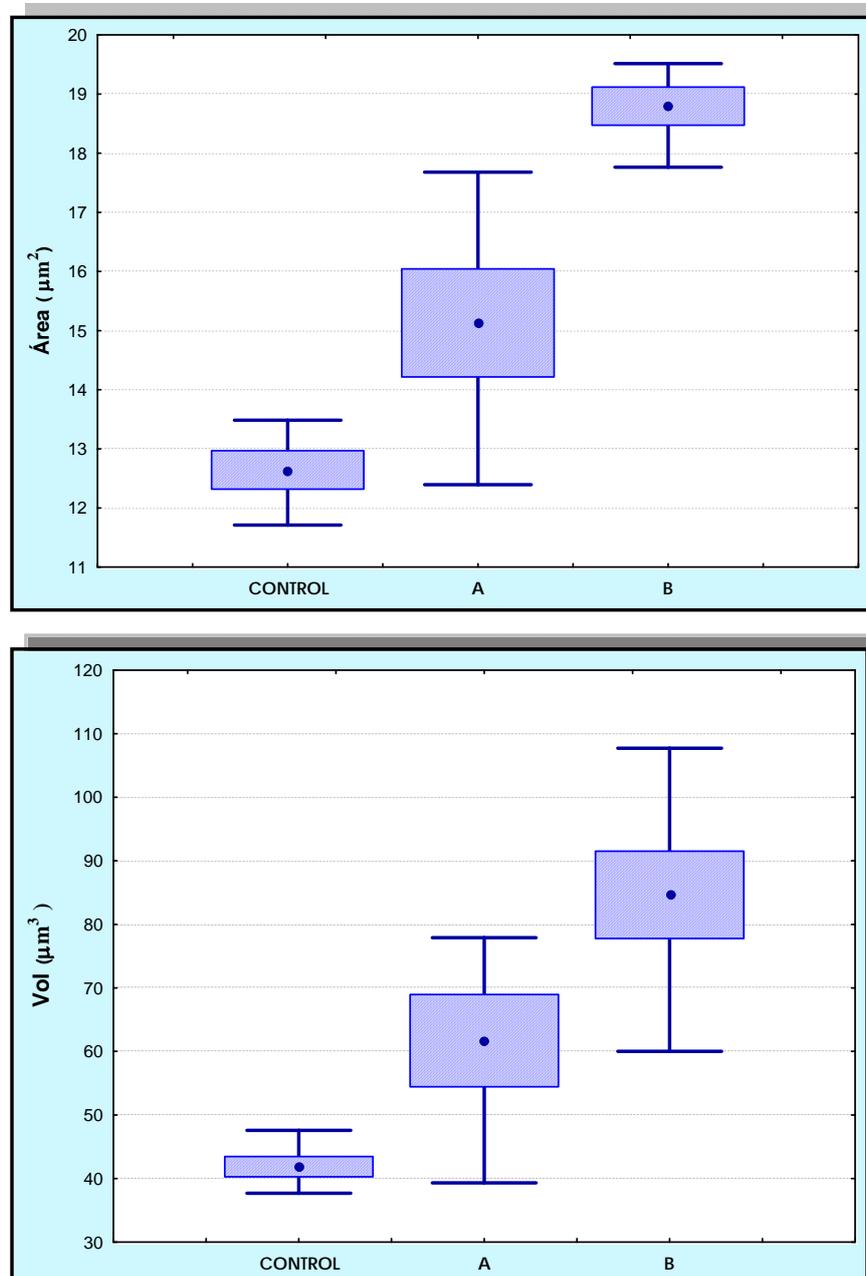
**Tabla 7:** Límites de confianza estadística entre los distintos grupos del estudio para los datos referidos al área nuclear.

El volumen nuclear (VJ) reflejo una respuesta muy similar al de los tratamientos anabólicos administrados, si bien los incrementos porcentuales son más considerables. Así el volumen nuclear se incremento del  $41.87 \pm 3.58 \mu\text{m}^3$  en el grupo control a el  $61.70 \pm 16.22 \mu\text{m}^3$  en el grupo clenbuterol (47 %) y al  $84.65 \pm 16.83 \mu\text{m}^3$  en el grupo al cual se le incorporó la dexametasona (102 %). En este caso el análisis estadístico reveló la existencia de diferencias significativas entre el grupo control y el grupo B, pero no entre el grupo control y el A ni entre el A y el B, como se refleja en la tabla 8.

Grupo	Control	A	B
Control		0,117680	0,000828
A	0,117680		0,053323
B	0,000828	0,053323	

**Tabla 8:** Significación estadística en relación al volumen tímico de los distintos grupos.

Estos cambios descritos anteriormente fueron muy evidentes en la proyección gráfica de los resultados del área y volumen nuclear que se recoge en la figura 26.



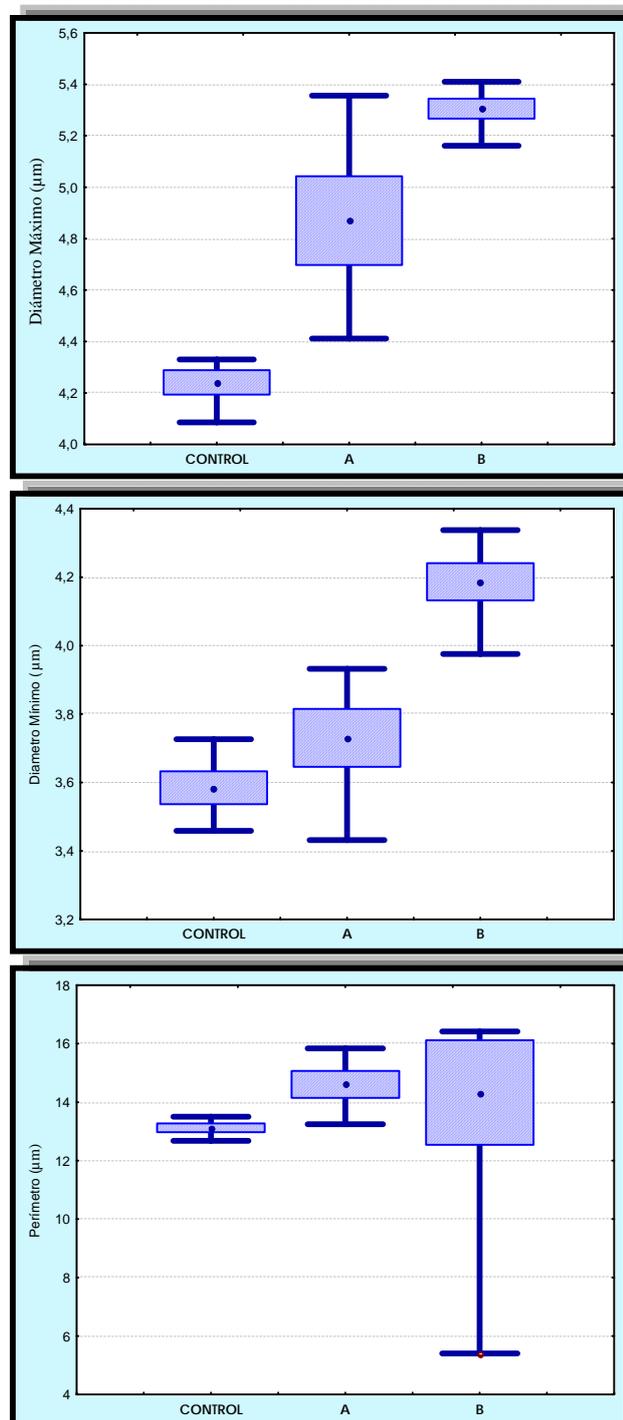
**Figura 26:** Proyección grafica de los datos del área y volumen nuclear ( $\bar{V}_V$ ) de los timocitos en la corteza del timo.

Los parámetros lineales de los timocitos (Fig. 10) reflejaron cambios significativos en el tamaño de esta población celular como consecuencia de los tratamientos anabolizantes administrados. Así, los diámetros (máximo y mínimo) y el perímetro nuclear medio de los linfocitos T fueron significativamente mayores en los animales tratados con clenbuterol respecto a los controles (4%, diámetro nuclear mínimo; 14%, diámetro nuclear máximo) y aún el incremento fue más marcado cuando se administró la dexametasona ( 17%, diámetro nuclear mínimo; 260%, diámetro nuclear máximo). Dicho incremento del tamaño nuclear medio también se reflejó, aunque de forma más amortiguada, en los datos del perímetro nuclear, tal como se observa en la proyección gráfica de los resultados que se recoge en la figura 27.

Las tabla 9, muestran los niveles de significación estadística al comparar los parámetros del tamaño nuclear entre los distintos grupos experimentales.

Grupos	Diámetro nuclear máximo			Diámetro nuclear mínimo			Perímetro		
	Control	A	B	Control	A	B	Control	A	B
Control		0,003016	0,000015		0,319541	0,000052		0.707387	0.778123
A	0,003016		0,025907	0,319541		0,000722	0.707387		0.986404
B	0,000015	0,025907		0,000052	0,000722		0.778123	0.986404	

**Tabla 9:** Niveles de significación para los distintos parámetros morfométricos nucleares.



**Figura 27:** Diámetros nucleares (máximo y mínimo), así como perímetro nuclear de los timocitos corticales en los distintos grupos de la experiencia.

## **2° Parámetros Esterológicos**

Las densidades nucleares de los timocitos obtenidas mediante la metodología esterológica usada en este estudio revelaron una notable disminución de la presencia relativa de células linfoides en la corteza del timo como consecuencia de la administración de las sustancias anabolizantes objeto de este estudio.

Así, mientras que en los animales control la fracción de volumen de la corteza tímica ( $V_V(\text{nucl}/\text{tis})$ , Figura 28) que ocuparon los núcleos de los timocitos fue del 20,99%, en los animales tratados con clenbuterol esta cifra se redujo al 20,28%, llegando a caer al 16,84% en el grupo tratado con dexametasona, lo que supone una reducción de cerca del 50% respecto a los datos control.

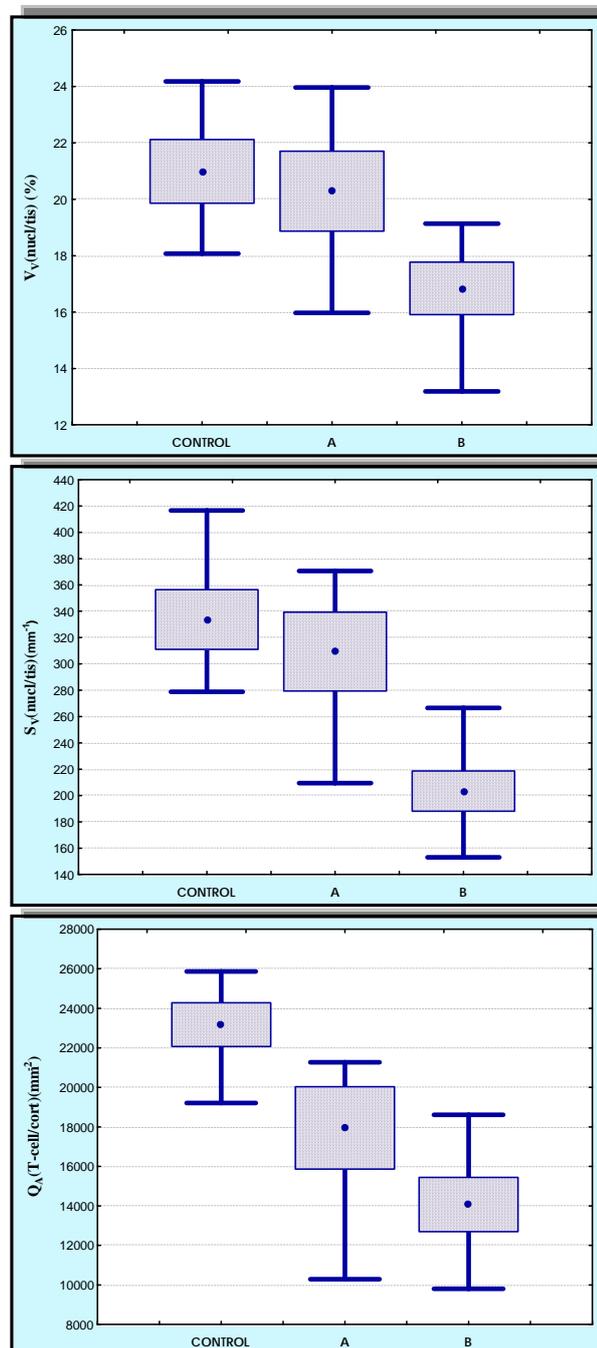
Los datos de la densidad de superficie nuclear ( $S_V(\text{nucl}/\text{tis})$ , Figura 28) reflejaron un comportamiento muy similar al anteriormente expresado. En el grupo tratado con clenbuterol fue de  $309,34 \text{ mm}^{-1}$ , y en el grupo expuesto al clenbuterol + dexametasona  $203,41 \text{ mm}^{-1}$ , cifras muy por debajo de  $333,77 \text{ mm}^{-1}$ , registrado en los animales control.

La densidad numérica de los timocitos corticales ( $Q_A(\text{T-cell}/\text{cort})$ , Figura 28) registró descensos aún más acentuados en respuesta a los tratamientos administrados. En el grupo tratado con clenbuterol contabilizamos 17.951,03 timocitos por  $\text{mm}^2$ , frente a los 23.174,72 que presentaron los controles, en tanto que los animales tratados también con dexametasona el registro descendió a 14.071,27 timocitos/ $\text{mm}^2$ .

Al comparar los datos entre los tres grupos experimentales puede observarse como las diferencias fueron altamente significativas en la mayor parte de los casos, tal como se recoge en las tablas 10.

Grupos	Fracción de volumen			Densidad de superficie			Densidad numérica		
	Control	A	B	Control	A	B	Control	A	B
Control		0,916624	0,068315		0,764447	0,004260		0,108675	0,003890
A	0,916624		0,140523	0,764447		0,017120	0,108675		0,240762
B	0,068315	0,140523		0,004260	0,017120		0,003890	0,240762	

**Tabla 10:** Niveles de significación para los distintos parámetros estereológicos nucleares de los timocitos corticales.



**Figura 28:** Resultados estereológicos de la fracción de volumen (VV), densidad de superficie (SV) y densidad numérica (QA) de los núcleos de los timocitos en la corteza del timo.

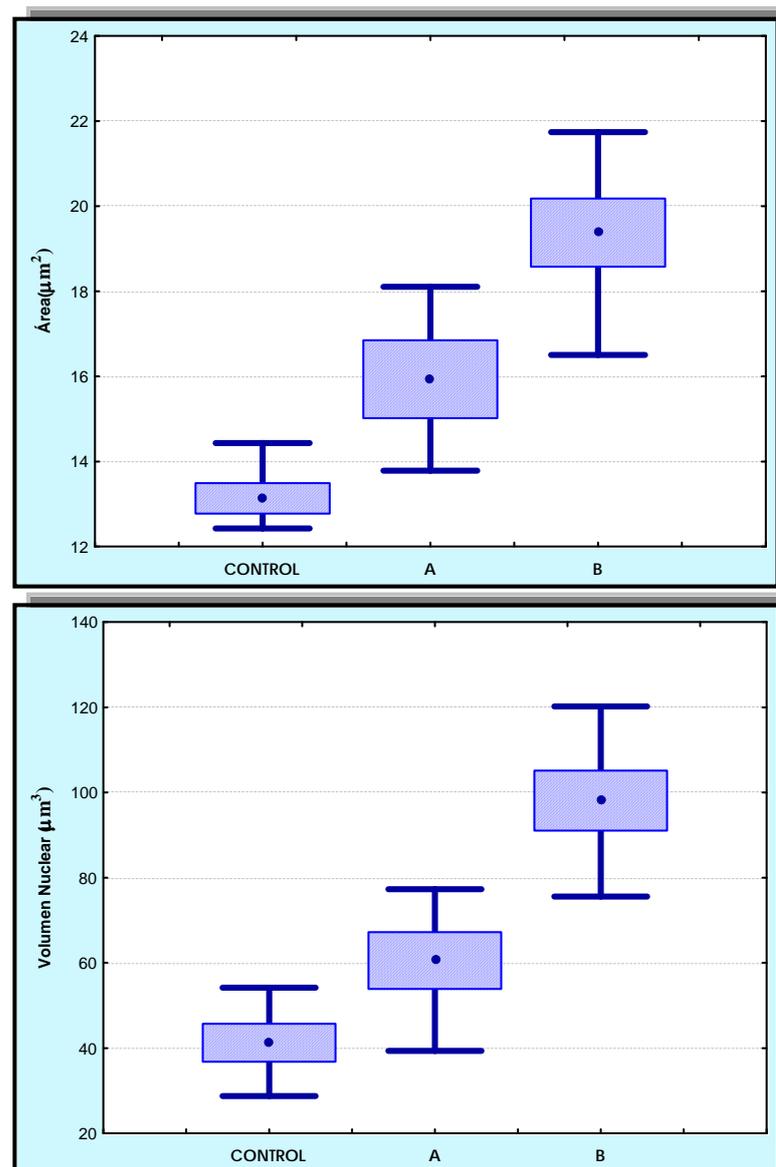
### III.1.b Médula

#### 1° Parámetros morfométricos

Los resultados morfométricos en los animales control reflejaron el tamaño nuclear medio de los timocitos medulares en la glándula normal, observándose que el tamaño nuclear medio de las células linfoides fue superior en la médula respecto a los datos registrados en la corteza. Así, los timocitos medulares registraron un área nuclear de  $13,13 \pm 0.80 \mu\text{m}^2$  (frente a  $12.64 \pm 0.72 \mu\text{m}^2$ , en la corteza), y un volumen nuclear ( $\bar{v}_v$ ) de 41,25 (frente a  $41.87 \pm 3.58 \mu\text{m}^3$ , en la corteza).

El tratamiento con las sustancias anabolizantes utilizadas en este estudio provocó un significativo incremento de estos parámetros morfométricos de los timocitos medulares de forma similar a lo registrado a nivel de la corteza tímica. Así el área nuclear se incrementó en el grupo tratado con clenbuterol a  $15,93 \mu\text{m}^2$  (un 21%, respecto al control), mientras que en el grupo inyectado con dexametasona fue de  $19,37 \mu\text{m}^2$  (un 47%, respecto al control).

En lo que respecta al volumen nuclear ( $\bar{v}_v$ ) el grupo clenbuterol registró  $60,57 \mu\text{m}^3$  (46% superior al control), el grupo clenbuterol + dexametasona alcanzó  $98,09 \mu\text{m}^3$  (137% superior respecto al control.)



**Figura 29:** Área y volumen nuclear ( $\bar{v}_v$ ) de los timocitos medulares en los tres grupos de la experiencia.

	Área			Volumen Nuclear		
	Control	A	B	Control	A	B
Control		0,069006	0,000183		0,151639	0,000092
A	0,069006		0,019049	0,151639		0,003514
B	0,000183	0,019049		0,000092	0,003514	

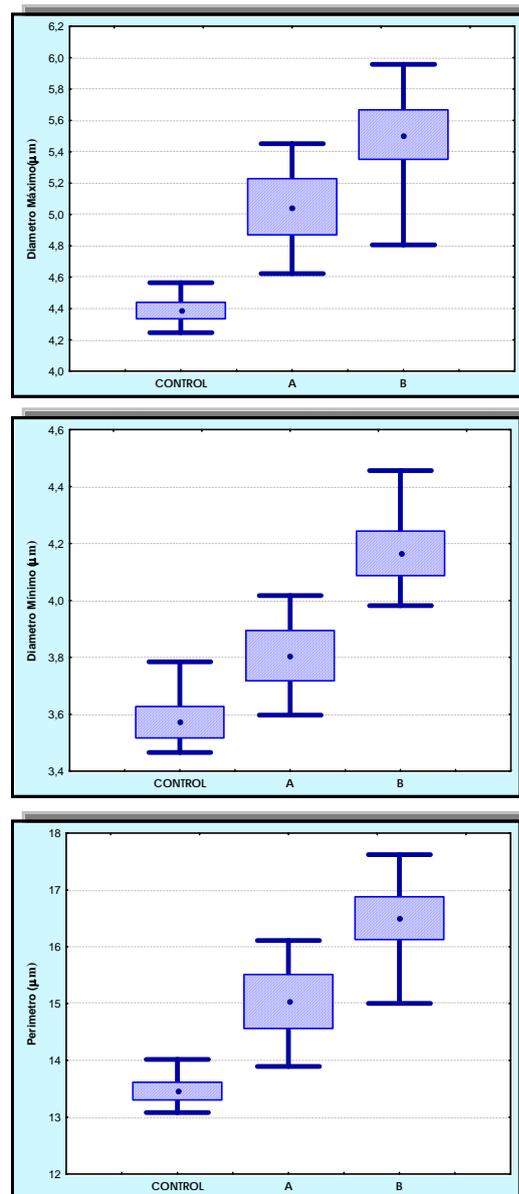
**Tabla 11:** Límites de confianza estadística entre los distintos grupos del estudio para los datos referidos al área nuclear y  $\bar{v}$ .

Los parámetros lineales de los núcleos de los timocitos medulares reflejaron un fuerte incremento como consecuencia de la administración del clenbuterol, y más aún en el grupo tratado con dexametasona (figura 30).

		Control	A	B
Diámetro Máximo	Control		0,025160	0,000357
	A	0,025160		0,110924
	B	0,000357	0,110924	
Diámetro Mínimo	Control		0,147720	0,000347
	A	0,147720		0,016304
	B	0,000347	0,016304	
Perímetro	Control		0,035125	0,000190
	A	0,035125		0,040942
	B	0,000190	0,040942	

**Tabla 12:** Resultados del Anova para los diámetros nucleares (máximo y mínimo) y perímetro nuclear de los timocitos medulares.

La muestra los datos de estos parámetros; la tabla 12 recoge los niveles de significación estadística para las comparaciones entre los grupos experimentales del trabajo.



**Figura 30:** Resultados morfométricos de los parámetros lineales (diámetros y perímetro nucleares) de los timocitos en médula.

La tabla 13 muestra de forma comparada los parámetros morfométricos en ambas regiones glandulares (corteza y médula) lo que permite comparar estas variables en ambas regiones del timo.

<b>Control</b>			
	<b><u>Corteza</u></b>	<b><u>Médula</u></b>	<b>p</b>
<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	12,64 $\pm$ 0,72	13,13 $\pm$ 0,80	0,342626
<b>Volumen Nuclear (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	41,87 $\pm$ 3,58	41,25 $\pm$ 9,94	0,898148
<b>Diámetro Máximo(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	4,24 $\pm$ 0,10	4,38 $\pm$ 0,11	0,074287
<b>Diámetro Mínimo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	3,58 $\pm$ 0,10	3,57 $\pm$ 0,12	0,869141
<b>Perímetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	13,12 $\pm$ 0,34	13,45 $\pm$ 0,34	0,161511
<b>Clenbuterol</b>			
	<b><u>Corteza</u></b>	<b><u>Médula</u></b>	<b>p</b>
<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	15,13 $\pm$ 2,04	15,93 $\pm$ 2,04	0,552783
<b>Volumen Nuclear (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	61,70 $\pm$ 16,22	60,57 $\pm$ 14,95	0,911420
<b>Diámetro Máximo(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	4,87 $\pm$ 0,38	5,04 $\pm$ 0,40	0,492364
<b>Diámetro Mínimo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	3,730 $\pm$ 0,18	3,80 $\pm$ 0,19	0,554782
<b>Perímetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	14,60 $\pm$ 1,03	15,03 $\pm$ 1,06	0,532434
<b>Clenbuterol +Dexametasona</b>			
	<b><u>Corteza</u></b>	<b><u>Médula</u></b>	<b>p</b>
<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	18,79 $\pm$ 0,78	19,37 $\pm$ 1,96	0,342626
<b>Volumen Nuclear (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	84,65 $\pm$ 16,83	98,09 $\pm$ 17,21	0,898148
<b>Diámetro Máximo(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	5,30 $\pm$ 0,09	5,50 $\pm$ 0,38	0,074287
<b>Diámetro Mínimo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	4,18 $\pm$ 0,13	4,16 $\pm$ 0,19	0,869141
<b>Perímetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	14,32 $\pm$ 4,38	16,50 $\pm$ 0,92	0,161511

**Tabla 13:** Resultados del análisis estadístico t de Student para muestras apareadas comparando los datos entre corteza y medula para cada parámetro morfométrico estudiado.

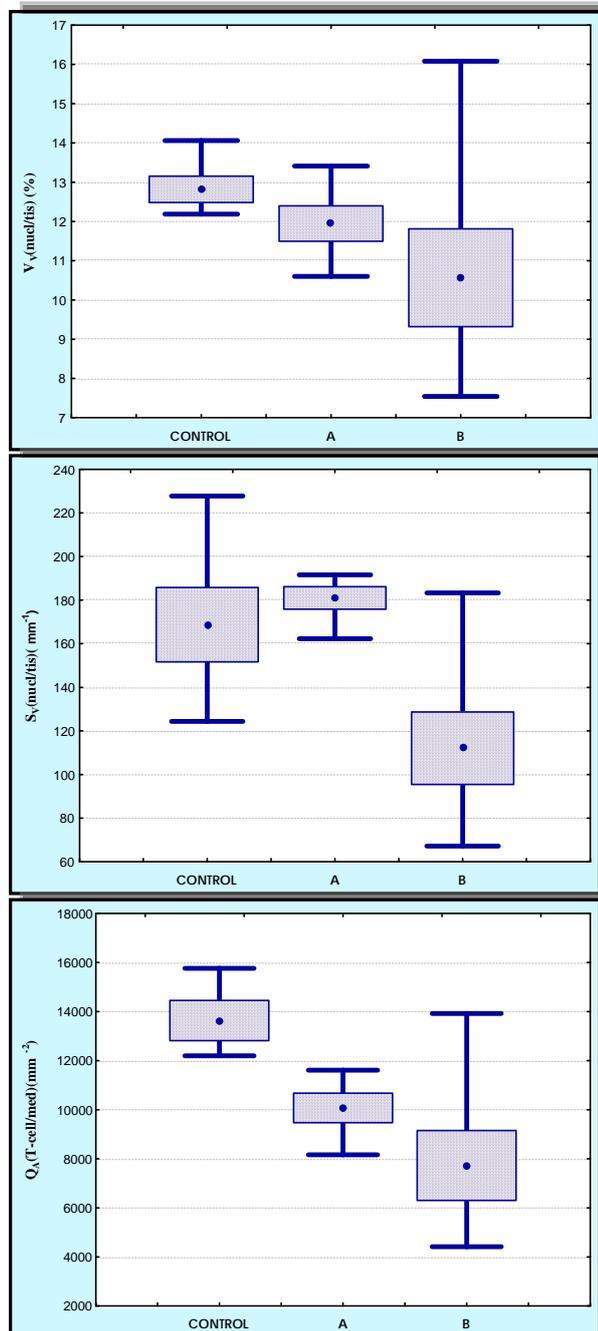
## 2° Parámetros estereológicos

Al observar los resultados de las densidades nucleares de los timocitos en el grupo control, se apreciaron significativas diferencias respecto a los datos registrados en la corteza, en correspondencia con las características histofuncionales diferenciales entre ambas regiones en la glándula normal.

