

## Expressão gênica de caspases 3 e 8 em timo e baço de ratas recém-desmamadas e imunossuprimidas por glicocorticóide

[Genic expression of caspases 3 and 8 in thymus and spleen of glucocorticoid-immunosuppressed weaned rats]

J.J. Batista<sup>1</sup>, A.S. Martins<sup>2</sup>, L. Moro<sup>1</sup>, A.C. Vasconcelos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia Geral – Instituto de Ciências Biológicas – UFMG  
Caixa Postal 486  
31270-901 – Belo Horizonte, MG

<sup>2</sup>Departamento de Fisiologia – ICB – UFMG - Belo Horizonte, MG

### RESUMO

Determinou-se a expressão gênica das caspases 3 e 8 mediante transcrição reversa de mRNA total e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para avaliar a apoptose em timo e baço de ratas imunossuprimidas por glicocorticóides. Utilizou-se dexametasona para indução da apoptose e atrofia linfóide. Quarenta e cinco fêmeas Wistar recém-desmamadas foram separadas em três grupos: as ratas de A (n=18) e B (n=18) foram tratadas com 250 e 500mg de glicocorticóide, via intramuscular, respectivamente, e as do C (n=9) não foram tratadas. Após 24, 48 e 72 horas, seis animais de cada grupo tratado e três do controle foram anestesiados, pesados e sacrificados. O baço e o timo foram coletados e pesados. Fragmentos dos órgãos foram fixados em formol tamponado a 10% e processados segundo técnica para inclusão em parafina. Os blocos foram seccionados em 5µm, e os cortes corados em hematoxilina e eosina. A análise histopatológica aliada ao peso dos órgãos nas diferentes doses e tempos demonstrou que a dexametasona induziu hipotrofia linfóide, que ocorreu com maior intensidade no tempo de 72 horas em animais do grupo B. Fragmentos de timo e de baço foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para extração de mRNA e DNA. Para a padronização da técnica de RT-PCR, utilizaram-se *pool* de amostras de mRNA dos animais-controle e *pool* de mRNA de animais tratados em cada tempo de experimento. A técnica de RT-PCR foi sensível o suficiente para a detecção dos mRNAs que codificam as caspases 3 e 8, e ambas participaram do processo de apoptose induzido por dexametasona.

Palavras-chave: rato, apoptose, dexametasona, timo, baço, caspase 3, caspase 8, RT-PCR

### ABSTRACT

*Expression of caspases 3 and 8 in spleen and thymus of immunosuppressed rats was analyzed by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Forty-five weaned female Wistar rats were divided into three groups: A (n=18) and B (n=18) rats were injected with 250µg and 500µg per rat, respectively; and C (n=9) rats were non-treated control animals. After 24, 48 and 72 hours, six animals from A and B groups and three controls were anaesthetized with chloroform, weighed and euthanized. Thymus and spleens were collected, weighed and a sample of each organ was fixed by immersion in 10% buffered formaline and embedded in paraffin. Thin sections (5µm) were stained with HE. Thymus and spleen samples were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for total RNA and DNA extraction. Apoptotic indices were calculated using sections stained with HE. Apoptotic indices and organs weights showed that hypotrophy happened mainly at 72h post treatment with 500µg/rat. RT-PCR was standardized using a pool of control animals and another from treated animals with A and B doses at each time period, respectively. Specific oligonucleotides for caspases 3 and 8 were drawn to obtain*

Recebido para publicação em 22 de janeiro de 2004

Recebido para publicação, após modificações, em 13 de agosto de 2004

E-mail: moro@icb.ufmg.br

*fragments of 271bp and 368bp, respectively. The results demonstrated that technique RT-PCR is sensitive enough to detect caspases 3 and 8 mRNAs and that caspase 3 and 8 participate in the apoptotic process induced by dexamethasone in weaned rats.*

*Keywords: rat, apoptosis, dexamethasone, thymus, spleen, caspase 3, caspase 8, RT-PCR*

## INTRODUÇÃO

A apoptose é um tipo ativo de morte celular que requer energia, síntese e degradação protéicas para sua execução (Kerr e Searle, 1972), sendo, portanto, um processo ordenado que ocorre por meio da ativação e expressão de genes, gerando diversas enzimas necessárias para a autodestruição celular (Kerr, 1971; Kerr et al., 1972). É um processo diferente da necrose, que ocorre quando uma agressão externa intensa medeia a destruição da membrana citoplasmática ou do suporte bioquímico dessa integridade (Collins et al., 1997). A apoptose ocorre freqüentemente como resultado da diferenciação terminal em células lábeis e estáveis, sendo importante na homeostasia de organismos multicelulares (Wyllie et al., 1980). A morte celular fisiológica ocorre na maturação imunológica, incluindo a supressão de clones não reativos e auto-reativos no timo, também chamadas de seleção negativa e positiva, respectivamente. A morte de células-alvo (infectadas ou transformadas) por linfócitos citotóxicos e células *killer* também ocorre por apoptose (Arends e Wyllie, 1991).