La fracción de volumen del timo ocupado por los núcleos linfoides en la médula fue de 12,81% (63% menos que en la corteza); la densidad de superficie nuclear en la médula fue de 168,75 mm<sup>-1</sup> (97% menos que en la corteza); la densidad numérica en la médula fue de 13.632,91 timocitos/mm<sup>2</sup> (3% menos que en la corteza).

		Control	A	B
Fracción de volumen	Control		0,795375	0,221383
	A	0,795375		0,544277
	B	0,221383	0,544277	
Densidad de superficie	Control		0,848463	0,047725
	A	0,848463		0,016346
	B	0,047725	0,016346	
Densidad numérica	Control		0,119034	0,006640
	A	0,119034		0,334586
	B	0,006640	0,334586	

**Tabla 14:** Resultados del Anova para los parámetros estereológicos fracción de volumen (VV), densidad de superficie (SV) y densidad numérica (QA) de los timocitos medulares



**Figura 31:** Resultados esterológicos de la fracción de volumen (VV), densidad de superficie (SV) y densidad numérica (QA) de los núcleos de los timocitos en la corteza tímica.

La administración del clenbuterol provocó una notable disminución de las densidades nucleares de los timocitos medulares, respecto a las cifras del control; acentuándose la diferencia aún más en el grupo tratado con clenbuterol y dexametasona, tal como se puede apreciar en los datos que se recogen en la figura 31.

En la tabla 14 se muestran los niveles de significación estadística al comparar estos resultados entre los distintos grupos de la experiencia.

La tabla 15 recopila los datos esterológicos para la corteza y la médula del timo lo que permite comparar estas variables en ambas regiones del timo.

<b>Control</b>			
	<b>Corteza</b>	<b>Médula</b>	<b>p</b>
<b>Vv</b>	20,99±2,53	12,81±0,74	0,000122
<b>Sv</b>	333,70±50,58	168,75±38,12	0,000395
<b>QA</b>	23174,72±2468,08	13632,91±1832,68	0,000120
<b>Clenbuterol</b>			
	<b>Corteza</b>	<b>Médula</b>	<b>p</b>
<b>Vv</b>	20,28±3,17	11,94±1,00	0,000508
<b>Sv</b>	309,34±67,01	181,02±11,60	0,002920
<b>QA</b>	17951±4655	10073,92±1345,11	0,006642
<b>Clenbuterol +dexametasona</b>			
	<b>Corteza</b>	<b>Médula</b>	<b>p</b>
<b>Vv</b>	16,84±2,28	10,56±3,05	0,002395
<b>Sv</b>	203,41±37,39	112,07±40,81	0,002354
<b>QA</b>	14071±3362	7729,07±3494,72	0,009441

**Tabla 15:** Tabla comparativa de los parámetros esterológicos en la corteza y en la medula del timo, así mismo se incorpora los resultados de análisis estadístico T de Studens.

### **III.2. Timocitos Apoptóticos**

Los datos morfométricos de los timocitos normales y apoptóticos se demuestran en la tabla 16, en la cual se observa una disminución del tamaño nuclear de la Célula-T en el grupo de clenbuterol con respecto al control. En ambos grupos (control y clenbuterol) la media del tamaño nuclear de los timocitos era más pequeña en la corteza que en la médula tímica. En todos los especímenes, los parámetros morfométricos nucleares de los timocitos apoptóticos fueron enormemente disminuidos en comparación con las Células-T normales, de modo que las diferencias en el tamaño de las Célula-T apoptóticas entre los grupos y entre las regiones tímica fueran escasas.

Los datos de la forma nuclear dieron escasas diferencias entre los grupos, aunque el general, los factores de la forma de los timocitos normales reflejó una forma nuclear más irregular en la médula que en las regiones de la corteza.

Los resultados estereológicos para los timocitos normales y apoptóticos se demuestran gráficamente en la figura 32. Las variaciones significativas en la fracción del volumen y la densidad numérica de las Células-T fueron observadas en la corteza y la médula tímica del grupo del clenbuterol con respecto al control.

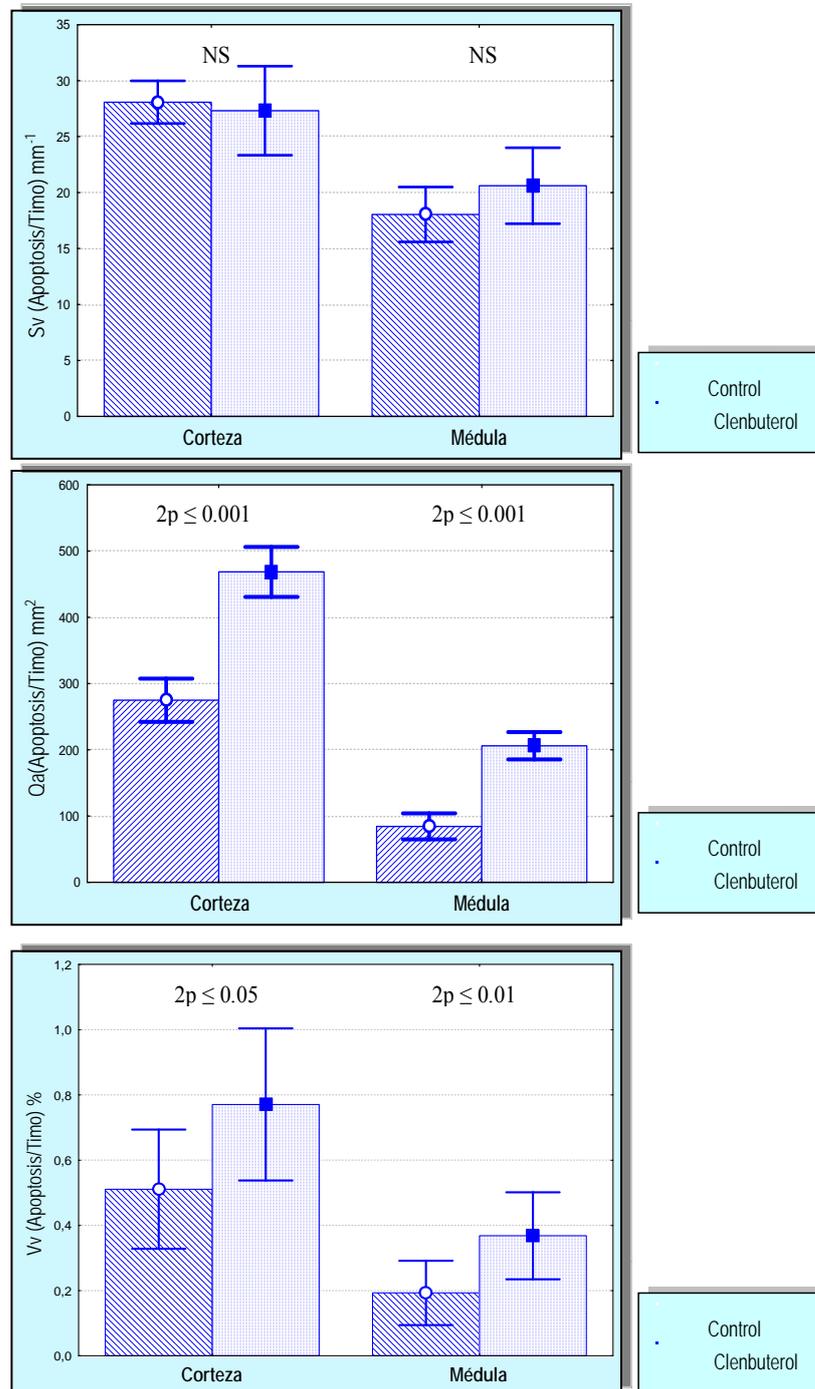
Más excepcionales fueron los datos sobre la densidad numérica de las Células-T apoptóticas, que fueron muy aumentadas en el grupo del clenbuterol con respecto al control.

Análisis	Región	Timocitos apoptóticos				
		Control	Test t pareados <sup>2p</sup>	Clenbuterol	Test t pareados <sup>2p</sup>	Test t Student <sup>2p</sup>
<i>nuclear</i> $\bar{v}_v$	Corteza	29.4 ± 6.4	0.5 <sup>NS</sup>	23.5 ± 3.3	2.3 <sup>NS</sup>	2.3 <sup>*</sup>
	Médula	31.7 ± 9.1		36.6 ± 14.6		0.8 <sup>NS</sup>
Area	Corteza	8.1 ± 0.2	0.6 <sup>NS</sup>	7.7 ± 0.6	1.3 <sup>NS</sup>	1.7 <sup>NS</sup>
	Médula	8.0 ± 0.8		8.3 ± 1.0		0.6 <sup>NS</sup>
Perímetro	Corteza	10.5 ± 0.1	0.7 <sup>NS</sup>	10.2 ± 0.4	0.9 <sup>NS</sup>	2.1 <sup>NS</sup>
	Médula	10.4 ± 0.5		10.5 ± 0.5		0.2 <sup>NS</sup>
Diámetro medio	Corteza	3.05 ± 0.2	0.2 <sup>NS</sup>	3.08 ± 0.1	0.1 <sup>NS</sup>	0.4 <sup>*</sup>
	Médula	3.06 ± 0.2		3.07 ± 0.2		0.04 <sup>NS</sup>
FFPE	Corteza	0.93 ± 0.03	0.9 <sup>NS</sup>	0.88 ± 0.06	1.3 <sup>NS</sup>	1.9 <sup>NS</sup>
	Médula	0.91 ± 0.07		0.89 ± 0.08		0.5 <sup>NS</sup>
FFELL	Corteza	0.81 ± 0.02	1.2 <sup>NS</sup>	0.84 ± 0.01	2.3 <sup>NS</sup>	2.6 <sup>*</sup>
	Médula	0.83 ± 0.01		0.82 ± 0.01		0.7 <sup>NS</sup>
Índice Apoptótico <sup>a</sup>	Corteza	0.89 ± 0.11	3.2 <sup>*</sup>	1.33 ± 0.11	8.7 <sup>***</sup>	7.8 <sup>***</sup>
	Médula	0.64 ± 0.17		1.67 ± 0.04		16.9 <sup>***</sup>

<sup>a</sup> Porcentaje de timocitos apoptóticos respecto al total de timocitos

NS: No significativa; \*:  $2p \leq 0.05$ ; \*\*:  $2p \leq 0.01$ ; \*\*\*

**Tabla 16:** Datos morfométricos y resultados estadísticos de timocitos apoptóticos en corteza y médula. Los datos son dados como media ± Desviación estándar. Los resultados entre corteza y médula son comparados usando la t de Student para datos pareados y la comparación entre el grupo control y el tratado con clenbuterol fue realizada usando la t de Student para muestras independientes.



**Figura 32:** Resultados esterológicos de los timocitos apoptóticos en la corteza y en la medula en los animales normales y en los tratados con clenbuterol.

El índice de apoptosis, expresado como el porcentaje de los timocitos apoptóticos con respecto a las Células-T totales fue de  $0.89 \pm 0.11$  y  $0.64 \pm 0.17$  (corteza y médula, respectivamente) en el control, mientras que fue  $1.33 \pm 0.11$  y  $1.67 \pm 0.04$  (corteza y médula, respectivamente) en el grupo del clenbuterol. Se observó así mismo, un incremento altamente significativo en el índice apoptótico del timocito en el grupo del clenbuterol con respecto al control, en la corteza ( $t=7.8$ ,  $p<0.001$ ) y en la médula ( $t=16.9$ ,  $p<0.001$ ).

### **III.3. Células Epiteliales**

Las células epiteliales tímicas juegan un papel importante en los procesos selectivos de los timocitos inmaduros dobles positivos ( $CD4^+ CD8^+ TCR^+ CD3^+$ ) con los cuales interactúan, por mecanismos aún no bien conocidos, lo que conduce a la selección positiva y negativa. En la selección positiva los timocitos interactúan con células epiteliales corticales del timo (Las células corticales epiteliales van provistas de largos procesos de membrana que permiten contactos simultáneos con varios timocitos): los timocitos con el TCR restringido por MHC propio reciben una señal protectora que les libera de la muerte celular programada; en cambio, la apoptosis afectaría a los timocitos no restringidos por MHC propio.

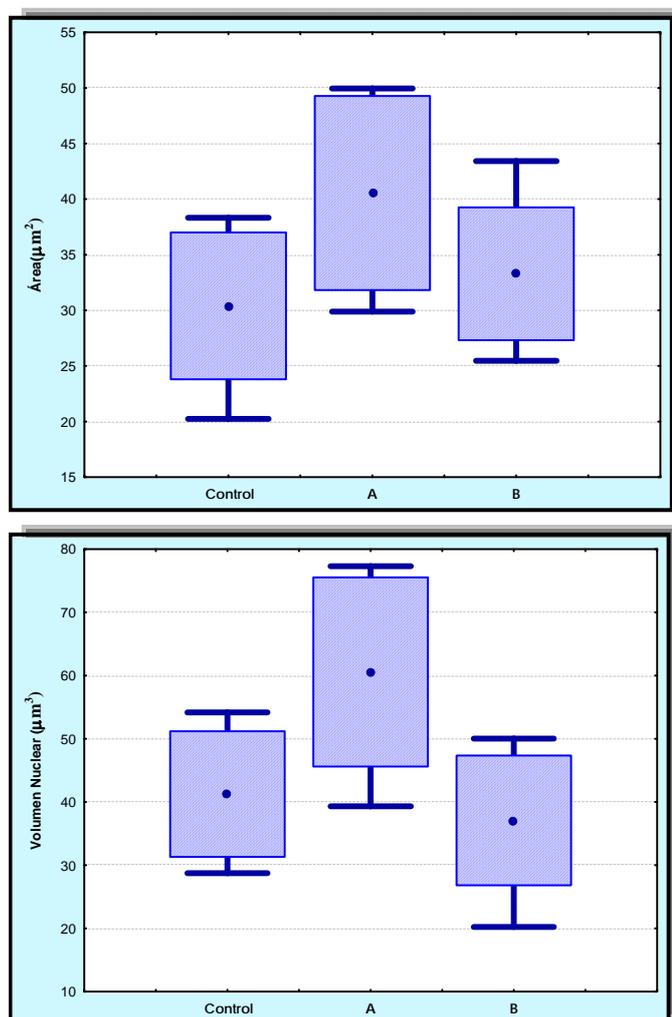
De los timocitos que sobreviven a la selección positiva algunos llevan TCR de baja afinidad hacia auto-péptidos presentados por MHC, y otros llevan TCR con alta afinidad hacia auto-péptidos presentados por ese MHC: estos últimos sufren selección negativa, que ocurre en la zona de transición córtico-medular y en la médula tímica, y en la que las células dendríticas y los macrófagos interaccionan con los timocitos portadores de TCR de alta afinidad hacia {autopéptidos-MHC} o hacia MHC solo.

### **III.3.a CORTEZA**

#### **1° Parámetros morfométricos**

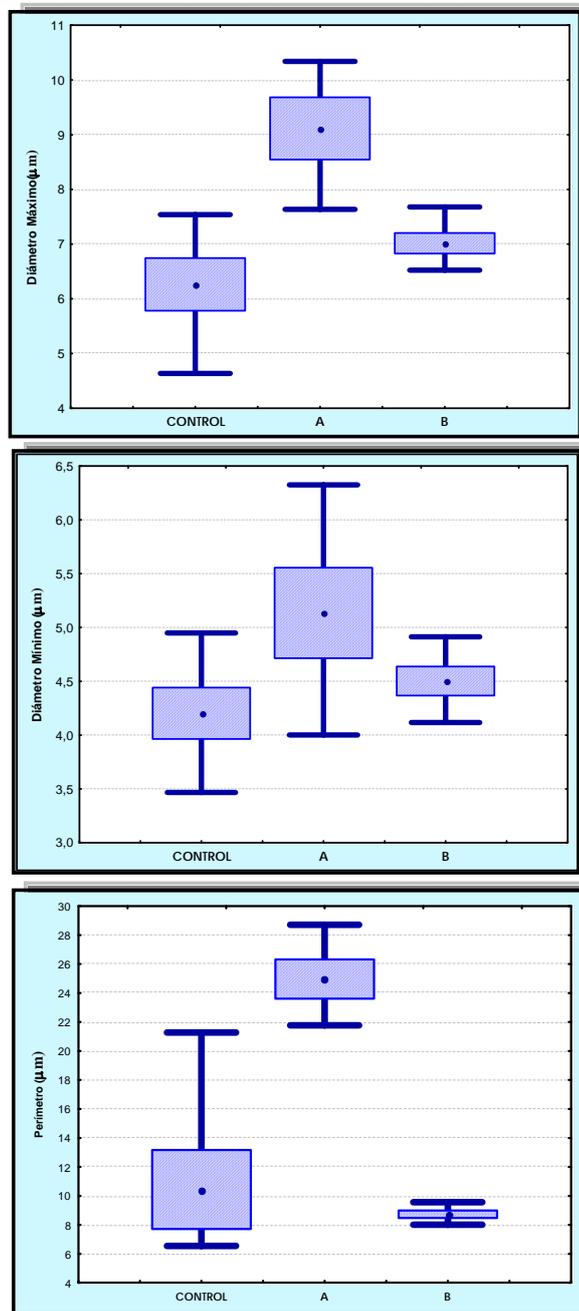
La administración del agonista  $\beta_2$  adrenérgico como es el clenbuterol provocó cambios significativos en el tamaño nuclear medio de las células epiteliales, de tal manera que los datos del área y volumen nuclear (Figura 33) de esta población celular se incrementó significativamente respecto a los valores del grupo control.

Sin embargo cuando se incorporó la dexametasona al tratamiento anabolizante, además del clenbuterol, el área y volumen nuclear de las células epiteliales descendió hasta aproximarse a las cifras registradas en el grupo control.



**Figura 33:** Área y volumen nuclear de las células epiteliales en la corteza del timo.

Los parámetros lineales de los núcleos de las células epiteliales en la corteza del timo (Figura 34) reflejaron cambios en consonancia con las variaciones del área y volumen nuclear antes comentadas. Especialmente significativo resultó en incremento del diámetro nuclear máximo y el perímetro nuclear en el grupo clenbuterol, respecto a los datos del control.



**Figura 34:** Parámetros lineales (diámetro máximo, mínimo y perímetro) de los núcleos de las células epiteliales en la corteza del timo.

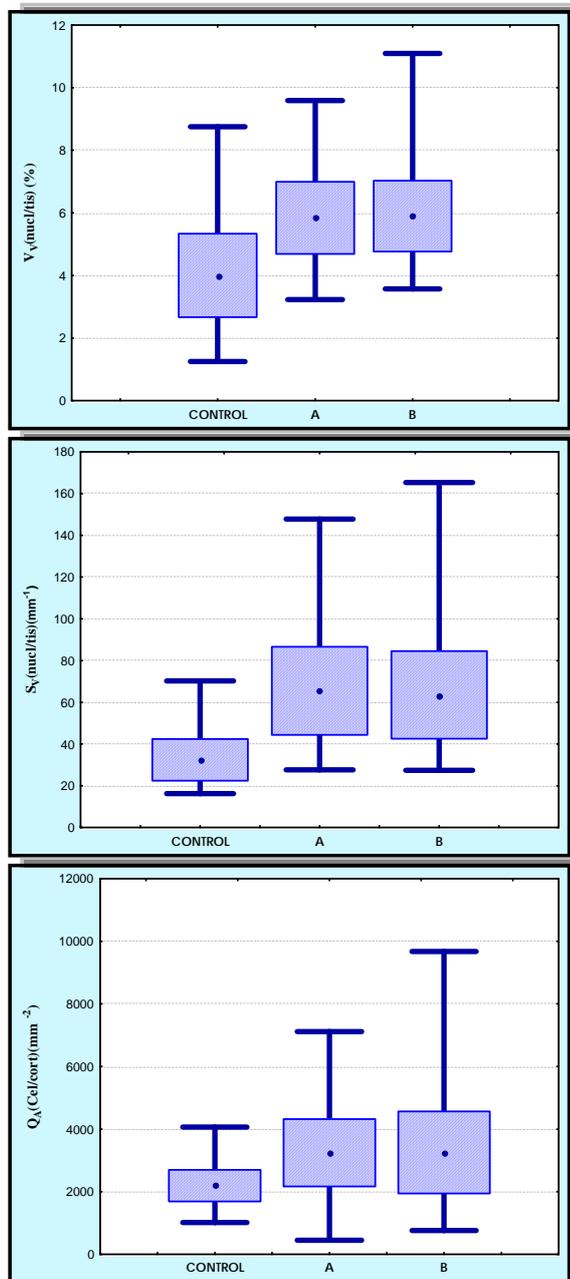
Los glucocorticoides (dexametasona) determinaron la práctica desaparición de estos incrementos, ofreciendo unos valores muy próximos a los registrados en el grupo control. En la tabla 17 se muestran los resultados del ANOVA que nos informan sobre los niveles de significación de las diferencias encontradas en los resultados morfométricos para esta población celular.

		Control	A	B
Área	Control		0,258409	0,083297
	A	0,258409		0,812854
	B	0,083297	0,812854	
Volumen Nuclear	Control		0,586125	0,141779
	A	0,586125		0,021443
	B	0,141779	0,021443	
Diámetro Máximo	Control		0,001698	0,461216
	A	0,001698		0,011540
	B	0,461216	0,011540	
Diámetro Mínimo	Control		0,104102	0,740972
	A	0,104102		0,291956
	B	0,740972	0,291956	
Perímetro	Control		0,000167	0,762973
	A	0,000167		0,000036
	B	0,762973	0,000036	

**Tabla 17:** Resultados del Anova para los parámetros morfológicos de las células epiteliales en la corteza del timo.

## 2° Parámetros esterológicos

Al observar los resultados de la densidad numérica de la células epiteliales en la corteza del timo se aprecia un ligero incremento respecto a las cifras del control tanto en el grupo clenbuterol como en el clenbuterol+dexametasona, sin que se aprecien apenas diferencias entre ambos grupos de tratamiento.



El ligero incremento de la densidad numérica de las células epiteliales en el grupo clenbuterol junto con el mayor tamaño nuclear registrado en este grupo en esta población celular estuvo en correspondencia con la mayor fracción de volumen de la corteza del timo que ocuparon los núcleos de las células epiteliales con clenbuterol, al compararlos con las cifras control.

**Figura 35:** Resultados esterológicos de la fracción de volumen ( $V_V$ ), densidad de superficie ( $S_V$ ) y densidad numérica ( $Q_A$ ) de los núcleos de las células epiteliales en la corteza del timo.

El incremento de la fracción de volumen nuclear ( $V_v$ ) en el grupo tratado con dexametasona fue mucho más moderado, tal como era de esperar teniendo en cuenta los datos registrados del tamaño nuclear en este grupo experimental.

La Figura 35 recoge los resultados de las variables estereológicas estimadas en los tres grupos de la experiencia.

La tabla 18 muestra los niveles de significación de las comparaciones entre los tres grupos, para los parámetros estereológicos obtenidos en este trabajo.

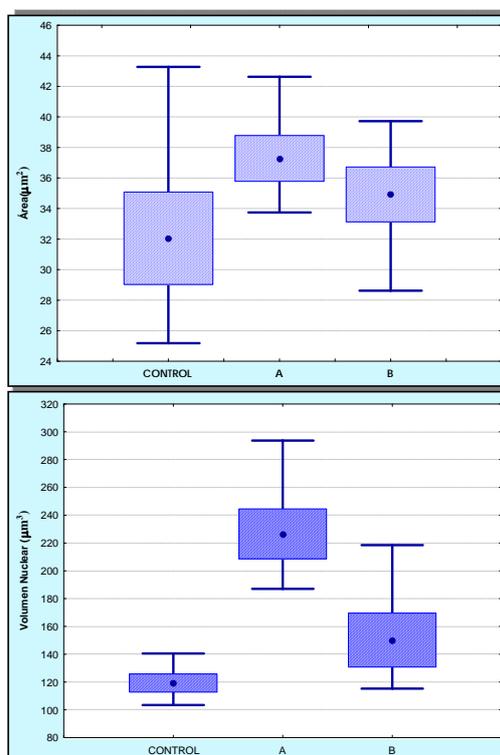
		Control	A	B
Fracción de volumen	Control		0,998165	0,500330
	A	0,998165		0,466406
	B	0,500330	0,466406	
Densidad de superficie	Control		0,498297	0,509654
	A	0,498297		0,997211
	B	0,509654	0,997211	
Densidad numérica	Control		0,802510	0,782562
	A	0,802510		0,999967
	B	0,782562	0,999967	

**Tabla 18:** Resultados del Anova para los parámetros estereológicos fracción de volumen ( $VV$ ), densidad de superficie ( $SV$ ) y densidad numérica ( $QA$ ) de las células epiteliales en la corteza del timo.

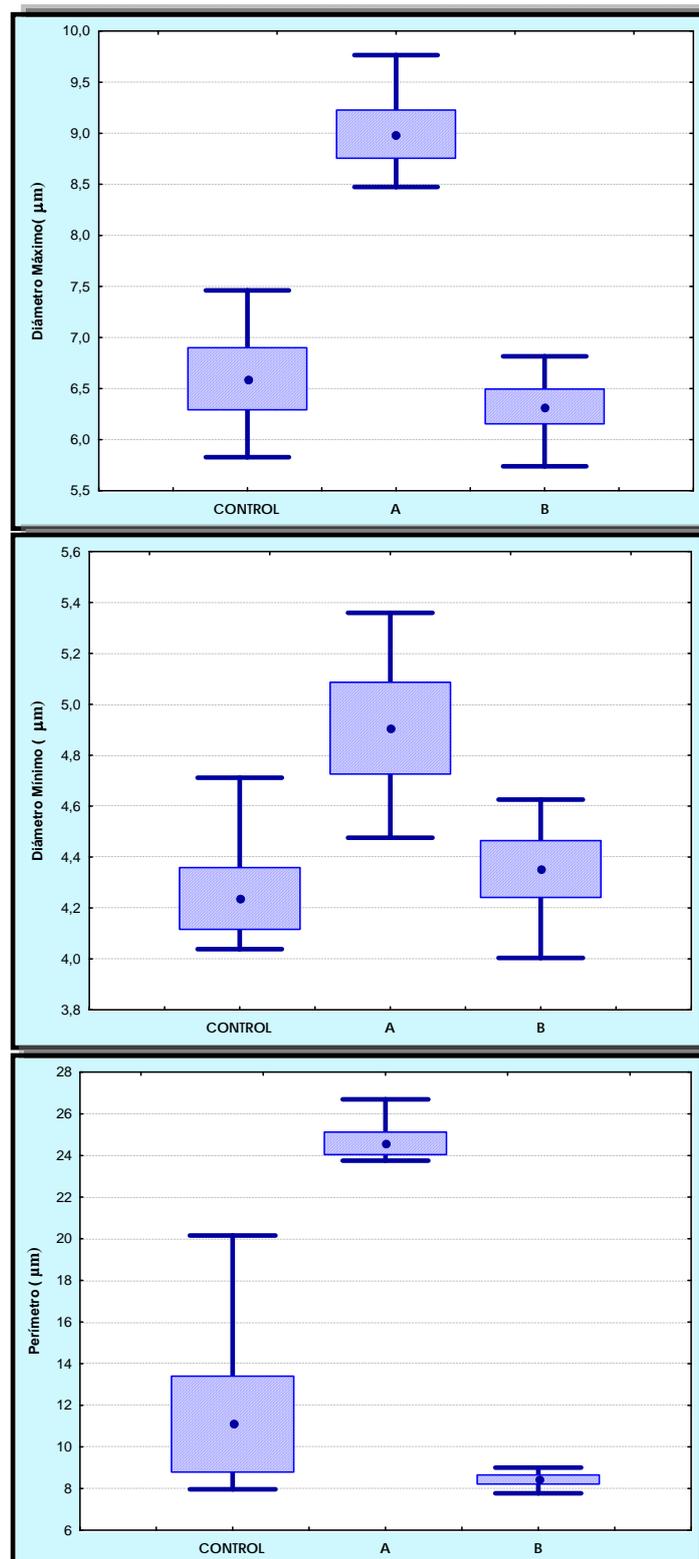
### III.3.b Médula

#### 1° Parámetros morfométricos

En la médula del timo las células epiteliales mostraron cambios en sus parámetros morfométricos nucleares que en líneas generales coinciden con los datos registrados en la corteza para esta población celular. Así el tamaño nuclear medio fue notablemente mayor en el grupo tratado con clenbuterol, en tanto que el grupo tratado con el clenbuterol más dexametasona solo registro ligeras oscilaciones respecto al control que no llegaron a ser significativas (Figura 36, 37 y Tabla 19).



**Figura 36:** Área y volumen nuclear de las células epiteliales en la médula del timo.



**Figura 37:** Parámetros lineales (diámetro máximo, mínimo y perímetro) de los núcleos de las células epiteliales en la médula del timo.

		Control	A	B
Área	Control		0,289302	0,647133
	A	0,289302		0,743982
	B	0,647133	0,743982	
Volumen Nuclear	Control		0,002306	0,427901
	A	0,002306		0,017999
	B	0,427901	0,017999	
Diámetro Máximo	Control		0,000040	0,717499
	A	0,000040		0,000008
	B	0,717499	0,000008	
Diámetro Mínimo	Control		0,018474	0,837711
	A	0,018474		0,041274
	B	0,837711	0,041274	
Perímetro	Control		0,000028	0,360217
	A	0,000028		0,000002
	B	0,360217	0,000002	

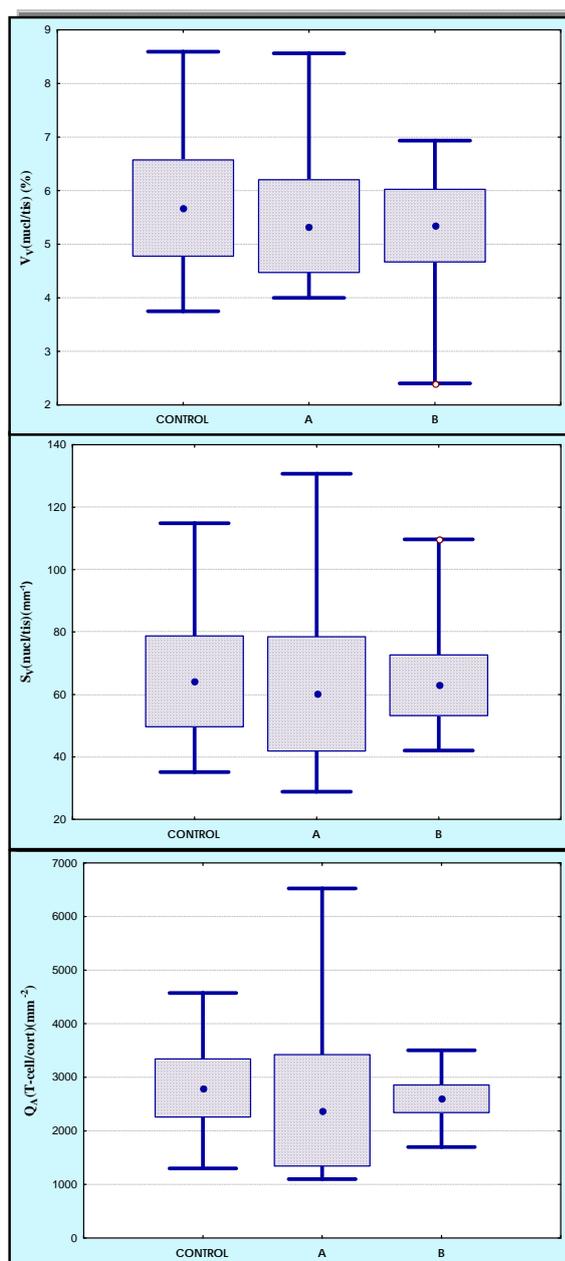
**Tabla 19:** Resultados del Anova para los parámetros morfológicos de las células

## 2º Parámetros esterológicos

La densidad numérica de las células epiteliales en la médula del timo mostró un ligero descenso respecto a las cifras del control en el grupo clenbuterol.

Este ligero descenso de la densidad numérica de las células epiteliales en el grupo clenbuterol contrarrestó el mayor tamaño nuclear de esta población celular de tal manera que la fracción de volumen que ocuparon los núcleos de las células epiteliales no mostró diferencias entre los grupos experimentales.

La Figura 38 recoge los resultados de las variables estereológicas estimadas en los tres grupos de la experiencia.



**Figura 38:** Resultados esterológicos de la fracción de volumen ( $V_v$ ), densidad de superficie ( $S_v$ ) y densidad numérica ( $Q_n$ ) de los núcleos de las células epiteliales en la médula del timo.

Obviamente las comparaciones entre grupos para estas variables no alcanzaron ningún nivel de significación (Tabla 20).

		Control	A	B
Fracción de volumen	Control		0,959676	0,958606
	A	0,959676		0,999960
	B	0,958606	0,999960	
Densidad de superficie	Control		0,980933	0,997880
	A	0,980933		0,990263
	B	0,997880	0,990263	
Densidad numérica	Control		0,909559	0,976021
	A	0,909559		0,972614
	B	0,976021	0,972614	

**Tabla 20:** Resultados del Anova para los parámetros estereológicos fracción de volumen (VV), densidad de superficie (SV) y densidad numérica (QA) de las células epiteliales en la médula del timo.

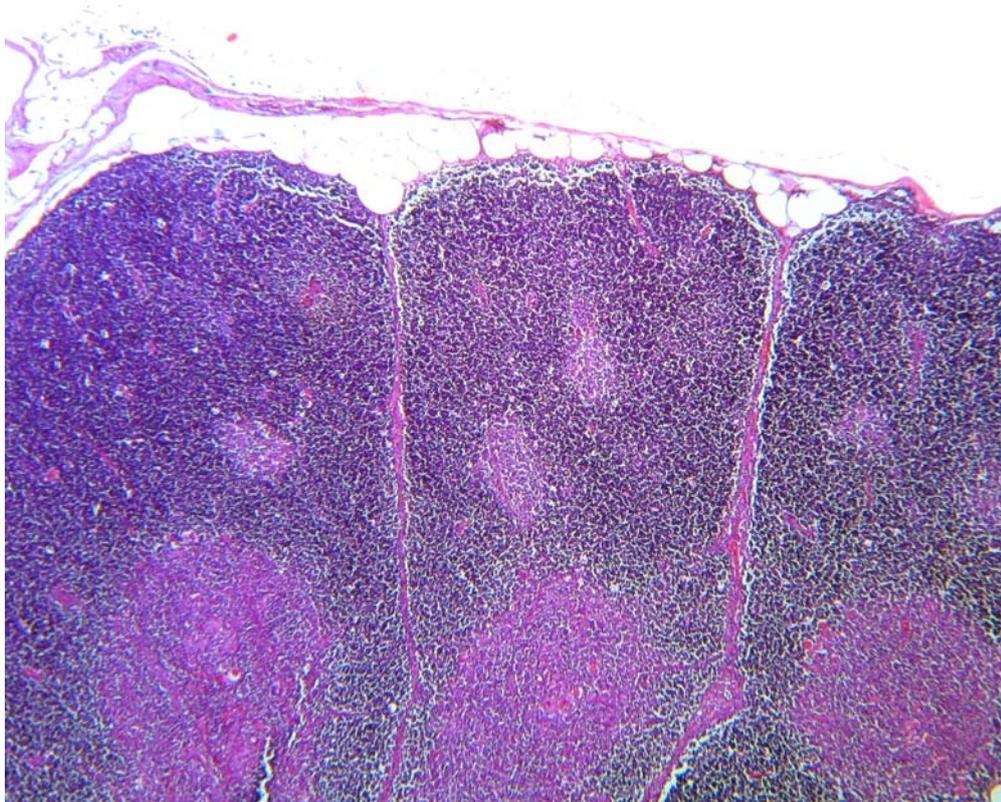
#### **IV. Datos Histopatológicos**

Las alteraciones, a nivel morfológico y esterológico, sufridas por los timos de los animales tratados en comparación con los controles son igualmente evidentes tanto a nivel histológico como ultraestructural.

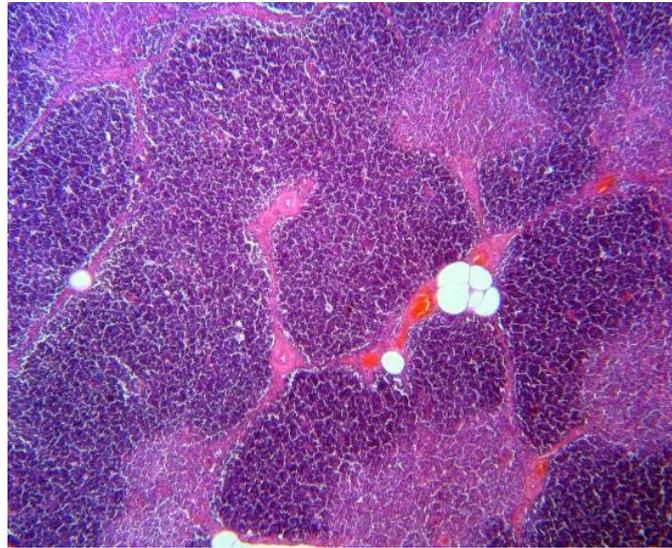
## IV.1. Microscopía óptica

### IV.1.a Grupo Control

Los timos de los animales controles están constituidos por lóbulos con su corteza y médula correspondientes, separados por finos tabiques de tejido conectivo vascular. La médula de todos los lóbulos en el timo normal, está rodeada por una corteza de espesor generalmente constante (Figura 39 y 40).

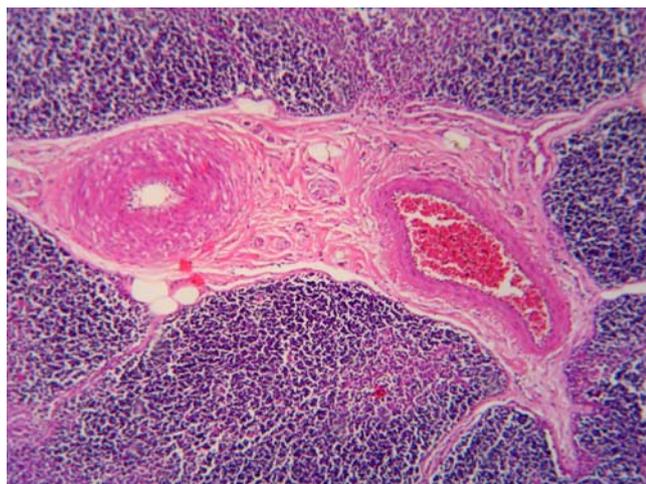


**Figura 39:** Detalle de los lóbulos subcapsulares del timo de un animal control (HE x40)



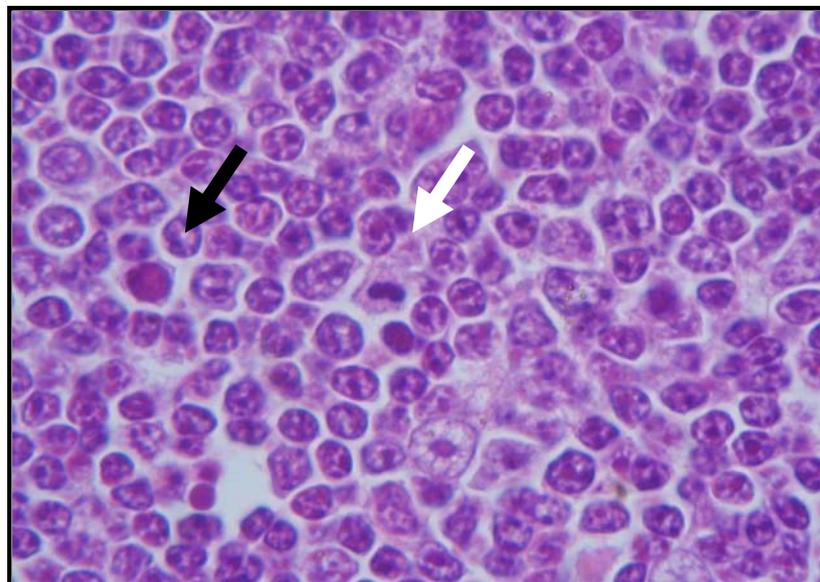
**Figura 40:** Imagen de los tabiques interlobulares en el timo de un animal control (HE x40)

A nivel de los tabique encontramos arteriolas musculares y vénulas de mediano tamaño y aislados adipositos (Figura 41). En la corteza y en la médula sólo se observan estructuras capilares.

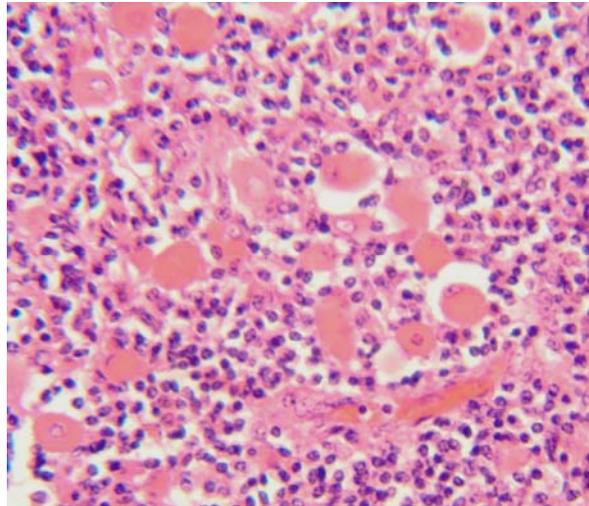


**Figura 41:** Detalle del tabique interlobular en un animal control. Obsérvese el escaso componente adiposo encontrado a este nivel. (HE x200)

En la corteza, los timocitos (de los distintos subtipos) se encuentran homogéneamente distribuidos y agrupados de forma compacta, presentan escaso citoplasma y núcleos redondos, de cromatina grumosa e hipercromáticos. Se observan aisladas mitosis y ocasionales núcleos apoptóticos (Figura 42). A nivel de médula se observa una menor densidad nuclear con células de núcleo ovalado ligeramente vesiculoso y cromatina menos densa. Así mismo, se observan células redondeadas y ovaladas, abundante citoplasma eosinófilo y núcleo oval de mayor tamaño que los timocitos que se corresponden con células epiteliales (Figura 43).

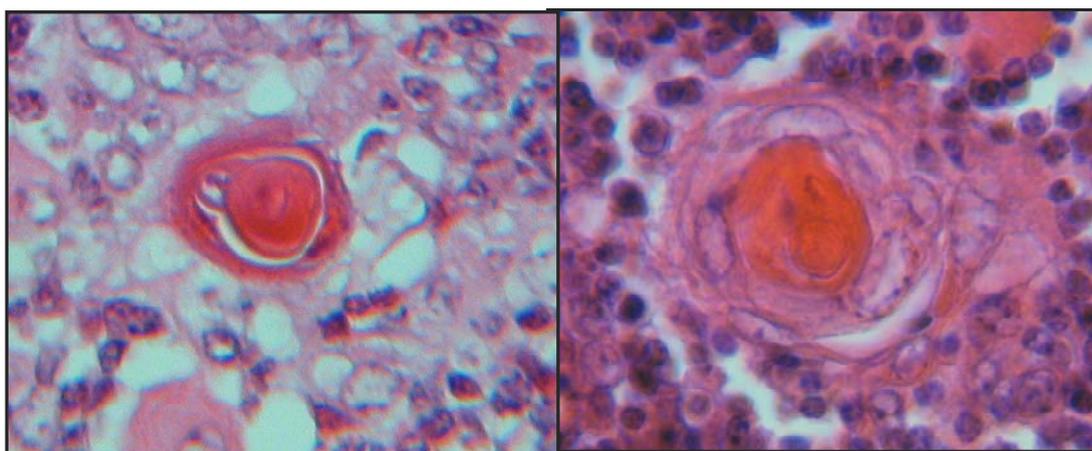


**Figura 42:** Imagen histológica de la corteza tímica donde se identifica una figura de mitosis (flecha blanca) y un cuerpo apoptótico (flecha negra). (HE x400)



**Figura 43:** Detalle las células epiteliales a nivel de la médula tímica. (HE x400)

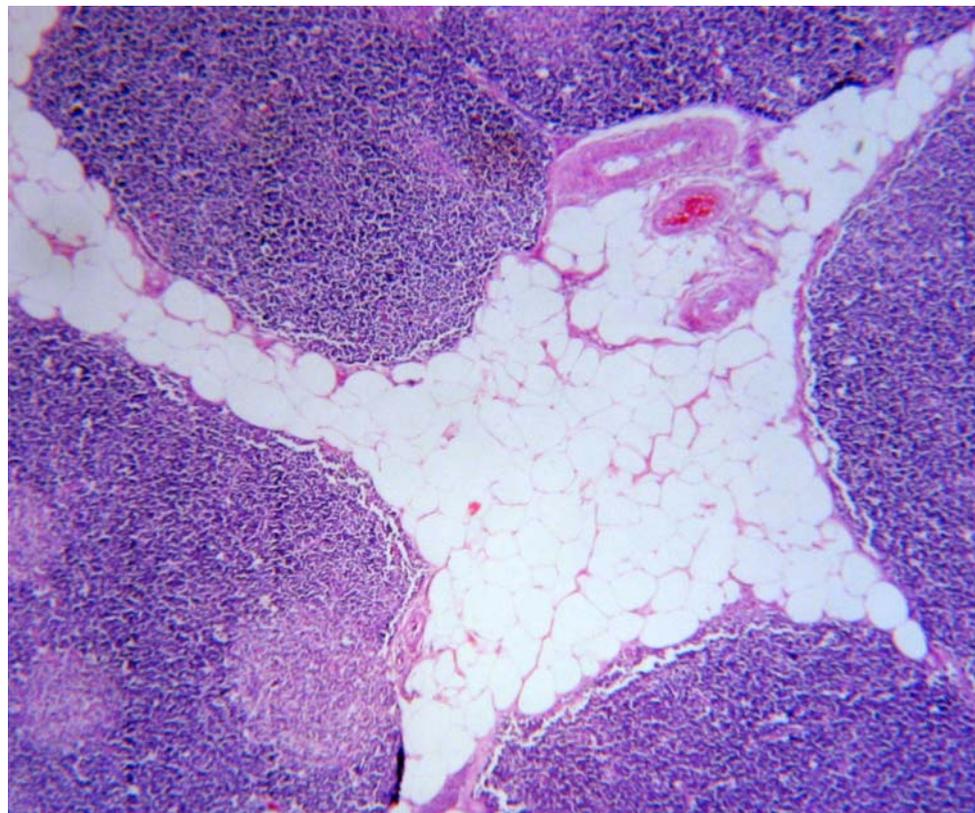
Los corpúsculos de Hassall observados en las médulas de los timos control son de pequeño tamaño con centro eosinófilo de aspecto corneo, rodeado por células epiteliales dispuestas de forma concéntrica. (Figura 44)



**Figura 44:** Detalle los corpúsculos de Hassall a nivel de la médula tímica en los animales control. (HE x1000)

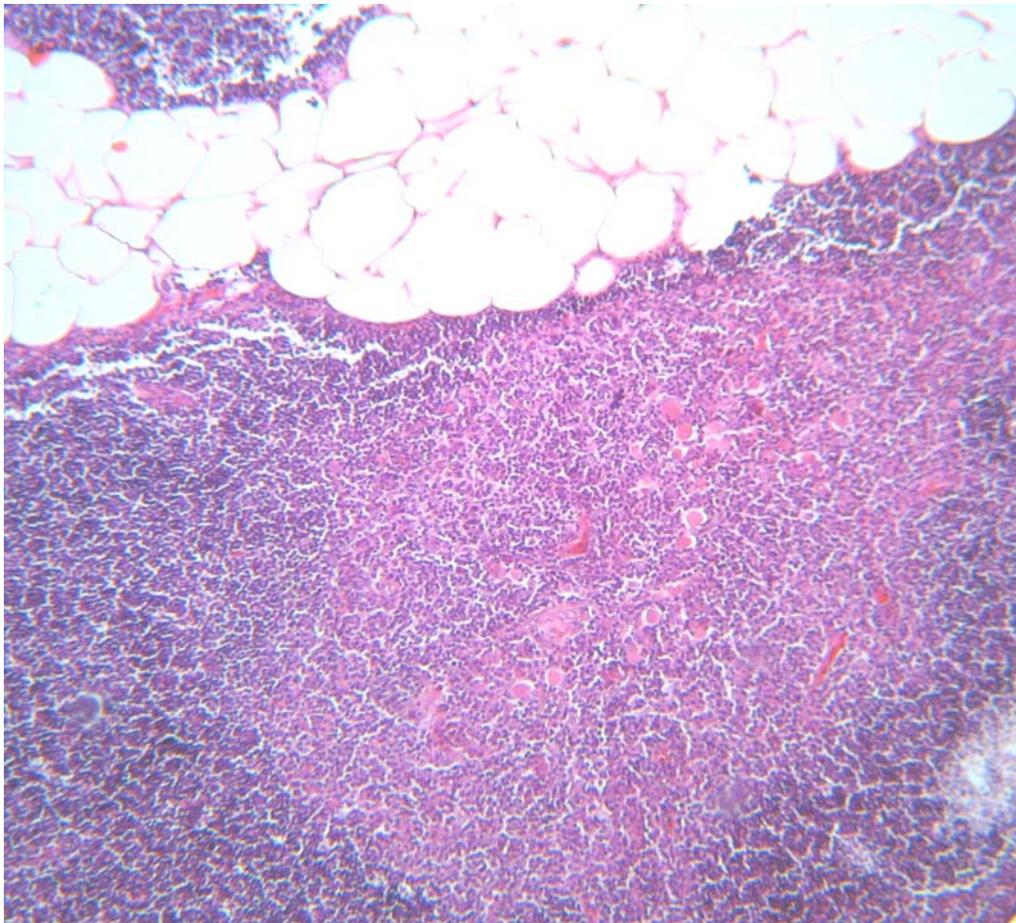
#### IV.1.b Grupo tratado con clenbuterol

En los timos tratados con clenbuterol se observa un aumento del tejido adiposo con engrosamiento de los tabiques, quedando los vasos inmersos en dicho tejido. (Figura 45)



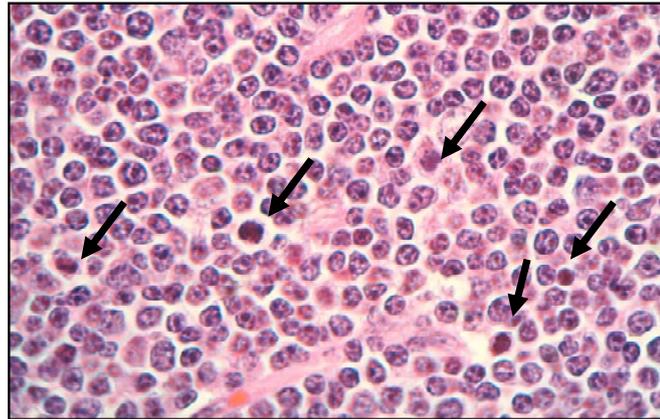
**Figura 45:** Timo de un animal del grupo A en el que se observa un ensanchamiento de los tabique interlobulares a expensas de un aumento del tejido adiposo. (HE x40)