As mudanças morfológicas observadas no processo de apoptose são condensação celular, presumivelmente pela perda de água (Kerr et al., 1972); desprendimento e arredondamento celular; projeções da membrana citoplasmática; condensação da cromatina nuclear (Mills, 1999; Hacker, 2000) e fragmentação nuclear e celular em corpos apoptóticos. A maioria dessas mudanças é mediada por uma cascata enzimática envolvendo cisteíno-proteases, chamadas caspases, que clivam resíduos de ácido aspártico (Hengartner, 2000). Atualmente, já foram identificadas 14 caspases (Abbas et al., 2000) que podem ser classificadas em iniciadoras (2, 8, 9 e 10) e executoras (3, 6 e 7) (Amarante-Mendes e Green, 1999).

Além das alterações morfológicas, ocorrem eventos bioquímicos marcantes como a fragmentação internucleossômica do genoma.

Uma endonuclease, na presença de  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$ , cliva o DNA em subunidades com cerca de 180 a 200pb ou múltiplos desses. Essa fragmentação internucleossômica pode ser visualizada através da eletroforese do DNA em gel de agarose, gerando o clássico padrão em escada (Wyllie, 1980). Os objetivos do trabalho foram desenvolver iniciadores específicos de oligonucleotídeos para transcrição reversa e amplificação de regiões-alvo dos mRNAs das caspases 3 e 8 de rato e avaliar qualitativamente sua expressão em timo e baço de ratos normais e imunossuprimidas por glicocorticoidoterapia.

## MATERIAL E MÉTODOS

Quarenta e cinco fêmeas Wistar recém-desmamadas (21 a 24 dias) foram divididas em três grupos experimentais: (A) tratamento com 250 $\mu$ g de fosfato dissódico de dexametasona/animal via intramuscular (n= 18), (B) tratamento com 500 $\mu$ g de fosfato dissódico de dexametasona/animal via intramuscular (n= 18) e (C) controle não-tratados (n= 9). Seis animais dos grupos A e B e três do C foram sorteados nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a aplicação do corticóide, anestesiados com clorofórmio, pesados, sacrificados e necropsiados. Os timos e os baços foram pesados. Fragmentos dos órgãos foram fixados em formol tamponado a 10% e processados segundo técnica de inclusão em parafina. Os blocos foram seccionados a 5 $\mu$ m e corados em hematoxilina-eosina (HE). As secções coradas foram examinadas ao microscópio óptico para a verificação morfológica da ocorrência de apoptose. Foram consideradas células em apoptose somente aquelas que apresentaram pelo menos três critérios de inclusão: anoiquia (retração celular e perda de adesões entre células e membrana basal), condensação do citoplasma, condensação nuclear (compactação da cromatina nuclear em massas densas uniformes, alinhadas no lado interno da membrana nuclear, inclusive com aspecto de crescentes), fragmentação nuclear (convolução e fragmentação da

membrana nuclear – sem cariorrexe ou ruptura), fragmentação celular (com formação dos corpos apoptóticos), fagocitose dos corpos apoptóticos pelas células adjacentes (canibalismo celular) e ausência de inflamação.

Fragmentos de timo e de baço foram congelados em nitrogênio líquido, imediatamente após a colheita, e mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Duzentos miligramas de cada fragmento de tecido foram descongelados, macerados e lisados com tampão de lise hipotônico TTE (10Mm Tris, 0,25% Triton X-100, 1Mm EDTA). As proteínas foram removidas por extração pelo fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O DNA foi precipitado com acetato de sódio 3M, lavado em etanol 75%, seco e ressuscitado em água ultrapura para PCR. Amostras do DNA obtido foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5%/1:15h a 80V. Os géis de agarose foram corados com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), transiluminados com luz ultravioleta e fotografados.