Los lóbulos tímicos adoptan formas geográficas debido a la infiltración y /o sustitución adiposa, observándose una distribución irregular del espesor de la corteza con áreas donde la médula tímica no presenta recubrimiento de corteza, estando en contacto directo con el tejido adiposo por desaparición de los timocitos corticales. (Figura 46)



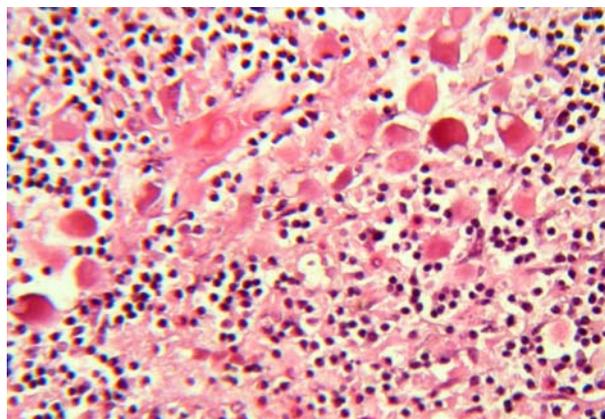
**Figura 46:** Lóbulo de un animal del grupo A en el que se observa una disminución focal del grosor de la corteza por el aumento del tejido adiposo. (HE x200)

La corteza presenta una disminución de su espesor observándose un aumento de las figuras de apoptosis. (Figura 47)



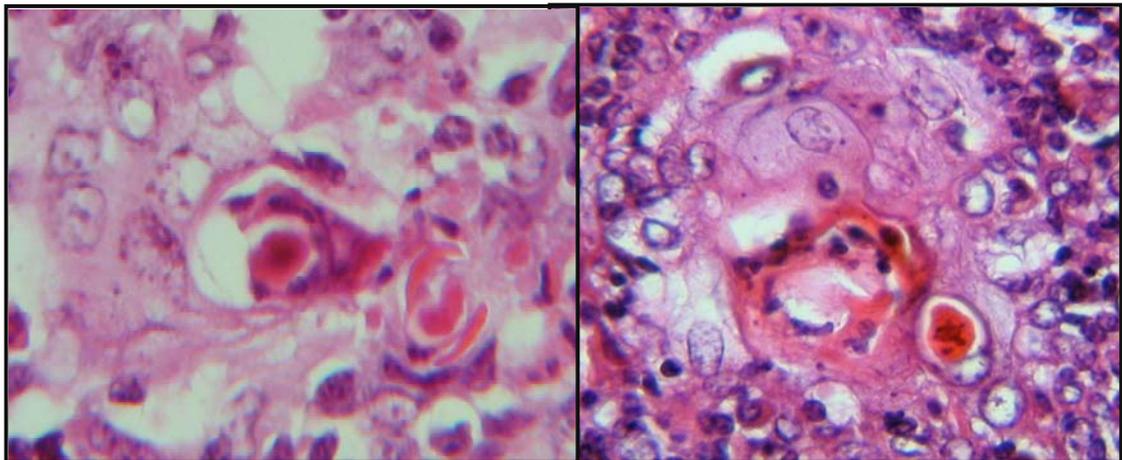
**Figura 47:** Detalle histológico de la corteza tímica del animal tratado con clenbuterol donde se identifican varias figuras de apoptosis. (HE x400)

La médula no presenta óptimamente una importante disminución en su espesor pero sí destacan más las células epiteliales que se debe más probablemente a un descenso en la densidad de timocitos que a un aumento en el número de las mismas. (Figura 48)



**Figura 48:** Médula tímica del animal tratado con clenbuterol donde se aprecia en detalle varias células epiteliales agrupadas. (HE x400)

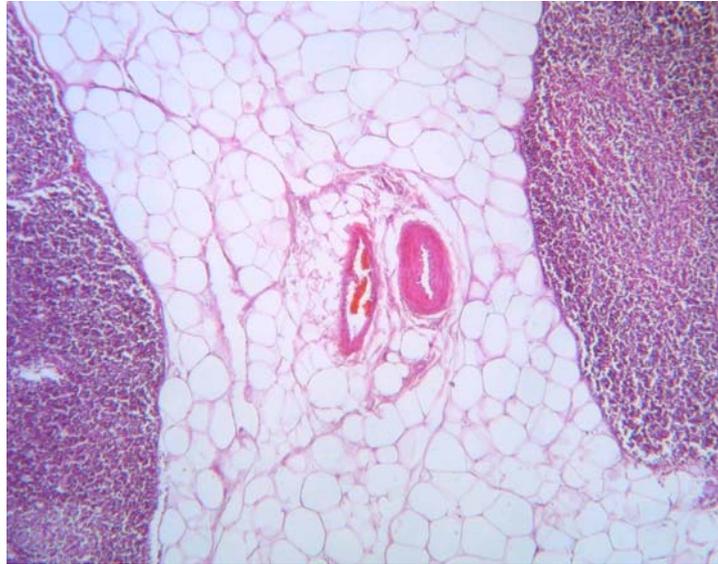
Los corpúsculos de Hassall presentan un mayor tamaño adoptando una morfología más irregular con un material corneo eosinófilo de menor densidad. (Figura 49) y una ligera hipertrofia de las células epiteliales.



**Figura 49:** Detalle histológico de los corpúsculos de Hassall en la médula de un timo del grupo A. (HE x1000)

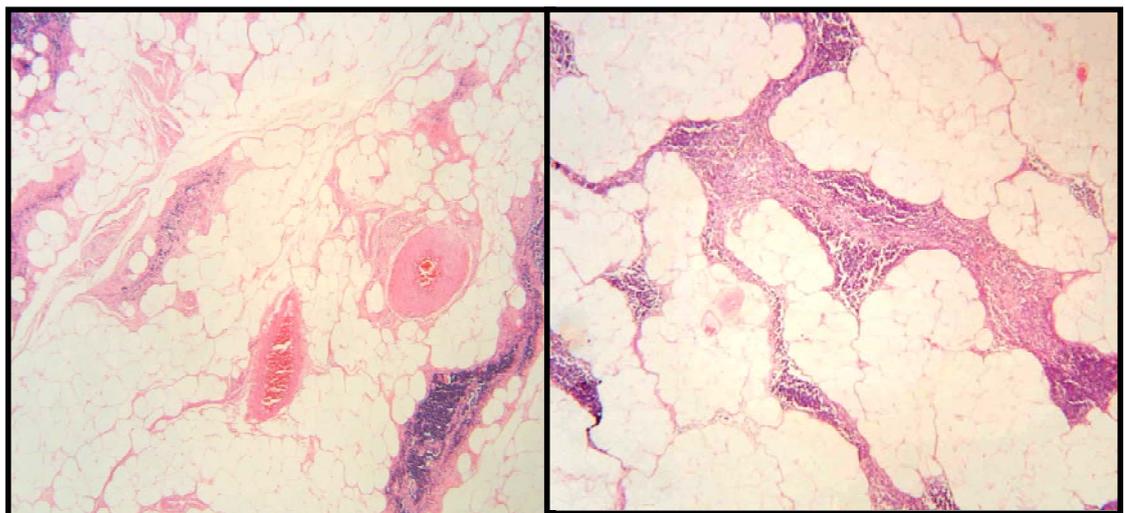
#### **IV.1.c Grupo tratado con clenbuterol y dexametasona**

Los timos de los animales con tratamiento combinado presentaron una marcada disminución del parénquima tímico con una importante sustitución adiposa, que amplía los tabiques conectivo vasculares y reduce la corteza y médula. (Figura 50)



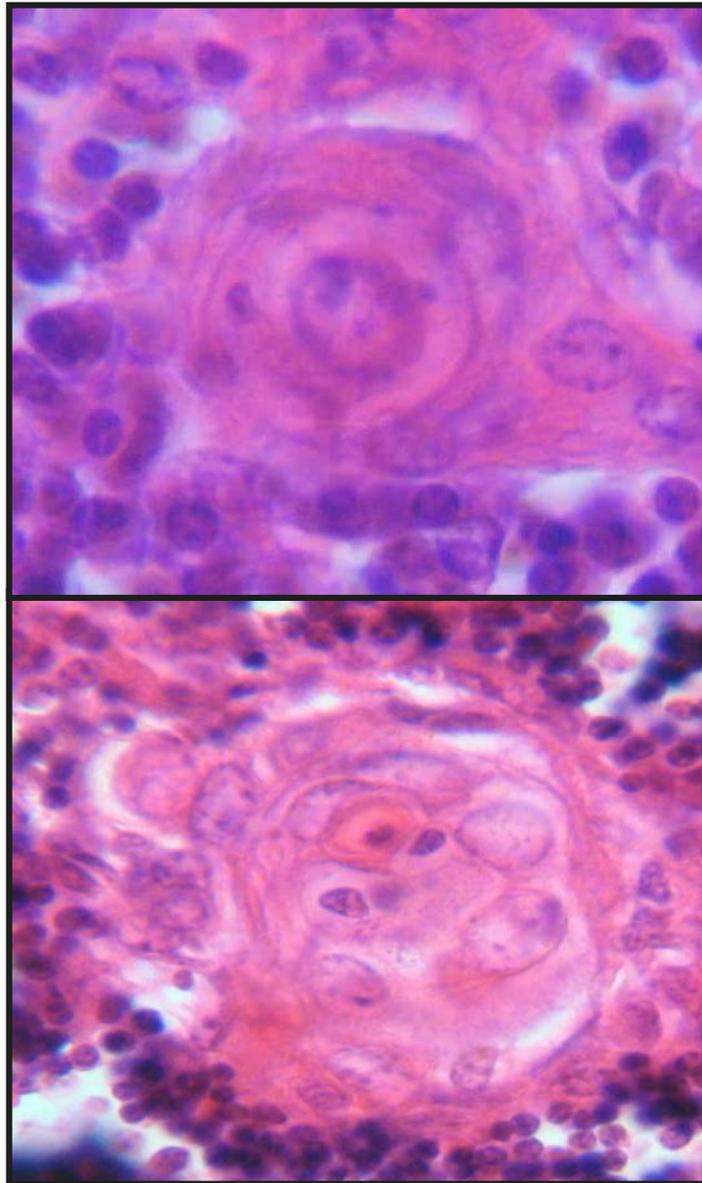
**Figura 50:** Timo de un animal del grupo B en el que se observa un marcado ensanchamiento del tabique interlobular (HE x40)

En los casos más extremos el parénquima tímico quedó reducido a un cordón de timocitos corticales y/o medulares. (Figura 51)



**Figura 51:** Sustitución adiposa extrema sufrida por el timo de un animal con tratamiento combinado. (HE x40)

Los corpúsculos de Hassall presentan un mayor tamaño y no se observa el material corneo eosinófilo a nivel central. (Figura 52)



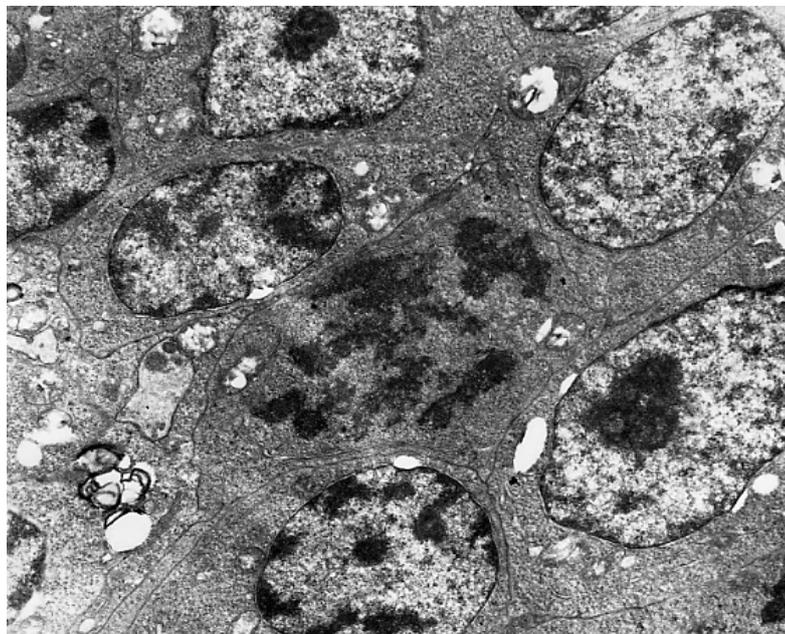
**Figura 52:** Detalle histológico de los corpúsculos de Hassall en la médula de un timo del grupo A. (HE x1000)

## IV.2. Microscopía Electrónica

A nivel ultraestructural se observaron cambios en los distintos elementos que componen el timo destacando algunas alteraciones en los animales tratados.

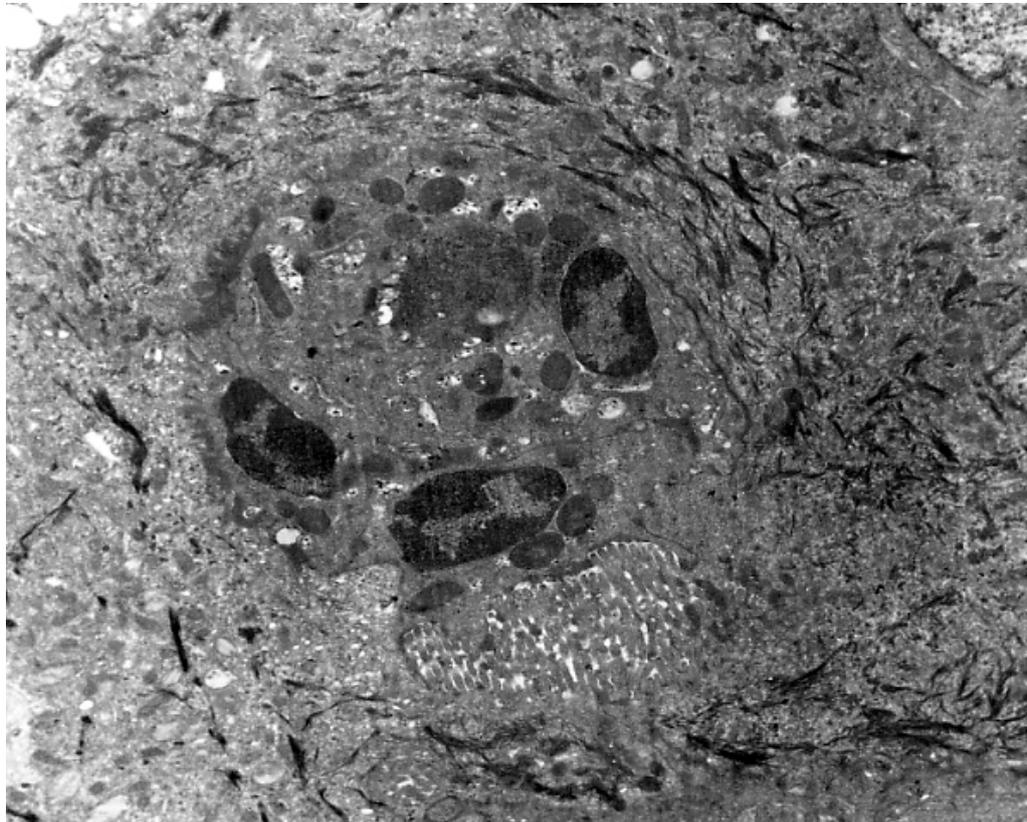
### IV.2.a Grupo Control

En este grupo de experimentación el timo diferencia claramente al microscopio electrónico su corteza y medula. En ambos casos son numerosos los timocitos que se evidencian, con una clara disposición en mosaico. Los timocitos muestran abundantes mitosis (Figura 53) y por el contrario son escasas las imágenes de apoptosis que hemos apreciado.



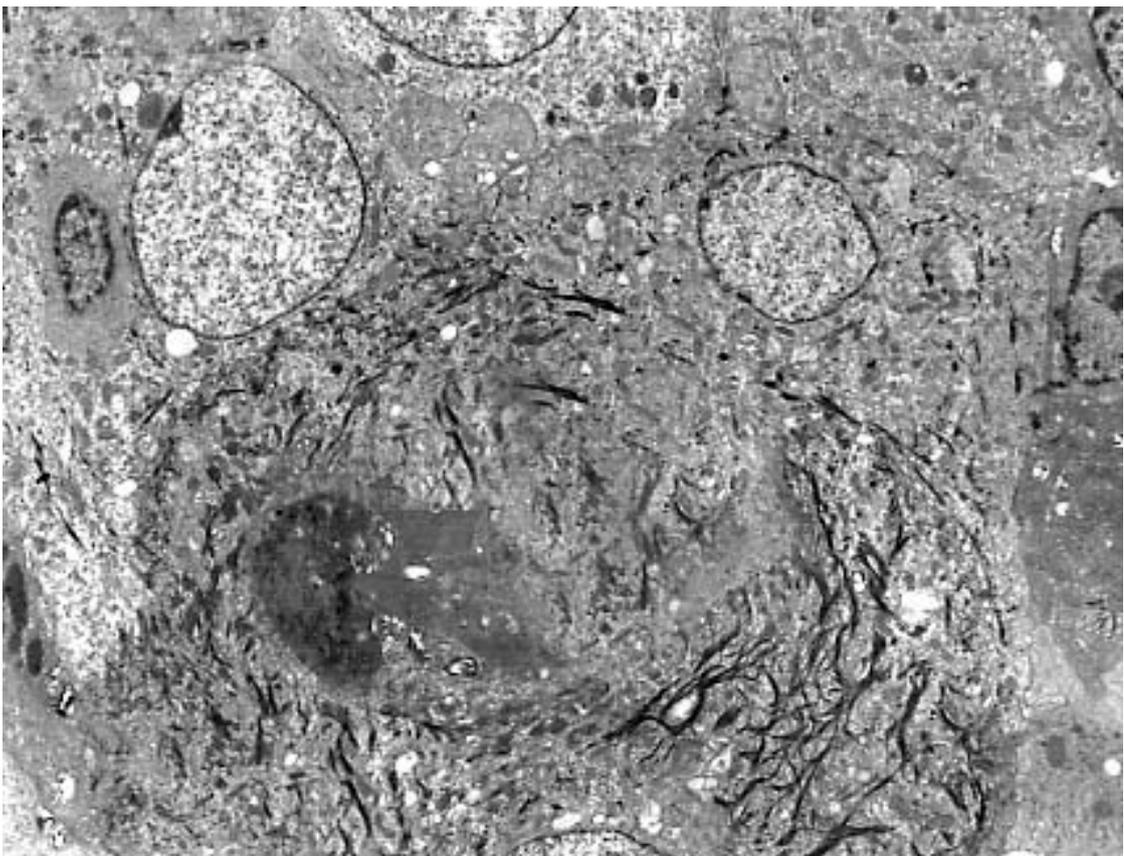
**Figura 53:** Figura de mitosis en un animal del grupo control

En el seno de la medula tímica se destaca la existencia de corpúsculos de Hassall con gran desarrollo, con un centro de una célula retículoepitelial hipertrófica y cornificada. (Figura 55)



**Figura 55:** Figura grupo control

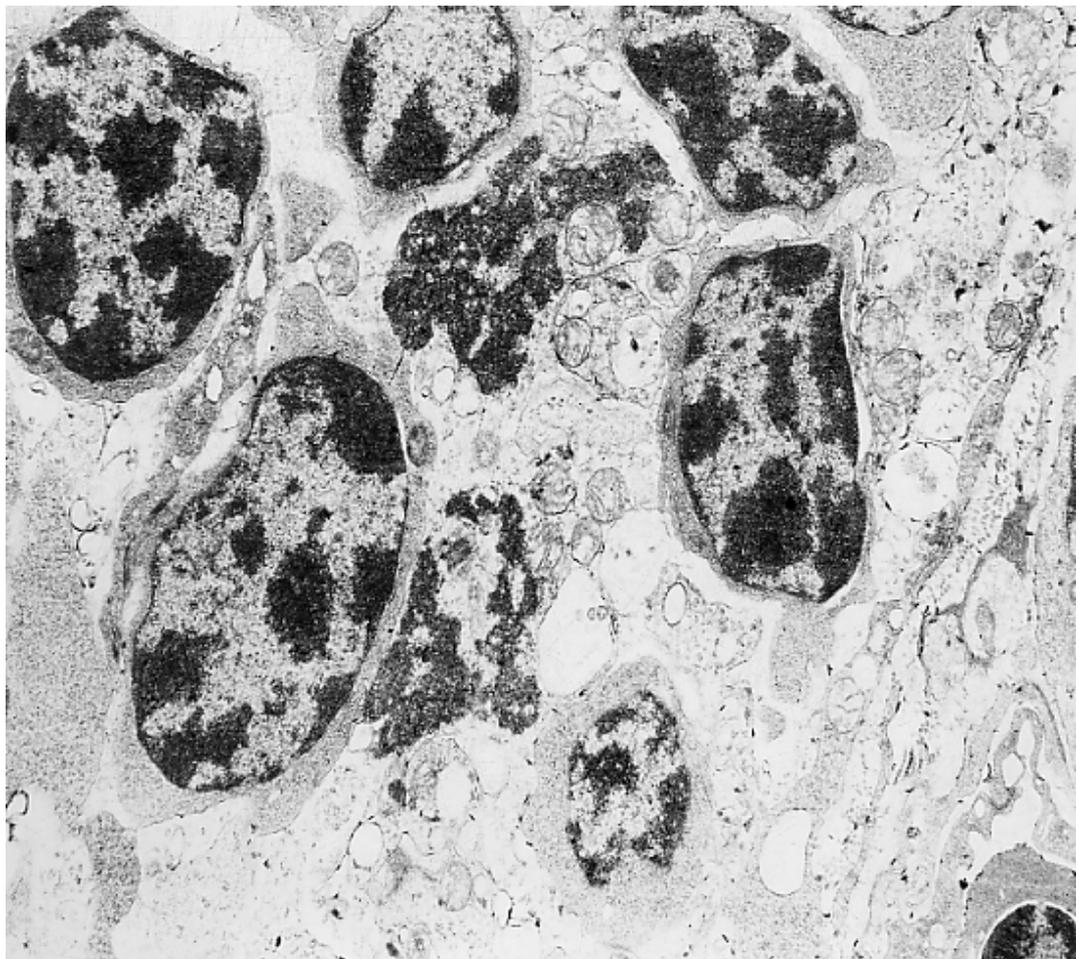
La transformación epitelial de esta célula se acompaña con la presencia de abundantes madejas de tonofilamentos (Figura 56). En la formación de los corpúsculos tímicos se aprecia como de la interrelación de las células epiteliales se conforma una cavidad con microvellosidades, que terminan siendo ocupadas por células del tipo de neutrófilos y sobre todo linfocitos.