Para a extração de RNA total, foi utilizada a técnica descrita por Chomczynski e Sacchi (1987). Amostras de 200mg de tecido foram homogeneizadas em 1ml de solução D (4M isotiocianato de guanidina, 25Mm de citrato de sódio pH 7,0, 0,5% sarcosil, 0,1M 2-mercaptoetanol) e transferidas para tubos de 4ml. Adicionaram-se ao homogenato 0,1 ml de acetato de sódio 2M pH 4, 1ml de fenol (água-saturado) e 1ml de clorofórmio:álcool isoamílico (49:1). A suspensão foi agitada por 10 segundos, resfriada em gelo por 15 minutos e centrifugada por 20 minutos a 10000g/4 $^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa foi transferida para novos tubos. Adicionou-se 1ml de isopropanol e armazenou-se a  $-20^{\circ}\text{C}/1\text{h}$ , seguida de centrifugação a 10000g/20 min/4 $^{\circ}\text{C}$ . O pélete de RNA foi dissolvido em 0,3ml de solução D, transferido para um tubo de 1,5ml e precipitado com um volume de isopropanol (0,3ml) a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O precipitado foi centrifugado a 14000g/4 $^{\circ}\text{C}/10$  minutos, e o pélete de RNA ressuscitado em etanol a 75% e centrifugado novamente. Os péletes foram secos a vácuo por 15 minutos e diluídos em 100 $\mu\text{l}$  de água DEPC (0,5ml de pirocarbonato dissolvido em água ultrapura - qsp 1 litro - solução autoclavada).

Os oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* de 20pb foram selecionados com base na análise das seqüências dos cDNAs das caspases 3 e 8 (Juan

et al., 1996) descritas no GeneBank, obtidas por meio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Os fragmentos da RT-PCR dentro das regiões-alvo foram de 271pb e 368pb para as caspases 3 e 8, respectivamente. Os oligonucleotídeos designados para RT-PCR das caspases 3 e 8 foram, respectivamente: (**C3F** = 5'-AACCTCAGAGAGACATTCAT-3' e **C3R** = 5'-AGGCTGAATGATGAAGAGT-3'), e 8 (**C8F** = 5'-GACTGCTTCATCTGCTGCAT-3' e **C8R** = 5'-AGGCTCTGGCAAAGTGACTG-3').

Para a realização da transcrição reversa (RT) e posterior reação em cadeia da polimerase (PCR), foram feitos *pools* de RNA dos animais-controle (três animais) para as amostras de timo e de baço e dos animais tratados (seis animais cada) com as doses A e B de dexametasona para as amostras de timo e de baço nos tempos de 24 e 72 horas após administração, separadamente.

Para a padronização da RT, usou-se o protocolo básico utilizado no Laboratório de Fisiologia Geral e Molecular do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG modificado de Frohman (1990). Aplicaram-se 1,6 $\mu\text{l}$  de cada *primer* (**C3R** e **C8R**, a 10 pmol/ $\mu\text{l}$  cada) e 9,4 $\mu\text{l}$  (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de RNA total (*pool* de amostras), incubou-se a 70 $^{\circ}\text{C}/10$  minutos. Acrescentaram-se 4 $\mu\text{l}$  de tampão de reação 5x (250mM Tris.HCl, pH 8,3 a 37 $^{\circ}\text{C}$ , 40mM  $\text{MgCl}_2$ , 150mM de KCl, 50mM de DDT), 2 $\mu\text{l}$  de dNTP mix e 2 $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  e incubou-se a 37 $^{\circ}\text{C}/2$  minutos. Em seguida, adicionaram-se 2 $\mu\text{l}$  (40U) de enzima transcriptase reversa e incubou-se a 38 $^{\circ}\text{C}/60$  minutos. Após a reação de transcrição reversa, os tubos foram mantidos a 4 $^{\circ}\text{C}$  e foram acrescentados 80 $\mu\text{l}$  de  $\text{ddH}_2\text{O}$  e 200 $\mu\text{l}$  de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 volumes) à reação. Centrifugou-se por 15 segundos. Ao sobrenadante foram adicionados 10 $\mu\text{l}$  de tampão acetato de sódio 3M pH 5,2 e 220 $\mu\text{l}$  de etanol. O cDNA foi precipitado a  $-20^{\circ}\text{C}/1\text{h}$  e centrifugado a 14000g/4 $^{\circ}\text{C}/15$  minutos. O pélete foi lavado com etanol 70%, seco ao ar e ressuscitado em 20 $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  para PCR.

A PCR baseou-se no método descrito por Mullis e Faloona (1987) e em protocolos desenvolvidos e já estabelecidos no laboratório (Carvalho et al., 2000a; Carvalho et al., 2000b). Foi utilizado um protocolo inicial de 45 ciclos térmicos. O

controle positivo da reação de RT-PCR foi feito utilizando-se de iniciadores específicos para um fragmento de 355pb para o peptídeo natriurético atrial (PNA), e o controle negativo das reações foi realizado pela PCR de tubos contendo água, dNTP mix, tampão, iniciadores, enzima, sem cDNA. Os amplicons foram solubilizados em tampão de amostra 10X (20% de Ficoll 400; 0,1M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8; 0,1% de SDS; 0,25% de azul de bromofenol). Vinte microlitros de cada produto de PCR foram corridos em gel de agarose 1,0% a 100V/1h.

Para confirmar se os fragmentos obtidos pela RT-PCR eram das caspases 3 e 8, os mesmos foram incubados com as endonucleases de restrição *Ava/III* e *Hind/III* (10U), respectivamente, por 1h a 37°C. A reação foi bloqueada pela elevação da temperatura a 65°C por 10 minutos. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata.

Os tratamentos foram definidos por esquema fatorial 3×3 (três tratamentos e três tempos de sacrifício dos ratos recém-desmamados) com três repetições (animais) para cada controle e seis repetições para cada grupo tratado. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, usando-se a análise de variância para os dados paramétricos e com distribuição normal para grupos independentes. Valores de P≤0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Tabela 1. Valores médios e respectivos erros-padrão dos pesos relativos (%) do timo de ratas nos diferentes tratamentos e tempos de sacrifício

	C-24	A-24	B-24	C-48	A-48	B-48	C-72	A-72	B-72
Média	0,526	0,188	0,220	0,389	0,112	0,106	0,354	0,079	0,084
Erro-padrão	0,121	0,009	0,021	0,031	0,011	0,010	0,054	0,004	0,012
P≤0,05									

C-24:grupo-controle/24h; A-24:grupo tratado com 250µg de dexametasona/24h; B-24:grupo tratado com 500µg de dexametasona/24h; C-48:grupo-controle/48h; A-48:grupo tratado com 250µg de dexametasona/48h; B-48:grupo tratado com 500µg de dexametasona/48h; C-72:grupo-controle/72h; A-72:grupo tratado com 250µg de dexametasona/72h; B-72:grupo tratado com 500µg de dexametasona/72h.

Tabela 2. Valores médios e respectivos erros-padrão dos pesos relativos (%) do baço de ratas nos diferentes tratamentos e tempos de sacrifício

	C-24	A-24	B-24	C-48	A-48	B-48	C-72	A-72	B-72
Média	0,400	0,317	0,261	0,351	0,317	0,295	0,360	0,348	0,263
Erro-padrão	0,044	0,024	0,009	0,010	0,016	0,014	0,002	0,022	0,016
P≤0,05									

C-24:grupo-controle/24h; A-24:grupo tratado com 250µg de dexametasona/24h; B-24:grupo tratado com 500µg de dexametasona/24h; C-48:grupo-controle/48h; A-48:grupo tratado com 250µg de dexametasona/48h; B-48:grupo tratado com 500µg de dexametasona/48h; C-72:grupo-controle/72h; A-72:grupo tratado com 250µg de dexametasona/72h; B-72:grupo tratado com 500µg de dexametasona/72h.

## RESULTADOS

A análise de variância dos pesos relativos dos órgãos obtida para um fator único mostrou diferenças significativas para todas as comparações ( $P= 1,91 \times 10^{-14}$ ) para o timo, principalmente, e para o baço ( $P= 4,82 \times 10^{-4}$ ) (Tab. 1 e 2).

A coloração de HE foi eficiente para verificação da ocorrência de células em apoptose. Foi evidente a maior ocorrência da apoptose nos órgãos dos animais tratados quando comparados com os do controle. No timo, a apoptose ocorreu mais intensamente na região cortical (Fig. 1) quando comparada com a região medular, particularmente 24 e 72 horas após o tratamento. Após 48 horas, a população de células estava reduzida, mostrando que houve apoptose, porém em intensidade inferior à observada 24 horas após o tratamento.