**Figura 56:** Corpúsculo de Hassall en el timo del grupo control.

#### IV.2.b Grupo tratado con clenbuterol

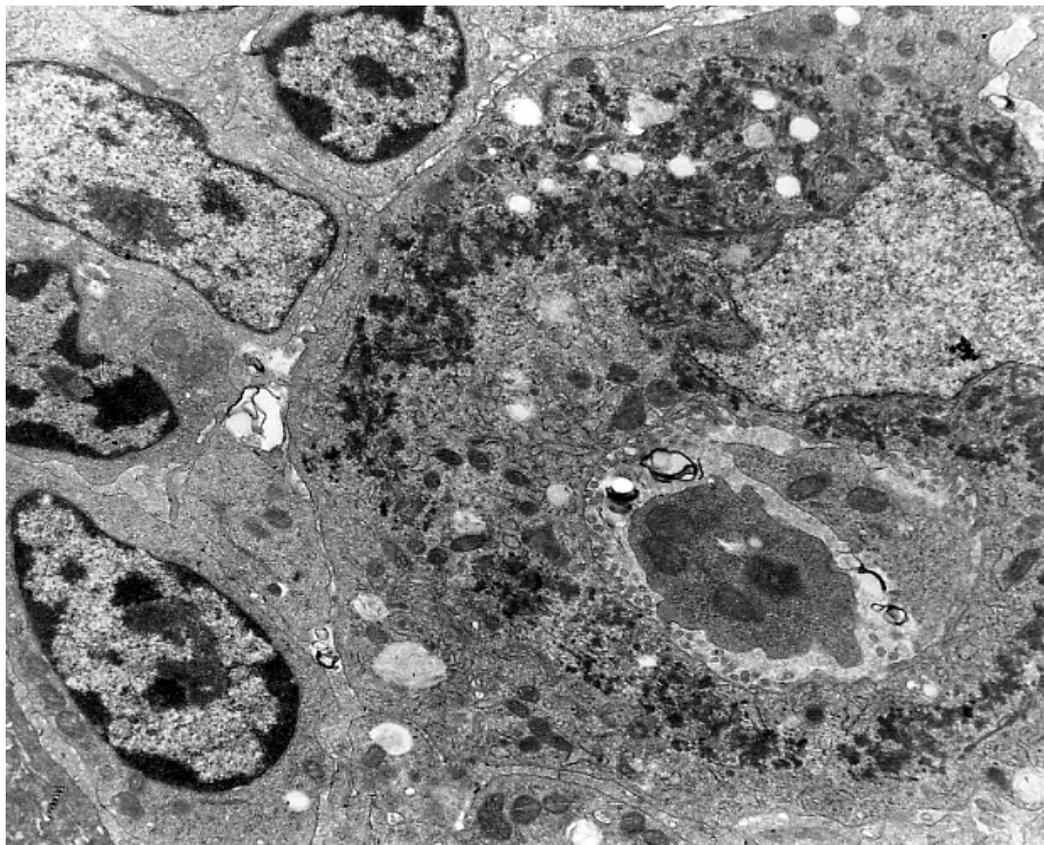
Los timos de este grupo de experimentación al microscopio electrónico, se aprecia una clara disminución de la población de timocitos tanto en la corteza como en la medula, con pérdida de las mitosis y un claro aumento de las apoptosis. (Figura 57)



**Figura 57:** Detalle de la apoptosis en una animal del grupo tratado clenbuterol.

Los corpúsculos de Hassall han aumentado notablemente, pero muestran un escaso grado de maduración, hasta el punto que las células reticuloepiteliales que lo constituyen han aumentado considerablemente su tamaño, y tienen un escaso grado de cornificación, ya que apenas si se distinguen tonofilamentos. (Figura 58)

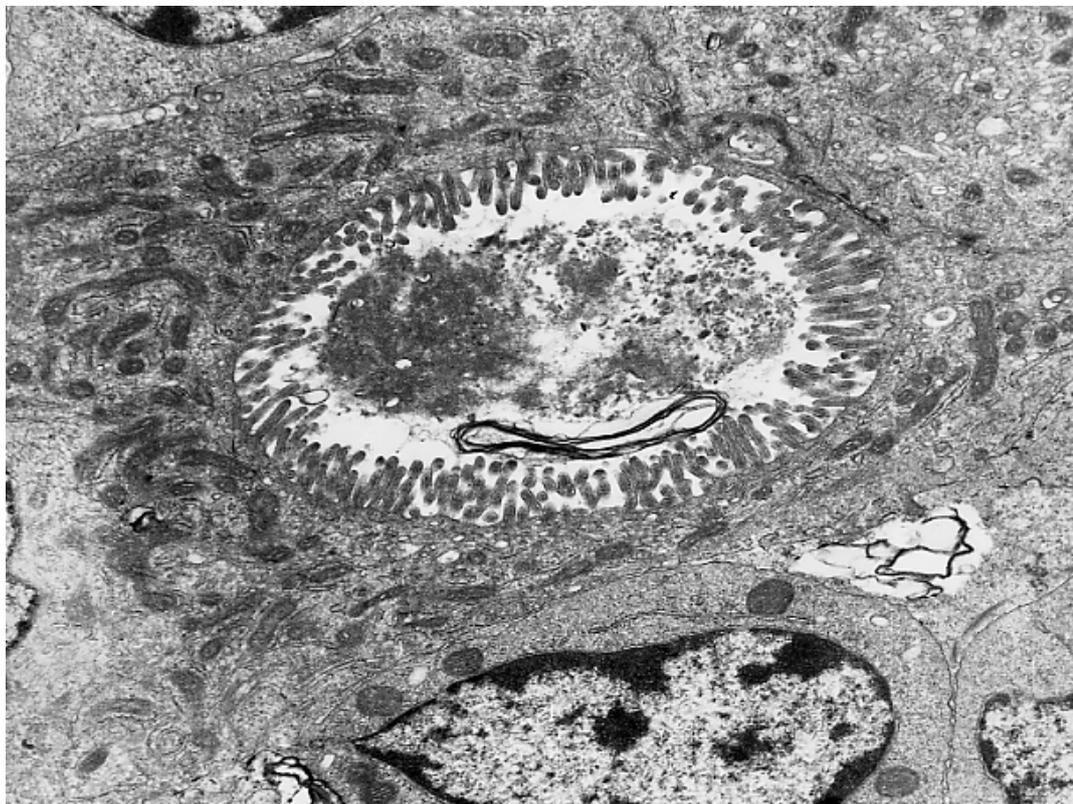
También se acentúa destacadamente la cavidad intercelular con microvellosidades, y apenas muestran relación con otras células sanguíneas.



**Figura 58:** Detalle del corpúsculo de Hassall en el grupo tratado con clenbuterol

#### IV.2.c Grupo tratado con clenbuterol y dexametasona

Los timos de este grupo de experimentación al microscopio electrónico, se acentúan aun más la pérdida de los componentes linfáticos en todo el parénquima tímico. Disminuyendo drásticamente sus mitosis y aumentando notablemente las apoptosis.



**Figura 59:** Cavidad con detalle de las microvellosidades en el grupo con tratamiento combinado

Igualmente que en el otro grupo tratado, los corpúsculos de Hassall han aumentado notablemente, y también muestran un escaso grado de maduración, hasta el punto que las células reticuloepiteliales que lo constituyen han aumentado considerablemente su tamaño, y la cronificación es prácticamente nula, y carece de tonofilamentos. (Figura 59)

Al igual que el grupo tratado con clenbuterol, apenas existe relación entre las células epiteliales pero por otro lado diferencia amplias cavidades con micovellosidades muy desarrolladas.

Se destaca la escasa relación con otros componentes sanguíneos, ni con linfocitos ni neutrófilos.

# *Discusión*

---

---

Actualmente, el uso de promotores de crecimiento en la producción de carne para el consumo humano ha causado una creciente preocupación sobre las potenciales consecuencias adversas en la salud pública. Desde comienzos de los años 80, la utilidad del clenbuterol, sustancia  $\beta$ -agonista, como promotor de crecimiento ha estado bien documentado (Williams, 1987). Con respecto al efecto sobre el timo, existen datos que señalan al timo cómo un

órgano diana de la acción de los anabolizantes, tanto adrenérgicos como esteroideos (Gropp, 1976; Weinstein, 1983; Galbraith, 1997; Groot, 1998; Schilt, 1998). Varios trabajos han documentado la involución del timo que provocan los corticosteroides (Lundin, 1966; Lee, 1967; Csaba ,1967). Sin embargo, los efectos del clenbuterol sobre los tejidos linfoides son escasamente conocidos, a pesar de haber sido descrito (Spencer, 1996) estados de inmunodepresión como consecuencia de tratamientos con clenbuterol.

## **I. A NIVEL DEL ÓRGANO**

Los datos cuantitativos referentes al peso, volumen y tamaño del timo en el grupo control estuvieron dentro de los rangos que eran de esperar, teniendo en cuenta la especie y edades que han sido objeto de estudio (Harderl, 1995). Sin embargo, la morfología tímica mostró una significativa reducción en los grupos tratados con clenbuterol respecto al control y más aun en el grupo al que se le sumo la dexametasona. La reducción del peso tímico en los animales tratados con clenbuterol fue ostensible, considerando el peso del órgano de forma aislada. Este hecho coincide con las observaciones de distintos autores (Gropp, 1976; Weinstein, 1983; Galbraith, 1997; Groot, 1998; Schilt, 1998) en terneros a los que se les alimentó con

finalizadores  $\beta$ 2-adrenérgicos y cuyos timos sufrieron una involución en su desarrollo.

Algunos mecanismos de autorregulación confieren cierto grado de autonomía al sistema inmunológico; sin embargo, pruebas recientes soportan la idea de que su coordinación depende del sistema nervioso y endocrino. Es ampliamente aceptado que el sistema inmune debe ser visto como componente de una red interactiva constituida por tres sistemas (inmune, nervioso, y endocrino) en vez de una entidad autónoma (Ader, 1990; Armstrong, 2001; Blalock, 1989, 1994, 2002; Bodey, 1997; Castagnetta, 2002; Dougherty, 1987; Dougherty, 1990; Ferone, 2000; Plata - Salaman, 1989; Safieh-Garabedian, 1992; Tomaszewska ,1997; Weigent, 1995). Cuando el equilibrio entre el sistemas inmune, nervioso, y endocrino es modificado por algún evento, los sistemas del cuerpo intentan responder por para restituir la homeostasis. El timo, como otros órganos, responde a los insultos de diferentes maneras, pero la complicación observada frecuentemente es la involución siendo el grado de esta dependiente del tipo e intensidad del estímulo (Domínguez-Gerpe, 1999).

Es bien conocido que el timo varía de tamaño con la edad. En terneros, el peso del timo se incrementa hasta los 12 meses de edad, y empieza a disminuir a la edad de 14 meses, aunque no se ha detectado una disminución

brusca en el peso del timo hasta la pubertad (Wise y Klindt, 1995; Geetha y Vijayaragavan, 1997). La involución tímica se caracteriza macroscópicamente por una disminución del peso y del tamaño del órgano (Bodey, 1997).

Los resultados mostraban que el peso de timo estaba evidentemente disminuido en el grupo B con respecto al grupo control. Descensos en el peso del timo han sido previamente descritos en relación al tratamiento con clenbuterol en los cuales se ha incluido corticoides (Groot, 1998). La atrofia tímica también ha sido documentada en tratamientos combinados de corticoides y esteroides anabolizantes (Gropp, 1976; Guarda, 1990; Schilt, 1998). Estos hallazgos están en consonancia con los conocimientos previos del efecto atrófico de los corticoides sobre la glándula tímica (Ficek, 1980; Aminova y Erofeeva, 1983; Van den Broek, 1983). La involución atrófica del timo fue observada en todos los animales similar a las observaciones descritas por Groot, (1998) y Schilt (1998).

No hay datos previos sobre la involución tímica en terneros como consecuencia del tratamiento de anabólico en el cual el clenbuterol fue dado solo, aunque Spencer y Oliver (1996) han informado sobre un efecto inmunosupresor en corderos tratados con clenbuterol pero sin cambios en el peso del timo.

En este estudio no es posible valorar si la involución tímica observada que en el grupo A es debida a un efecto directo del clenbuterol sobre el órgano o a un efecto indirecto de otros mediadores por alteración de la homeostasis neuroendocrina. Ha sido ampliamente demostrado que el tratamiento con clenbuterol afecta la función adrenal, incrementando el nivel hormonal de corticoides y causando los efectos similares al estrés (Cardoso y Stock, 1998; Illera, 1998). Tal vez los niveles aumentados de corticoides inducidos por el clenbuterol causen una leve involución tímica cuando el clenbuterol es dado a solas y una atrofia grave cuando la dexametasona fue añadida. Es bien sabido que las hormonas esteroideas poseen una importante influencia sobre el sistema inmunológico. Su administración da lugar a la apoptosis de timocitos inmaduros y también a una inmunosupresión general caracterizado por la activación de linfocitos antígenos específicos, producción de citoquinas y una disfunción de las células presentadoras de antígenos. Existen diversas propuestas bien documentadas de que los corticoides endógenos tienen un importante papel en la selección de las células T durante el desarrollo del timo (Ashwell, 2000).

## II. A NIVEL DE LA ESTRUCTURA

El Timo del grupo control muestra una equivalencia normal entre el tejido cortical y medular, relación que se ve profundamente modificada en los Timos de los dos grupos tratados.

Al valorar los efectos de la administración del clenbuterol sobre los distintos componentes arquitecturales del timo llama poderosamente la atención la desproporción de dichos componentes como resultado del tratamiento aplicado. El hecho más significativo fue el notable incremento del grasa tímica en los grupos tratados con clenbuterol respecto al control y más aún si consideramos el grupo al que se le incorporó la dexametasona.

En el intersticio tímico destacan los adipositos, hasta el punto que se considera como un factor indicativo del grado fisiológico que se encuentra este órgano. El aumento de estas células conectivas convive con la presentación de grandes corpúsculos de Hassall y una disminución significativa de los linfocitos, que equivale a una involución normal del Timo, descrito en 1987 por Bulloch. En cambio la presencia desmesurada de adipositos con solo células epiteliales cornificas a modo de es la corpúsculos tímicos, viene a indicar una involución atrófica de este órgano (Fukai, 1993)

La infiltración grasa del Timo, se considera como una lesión irreversible, de difícil cuantificación ya que una de las acciones de los agonistas  $\beta$ 2-adrenérgicos, que se buscan con estos tratamientos en el engorde de los animales de abasto, es la lipólisis, y a pesar de dicho efecto este se acentúa en el tejido intersticial del Timo (Fukai,1993).

La afectación de la estructura tímica en su involución presenta una pérdida de linfocitos corticales y cambios degenerativos en las células epiteliales. La infiltración por células de adiposas, que reemplazan la cortical y los componentes medulares del órgano, es otra característica de la involución tímica (Bodey, 1997). Si consideramos la estructura del timo, se observó una disminución de linfocitos con pérdida de su organización estructural e infiltración grasa.

Groot (1998) han descrito una severa involución tímica en terneros tratados a dosis bajas de una combinación de tres beta - agonistas (clenbuterol, mabuterol y mapenterol) asociado a un corticoide (dexametasona), pero no se detectó ninguna afectación del timo cuando los beta-agonistas fueron administrados independientemente. Spencer y Oliver (1996) publicaron los efectos de inmunosupresores en corderos tratado con clenbuterol, aunque la atrofia tímica no había sido previamente detectada.

En el grupo de control, la estructura tímica presentaba un aspecto normal con escaso infiltrado de tejido adiposo. En la corteza se observó una abundante cantidad de linfocitos, mientras que en la parte central de la medula numerosas células epiteliales hipertrofiadas fueron destacadas pero sin desarrollar corpúsculos de Hassall. Los timos del grupo A mostraron un componente linfoide cortical reducido con una moderada pérdida estructural, con fibrosis e infiltración grasa. El límite entre la corteza y el medula es menos evidente y se observó un aumento en las células de epiteliales en estas regiones de transición. Las células de epiteliales sufrieron un proceso de hipertrofia y queratinización con formación inicial de corpúsculos de tímico, como se observa en la involución tímica. Estos cambios estructurales están en consonancia con los descritos en la involución tímica aguda accidental. (Bodey, 1997).

En este trabajo no es posible valorar si la atrofia observada en el timo es una consecuencia primaria de los efectos inmunosupresores del clenbuterol (Spencer y Oliver, 1996), secundaria a las interacciones del tratamiento con clenbuterol con el sistema neuroendocrino (Moll, 1997) o una combinación de ambas.

Nuestros resultados señalaron que la involución del timo en los animales tratados estuvo acompañada con significativos cambios en los ratios de corteza: médula. Así, mientras que en el grupo control la corteza representaba un 71% del parénquima tímico, en los animales tratados con clenbuterol presento un ligero descenso (5%) con un incremento de la proporción de médula que pasó de un 29% en el grupo control a un 34% en el grupo con clenbuterol. Estos cambios fueron más dramáticos cuando se incorporo la dexametasona al tratamiento con una disminución de la corteza a un 45% y un incremento proporcional de la médula hasta un 55%. Cambios similares en los porcentajes de corteza y médula han sido igualmente descritos en otros casos de involución del timo (Weindruch, 1980))

Es conocido que la maduración de los timocitos está vinculada a cambios posicionales de estos dentro de la glándula tímica (Tomoo, 2004 y Witt, 2005), cuya migración de corteza a médula estaría regulada por mecanismos de señales que están siendo actualmente objeto de estudio (Tomoo, 2004). Los datos de nuestro trabajo apuntan a que tanto los adrenérgicos, como los corticoides interrelacionan y condicionan no sólo la maduración de los timocitos, sino que además interfieren con sus cambios posicionales de la corteza a la médula, de tal forma que los desequilibrios

observados en ambos componentes estructurales del timo en los grupos tratados, serían consecuencia de dicha interferencia.

En el estudio de Weindruch (1980) realizado en ratones se determinó que las fracciones de volumen específicos de las poblaciones celulares del timo son modificadas en animales con restricciones alimentarias. Las proporciones de la fracción de volumen entre la corteza y la médula son de 2:1 para animales restringidos y 1:1 para los controles. La corteza de tímica de ratones restringidos presenta una fracción de volumen más grande en las células linfoides sin modificación de las mismas en la médula. La fracción de volumen de los elementos celulares no linfoides presentaban una tendencia a disminuir en todo el timo con la limitación alimenticia. No se observó ningún efecto sobre los tejidos vasculares y conectivos del timo. La proporción de la fracción de volumen de las células linfoides de corteza respecto a médula indica una tendencia a aumentar en ratones con limitación alimenticia como lo hace la proporción de células linfoides corticales respecto a las células no linfoides corticales. La proporción de la fracción de volumen de las células no linfoides medulares respecto a las células linfoides de esta misma región también aumenta en ratones restringidos. Las proporciones de la fracción de volumen de las células no linfoides medulares respecto a las corticales no fueron modificadas por la dieta.

Durante el desarrollo dentro del timo los timocitos en maduración migran desde la corteza a la medula (van Ewijk, 1991; Gill, , 2003; Petrie, 2003). Esta migración de corteza a medula coincide con la diferenciación de CD4 + CD8 + (doble positivo) de los timocitos inmaduros en CD4 + CD8 - (CD4 positivo solo) y CD4 - CD8 + (CD8 positivo solo) de los timocitos maduros, durante la cual la selección positiva y negativa da forma a la estructura central del repertorio de células T.

Las células de epiteliales tímicas han sido reconocidas durante mucho tiempo por su capacidad para generar una diversidad de células T no reactivas por su interacción con los timocitos en desarrollo. Esta interacción linfo-epitelial recíproca es una característica única de la timopoyesis. La interacción de receptores de célula T y péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad representa el ejemplo clásico de una interacción que determina el destino del desarrollo de los timocitos.

Muchos estudios han sido dirigidos para determinar cómo se regula la supervivencia y la muerte de los timocitos en desarrollo. Sin embargo, los mecanismos que regulan la migración intratímica de timocitos seleccionados positivamente permanecen en gran parte desconocidos.

El estroma de medular del timo consta de una compleja mezcla de células de epiteliales, células de dendríticas, interdigitantes, macrófagos, y

células de fibroblásticas. Recientemente ha sido demostrado que las quimoquinas y sus receptores son diferencialmente expresados por las de células estromales tímicas y timocitos (Kim, 1998; Campbell, 1999; Norment, 2000), indicando que estas podría estar involucradas en dirigir la localización intratímica de los timocitos en desarrollo. Campbell(1999) mostró que en la transición evolutiva durante la maduración de los timocitos están asociados a cambios dramáticos en las respuestas quimiotácticas a las quimoquinas. Quimoquina derivada de los macrófagos, una quimoquina expresado en la medula tímica, atrae a los timocitos solamente durante un breve periodo del desarrollo. Todos los fenotipos medulares (solo CD4 o CD8 positivo) pero no los timocitos inmaduros responden a las quimoquinas expresadas por el estroma medular y secundariamente a quimoquinas derivadas del tejido linfoide y macrófagos.

Sin embargo hasta ahora, ninguna de las quimoquinas o sus receptores involucradas en la regulación de la migración de timocitos de la corteza a la medula han sido identificadas.

En el timo los timocitos inmaduro doble positivos (CD4 + CD8 +) son encontrados en la corteza exterior, mientras que después de la selección del receptor de antígeno de las células T (TCR), CD4 + CD8 - y CD4 - CD8 + los timocitos son encontrados en la medula central. Witt, 2005, demostraron que previo a la selección

positiva los timocitos corticales presentaban una ruta aleatoria de migración. Por el contrario la selección positiva se correlacionada con una población de timocitos que exhibe rápida transferencia, dirigida hacia el medula. Así diversos estudios muestran que la selección positiva da lugar a un rápido patrón de migración direccional reflejando la rápida migración de las células CD4+CD8+ tanto in vitro (Crisa, 1996) como in vivo (Witt, 2005)

### **III. A NIVEL CELULAR**

Nuestros resultados revelaron que el tratamiento con clenbuterol ejerció un importante efecto sobre el tamaño de los timocitos. El tamaño nuclear medio de las células T en los animales tratados con clenbuterol se incrementó significativamente ( 23 % en la corteza y 34 % en la médula) en comparación con el control. De hecho, es ampliamente conocido que los neurotransmisores son elementos importantes del eje inmune-neuroendocrino jugando un importante papel inmunoregulador (Olsen, 2001; Savino, 2000; Qiu , 1996;Moll, 1997).

Con respecto a los mediadores inducidos por el estrés, como glucocorticoides y catecolaminas, sus efectos inmunosupresores han sido publicados a menudo (Bauer , 2001; Pruett, 2000; Fujiwara, 1999; Cook - Mills , 1995; Yu , 1974; Semenkov / Afinogenova, 1982).

La expresión de receptores de glucocorticoides en los timocitos ha sido bien establecida mediante inmunohistoquímica, inmunoblotting y biología molecular. Estos receptores se ha localizado en el citoplasma y en núcleo de lo timocitos (Tsawdaroglou, 1981; Lowy, 1989; Okret 1981; Bernard, 1984; McGimsey, 1991). En el timo humano, los timocitos inmaduros exhiben una mayor densidad de estos receptores, aunque su afinidad, características cinéticas y la capacidad para trasladarse del citoplasma al núcleo fue similar en las distintas subpoblaciones linfocitarias (Ranelletti, 1987).

Los  $\beta$ 2-adrenoreceptores han probado tener un importante papel en la diferenciación de los timocitos, provocando la liberación de interleuquina - 6 de la células epiteliales tímicas (Madden/ Felten, 2001, Nakamura, 2000, von Patay, 1998); así que es lógico suponer que las subpoblaciones de células T fueron desequilibradas tras el tratamiento con clenbuterol. Teniendo en cuenta los estudios de Yagi (1997) y Yang / Parkhouse (1996) sobre las características morfológicas de las diferentes subpoblaciones de linfocitos, cuyos resultados manifestaron que los linfocitos más pequeños eran predominantemente CD4+8+ mientras que los timocitos más grandes exhibieron un fenotipo similar a subtipos maduros CD4 + y CD8 +, nuestros resultados indican que un aumento en el porcentaje de células T maduras(CD4 +o 8 +) podía estar detrás de los cambios morfológicos

sufridos en el grupo tratado con clenbuterol. Esta sugerencia es reforzada teniendo en cuenta los trabajos de Madden / Felten (2001), que estudiaron las consecuencias de un bloqueo de los  $\beta$ 2-adrenoreceptores sobre la diferenciación de los timocitos, con una disminución significativa CD4+8+ intermedios.

En la corteza tímica, el aumento del tamaño de los timocitos estuvo unido a una disminución en la densidad numérica, que en cierta manera balanceó la fracción del volumen tímico ocupado por las células T. Esto está en concordancia con los estudios de Kaminski et al (2000) que encontraron que el salbutamol, agonista  $\beta$ 2-adrenérgico similar a lo clenbuterol, reducía el peso del timo pero incrementaba la celularidad, suponiendo un cierto efecto de rebote. Malstrom (2001) informó sobre la existencia de mecanismos intrínsecos en el timo, que presentan una función doble regulando la proliferación y la muerte celular controlando el número total de células o la masa celular total. El modelo presentado en estos estudios sugiere un mecanismo protector que explica el porqué cambios genéticos que transforman las células en un cultivo, pueden no ser suficientes para producir tumores en animales. Teniendo en cuenta estas observaciones, nuestros resultados indican que el clenbuterol afectó los mecanismos que regulan la diferenciación de los timocitos, pero los cambios en el tamaño y

número de las células T estaban en cierta manera equilibrados, así que la densidad de células T en la corteza tímica permaneció constante. Sin embargo, en el medula del timo, el clenbuterol no aumentó la densidad numérica de las células T, de tal manera que la fracción de volumen de timocitos disminuyó en esta región. Esto podría estar relacionado con el hecho de que las células T dejan el timo principalmente en la región medular.

Junto a la misión de producir timocitos, este órgano hematopoyético, desde su diferenciación pero sobre todo en fases de preinvolución y en la involución fisiológica, realiza funciones de hematocateresis, al participar en la destrucción de linfocitos de distinta naturaleza y en fases funcionales diferentes, por lo que es normal el estudio de apoptosis en gran número de linfocitos, tanto en la zona medular como en la cortical (Bulloch, K., et. al., 1987). Las Células T apoptóticas fueron claramente identificadas mediante la técnica de Túnel y sus características morfológicas estuvieron en consonancia con las descripciones previas, incluyendo una marcada condensación de la cromatina relacionadas con la reducción del núcleo y la fragmentación en cuerpos apoptóticos (Quaglino, 2000). También, nuestros resultados coinciden con los datos previos que registran un predominio de apoptosis de timocitos en la corteza con respecto a la médula tímica (Kanavaros, 2001).

Como era de esperar, el núcleo de los timocitos apoptóticos se caracterizaron por una importante disminución en sus datos morfométricos, así bien las diferencias entre las regiones tímicas en los grupos experimentales no alcanzaron niveles significativos

Está en general aceptado que los timocitos que reconocen los autoantígenos son eliminados por el proceso de selección negativa por apoptosis. Sin embargo, como previamente ha sido publicado, la elevada proporción de muerte celular esperada para el timo normal fue discreta en las secciones de tejido, tanto así que los porcentajes de los timocitos apoptóticos fue relativamente bajos. La eficiencia de los macrófagos en eliminar las células apoptóticas ha sido argumentada para explicar esta paradoja (Surh / Sprent, 1994).

Con respecto al efecto adrenérgico sobre la apoptosis, nuestros resultados mostraron un claro efecto sobre el índice de apoptosis en el tratamiento con clenbuterol. El aumento de la apoptosis en el timo en el grupo tratado con clenbuterol está en consonancia con otros estudios publicados anteriormente (Miura, 2000, Wajeman-Chao, 1998, Anderson, 1996, Morale, 1992) que han documentado, al igual que nosotros, un aumento en la apoptosis de timocitos como consecuencia del estímulo  $\beta$  - adrenérgico. Teniendo en cuenta nuestros resultados, podemos afirmar que el estímulo de

receptores de  $\beta$ 2-adrenérgicos por el clenbuterol tiene claros efectos sobre los mecanismos que regulaban la proliferación, la diferenciación y muerte de los timocitos.

Mención especial merece la relación que mantienen los mecanismos de estrés y el sistema inmune. En este sentido es conocido que el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal y las ramas eferentes del sistema nervioso simpático humano son activados en respuesta al estrés, dando como resultado un incremento en la liberación de inmunomoduladores como son los corticoesteroides y catecolaminas.(Ader, 1995; Madden, 1995; Buckingham, 1996; Besodovsky, 1996)

El neurotransmisor adrenérgico de las catecolaminas, se libera localmente en las terminaciones de los nervios simpáticos en las uniones similares a las sinapsis con las células inmunes en el bazo (Felten, 1986) timo y ganglios linfáticos (Felten, 1991).