A eletroforese do DNA genômico das amostras de timo e de baço mostrou o clássico padrão em escada que caracteriza a fragmentação internucleossômica do genoma, tanto nos animais-controle (apoptose fisiológica de linfócitos) quanto nos dos grupos tratados nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação da dexametasona (Fig. 2).

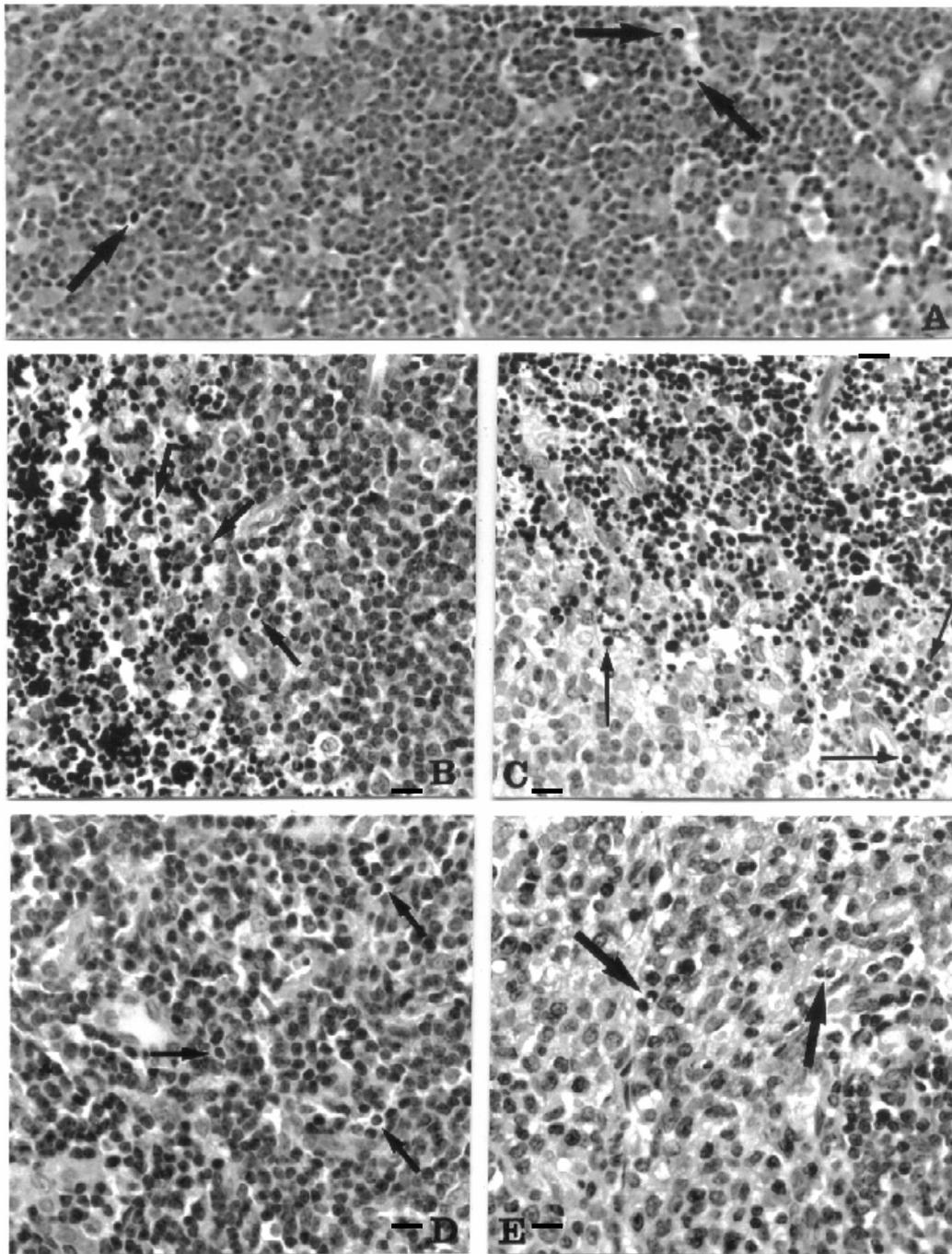


Figura 1. Fotomicrografia de timo mostrando células em apoptose (setas). (A) Timo de animal controle-24 horas. Homogeneidade celular em todo o corte e poucas células em apoptose (setas). (B) Timo tratado com 250µg de dexametasona-24 horas. Grande número de células em apoptose na região cortical do tecido (porção esquerda) quando comparada com a região medular (porção direita). (C) Timo tratado com 500µg de dexametasona-24 horas. Grande número de células em apoptose na região cortical (porção superior). (D) Timo tratado com 250µg de dexametasona-48 horas. Observar que o número de células em apoptose é menor quando comparado com os cortes anteriores, B e C, porém maior que o corte A. (E) Timo tratado com 500µg de dexametasona-48 horas. Notar que o mesmo fenômeno do corte D se repete nesse corte. (HE, Barra = 10µm).

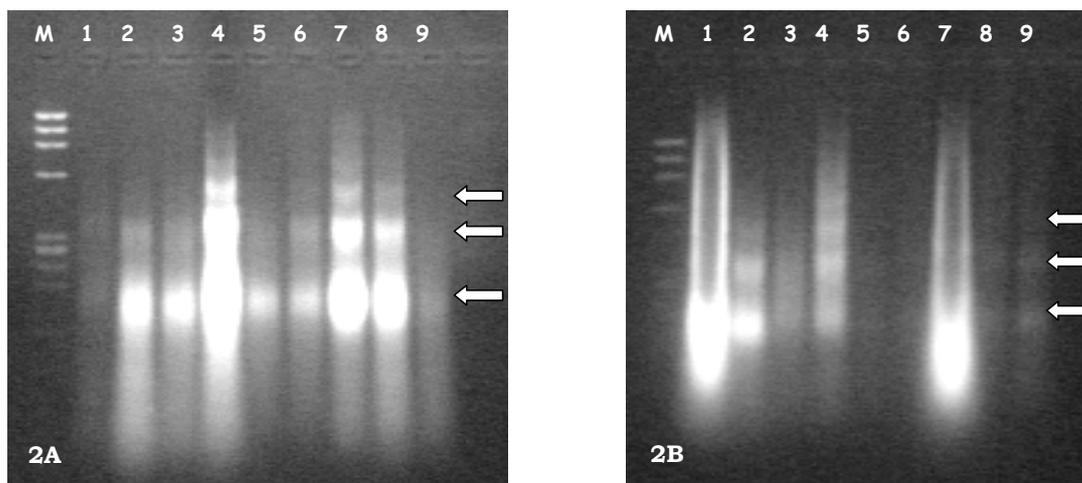


Figura 2. Gel de agarose das amostras de DNA obtidas de baço (2A) e timo (2B) de ratas. Canaletas: 1, 2 e 3 – não tratado e tratados com 250 e 500µg de dexametasona, respectivamente, no tempo de 24 horas; 4, 5 e 6 – amostras no tempo de 48 horas e 7, 8 e 9 – no tempo de 72 horas, na mesma ordem de citação dos tratamentos.

Os resultados qualitativos das reações de RT-PCR são mostrados nas Fig. 3 e 4, indicando que houve amplificação das caspases 3 e 8 em todas as amostras.

As eletroforeses mostraram digestão dos produtos incubados com as enzimas, confirmando, assim, que os produtos amplificados eram realmente os genes das caspases 3 e 8 (Fig. 5).

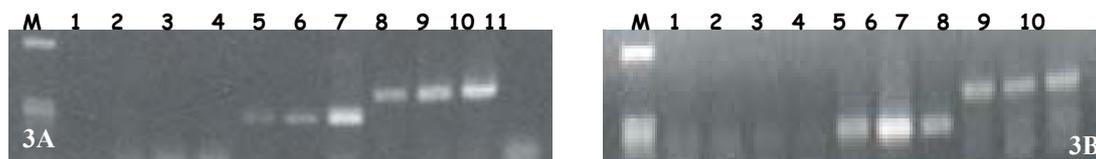


Figura 3. Gel de agarose mostrando o resultado da RT-PCR dos *pools* de amostras de baço de animais-controle e tratados com 250 e 500µg de dexametasona nos tempos de 24 (3A) e 72 horas (3B), respectivamente. M: corresponde ao marcador  $\phi$ X 174 DNA/BSU RI. Canaletas: 1 – controle positivo; 2 a 4 – PNA em amostras de baço (controle, doses de 250 e 500µg, respectivamente); 5 a 7 – caspase 3; 8 a 10 – caspase 8; 11 – controle negativo.