La hipótesis de que los mecanismos de estrés inducen una involución tímica ha sido propuesta por varios autores (Bomberger, 1992; Dominguez-Gerpe, 1998b, 2000). En respuesta al estrés, las catecolaminas son también liberadas en la circulación sanguínea, donde actúan hormonalmente sobre las células inmunes circulantes. Publicaciones recientes han descrito que los linfocitos humanos y murinos sintetizan e internalizan catecolaminas

(Bergquist, 1994. Faraj, 1994). y pueden contener altas concentraciones intracelulares de estas.( Josefsson, 1996).Así, durante la respuesta al estrés, es probable que las células inmunes estén expuestas a concentraciones suprafisiológicas de 3 y 4 veces las concentración normal de catecolaminas en la circulación. Estos y otros autores han revelado que la modulación de la función inmune de las catecolaminas afecta a una variedad de células del sistema inmune, incluyendo las células de T, B, y células NK (Ader, 1995; Madden, 1995; Besodovsky, 1996;Chambers, 1993.).

Estudios previos han demostrado que las catecolaminas y el cAMP inhiben la activación de T células (Chambers, 1993. Chambers, 1974. Cook-Mills,. 1995. Cook-Mills, 1992) y la generación de la inmunidad antitumoral (Cook-Mills, 1995)

Una parte importante de la comunicación entre los sistemas neuroendocrino e inmune se realiza a través de las catecolaminas liberadas bien a nivel sistémico por la médula adrenal o localmente por las terminaciones de los nervios simpáticos. En este sentido los trabajos de Wajeman-Chao y colaboradores, 1998 soportan el concepto de que las catecolaminas presentan un efecto inmunosupresor y que su función se realiza a través de rutas dependientes de cAMP.

Una característica excepcional de la estructura de tímica es el desarrollo gradual de corpúsculos (Corpúsculos de Hassall), que se originan en el medula como consecuencia de los cambios degenerativos en las células de epiteliales (Anna, 1981; Nicolas, 1989; Bodey, 1997). Las células epiteliales sufrieron hipertrofia y degeneración pero al contrario que en la involución con la edad, se mantienen aisladas sin incluirse en el desarrollo normal de los corpúsculos de Hassall.

Pero lo más importante como estudia Bulloch, (1987) es el hecho, que en la involución fisiológica del Timo, la perdida de los timocito es acompañada por la presencia de grandes corpúsculos de Hassall, pero en los grupos de experimentación junto a la disminución de los linfocitos se destacan la presencia de numerosas células epiteliales hipertróficas y cornificadas, que hacen el papel de corpúsculos tímicos atróficos (Fukai , 1993).

Tanto en los grupos experimentales con clenbuterol y clenbuterol con dexametasona, hemos descrito al microscopio óptico corpúsculos tímicos inmaduros, con cronificación e hipertrofia de las células epiteliales, que al microscopio electrónico se destaca las cavidades interepiteliales libres (Kendall, 1994). Solo se destaca como signo de maduración las microvellosidades libres.

Como describe Schulof, (1987), los tonofilamentos son los componentes principales en las células reticuloepiteliales del Timo que indican el proceso de queratinización en la formación de los corpúsculos de Hassall. Los agonistas  $\beta$ 2-adrenérgicos afectan gravemente la síntesis de los tonofilamentos, por lo que a diferencia de las muestras estudiadas en el control, en los grupos tratados solo hemos evidenciado escasos penachos de filamentos intermedios, fenómeno también descrito por Elliott, (1995) y Herrlich, (2002).

En la formación de los corpúsculos tímicos como señala Savino, (1988), existe una relación previa de las células reticuloepiteliales con otros componentes sanguíneos, como son linfocitos y neutrófilos, como también hemos podido describir en los estudios de nuestro grupo control (Kendall, MD, 1991). En tanto esta relación no se presenta en ninguno de los grupos tratados, por lo que se puede considerar como un signo importante en la falta de maduración que se producen en dichos grupos de investigación de los corpúsculos de Hassall. Esta escasa maduración de los corpúsculos tímicos, junto a la clara disminución de la población linfocitaria nos permite considerar que se ha producido una involución atrófica del Timo en los tratamientos con clenbuterol y clenbuterol y dexametasona (Lukert, 1995; Kuiper, 1998)

La distribución del componente linfocitario se evidencia con claridad al microscopio electrónico, con una disposición, en el grupo control, a modo de mosaico de los timocitos tanto en la zona cortical como en la medular. Si bien en la medular se aprecian relacionados con las células reticuloepiteliales, relación que se ve disminuida en la corteza, ya que en esta parte del Timo predominan con claridad los linfocitos (Smith, 1988). Las mitosis que hemos descrito de los timocitos indican el alto grado de actividad del Timo en este grupo control de animales.

Junto con las imágenes ultraestructurales, los datos obtenidos de la utilización del método inmunocitoquímico de TUNEL, nos han permitido no solo conocer las líneas o colonias celulares tímicas, sino también los procesos de aumento de involución en los dos grupos tratados según los estudios de Hetts, (1998). Al microscopio electrónico son numerosas en ambas zonas del parénquima tímico las imágenes de desestructuración de la cromatina en los linfocitos y solo todo del despegamiento de la envoltura nuclear que corresponde a procesos de apoptosis. Apoptosis linfocitaria que hemos podido comprobar con la técnica de TUNEL, destacándose numerosísimas colonias de timocitos que dan positiva la reacción inmunocitoquímica. Estos procesos los describen Bork, (1971), utilizando corticoides, y según Kurz, (1997), también se relacionan con los agonistas  $\beta$ 2-adrenérgicos.

# *Conclusiones*

---

---

**Primera:** La administración de clenbuterol como finalizador en la alimentación provocó una involución del timo que se reflejó en una disminución del volumen y tamaño de la glándula, así como un incremento de la grasa en los animales estudiados. La involución del timo fue mucho más acusada al añadir la dexametasona.

**Segunda:** El tratamiento con clenbuterol determinó un notable desequilibrio de la proporción corteza/médula, de tal manera que la fracción de volumen de la corteza disminuyó muy significativamente al administrarse el clenbuterol, y más aún al añadir la dexametasona.

**Tercera:** Los timocitos mostraron cambios significativos en sus variables morfométricas en respuesta a los tratamientos: tanto en corteza cómo en médula se registró un notable incremento del tamaño celular, siendo mayor al añadir la dexametasona. La disminución de la densidad numérica fue leve en el grupo clenbuterol y muy acusada con la dexametasona, de tal forma los corticoides provocaron un significativo descenso de la celularidad.

**Cuarta:** El tratamiento con clenbuterol y mucho más la dexametasona provocaron un incremento de las apoptosis en los timocitos, aumentando los índices respecto a las cifras del control.

**Quinta:** La consideración conjunta de los resultados morfométricos y estereológicos tanto en los timocitos normales como apoptóticos sugiere que el tratamiento con clenbuterol, solo y con dexametasona, provocó un desequilibrio de las subpoblaciones de timocitos en maduración, de tal forma que se incremento el porcentaje de células T (CD4+ o CD8+).

**Sexta:** El tamaño de las células epiteliales se incrementó muy significativamente en el grupo en el que se administró sólo el clenbuterol, mientras que al añadir la dexametasona las variables morfométricas se aproximaron hacia los datos del grupo control. Los parámetros estereológicos apenas mostraron variación en esta población celular.

**Séptima:** A nivel histopatológico el timo de los animales tratados con clenbuterol presentó un aumento del grosor de los tabiques interlobulares por infiltración y/o sustitución adiposa con disminuciones objetivas en los espesores de los componentes del parénquima tímico, acompañada de variables desproporciones entre la corteza y médula. Cambios que fueron más marcados al añadir la dexametasona con casos dramáticos de casi desaparición del parénquima tímico.

**Octava:** Los corpúsculos de Hassall en la médula tímica presentaron con los tratamientos una hipertrofia de las células epiteliales y una alteración de su cornificación, con disminución de la misma en los animales tratados con clenbuterol y su práctica desaparición al añadir la dexametasona. Estos datos se pusieron también de manifiesto al microscopio electrónico con una disminución de los tonofilamentos tras tratamiento con clenbuterol y su desaparición con la incorporación de la dexametasona.

# *Resumen*

---

---

Se estudian los efectos sobre el timo del  $\beta$ 2-agonista clenbuterol utilizado ilegalmente como sustancia finalizadora en el engorde del ganado; considerando tanto su administración en solitario como asociado a la dexametasona.

Para ello se utilizaron 18 terneros machos, Charolais x Retitnto, de 12-14 meses de edad, que asignan aleatoriamente en tres grupos experimentales: Grupo tratado con Clenbuterol (A, n=6); Grupo con clenbuterol más dexametasona (B, n=6); Grupo Control (n=6). Los efectos del tratamiento con clenbuterol sobre el timo fueron cuantificados mediante métodos morfométricos (área, volumen, dimensiones lineales, y factores de forma) y estereológicos (fracción de volumen, densidad de superficie y densidad numérica); las modificaciones histopatológicas atribuibles al tratamiento fueron observadas tanto a nivel óptico como electrónico, y su incidencia fue expresada semicuantitativamente.

Los resultados señalaron una clara involución del timo en los grupos tratados respecto al control, al mismo tiempo que los parámetros morfométricos y estereológicos de los componentes tisulares variaron significativamente en los grupos tratados respecto a las cifras control. La fracción de volumen de grasa se incremento significativamente en el grupo tratado con clenbuterol y aún más cuando se administró la dexametasona. Los tratamientos afectaron igualmente a los ratios corteza/médula apreciándose una disminución de la primera en favor de la segunda desde el grupo control, clenbuterol al dexametasona.

Al considerar el efecto sobre los timocitos normales en la corteza se apreció un incremento en el tamaño que en parte fue compensado con una disminución de los parámetros estereológicos (fracción de volumen, densidad de superficie y densidad numérica) de tal manera que el criterio de celularidad tendió mantenerse constante; la médula por el contrario se produjo un incremento tanto del tamaño como de la densidad de los timocitos. Por otro lado, en ambas regiones glandulares se registro un notable incremento de los timocitos en apoptosis. Por su parte, las células epiteliales incrementaron sus valores morfométricos y estereológicos, especialmente en el grupo clenbuterol y en menor medida al incorporar la dexametasona.

Las observaciones histopatológicas reflejaron en los timos tratados con clenbuterol un aumento del tejido adiposo con engrosamiento de los tabiques observándose una distribución irregular del espesor de la corteza y médula con variable desproporción de ambos componentes. A mayor aumento se observó en la corteza un aumento de las figuras de mitosis y cuerpos apoptóticos, y a nivel de la médula destacó un relativo aumento y agrupación de las células epiteliales debido a la relativa disminución del componente linfoide. Estas mismas alteraciones histopatológicas se observaron en los timo de los animales tratados con clenbuterol mas

dexametasona, si bien la intensidad y magnitud de las mismas se incrementaron notablemente alcanzaron en algunos casos connotaciones radicales.

Un elemento destacado en la estructura y evolución del timo que se vio claramente afectado por los tratamientos con clenbuterol sólo o combinado con la dexametasona fue el corpúsculo de Hassall, que se objetivó tanto óptica como ultraestructuralmente. Lo más destacado de esta alteración consiste en la hipertrofia de las células epiteliales que lo componen junto a una disminución e irregularidad en su cornificación tras tratamiento con clenbuterol y su desaparición tras añadir la dexametasona.

# *Bibliografía*

---

---

Adams, JS; Wahl, TO; Lukert, BP. Effects of hydrochlorothiazide and dietary sodium restriction on calcium metabolism in corticosteroid treated patients. *Metabolism*. 30:217-221, 1981

Ader, R; Felten, D; Cohen, N. Interactions between the brain and the immune system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:561-602, 1990.

- Ader, R; Cohen, N; Felten, N. Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet* 345:99, 1995.
- Aguilar, LK; Aguilar-Cordova, E; Cartwright, J; Jr and Belmont, JW. Thymic nurse cells are sites of thymocyte apoptosis. *J.Immunol.* 152:2645-2651, 1994.
- Akbarsha, M.A; Murugaian, P. Aspects of the male reproductive toxicity/male antifertility property of andrographolide in albino rats: effect on the testis and the cauda epididymidal spermatozoa. *Phytother. Res.* 14: 432-435, 2000.
- Al-Bader, A; Omu, AE; Dashti, H. Chronic cadmium toxicity to sperm of heavy cigarette smokers: immunomodulation by zinc. *Arch Androl.* 43(2):135- 40, 1999.
- Al-Shawaf, AA; Kendall, MD and Cowen, T. Identification of neural profiles containing vasoactive intestinal polypeptide, acetylcholinesterase and catecholamines in the rat thymus. *J Anat.* 174:131-143, 1991
- Ameisen, JC. The origin of programmed cell death. *Science.* 272: 1278-1279, 1996.
- Anderson, KL; Anderson, G; Michell, RH; Jenkinson, EJ; Owen, JJ. Intracellular signaling pathways involved in the induction of apoptosis in immature thymic T lymphocytes. *J Immunol.* 156(11):4083-91, 1996.
- Ando, M; Hiratsuka, H; Nakagawa, J; Sato, S; Hayashi, Y; Mitsumori. Cadmium accumulation in rats treated orally with cadmium chloride for 8 months. *J Toxicol Sci.* 23(3):243-8, 1999.

- Armstrong, MD; Klein, JR. Immune-endocrine interactions of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis: integration, communication and homeostasis. *Arch Immunol Ther Exp* 49:231-237, 2001.
- Ashkenazi, A; Digit, VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 281: 1305-1308, 1998.
- Ashwell, JD; Lu, FW; Vacchio, MS. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 309-345, 2000.
- Ayala, A; Herdon, CD; Lehman, DL; Ayala, CA; Chaudry, IH. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: Variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood*.87:4261-4275, 1996.
- Bach, JF. Thymic hormone in the treatment of cancer. *Prog Clin Biol Res*. 288:363-82, 1989.
- Ballantyne, B; Marrs, T.; Syversebm T. General and applied Toxicology. Vol.1. Second edition. Ed. Macmillan reference LTD. London, 1999.
- Ban, EM; Gagnerault, MCL; Jammes, H; Postel-Vinay, MC; Haour, F and Dardenne, M. Specific binding sites for growth hormone in cultured mouse thymic epithelial cells. *Life Sci*. 48:2141-2148, 1990.
- Banks, W. Applied veterinary Histology, 3rd. Mosby Year Book, Inc. St. louis, Missouri, 1993.
- Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science*. 94(6):557-72, 1998.

- Barnes, PJ and Adcock, IM. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 14: 436-41, 1993.
- Bauer, ME; Perks, P; Lightman, SL; Shanks, N. Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. *Physiol Behav.* 73, 525-532, 2001.
- Beckett, AH. Clenbuterol and sport. *LANCET.* 340: 1165, 1992.
- Beerman, DH; Butler, WR; Hogue, DE; Fishell, VK; Dalrymple RH; Ricks CA and Scanes, CG. Cimaterol-induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs. *J Anim Sci.* 65: 1514-1524, 1987.
- Benschop, R and Schedlowski, RFM: Catecholamine-induced leukocytosis: Early observations, current research, and future directions. *Brain Behav and Immun.* 10:77-91, 1996
- Bergmann, A; Agapite, J; Steller, H. Mechanisms and control of programmed cell death in invertebrates. *Oncogene.* 17: 3215-3223, 1998.
- Bergquist, J; Tarkowski, A; Ekman, R; Ewing, A. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12912. 1994.
- Bernard, PA; Joh, TH. Characterization and immunocytochemical demonstration of glucocorticoid receptor using antisera specific to transformed receptor. *Arch Biochem Biophys* 229:466-476, 1984.

- Besedovsky, HO and Sorkin, E. Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature*. 249:356, 1974.
- Besedovsky, HO; Del Rey, AE; Sorkin, E; Da Prada, M and Keller, NH. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cell Immunol*. 48:346-355, 1979.
- Besodovsky, HO; Del Rey, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr. Rev*. 17:64. 1996.
- Bilbao, GJ; Hoyo Jimenez, JF; Lopez, JM; Vinuesa, SM; Perianes, MJ; Munoz, MP and Ruiz, GJ. Clenbuterol poisoning. Clinical and analytical data on an outbreak in Mostoles, Madrid. *Rev Clin Esp*. 197: 92-95, 1997.
- Binder, C. The physiology and pharmacology of the glucocorticoids. *Acta Medica Scandinavica - Supplementum*. 500:9-16, 1969.
- Blalock, JE. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev* 69:1-32, 1989.
- Blalock, JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today* 15:504-511. 1994.
- Blalock, JE. Harnessing a neural-immune circuit to control inflammation and shock. *J Exp Med* 195:F25-28, 2002.
- Blanco, A; Monterde, JG; Moyano, R; and Mendez, A. Thymic involution in calves treated with clenbuterol. *Vet Rec*. 147: 552-553, 2000.

- Bloom, BR; Bennett, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*. 153(731):80-2, 1966.
- Bodey, B; Bodey, B Jr; Siegel, SE; Kaiser, HE. Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of aging. *In Vivo* 11:421-440, 1997.
- Bomberger, CE; Haar, JL. Restraint and sound stress reduce the in vitro migration of prethymic stem cells to thymus supernatant. *Thymus* 19:111-115, 1992.
- Borish, L; Mascali, JJ; Dishuck, J; Beam, WR; Martin, RJ and Rosenwasser, LJ. Detection of alveolar macrophage-derived IL-1b in asthma. Inhibition with corticosteroids. *J Immunol*. 149: 3078-82, 1992.
- Bork, KH; von Werder, F; Metz, H; Bruckner, K; Baumgarth, M. Synthesis of a highly active, fluorine-free glucocorticoid. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 747:123-32, 1971.
- Borregaard, N; Miller, LJ and Springer, TA. Chemoattractant-regulated fusion of a novel, mobilizable intracellular compartment with the plasma membrane in human neutrophils. *Science*. 237:1204-1206, 1987.
- Bost, KL; Smith, EM; Wear, LB and Blalock, JE. Presence of ACTH and its receptor on a B lymphocytic cell line: A possible autocrine function for a neuroendocrine hormone. *J Biol Regu. Homeostat Agents*. 1:23-27, 1987.
- Boswan, FJ; Vissner, BC; Deveren, J. Apoptosis: pathophysiology of programmed cell death. *Path Res Pract*. 192: 676-683, 1996.

- Boyle, PJ. Cushing's disease, glucocorticoid excess, glucocorticoid deficiency, and diabetes. *Diabetes Rev.* 1: 301-308, 1993.
- Brambilla, G; Cenci, T; Franconi, F; Galarini, R; Macri, A; Rondoni, F; Strozzi, M; Loizzo, A. Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. *Toxicol Lett.* 114: 47-53, 2000.
- Brambilla, G; Loizzo, A; Fontana, L; Strozzi M and Guarino, A. Food Poisoning Following Consumption of Clenbuterol-Treated Veal in Italy. *JAMA.* 278: 635-635, 1997.
- Breuninger, LM; Dempsey, WL; Uhl, J and Murasko, DM. Hydrocortisone regulation of interleukin-6 protein production by a purified population of human peripheral blood monocytes. *Clin Immunol Immunopathol.*; 69: 205-214,1993.
- Brown, SL and Van Epps, DE. Suppression of T lymphocyte chemotactic factor production by the opioid peptides p-endorphin and met-enkephalin. *J Immunol.* 134: 3384-3390, 1985.
- Buckingham, JC; Loxley, HD; Christian, HC; Philip, JG. Activation of the HPA axis by immune insults: roles and interactions of cytokines, eicosanoids and glucocorticoids. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54:285. 1996.
- Bulloch, K; Cotman, CW; Brinton, RE; Galaburda, A; McEven, B and Schneider, DM. The innervation of immune system tissues and organs. In *The Neuro-Immune-Endocrine Connection*, eds. Raven Press. New York. 33-47, 1987.

Burton, JL; Kehrli, ME; Kapil, S and Horst, RL. Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. *J Leukoc Biol.* 57: 317-325, 1995.

Calandra, T; Bernhagen, J; Metz, CN; Spiegel, LA; Bacher, M; Donnelly, T; Cerami, A and Bucala, R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature.* 377(6544):68-71, 1995.

Calzolari, A. Recherches experimentales sur un rapport probable entre la fonction du thymus et celle testicles. *Arch Ital Biol.* 30: 71-77, 1898.

Cameron, BD and Phillips, MWA. The residue kinetics of 14C-N-AB 365 CL in the lactating cow. IRI Project No. 135014/IRI. Report No. 4445. Amendment to IRI Report No. 4445 of Hall, B.E. of 24.10.88 - U-Venti 90, Plani 56. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1987.

Cameron, BD; Phillips, MWA and Mikhail, M. The residue kinetics of 14C-N-AB 365 CL in the calf. IRI Project No. 135009 IRI Report No. 4371 Summary table on local tolerance\*, 04.89 - U-Venti 83. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1987.

Campbell, JJ; Pan, J; Butcher, EC.. Developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J. Immunol.* 163:2353-2357, 1999.

Carding, SR; Hayday, AC and Bottomly K. Cytokines in T-cell development. *Immunol Today.* Jul 12(7):239-45, 1991.

- Castagnetta, L; Granata, OM; Traina, A; Cocciadiferro, L; Saetta, A; Stefano, R; Cutolo, M; Carruba, G. A role for sex steroids in autoimmune diseases: a working hypothesis and supporting data. *Ann NY Acad Sci* 966:193-203, 2002.
- Cavallotti, C; Artico, M and Cavallotti D. Occurrence of adrenergic nerve fibers and of noradrenaline in thymus gland of juvenile and aged rats. *Immunol Lett* 1. Oct 70(1):53-62, 1999.
- Chambers, DA; Martin, DW Jr; Weinstein, Y. Effect of cyclic nucleotides on purine biosynthesis and induction of PRPP synthetase during lymphocyte activation. *Cell* 3:375, 1974.
- Chambers, DA; Cohen, RL; Perlman, RL. Neuroimmune modulation: signal transduction and catecholamines. *Neurochem. Int.* 22:95, 1993.
- Chen, WF; Fischer, M; Frank, G and Zlotnik A. Distinct patterns of lymphokine requirement for the proliferation of various subpopulations of activated thymocytes in a single cell assay. *J Immunol.* Sep 143(5):1598-605, 1989.
- Chiodi, H. The relationship between the thymus and the sexual organs. *Endocrinology.* 26: 107-116, 1940.
- Cohan, VL; Udem, BJ; Fox, CC; Adkinson, NF; Lichtenstein, LM and Schleimer, RP.) Dexamethasone does not inhibit the release of mediators from human lung mast cells residing in airway, intestine or skin. *Am Rev Respir Dis.* 140:951-4, 1989.
- Comsa, J. Hormonal interactions of the thymus. *Thymic Hormones*, TD Luckey ed. University Park Press, Baltimore, Dardeene p 59, 1973.

- Cook-Mills, JM; Cohen, RL; Perlman, RL; Chambers, DA. Inhibition of lymphocyte activation by catecholamines: evidence for a non-classical mechanism of catecholamine action. *Immunology* 85, 544-549, 1995.
- Cook-Mills, JM; Munshi, HG; Perlman, RL; Chambers, DA. Mouse hepatitis virus infection suppresses modulation of mouse spleen cell activation. *Immunology* 75:542, 1992.
- Cook-Mills, JM; Mokyry, MM; Cohen, RL; Perlman, RL; Chambers, DA. Neurotransmitter suppression of the in vitro generation of a cytotoxic T-lymphocyte response against the syngeneic MOPC-315 plasmacytoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 40:79, 1995.
- Cox, G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. *J Immunol.* 193: 4719-25, 1995.
- Crapo, L. Cushing's syndrome: A review of diagnostic tests. *Metabolism.* 28: 955-977, 1979.
- Cronstein, BN; Kimmel, SC; Levin, RI; Martinuk, F and Weissmann, G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 9991-9995, 1992.
- Csaba, G; Dunay, C; Olah, I; Toro, I. Effect of glucocorticoids on the thymus. I. Histochemical and electron-microscopic investigation of mast cell formation. *Acta Biol.* 18(3):345-61, 1967.
- Cummings, MC; Winterford, CM and Walker, NI. Apoptosis. *Am J Pathol.* 21: 88-101, 1997.

- Dalrymple, RH; Baker, PK; Gingher, PE; Ingle, DL; Pensack, JM and Ricks CA.. A repartitioning agent to improve performance and carcass composition of broylers. *Poultry Science*. 63: 2376-2383, 1984.
- Dardenne, M; and Savino, W. Neuroendocrine circuits controlling the physiology of the thymic epithelium. *Ann NY Acad Sci*. 650: 85-90, 1992.
- Dardenne, M; Itoh, T; and Homo-Delarche, F. Presence of glucocorticoid receptors in cultured thymic epithelial cells. *Cell Immunol*. 100: 112-118, 1986.
- Dardenne, M; Savino, W; Gagnerault, MC; Itoh, T and Bach, JF. Neuroendocrine control of thymic hormonal production prolactin stimulates in vivo and in vitro the production of thymulin by human and murine thymic epithelial cells. *Endocrinology*. 125: 3-12, 1989.
- Davila, DR; Brief, S; Simon, J; Hammer, RE; Brinster, RL and Kelly, KW. Role of growth hormone in regulating T-dependent immune events in aged, nude, and transgenic rodents. *J Neurosci Res*. 18: 108-116, 1987.
- Davill, J. Apoptosis and the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 5: 12-21, 1994.
- De Castro, J; Zamora, P and Gonzalez Baron, M. Glucocorticoids in oncology. *Medicina Clinica*. 104(9): 349-56, 1995.
- De Leeuw, F.-E; Jansen, G.H; Batanero, E; van Wichen, D.F; Huber, J; and Schuurman, H.-J. (1992) The neural and neuro-endocrine component of the human thymus. I. Nerve-like structures. *Brain Behav. Immun*; 6:238-248.

- Delaunay, F; Khan, A; Cintra, A; Davani, B; Ling, ZC; Andersson, A; Östenson, CG; Gustafsson, JA; Efendic, S and Okret, S. Pancreatic beta cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. *J Clin Invest.*; 100(8): 2094 - 2098, 1997.
- Delbeke, FT; Desmet, N; Debackere, M. The abuse of doping agents in competing body builders in Flanders (1988-1993). *Int J Sports Med.* 16: 66-70, 1995.
- Dempster, DW. Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 4: 137-141, 1989.
- Deniz, E. Blood supply of the thymus in calf. *Zbl Vet Med.* 11A: 749-759, 1964.
- Dennis, EA. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A2. *J Biol Chem.* 269: 13057-60, 1994.
- Dhabhar, FS and McEwen, BS. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 1059-1064, 1999.
- Dhabhar, FS; Miller, AH; McEwen, BS and Spencer, RL. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J Immunol.* 154:5511-5527, 1995.
- Domínguez-Gerpe, L; Rey-Méndez, M. Role of pre-T cells and chemoattractants on stress-associated thymus involution. *Scand J Immunol* 52:470-476, 2000.

- Domínguez-Gerpe, L and Rey-Méndez, M. Modulation of stress-induced murine lymphoid tissue involution by age, sex and strain: role of bone marrow. *Mech Ageing Dev* 104:195-205, 1998.
- Domínguez-Gerpe, L and Rey-Méndez, M. The thymus: from normal to involution or hyperplasia, vol. I. *Recent Research Developments in Immunology: Research Signpost* pp 531-540, 1999.
- Domínguez-Gerpe, L and Rey-Méndez, M. Alterations induced by chronic stress in lymphocyte subsets of blood and primary and secondary immune organs of mice. *BMC Immunology*. 2:7, 2001
- Dougherty, PM; Aronowski, J; Drath, D; Dafny, N. Evidence of neuro-immunologic interactions: cyclosporine modifies opiate withdrawal by effects on the brain and immune components. *J Neuroimmunol* 13:331-342, 1987.
- Dougherty, PM; Dafny, N. Microiontophoretic application of muramyl-dipeptide upon single cortical, hippocampal and hypothalamic neurons in rats. *Neuropharmacology* 29:973-981, 1990.
- Dragovich, T; Rudin, CM and Thompson, CB. Signal transduction pathways that regulated cell survival and cell death. *Oncogene*. 17: 3207-3213, 1998.
- Driscoll, M. and Elegans, C. Cell death in molecular insights into mechanism conserved between nematodes and mammals. *Brain Pathol*. 6: 411-425, 1996.
- Dworski, R; Fitzgerald, GA; Oates, JA and Sheller JR. Effect of oral prednisone on airway inflammatory mediators in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 149: 953-9, 1994.

- Elands, J; Resink, A; and De Kloet, E.R. Neurohypophyseal hormone receptors in the rat thymus, spleen and lymphocytes. *Endocrinology*. 126: 2703-2710, 1990.
- Elenkov, IJ and Chrousos, GP. Stress, cytokine patterns and susceptibility to disease. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 13: 583-595, 1999.
- Elliott, CT; McCaughey, WJ; Crooks, SRH; McEvoy, JDG and Kennedy, DG. Residues of clenbuterol in cattle receiving therapeutic doses: Implications for differentiating between legal and illegal use. *Vet Quarterly*. 17, 100-102, 1995.
- Ernstroem, U. Hormonal influences on thymic release of lymphocytes into the blood. In: *Hormones and the Immune Response*. Ciba Foundation Study Group No. 36. G.E. Wolstenhohne and I. Knight, eds. Churchill Livingstone, London. 53-60, 1970.
- Evans, PM; Barnes, PJ and Chung KF. Effect of corticosteroids on human eosinophils in vitro. *Eur J Pharmacol*. 3: 160S, 1990.
- Fabris, N. Biomarkers of aging in the neuroendocrine-immune domain. Time for a new theory of aging. *Ann. NY Acad Sci*. 663: 335-348, 1992.
- Fabris, N; Muzzioli, M; and Mocchegiani, E. Recovery of age-dependent immunological deterioration in BALB/c mice by short-term treatment with L-thyroxine. *Mech Age Dev*. 18: 327-338, 1982.
- Faraj, BA; Olkowski, ZL; Jackson, RT. Expression of a high affinity serotonin transporter in human lymphocytes. *Int. J. Immunopharmacol*. 16:561, 1994.

- Farber, E. Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod Pathol.* 7: 605-609, 1994.
- Felten, DL; and Felten, SY. Innervation of the thymus. *Thymus Update.* 2:73-88, 1989.
- Felten, DL; Felten, SY; Bellinger, DL; Carlson, SL; Ackerman, KD Madden, KS et al. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: Structure and function. *Immunol Rev.* 100: 225-260, 1987.
- Felten, SY; Felten, DL. Innervation of lymphoid tissue. In *Psychoneuroimmunology.* R. Ader, D. L. Felten, and N. Cohen, eds. Academic Press, New York, p. 27, 1991.
- Felten, SY; Felten, DL; Bellinger, DL and Olschowka, JA. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs. *Chem Immunol.* 52: 25-48, 1992.
- Felten, SY; Housel, J; Felten, DL. Use of in vitro dialysis for evaluation of splenic norepinephrine and serotonin. *Soc. Neurosci. Abs.* 12:1065, 1986.
- Ferone, D; Pivonello, R; Van Hagen, PM; Waaijers, M; Zuijderwijk, J; Colao, A; Lombardi, G; Bogers, AJ; Lamberts, SW; Hofland, LJ. Age-related decrease of somatostatin receptor number in the normal human thymus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E791-798, 2000.
- Flower, RJ. Lipocortin and the mechanism of action of glucocorticoids. *Br J Pharmacol.* 94: 987-1015, 1988.

- Fujiwara, R; Shibata, H; Komori, T; Yokoyama, MM; Okazaki, Y and Ohmori, M. The mechanisms of immune suppression by high-pressure stress in mice. *J Pharm Pharmacol.* 51:1397-1404, 1999.
- Fukai I, Masaoka A, Hashimoto T, Yamakawa Y, Mizuno T, Tanamura O. Cytokeratins in normal thymus and thymic epithelial tumors. *Cancer.* 71:99-105,1993.
- Galmes, TA; Mariano, SAC; Oliver, PJ; Gonzalez, PF and De-La-Calleja, C. Description of intoxication produced by the consumption of meat which had been treated with clenbuterol in the Balearics. *Alimentaria.* 33: 23-25, 1995.
- Garcia-López, A. Alerta epidemiológica por la intoxicación con clenbuterol y su empleo en la alimentación del ganado. *Rev Sanid Milit Mex.* 56(3) May-Jun:131-134, 2002.
- Gastal, MO; Gastal, EL; Torres, CAA and Ginther, OJ. Effect of oxytocin, prostaglandin F2 alpha, and clenbuterol on uterine dynamics in mares. *Theriogenology.*50:521-553,1998.
- Gennari, C. Glucocorticoids and bone. Peck WA, ed. *Bone and Mineral Research.* Amsterdam, Elsevier. 213-232, 1985.
- Gill, J; Malin, M; Sutherland, J; Gray, D; Hollander, G; Boyd, R. Thymic generation and regeneration. *Immunol. Rev.*195:28-50, 2003.
- Gilman, SC; Schwartz, JM; Milner, RJ; Bloom, FE and Feldman, J.D. R-Endorphin enhances lymphocyte proliferative responses. *Proc Natl Acad Sci.* 79: 4226-4230, 1982.

- Gorczyca, W; Bedner, I; Burfeind, P; Darzynkiewicz, Z and Melamed, MR. Analysis of apoptosis in solid tumors by laser-scanning cytometry. *Mod Pathol.* 11: 1052-1058, 1998.
- Goren, HJ; Okabe, T; Lederis, K and Hollenberg, MD. Oxytocin stimulates glucose oxidation in rat thymocytes. *Proc West Pharmacol Soc.* 27: 461-463, 1984
- Goulding, NJ and Guyre, PM. Glucocorticoids, lipocortins and the immune response. *Curr Opin Immunol.* 5: 108-113, 1993
- Greenstein, B.D; Fitzpatrick, F.T; Adcock, I.M; Kendall, M.D; and Wheeler, M.J. Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy: Inhibition of regeneration by testosterone. *J Endocrinol.* 110:417-422, 1986.
- Greenstein, BD; Fitzpatrick, FT; Kendall, MD and Wheeler, MJ. Regeneration of the thymus in old male rats treated with a stable analogue of LHRH. *J Endocrinol.* 112: 345-350, 1987.
- Gremlich, S; Roduit, R and Thorens, B. Dexamethasone induces posttranslational degradation of GLUT2 and inhibition of insulin secretion in isolated pancreatic  $\beta$ -cells. Comparison with the effects of fatty acids. *J Biol Chem.* 272: 3216-3222, 1997.
- Griffith, RC. Thymus gland. *Anderson's pathology*, 9th edition. Mosby Inc. St. Louis, Kissane. 1493-516, 1990.
- Grossman, CJ. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science.* 227: 257-261, 1985.
- Grossman, CJ. Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrinol Rev.* 5: 435-455, 1984.

Grossman, CJ; Sholiton, LJ and Nathan, P. Rat thymic estrogen receptor. Preparation, location and physicochemical properties. *J Steroid Biochem.* 11:1233-1240, 1979.

Haeryfar, SM and Berczi, I. The thymus and the acute phase response. *Cell Mol Biol.* Feb 47(1):145-56, 2001.

Hammar, JA. Konstitutionsanatomische Studien über die Neurotisierung des Menschenembryos; über die Innervationsverhältnisse der Inkretorgane and der Thymus his in den 4. Fotalmonat, *Ztschr f mikr anat Forsch.* 38: 253-293, 1935.

Hatai, S. On weight of the thymus gland of the albino rat (*Mus norvegicus albinus*) according to age. *Amer J Anat.* 16: 251-257, 1914.

Hawkins, DR; Cheng, KN and Major, RM. Validation of a GC-MS method for the measurement of <sup>14</sup>C-Clenbuterol in calf liver and measurement of samples from calves administered with <sup>14</sup>C-Clenbuterol. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1993.

Hawkins, DR; Cheng, KN and Major, RM. Bioanalytical report. Validation of a GC-MS method for the measurement of <sup>14</sup>C-Clenbuterol in horse liver and measurement of samples from horses administered with <sup>14</sup>C-Clenbuterol. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1994.

Hawkins, DR; Elsom, LF and Dighton, MH. Investigation of the metabolic profiles in the livers of the horses following multiple oral administration. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1993.

Hawkins, DR; Elsom, LF; de-Salis, CM; Morris, GR; Roberts, NL; Cameron, DM; Offer, J; Fish, C. The disposition of the combination product 14-C-N-AB 365 CL Trimethoprim/Sulfadiazine in calves. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1985.

Hawkins, DR; Elsom, LF; de-Salis, CM; Morris, GR; Roberts, NL; Cameron, DM; Pugh, KE. The disposition of the combination product 14-C-N-AB 365 CL/Trimethoprim/Sulfadiazine in dairy cows. Comment on the HRC report HRC/BOI III/84680A. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1985.

Hawkins, DR; Elsom, LF; de-Salis, CM; Roberts, NL; Cameron, DM. The disposition of the combination product 14C-N-AB 365 CL/Trimethoprim/Sulfadiazine after oral administration to horses. With addenda: letter of K. E. Pugh to Dr. Hawkins of 22.08.85 and letter of Dr. Hawkins to K. E. Pugh of 09.09.85. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1984.

Hawkins, DR; Elsom, LF; Dighton, MH; Kaur A; Cameron, DM. The pharmacokinetics, metabolism and residues of 14C-Clenbuterol (14C-N-AB 365 CL) following intramuscular administration to calves. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1993.

Hazum, E; Chang, K and Cuatrecasas, P Specific nonopioid receptors for beta-endorphin. *Science*. 205: 1033-1035, 1979.

Heilein, UAO. Dead box for the living. *J Pathol*. 184: 354-347, 1998.

- Henderson, J. On the relationship of the thymus to the sexual organs. The influence of castration on the thymus. *J Physiol.* 31 : 222-229, 1904.
- Herrlich, P and Gottlicher, M. The anti-inflammatory action of glucocorticoid hormones. Ernst Schering Research Foundation Workshop. 40: 297-304, 2002.
- Hetts, SW. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA.* 279: 300-307, 1998.
- Hillyer, PK. Utilization of hormonal profiles as indicators of reproductive capacity in beef heifers. MS Thesis. The University of Tennessee, Knoxville, 1992.
- Hinterberger, W; Cerny, C; Kinast, H; Pointner, H and Tragl, KH. Somatostatin reduces the release on colony-stimulating activity (CSA) from PHA-activated mouse spleen lymphocytes. *Experientia.* 34: 860-862, 1978.
- Hirokawa, K ; Utsunomiya, M ; Moriizumi, E ; Hashimoto, T ; Masaoka, A and Goldstein, AL. Immunohistochemical studies in human thymoma. Localization of thymosin and various cell markers. *Virchows Arch, Cell Pathol.* 55: 371-80, 1988.
- Hochman, A. Programmed cell death in prokaryotes. *Crit Rev Microbiol.* 23: 207-214, 1997.
- Hockenbery, D. Defining apoptosis. *Am J Pathol.* 146: 16-19, 1995

- Hogger, P. What happens in the body with glucocorticoids?. Pharmacokinetics and pharmacodynamics. Pharmazie in Unserer Zeit. 32(4): 296-301, 2003.
- Hollowood K, Goodlad, JR. Germinal centre cell kinetics. J Pathol. 185: 229-233, 1998.
- Hunt, NH; Perris, AD and Sandford, PA. Role of vasopressin in the mitotic response of rat bone marrow cells to hemorrhage. J Endocrinol. 72: 5-16, 1977.
- Huntingdon Research Centre. Pharmacokinetics of <sup>14</sup>C-N-AB 365 during chronic inhalation toxicity studies in cynomolgus monkeys. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1978.
- Ichii, S. Protein metabolism and glucocorticoid. Hormon to Rinsho. Clinical Endocrinology. 19(9):691-7, 1971.
- Imai, F ; Minger, JN ; Mitchell, JA ; Yamamoto, KR and Granner DK. Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. J Biol Chem. 268: 5353-6, 1993.
- Imam, AP; Halpern, GM. Uses, adverse effects of abuse of corticosteroids. Part I. Allergologia et Immunopathologia. 22(6):250-60, 1994
- Jacobson, MD; Weil, M and Raff, MC. Programmed cell death in animal development. Cell. 88: 347-354, 1997.

- Johnson, H and Torres, B. Regulation of lymphokine production by Arg-vasopressin and oxytocin: Modulation of lymphocyte function by neurohypophyseal hormones. *J Immunol.* 135:773-775, 1985.
- Johnson, HM; Farrar, WL; and Torres, BA. Vasopressin replacement of interleukin 2 requirement in gamma interferon production: Lymphokine activity of a neuroendocrine hormone. *J Immunol.* 129:983-986, 1982.
- Johnson, HM; Torres, BA; Smith, EM; Dion, LD; and Blalock, JE. Regulation of lymphokine ( $\gamma$ -interferon) production by corticotropin. *J Immunol.* 132:246-250, 1984.
- Johnson, M. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of inhaled glucocorticoids. *Journal of Allergy & Clinical Immunology.* 97:169-76, 1996.
- Johnston, AM and Jenner, WN. Study of the metabolism of  $^{14}\text{C}$ -labelled N-AB 365 in the male baboon. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1976.
- Johnston, AM; Dunsire, JP. Plasma kinetics, metabolism, excretion and residue kinetics of N-AB 365 CL following multiple oral administration to the horse. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1993
- Jones RW; Easter RA; Mckeith FK; Dalrymple RH; Maddock HM and Behtel PJ. Effect of the  $\beta$ -adrenergic agonist cimaterol (CL 263,780) on the growth and carcass characteristics of the finishing swine. *J Anim Sci.* 61 : 905-913, 1985.

- Josefsson, E; Bergquist, J; Ekman, R; Tarkowski, A. Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology* 88:140. 1996.
- Kaminski, HJ and Ruff, RL. Endocrine myopathies (hyper and hypofunction of adrenal, thyroid, pituitary glands and iatrogenic glucocorticoid myopathy), in Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology*. New York, McGraw Hill Book Company. 1726-1753, 1994:.
- Kaminski, P; Skopinska-Rozewska, E; Wasik, M; Bany, J; Barcz, E; Sommer, E and Marianowski, L. Thymus and lymph node cell CD4(+) and CD8(+) marker expression and their angiogenic activity of offspring of salbutamol-treated pregnant C3H mice. *Pharmacol Res.* 41 : 95-99, 2000.
- Keller, SE; Weiss, JM; Schleifer, SJ; Miller, NE; and Stein, M. Stress induced suppression of immunity in adrenalectomized rats. *Science.* 221: 1301-1304, 1983.
- Kellermann, F. Illegal use of veterinary drugs. Results of residue controls in 1995. *Deutsches Tierarzteblatt.* 44: 841-842, 1996.
- Kelley, KW, Brief, S; Westly, HJ; Novakofski, J; Bechtel, PJ; Simon, J and Walker, EB. GH3 pituitary adenoma cells can reverse thymic aging in rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 5663-5667, 1986.
- Kelley, KW; Arkins, S and Li, YM. Role of growth hormone and insulin-like growth factor I in immunoregulation. In: *Growth Hormone II. Basic and Clinical Aspects.* Springer Verlag, New York. 87-103, 1994.
- Kendall, MD and Al-Shawaf, AA. Innervation of the rat thymus gland. *Brain Behav. Immun.* 5: 9-28, 1991.

- Kendall, MD. Functional anatomy of the thymic microenvironment. *J Anat.* 177: 1-29, 1991.
- Kendall, MD; and Clark, AG. The female thymus and reproduction in mammals. *Oxford Rev Reprod Biol.* 16: 165-213, 1994.
- Kendall, MD; Johnson, HR and Singh, J. The weight of the human thymus gland at necropsy. *J Anat.* 131: 485-99, 1980.
- Kerr, JFR ; Wyllie, AH ; Currie, AR. Apoptosis: a basic phenomenon with wide-ranging implantation in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26: 239-257, 1972.
- Khan, A; Hong-Lie, C and Landau BR. Glucose-6-phosphatase activity in islets from ob/ob and lean mice and the effect of dexamethasone. *Endocrinology.* 136: 1934-1938, 1995.
- Kim, CH; Pelus, LM; White, JR and Broxmeyer, HE. Differential chemotactic behaviour of developing T cells in response to thymic chemokines. *Blood.* 91:4434-4443, 1998.
- Kintz, P; Dumestre-Toulet, V; Jamey, C; Cirimele, V and Ludes, B. Doping control for beta-adrenergic compounds through hair analysis. *J Forensic Sci.* 45 : 170-174, 2000.
- Kita, H ; Abu-Ghazaleh, R ; Sanderson CJ and Gleich GJ. Effect of steroids on immunoglobulin-induced eosinophil degranulation. *J Allergy Clin Immunol.* 87: 70-7, 1991.

- Knowles, DM ; Chadburn, A and Inghirami, G. Immunophenotypic markers useful in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasms. Inc Knowles DM, ed. Neoplastic hematopathology. Baltimore, Williams & Wilkins. 73-167, 1992.
- Kondo, K ; Mukai , K ; Sato , Y ; Matsuno , Y ;Shimosato ,Y and Monden , Y. An immunohistochemical study of thymic epithelial tumors. The distribution of interdigitating reticulum cells and S-100 beta- positive small lymphocytes. Am J Surg Pathol. 14: 1139-47, 1990.
- Kopitar, Z and Zimmer, A. Effect of repeated doses of NAB 365 CL on the pharmacokinetic profile in rats (ADME ID). Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1973.
- Kopitar, Z. N-AB 365-CL Autoradiographic investigations on the distribution of [14C]-N-AB 365 CL in rats and pregnant mice (ADME I B). Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1969.
- Kopitar, Z. N-AB 365CL. Pharmacokinetic investigations with [14C]-N-AB 365 CL in rats (ADME I B). Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1970.
- Kruger, TE. Thyrotropin: An endogenous regulator of the immune response. Ph.D. Thesis. University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, 1988.
- Kuiper, HA; Noordam, MY; Dooren-Flipsen, MM; Schilt, R and Roos, AH. Illegal use of beta-adrenergic agonists: European Community. J Anim Sci. 76: 195-207, 1998

Kurz, B ; Feindt, J ; von Gaudecker, B ; Kranz, A ; Loppnow, H and Mentlein, R. Beta-adrenoceptor-mediated effects in rat cultured thymic epithelial cells. *Br J Pharmacol.* Apr 120(8): 1401-8, 1997

Laguna, J. Importance of lipids in various metabolic aspects. Effect of glucocorticoids on the metabolism of lipids. *Gaceta Medica de Mexico.* Sep 97(9):1130-5, 1967.

Lamas, AM ; Leon, OG and Schleimer, RP. Glucocorticoids inhibit eosinophil responses to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol.* 147: 254-9, 1991.

Lambillotte, C; Gilon, P and Henquin, JC. Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. *J Clin Invest.* 99: 414-423, 1997.

Lechat, P ; Lagier, G. Classification of corticoids. *Revue du Praticien.* 25(15): 1087-99, 1975.

Lee, RE Jr; Domm, LV. A histological and histochemical study on the effects of adrenal cortical steroids in the fetal and neonatal rat thymus. *Anat Rec.* Feb 157(2):105-15, 1967

Leers, MPG; Kölgen, W; Björklund, V; Bergman, T; Tribbick, G; Persson, B. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol.* 187: 567-572, 1999.

Leposavic, G and Micic, M. Testosterone binding sites in the rat thymus during late embryonal and postnatal period. *Thymus.* 20:77-88, 1992.

- Levine, R and Haft, DE. Carbohydrate homeostasis. *N Engl J Med.* 283(5): 237-46, 1970.
- Linden, M and Brattsand, R. Effects of a corticosteroid, budesonide, on alveolar macrophages and blood monocyte secretion of cytokines: differential sensitivity of GM-CSF, IL-1b and IL-6. *Pulmonary Pharmacol.* 7: 43-7, 1994.
- Lloyd-Evans, LPM. Application for establishment of maximum residue limits under council regulation (EEC) 2377/90. Clenbuterol hydrochloride; expert report on the residues file. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1994.
- Love, PE; Lee, J and Shores, EW. Critical relationship between TCR signaling potential and TCR affinity during thymocyte selection. *J Immunol.* 165: 3080-3087, 2000.
- Lowy, MT. Quantification of type I and II adrenal steroid receptors in neuronal, lymphoid and pituitary tissues. *Brain Res* 503:191-197, 1989.
- Lukert, BP and Adams, JS. Calcium and phosphorus homeostasis in man. Effect of corticosteroids. *Arch Intern Med.* 136: 1249-1253, 1976.
- Lukert, BP. Etidronate in the management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *American Journal of Medicine.* 99(3): 233-4, 1995.
- Lundin M, Schelin U. The effect of steroids on the histology and ultrastructure of lymphoid tissue.I. Acute thymic involution. *Pathol Eur.*;1(1):15-28, 1966.

- Lunstra, DD; Ford, JJ and Echternkamp, SE. Puberty in beef bulls: Hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. *J Anim Sci.* 46: 1054-1062, 1978.
- Madden, KS and Felten, DL. Beta-adrenoceptor blockade alters thymocyte differentiation in aged mice. *Cell Mol.Biol (Noisy.-le-grand)* 47, 189-196, 2001.
- Madden, KS and Felten, DL. Beta-adrenoceptor blockade alters thymocyte differentiation in aged mice. *Cell Mol Biol.* 47(1): 189-96, 2001.
- Madden, KS; Sanders, VM; Felten, DL. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35:417, 1995.
- Majno, G and Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 146: 3-15, 1995.
- Malech, ML and Gallin, JI. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med.* 317: 687-694, 1987.
- Malgor, LA ; Torales, PR ;Klainer, TE; Barrios, L and Blanc, CC. Effects of dexamethasone on bone marrow erythropoiesis. *Hormone Research.* 5(5): 269-77, 1974.
- Malgor, LA; Valsecia, M; Verges, E and De Markowsky, EE. Blockade of the in vitro effects of testosterone and erythropoietin on Cfu-E and Bfu-E proliferation by pretreatment of the donor rats with cyproterone and flutamide. *Acta Physiologica, Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana.* 48(2): 99-105, 1998.

- Malstrom, S; Tili, E; Kappes, D; Ceci, JD and Tschlis, PN. Tumor induction by an Lck-MyrAkt transgene is delayed by mechanisms controlling the size of the thymus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 14967-14972, 2001.
- Marchetti, B; Morale, MC; Batticane, N; Gallo, F; Farinella, Z and Cioni, M. Aging of the reproductive-neuroimmune axis. A crucial role for the hypothalamic neuropeptide luteinizing hormone releasing hormone. *Ann NY Acad Sci.* 621: 159-173, 1991.
- Marchetti, B; Morale, MC; Paradis, P and Bouvier, M. Characterization, expression, and hormonal control of a thymic beta 2-adrenergic receptor. *Am J Physiol.* 267, 718-731, 1994.
- Marchevsky, AM and Kaneko, M. *Surgical pathology of mediastinum*, 2nd ed. New York: Raven Press, 1992.
- Martinet, N; Vaillant, P; Charles, T; Lambert, J and Martinet, Y. Dexamethasone modulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  (cachectin) release by activated normal human alveolar macrophages. *Eur Respir J.* 5: 67-72, 1992.
- Martinez-Navarro, JF. Food poisoning related to consumption of illicit beta-agonist in liver. *Lancet.* 336: 1311, 1990.
- Mastorakos, G and Ilias, I. Maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy and the postpartum period. Postpartum-related disorders. *Ann NY Acad Sci.* 900:95-106, 2000.
- McEwen, BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 886:172-189, 2000.