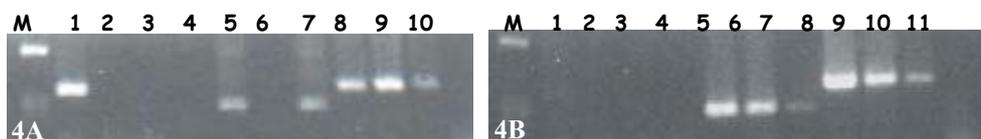


Figura 4. Gel de agarose mostrando o resultado da RT-PCR dos *pools* de amostras de timo de animais-controle e tratados com 250 e 500µg de dexametasona nos tempos de 24 horas (4A) e 72 horas (4B). M: corresponde a marcador  $\phi$ X 174 DNA/BSU RI. Canaletas: 1 – controle positivo; 2 a 4 – PNA em amostras de baço (controle, doses de 250 e 500µg, respectivamente); 5 a 7 – caspase 3; 8 a 10 – caspase 8; 11 – controle negativo.

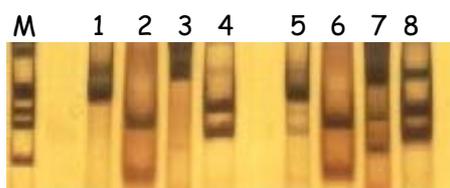


Figura 5. Gel de poliacrilamida mostrando fragmentos liberados após digestão das caspases 3 e 8 com as enzimas de restrição. M: marcador  $\phi$ X 174 DNA/BSU RI. Canaletas: 1 e 2 – caspase 3 não digerida e digerida 24h após tratamento com dexametasona, respectivamente; 3 e 4 – caspase 8 não digerida e digerida 24h após tratamento com dexametasona, respectivamente; 5 e 6 – caspase 3 não digerida e digerida 72h após tratamento com dexametasona, respectivamente; 7 e 8 - caspase 8 não digerida e digerida 72h após tratamento com dexametasona, respectivamente.

## DISCUSSÃO

A coloração dos cortes de baço e timo em HE evidenciou as alterações morfológicas das células em apoptose. A dexametasona, um dos hormônios corticóides sintéticos, induziu perda de massa do timo e do baço, como pode ser verificado na análise dos pesos relativos desses órgãos (Tab. 1 e 2). A atrofia induzida por dexametasona no timo se associa ao maior número de células em apoptose (King et al., 1995) e admite-se que a apoptose é a forma de morte celular mais comum do sistema imune, com um papel regulador característico (Krammer, 2000). Esse fato foi observado pela análise dos cortes ao microscópio óptico. A detecção da apoptose pela fragmentação internucleossômica do DNA (padrão em escada) visualizada em gel de agarose a 1,5% (Fig. 2) confirmou a associação entre a hipotrofia do timo e do baço e o aumento de células em apoptose. Essa fragmentação é clássica tanto em células que sofrem apoptose fisiológica quanto em tecidos tratados com substâncias indutoras do processo, como, por exemplo, glicocorticóides. Os tempos de 24 e 72 horas foram escolhidos para a realização da RT-PCR depois de feita a análise microscópica das lâminas juntamente com a análise das médias dos pesos dos órgãos linfóides dos animais-controle e dos tratados com as doses A e B de dexametasona nos três tempos

do experimento.

A amplificação das caspases 3 e 8 (Fig. 3 e 4) indica que elas participam do processo de apoptose induzida por dexametasona em ratos Wistar. Kuida et al. (1996) afirmaram que a caspase 3 não participa da via de apoptose induzida por corticosteróide em camundongos. A ativação da caspase 3 em células tratadas com corticosteróides foi relatada por Alam et al. (1997). Miyashita et al. (1998) citaram que a caspase 6 é a principal caspase ativada na indução de apoptose por corticóide. Esses dados sugerem que deve haver mais de uma via para apoptose induzida por corticosteróide, uma com predominância de caspase 3 e outra de caspase 6 (Distelhorst, 2002). Provavelmente, as vias se relacionam com os sistemas celulares e espécies animais utilizados.

A expressão das caspases 3 e 8 foi diferente nos dois tecidos estudados. No baço, 24 horas após o experimento, tanto a caspase 3 quanto a caspase 8 mostraram bandas de intensidade diretamente proporcionais à dose de dexametasona. Essa intensidade crescente das bandas sugere que o número de células em apoptose aumentou com a elevação das doses de dexametasona e que, no tempo de 24 horas, o órgão ainda possuía um número significativo de células que, provavelmente, encontravam-se na fase inicial do processo. O timo mostrou maior intensidade de hipotrofia em relação ao aumento da dose de dexametasona e ao aumento do intervalo de tempo do experimento. Nesse órgão, as caspases 3 e 8 mostraram um comportamento molecular diferente do apresentado no baço. Ao contrário do baço, houve uma intensidade decrescente das bandas com as doses e os intervalos de tempo utilizados no presente estudo, principalmente, após 72 horas de tratamento (Fig. 4). A diminuição da expressão das caspases pode ser explicada pela grande perda celular que o timo sofreu no início do tratamento com a dexametasona. Assim, com dose e período de ação maiores, o órgão já estaria muito atrófico e não contaria mais com número tão significativo de células expressando o mRNA para as caspases 3 e 8, isto é, as caspases 3 e 8 teriam sua expressão reduzida pela alta taxa de apoptose já ocorrida anteriormente no timo, induzida pela maior dose de dexametasona e pelo maior tempo decorrido.

## CONCLUSÕES

A técnica de RT-PCR foi sensível e capaz de detectar a expressão dos mRNAs das caspases 3 e 8, sendo uma ferramenta rápida, eficiente e segura para o estudo da expressão gênica dessas enzimas. Em ratos Wistar, as caspases 3 e 8 participam do processo de apoptose induzida por dexametasona. A apoptose induzida por dexametasona em baço e, principalmente, em timo de ratos Wistar é um modelo para o estudo da expressão das caspases 3 e 8.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Cellular and molecular immunology*. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. cap. 10: Immunology tolerance, p.208-231.
- ALAM, A.; BRAUN, M.Y.; HARTGERS, F. et al. Specific activation of the cysteine protease CPP32 during the negative selection of T cells in the thymus. *J. Exp. Med.*, v.186, p.1503-1572, 1997.
- AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulator apoptotic cell death. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, p.1053-1061, 1999.
- ARENDS, M.J.; WYLLIE, A.H. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, v.32, p.223-254, 1991.
- CARVALHO, R.; OLIVEIRA, A.M.; SOUZA, A.M. et al. Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. *Arch. Virol.*, v.145, p.1773-1787, 2000b.
- CARVALHO, R.; PASSOS, L.M.F; MARTINS, A.S. Development of differential multiplex PCR assay to equine herpesvirus 1 and equine herpesvirus 4 as an aim to diagnosis investigation. *J. Vet. Med.*, v.47, p.351-359, 2000a.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, v.162, p.156-159, 1987.
- COLLINS, J.A.; SCHANDL, C.A.; YOUNG, K.K. et al. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.*, v.45, p.923-934, 1997.
- DISTELHORST, C.W. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ.*, v.9, p.6-19, 2002.
- FROHMAN, M.A. Race: rapid amplification of cDNA ends. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J. et al. (Eds.). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic, 1990. p.28-38.
- HACKER, J. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.*, v.301, p.5-17, 2000.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, v.407, p.770-776, 2000.
- JUAN, T.S.; MCNIECE, I.K.; JENKINS, N.A. et al. Molecular characterization of mouse and rat CPP32 beta gene encoding a cysteine protease resembling interleukin-1 beta converting enzyme and CED-3. *Oncogene*, v.13, p.749-755, 1996.
- KERR, J.F.R. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.*, v.105, p.13-20, 1971.
- KERR, J.F.R.; SEARLE, J.A. Suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. *J. Pathol.*, v.107, p.41-44, 1972.
- KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: A basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Canc.*, v.26, p.239-257, 1972.
- KING, L.B.; VACCHIO, M.S.; DIXON, K. et al. A targeted glucocorticoid receptor antisense transgene increases thymocyte development. *Immunity*, v.3, p.647, 1995.
- KRAMMER, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, v.407, p.789-795, 2000.
- KUIDA, K.; ZHENG, T.S; NA, S. et al. Decrease apoptosis in the brain and premature lethality in CP-32 deficient mice. *Nature*, v.384, p.368-372, 1996.
- MILLS, J.C.; STONE, N.L.; PITTMAN, R.N. Extranuclear apoptosis: the role of the cytoplasm in the execution phase. *J. Cell Biol.*, v.146, p.703-707, 1999.
- MIYASHITA, T.; NAGAO, K.; KRAJEWSKI, S. et al. Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ.*, v.5, p.1034-1041, 1998.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: WU, R. (Ed.). *Methods in enzymology*. San Diego: Academic, 1987. v.155. p.335-350.
- WYLLIE, A.H.; KERR, A.H.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, v.68, p.251-306, 1980.