- McGimsey, WC; Cidlowski, JA; Stumpf, WE; Sar, M. Immunocytochemical localization of the glucocorticoid receptor in rat brain, pituitary, liver, and thymus with two new polyclonal antipeptide antibodies. *Endocrinology* 129:3064-3072, 1991.
- McMahon, M; Gerich, J and Rizza, R. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes Metab Rev.* 4: 17-30, 1988.
- Meagher, LC; Cousin, JM; Seckl, JR and Haslett, C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol.* 156: 4422-8, 1996.
- Meyer, HH and Rinke, LM. The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *J Anim Sci.* 69: 4538-4544, 1991
- Mishra, DB; Das, LN and Biswal, G. Comparativa histological study of the thymus gland of the bull and the bullock. *Indian vet J.* 43:12-16, 1966.
- Mitchell, GA and Dunnavan, G. Illegal use of beta-adrenergic agonists in the United States. *J Anim Sci.* 76: 208-211, 1998
- Miura, T; Muraoka, S; Fujimoto, Y and Zhao, K. DNA damage induced by catechol derivatives. *Chem Biol Interact.* 126: 125-136, 2000.
- Moll, UM. Functional histology of the neuroendocrine thymus. *Microsc Res Tech.* 38: 300-310, 1997.
- Moll, UM; Lane, BL; Robert, F; Geenen, V and Leros, JJ. The neuroendocrine thymus. Abundant occurrence of oxytocin,

vasopressin, and neurophysin-like peptides in epithelial cells. *Histochemistry*. 89: 385-390, 1988.

Moore, TC. Modification of lymphocyte traffic by vasoactive neurotransmitter substances. *Immunology*. 52: 511-518, 1984.

Morale, MC; Gallo, F; Batticane, N and Marchetti, B. The immune response evokes up- and down-modulation of beta 2-adrenergic receptor messenger RNA concentration in the male rat thymus. *Mol Endocrinol*. 6(9): 1513-24, 1992.

Moraska, A; Deak, T; Spencer, RL; Roth, D; Fleshner, M. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 279: 1321-1329, 2000.

Moreno, AM and Zapata, A. In situ effects of estrogens on the stroma of rat thymus. In: *Lymphatic Tissues In Vivo Immune Responses*, B.A. Imhof, S. Berrih-Aknin, and S. Ezine, eds. Marcel Dekker, New York, 81-87, 1991.

Moskovtchenko, JF and Cognet JB. Classification of corticoids. *Annales de l'Anesthesiologie Francaise*. 17(4):399-405, 1976.

Müller-Hermelink, HK; Marino, M and Palestro, G. Pathology of thymic epithelial tumors. *Curr Top Pathol*. 75: 207-68, 1986

Munck, A; Toth, ANF. Glucocorticoid action. Degroot L, ed. *Endocrinology*. Vol 3.: WB Saunders Company. Philadelphia, 1995.

- Murphy, WJ; Durum, SK; and Longo, DL. Role of neuroendocrine hormones in murine T cell development. Growth hormone exerts thymopoietic effects in vivo. *J Immunol.* 149: 3851-3857, 1992
- Newton, R; Kuitert, LM; Slater, DM; Adcock, IM and Barnes, PJ. Induction of cPLA2 and COX-2 mRNA by proinflammatory cytokines is suppressed by dexamethasone in human airway epithelial cells. *Life Sci.* 60: 67-78, 1997.
- Nicod, N; Giusti, V; Besse, C and Tappy, L. Metabolic Adaptations to Dexamethasone-Induced Insulin Resistance in Healthy Volunteers *Obes. Res.* 11(5): 625-631, 2003.
- Norment, AM and Bevan, MJ. Role of chemokines in thymocyte development. *Semin. Immunol.* 12:445-455, 2000.
- Norton, DA. Preparation of steroid structural data for the consideration of possible structural-functional relationships. *Biophysical Journal.* 5(4): 425-37, 1965.
- Okret, S; Carlstedt-Duke, J; Wrangé, O; Carlstrom, K; Gustafsson, JA. Characterization of an antiserum against the glucocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta.* 677:205-219, 1981.
- Olsen, NJ; Olson, G; Viselli, SM; Gu, X and Kovacs, WJ. Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development. *Endocrinology.* 142, 1278-1283, 2001.
- Ottaway, CA; and Greensberg, GR. Interaction of vasoactive intestinal peptide with mouse lymphocytes: Specific binding and the modulation of mitogen responses. *J Immunol.* 132:417-423, 1984.

- Owens, GP; Hahn, WE and Cohen, JJ. Identification of mRNAs associated with programmed cell death in immature thymocytes. *Mol Cell Biol.* 11: 4177-88, 1991.
- Payan, DG; Brewster, DR and Goetzl, EJ. Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J. Immunol.* 131:1613-1615, 1983.
- Payan, DG; Hess, CA and Goetzl, EJ. Inhibition by somatostatin of the proliferation of T-lymphocytes and Molt-4 lymphoblasts. *Cell Immunol.* 84:433-438, 1984.
- Pearce, P; Khalid, BAK; and Funder, JW. Androgens and the thymus. *Endocrinology.* 109: 1073-1077, 1981.
- Pearce, PT; Khalid, BAK; and Funder, JW. Progesterone receptors in rat thymus. *Endocrinology.* 113:1287-1291, 1983.
- Pedersen, BK; Kappel, M; Klokke, M; Nielsen, HB; Secher, NH. The immune system during exposure to extreme physiologic conditions. *Int J Sports Med.* 15 Suppl 3: 116-121, 1994.
- Peng, L and Lin JJ. A novel method for quantitative analysis of apoptosis. *Lab Invest.* 78: 547-555, 1997.
- Perretti, M and Flower RJ. Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin-1. *J Immunol.* 150:992-999, 1993.

- Perrin-Wolff, M; Mishal, Z; Bertoglio, J and Pallardy M. Position 16 of the steroid nucleus modulates glucocorticoid-induced apoptosis at the transcriptional level in murine T-lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*. 52(9):1469-76, 1996.
- Persike, EC. Involution of the thymus during pregnancy in young mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 45:315-317, 1940.
- Petrie, HT. Cell migration and the control of post-natal T cell lymphopoiesis in the thymus. *Nat. Rev. Immunol*. 3:859-866, 2003.
- Piantelli, M; Maggiano, N; Larocca, M; Ricci, R; Ranelletti, F.O; Lauriola, L; and Capelli, A. Neuropeptide-immunoreactive cells in human thymus. *Brain Behav Immun*. 4:189-197, 1990.
- Pierpaoli, W and Sorkin, E. Relationship between thymus and hypophysis. *Nature*. 215: 834-837, 1967.
- Plata-Salaman, CR. Immunomodulators and feeding regulation: a humoral link between the immune and nervous systems. *Brain Behav Immun* 3:193-213, 1989.
- Provinciali, M and Fabris, N. Modulation of lymphoid cell sensitivity to interferon by thyroid hormones. *J Endocr Invest*. 13:187-191, 1990.
- Provinciali, M and Fabris, N. Role of pituitary thyroid-axis on basal and lymphokine-induced NK cell activity in aging. *Int J Neurosci*. 51: 273-274, 1990.

- Pruett, SB; Fan, R; Myers, LP; Wu, WJ and Collier, S. Quantitative analysis of the neuroendocrine-immune axis: linear modeling of the effects of exogenous corticosterone and restraint stress on lymphocyte subpopulations in the spleen and thymus in female B6C3F1 mice. *Brain Behav Immun.* 14: 270-287, 2000.
- Qiu, Y; Peng, Y and Wang, J. Immunoregulatory role of neurotransmitters. *Adv Neuroimmunol.* 6(3): 223-31, 1996.
- Ranelletti, FO; Maggiano, M; Aiello, FB; Carbone, A; Larocca, LM; Musiani, P; Piantelli, M. Glucocorticoid receptors and corticoid sensitivity of human thymocytes at discrete stages of intrathymic differentiation. *J Immunol.* 138:440-445, 1987.
- Rebar, RW. Effects of thymic peptides on hypothalamic-pituitary function. Goldstein, AL ed. *Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Application.* New York, 1984.
- Rebar, RW; Miyake, A; Low, TLK and Goldstein, AL. Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science.* 214: 669-671, 1981.
- Reid, IR; Heap, SW; King, AR and Ibbertson HK. Two-year follow-up of biphosphonate (APD) treatment in steroid osteoporosis. *Lancet.* 2:1144, 1988
- Ricks, CA; Dalrymple, RH; Baker, PK and Ingle DL. Use of  $\beta$ -agonist to alter fat and muscle deposition in steers. *J Anim Sci.* 59: 1247-1255, 1984.
- Rominger, KL and Schrank, H. Placental transfer of <sup>14</sup>C-clenbuterol in the dog. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim. Germany, 1982

- Rosai, J and Levine, GD. Tumors of the thymus. Atlas of Tumor Pathology, 2nd Series, Fascicle 13. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, DC, 1975.
- Rouabhia, M; Chakin, J; and Deschaux, P..Interaction between the immune and endocrine systems: immunomodulatory effects of luteinizing hormone. Prog NeuroEndocrinoimmunol. 4: 86-91, 1991.
- Rouabhia, M; Ghanmi, Z and Deschaux, PA. Luteinizing hormone receptor and inhibition of T cell cytotoxicity in vitro. Period Biol. 89: 119-123, 1987.
- Rouleau G, Karpati G, Stirling C, Soza M, Prescott S, Holland P. Glucocorticoid excess induces preferential depletion of myosin in denervated skeletal muscle fibers. Muscle Nerve 1987;10: 428-438.
- Ruco, LP; Rosati, S; Monardo, F; Pescarmona, E; Rendina, EA and Baroni CD. Macrophages and interdigitating reticulum cells in normal thymus and in thymoma: an immunohistochemical study. Histopathology. 14: 37-45, 1989.
- Ruff, MR; Pert, CB; Weber, RJ; Wahl, LM; Wahl, SM and Paul, SM. Benzodiazepine receptor-mediated chemotaxis of human monocytes. Science. 229:1281-1283, 1985.
- Ryman, BE and Whelan WJ. New aspects of glycogen metabolism. Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology. 34:285-443, 1971.
- Safieh-Garabedian, B; Kendall, MD; Khamashta, MA; Hughes, GR. Thymulin and its role in immunomodulation. J Autoimmun, 5:547-555, 1992.

- Sainte-Marie, G and Peng, FS. Emigration of thymocytes from the thymus: A review and study of the problem. *Rev Can Biol.* 30: 51-78, 1971.
- Sakabe, K and Seikik, Fuji-Hanamoto H. Histochemical localization of progesterin receptor cells in the rat thymus. *Thymus.* 8: 97-103, 1986.
- Salleras, L; Dominguez, A; Mata, E; Taberner, J. L; Moro, I and Salva, P. Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain. *Public Health Rep.* 110: 338-342, 1995.
- Salomon, RN and Díaz-Cano, S. Introduction to apoptosis. *Diag Mol Pathol.* 5: 235-238, 1995.
- Savill, J. Phagocytic docking without shocking. *Nature.* 392: 442-443, 1998.
- Savino, W and Dardenne, M. Developmental studies on expression of monoclonal antibody defined cytokeratins by thymic epithelial cells from normal and autoimmune mice. *J Histochem Cytochem.* 36:1123-9, 1988.
- Savino, W. and Dardenne, M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr.Rev.* 21, 412-443, 2000.
- Scheiff, JM; Cordier, AC and Hammont, S. Epithelial cell proliferation in thymic hyperplasia induced by triiodothyronine. *Chn Exp Immunol.* 27: 516-521, 1977.
- Schindler, BA. Stress, affective disorders, and immune function. *Med Clin North Am.* 69:585-597, 1985.

- Schmid, J and Bücheler A. Report: NAB 365 CL (Clenbuterol). Quantitative determination of Clenbuterol in tissues by automated gas chromatography/mass spectrometry ADME 65/87-U-Venti 85, Plani 51, Venti TMP/S 66 - U87-0984. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim. Germany, 1987.
- Schmid, J and Zimmer A. N-AB 365 CL. ADME V. Residue studies in the cow following multiple i.m. dosing with N-AB 365 CL -U-Venti 16, Plani 11, Venti TMP/S 21-U77-0190. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1977.
- Schmid, J and Zimmer, A. Pilot pharmacokinetic investigations after intramuscular administration (single and multiple doses) of N-AB 365 CL in the cow - U-Venti 14, Plani 8, Venti TMP/S 19-U77-0188 . Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim. Germany, 1977.
- Schmid, J and Zimmer, A. Pilot pharmacokinetic studies following oral administration (single and multiple dosing) of <sup>14</sup>C-N-AB 365 CL to a cow. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1977.
- Schmid, J. Investigations of the placental transfer of <sup>14</sup>C N-AB 365 CL in the baboon. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim. Germany, 1980.
- Schmid, J. Pilot pharmacokinetic investigations after intravenous administration of N-AB 365 CL in a cow - U-Venti 13, Plani 9, Venti TMP/S 18 - U77-0187 -. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim. Germany, 1977.

Schmid, J. Report: N-AB 365 CL. N-AB 365 CL in the cow's milk after oral and intramuscular administration (P 64189) - U-Venti 105, Plani 63, Venti TMP/S 88 - U90-0099. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim. Germany, 1990.

Schmid, J. Report: N-AB 365 CL. Plasma levels and residue analysis in cows and calves (P 62/89) -U-Venti 106, Plani 64, Venti TMP/S 89. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim. Germany, 1990.

Schulof, RS; Naylor, PH; Sztejn, MB and Goldstein AL. Thymic physiology and biology. *Adv Clin Chem.* 26: 203-92, 1987.

Selye, H. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Br J Exp. Pathol.* 17: 234-248, 1936.

Semenkov, VF and Afinogenova, SA. Effect of endogenous glucocorticoids on the morphology of mouse thymus and spleen. *Biull.Eksp.Biol.Med.* 94, 107-109, 1982.

Siegel, SC. Corticosteroid agents. Overview of corticosteroid therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 76: 312-320, 1985

Simons, SS; Thompson, EB; Merchlinsky, MJ and Johnson DF. Synthesis and biological activity of some novel, chemically reactive glucocorticoids *Journal of Steroid Biochemistry.* 13(3):311-22, 1980.

Singh, U. Effect of catecholamines on lymphopoiesis in fetal mouse thymic explants. *J Anat.* 129: 279-292, 1979.

Skosey, JL. Some basic aspects of bone metabolism in relation to osteoporosis. *Medical Clinics of North America.* 54(1):141-52, 1970.

- Smith, EM and Blalock, JE. A molecular basis for interactions between the immune and neuroendocrine systems. *Int J Neurosci.* 38: 455-464, 1988.
- Smith, EM; Brosnan, P; Meyer, WJ; and Blalock, JE. An ACTH receptor on human mononuclear leukocytes. *N Engl J Med.* 317: 1266-1269, 1987.
- Smith, EM; Morrill, AC; Meyer, WJ; and Blalock, JE. Corticotropin releasing factor induction of leukocyte-derived immunoreactive ACTH and endorphins. *Nature.* 321:881-882, 1986.
- Soini, Y; Päkko, P and Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol.* 153: 1041-1049, 1998.
- Solomon, GF; Fiatarone, MA; Benton, D; Morley, JE; Bloom, E and Makinodan, T. Psychoimmunologic and endorphin function in the aged. In *Neuro-Immunomodulation: Intervention in Aging and Cancer.* W Pierpaoli, and N.H. Spector, eds. *Ann. N.Y. Acad. Sci;* 521:43-58, 1988.
- Wajeman-Chao, SA; Lancaster, SA; Graf LH Jr and Chambers, DA.. Mechanism of Catecholamine-Mediated Destabilization of Messenger RNA Encoding Thy-1 Protein in T-Lineage Cells<sup>1</sup>. The Journal of Immunology.* 161: 4825-4833, 1998.
- Spangelo, BL; Ross, PC; Judd, AM and MacLeod, RM. Thymic stromal elements contain an anterior pituitary hormone stimulating activity. *J Neuroimmunol.* 25:37-46, 1989.
- Spann, C and Winter, M E. Effect of Clenbuterol on Athletic Performance. *Ann Pharmacother.* 29: 75-77, 1995.

- Sporano, V; Grasso, L; Esposito, M; Oliviero, G; Brambilla, G and Loizzo, A. Clenbuterol residues in non-liver containing meat as a cause of collective food poisoning. *Veterinary and Human Toxicology*. 40: 141-143, 1998.
- Stalmans, W and Laloux, M. Glucocorticoids and hepatic glycogen metabolism. *Monogr Endocrinol*. 12: 517-533, 1979.
- Stalmans, W; Bollen, M and Mvumbi, L. Control of glycogen synthesis in health and disease. *Diabetes Metab Rev*. 3: 127-161, 1987.
- Standiford, TJ; Kunkel, SL; Rolfe, MW; Evanoff, HL; Allen, RM and Sriter, RW. Regulation of human alveolar macrophage and blood monocyte-derived interleukin-8 by prostaglandin E2 and dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 6: 75-81, 1992.
- Staunton, MJ and Gaffney, EF. Apoptosis. Basic concepts and potential significance on human cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 122: 310-319, 1998.
- Steinmann, GG; Klaus, B and Mglger-Hernelink, HK. The involution of the aging human thymic epithelium is independent of puberty. *Scand J Immunol*. 22: 563-575, 1985.
- Suda, T; Murray, R; Guidos, C and Zlotnik A. Growth-promoting activity of IL-1 alpha, IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in combination with IL-2, IL-4, or IL-7 on murine thymocytes. Differential effects on CD4/CD8 subsets and on CD3+/CD3-double-negative thymocytes. *J Immunol*. 144(8):3039-45, 1990.
- Sudo, N; Yu, XN; Sogawa, H and Kubo, C. Restraint stress causes tissue-specific changes in the immune cell distribution. *Neuroimmunomodulation*. 4(3):113-9, 1997.

- Surh, CD and Sprent, J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*. 372: 100-103, 1994.
- Suster, S and Rosai, J. Thymus. Sternberg SS. ed. *Histology for pathologists*. Raven Press. New York, 1992.
- Suzuki, Y; Ichikawa, Y; Saito, E and Homma, M. Importance of increased urinary calcium excretion in the development of secondary hyperparathyroidism of patients under glucocorticoid therapy. *Metabolism*. 32:151-156, 1983.
- Takai, Y; Wong, GG; Clark, SC; Burakoff, SJ and Herrmann, SH. B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 140(2): 508-12, 1988.
- Talar-Williams, C and Sneller MC. Complications of corticosteroid therapy. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 251(3):131-6, 1994.
- Tappy, L; Randin, D; Vollenweider, P; Vollenweider, L; Paquot, N; Scherrer, U; Nicod, P and Jéquier, E. Mechanisms of dexamethasone-induced insulin resistance in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 79: 1063-1069, 1994.
- Thatte, W and Dahanukar, S. Apoptosis. Clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs*. 54: 511-532, 1997.
- Tomaszewska, D; Przekop, F. The immune-neuro-endocrine interactions. *J Physiol Pharmacol*. 48:139-158, 1997.

- Ueno, T; Saito, F; Gray, DHD; Kuse, S; Hieshima, K; Nakano, H; Kakiuchi, T; Lipp, M; Boyd, RL and Takahama, Y. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J. Exp. Med.* 200:493-505, 2004.
- Toyooka, K; Tai, XG; Park, CS; Yashiro, Y; Hamaoka, T and Fujiwara, H. A caspase inhibitor protects thymocytes from diverse signal-mediated apoptosis but not from clonal deletion in fetal thymus organ culture. *Immunol Lett.* 63: 83-89, 1998.
- Tsawdaroglou, NG; Govindan, MV; Schmid, W; Sekeris, CE. Dexamethasone-binding proteins in cytosol and nucleus of rat thymocytes. Purification of three receptor proteins. *Eur J Biochem* 114:305-313, 1981.
- Van Baarlen, J; Schuurman, HJ and Huber, J. Acute thymus involution in infancy and childhood: a reliable marker for duration of acute illness. *Hum Pathol.*19: 1155-60, 1988.
- Van De Stolpe, A; Caldenhoven, E; Raaijmakers, JAM; van der Saag, PT and Koendorman, L. Glucocorticoid-mediated repression of intercellular adhesion molecule-1 expression in human monocytic and bronchial epithelial cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 8: 340-7, 1993.
- Van de Wijngaert, FP; Kendall, MD; Schuurman, HJ; Rademakers, LH and Kater, L. Heterogeneity of epithelial cells in the human thymus. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res.* 237: 227-37, 1984.
- Van Epps, DE and Saland, L. 3-Endorphin and metenkephalin stimulate human peripheral blood mononuclear cell chemotaxis. *J Immunol.* 132:3046-3053, 1984.
- Van Ewijk, W. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu. Rev. Immunol.* 9:591-615, 1991.

- Verhaegen, S. Microscopical study of cell death via apoptosis. *Europ Microsp Anal.*8: 31-33, 1998.
- Villa Verde, DMS; Defresne, MP, Vannier-Dos-Santos, MA; Dussault, JH; Bonvier, J and Savino, W. Identification of nuclear triiodothyronine receptors in the thymic epithelium. *Endocrinology.*131: 1313-1320, 1992.
- Von Gaudecker, B; Steinman, GG; Hausmann, ML; Harpprecht, J; Milicevic, NM and Muller-Hermelink, HK. Immunohistochemical characterization of the thymic microenvironment. A lightmicroscopic and ultrastructural immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 244: 403-412, 1986.
- Von Patay, B; Loppnow, H; Feindt, J; Kurz, B and Mentlein, R. Catecholamines and lipopolysaccharide synergistically induce the release of interleukin-6 from thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol.* 86(2): 182-9, 1998.
- Wadler, GI. Drug-Use Update. *Med Clin N Amer.* 78: 439-455, 1994.
- Wajeman-Chao, SA; Lancaster, SA; Graf, LH and Chambers, DA. Mechanism of catecholamine-mediated destabilization of messenger RNA encoding Thy-1 protein in T-lineage cells. *J Immunol.* 161: 4825-4833, 1998.
- Wallen, N; Kita, H; Weiller, D and Gleich, GJ. Glucocorticoids inhibit cytokine-mediated eosinophil survival. *J Immunol.* 147: 3490-5, 1991.
- Weigent, DA; and Blalock, JE. Associations between the neuroendocrine and immune systems. *J Leukoc Biol* 58:137-150, 1995.

- Weigent, DA; and Blalock, JE. Growth hormone and the immune system. *Prog NeuroEndocrin Immunol.* 3:231-241, 1990.
- Weil, P and Browne JSL. Excretion of cortin after surgical operation. *Science.* 90: 445-446, 1939.
- Weindruch, RH; Suffin, SC. Quantitative histologic effects on mouse thymus of controlled dietary restriction. *J Gerontol.* Jul;35(4):525-31, 1980.
- Weinstein, SP; Paquin, T; Pritsker, A and Haber, RS. Glucocorticoid-induced insulin resistance: dexamethasone inhibits the activation of glucose transport in rat skeletal muscle by both insulin- and non-insulin-related stimuli. *Diabetes.* 44: 441-445, 1995.
- Wirt, DP; Grogan, TM; Nagle, RB. A comprehensive immunotopographic map of human thymus. *J Histochem Cytochem.* 36:1-12, 1988.
- Wise, T and Maurer, RR.. Characterization of Thymosin  $\alpha$ 1 and 134 during the bovine estrual period: Effects of elevated estradiol and progesterin. *Biol Reprod.* 45: 57-63, 1991.
- Wise, T. The thymus: Old gland, new perspectives. *Dom Anim Endocrinol* 52: 109-128, 1988.
- Wise, T; Day, ML and Vakharia, DD. Endocrine relationships of thymosin  $\alpha$ 1, thymosin 134 and luteinizing hormone throughout the prepuberal period of development in heifers, ovariectomized heifers and ovariectomized heifers with estradiol implants. *J Reprod Immunol.* 18: 225-235, 1990.

- Wise, T; Klindt, J; Buonomo, FC and Yen, JT. Effects of porcine growth hormone on thymic weight and thymic peptides thymosin  $\alpha$ 1 and  $\beta$ 4 in swine. Bercu, BB and Walker, RF. Growth Hormone II. Basic and Clinical Aspects. Springer-Verlag, New York, 1994.
- Wise, T; Klindt, J; Macdonald, GJ and Ford, JJ. Effects of neonatal sexual differentiation, growth hormone and testosterone on thymic weights and thymosin  $\alpha$ 1 in hypophysectomized rats. *J Reprod Immunol.* 19: 43-54, 1991.
- Wise, TH. Developmental changes of serum thymosin  $\alpha$ 1 and  $\beta$ 4 in male and male castrated pigs: Modulation by testosterone and human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod.* 46: 892-897, 1992.
- Witt; CM; Raychaudhuri, S; Schaefer, B; Chakraborty, AK; Robey, EA. Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS Biol.* Jun 3(6), 2005
- Wu, W; Yamaura, T; Murakami, K; Murata, J; Matsumoto, K; Watanabe, H and Saiki, I. Social isolation stress enhanced liver metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells by suppressing immune responses in mice. *Life Sci.* 66: 1827-1838, 2000.
- Wybran, J; Appelboom, T; Famaey, J.P; and Govaerts, A. Suggestive evidence for receptors for morphine and methionine enkephalin on normal human blood T lymphocytes. *J Immunol.* 123: 1068-1070, 1979.
- Yagi, H., Nakamura, M., Ishii, T., Kasahara, S., and Itoh, T., Ultrastructural analysis of mouse thymocyte subpopulations. *Eur.J.Immunol.* 27, 2680-2687, 1997.

- Yang, H. and Parkhouse, R. M., Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 89, 76-83, 1996.
- Yu, D. T., Clements, P. J., Paulus, H. E., Peter, J. B., Levy, J., and Barnett, E. V., Human lymphocyte subpopulations. Effect of corticosteroids. *J.Clin.Invest* 53, 565-571, 1974.
- Zicha, L and Kittenberg, H. Glucocorticoids and glucose metabolism. Comparative studies on the influence of prednisolone-Na-hemisuccinate, 16-methylene-prednisolone monophosphate, 6-alpha-chloroprednisolone-Na-hemisuccinate, dexamethasone Na-hemisulfate and 9-alpha-fluoro-16-alpha-hydroxyprednisolone acetate on glucose tolerance. *Arzneimittel-Forschung*. 16(7):797-9, 1966.
- Zimmer, A. Administration of Clenbuterol in man. Single doses, multiple doses, and metabolite samples (ADME V). Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1976.
- Zimmer, A. Comparison of the pharmacokinetic profile in the dog with single and repeated dosage (ADME I D). Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1974.
- Zimmer, A. Pharmacokinetics and metabolite pattern in the rabbit and dog (ADME II). Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany, 1974.