

ERRATA

Na segunda página de agradecimentos, linha 12, onde se lê assesor assessoria.

Na página 31, linha 5, onde se lê dos, leia-se das.

Na página 32, linha 10, onde se lê 78kDa, leia-se 80kDa.

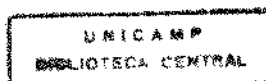
HERALDO MENDES GARMES

**EXTRAÇÃO E SOLUBILIZAÇÃO DE ANTÍGENOS
OVARIANOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM AUTO
ANTICORPOS ORGÃO ESPECÍFICO NA FALÊNCIA
OVARIANA PRECOCE.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de
Pós Graduação, da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção
do título de Mestre em Medicina. Área Medicina-
Interna

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

**UNICAMP
1995**



UNIDADE	BC
N.º CHAVE	1
T	UNICAMP
G	6185e
V	
P	25443
DATA	433/95
C	☐ 0 ☒ 1
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	13/09/95
N.º CPD	

CH-00076474-2

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIENCIAS MEDICAS - UNICAMP

Garmes, Heraldo Mendes
6185e Extração e solubilização de antígenos ovarianos e sua associação com auto anticorpos orgão específico na falência ovariana precoce / Heraldo Mendes Garmes. Campinas, SP : Is.n.l, 1995.

Orientador : Ricardo de Lima Zollner

Tese (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ovario. 2. Anticorpos. 3. Antígenos. 1. Zollner, Ricardo de Lima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Membros:

1. Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner - *X*
2. Prof. Dra. Juane Hermann Rodrigues - *Spinaux Fortuna*
3. Prof. Dr. José Antonio Miguel Marcondes - *Caude*

Curso de pós-graduação em Medicina, área Medicina Interna da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

12/07/95

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Elsa, pela doçura,
compreensão e estímulos constantes.

Ao meu pai, Fernando, pelo exemplo de vida
correta e incentivo à carreira científica.

À Karen, pela presença sempre oportuna e
carinhosa, na difícil tarefa de realizar ideais juntos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, pela dedicação, seriedade e objetividade na orientação da tese.

À Prof. Dra. Denise Elgelbrecht Zantut Wittmann, grande amiga, pelo incentivo e apoio desde o tempo que éramos residentes na disciplina de endocrinologia.

Ao Prof. Dr. Aluísio José Bedone, pela orientação e estímulo à pesquisa científica em gineco-endocrinologia.

À Ricardo Chaves Prado, pela presteza no auxílio à revisão final da tese.

Ao Prof. Dr. Marcos António Tambascia e às Dras. Lígia Vera Montalli Assumpção , Maria Teresa Baptista e Elisabeth João Pavin, pelos ensinamentos em endocrinologia e introdução na carreira científica.

Ao Dr. Luis Henrique Barbosa Boêchat, pelo auxílio nas técnicas laboratoriais e de informática.

À bióloga Conceição Villela, em nome dos funcionários do laboratório de imunologia clínica e alergia pelo apoio constante na elaboração desta tese.

À bióloga Sandra Maria Grandim Pereira, que em conjunto com os demais funcionários da disciplina de endocrinologia e metabologia, colaborou neste trabalho.

À Assessoria Técnica e Científica do CAISM, pela grande colaboração na finalização desta dissertação.

À Katia Mendes Garmes, minha irmã, pelo estímulo à perseverança e à busca do ideal, bases fundamentais para a investigação científica.

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µg	micrograma
EDTA	etileno-diamino-tetra-acético
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ETOS	extrato de tecido ovariano solubilizado
FC	fragmento cristalino
FSH	hormônio folículo estimulante
g	unidade gravitacional de centrifugação
g	grama
H ₂ O ₂	água oxigenada
Hcl	ácido clorídrico
HLA	antígeno de histocompatibilidade
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
kDa	Kilodaltons
LH	hormônio luteinizante
M	mol
mA	miliampere
mg	miligrama
ml	mililitros
mm	milímetro
mM	milimol

mUI	miliunidades internacionais
MW	<i>molecular weight</i>
NaCl 1M	cloreto de sódio um molar
nm	nanômetro
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
qsp	quantidade suficiente para
SDS	duodecil sulfato de sódio
Tris	tris(hidro-metil)amino acético
V	volt

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações gerais: falência ovariana precoce.....	1
1.2. Evidências para etiologia auto-imune.....	6
1.3. Anticorpo Anti ovário e Antígenos Correlatos.....	13
2. OBJETIVOS.....	18
3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Casuística.....	19
3.2. Materiais e métodos.....	21
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Dosagem protéica e determinação de imunoglobulinas contaminantes.....	30
4.2. Imunodifusão simples.....	30
4.3. Eletroforese analítica.....	32
4.4. Eletroforese de transferência seguida de <i>immunoblotting</i>	32
4.4. <i>Immunoblotting</i> de soros de pacientes com falência ovariana precoce.....	35
4.5. Correlação entre “fragmento” 30kDa e falência ovariana precoce.....	35
4.6. Relação entre auto-anticorpos com outras doenças auto-imunes.....	36
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

RESUMO

A falência ovariana precoce é caracterizada por amenorréia hipergonadotrófica antes dos 40 anos de idade e pode apresentar diversas etiologias. Trabalhos recentes caracterizaram subgrupos destas pacientes com inúmeras evidências sugerindo auto-imunidade como fator responsável. Com objetivos de detectar o anticorpo antiovário neste subgrupo, inúmeras técnicas têm sido utilizadas. Contudo, a prevalência deste anticorpo na população com falência ovariana precoce não está estabelecida. Neste trabalho realizaram-se a extração e a solubilização de antígenos a partir de tecido ovariano humano. Os extratos assim obtidos foram caracterizados eletroforeticamente e utilizados para a detecção do anticorpo antiovário através das técnicas de imunodifusão simples e *immunoblotting*. Utilizando imunodifusão simples foram detectados anticorpos séricos em 5 (14%) pacientes. Por outro lado, empregando o método de *immunoblotting*, 14 (40%) pacientes apresentaram reatividade para peptídeo com peso molecular de 30kDa. Após classificar as pacientes em dois grupos dependentes da presença ou não de reatividade à banda de 30kDa, não foram verificadas diferenças estatísticas quando avaliada a idade da menarca, idade de início dos sintomas e nível de gonadotrofinas. Estudos posteriores, como a caracterização das propriedades biológicas destes anticorpos e isolamento da fração com peso molecular de 30kDa, poderão trazer importantes subsídios para o entendimento dos fatores imunes envolvidos com a falência ovariana precoce.

SUMMARY

Premature Ovarian Failure is characterized by hypergonadotrophic ammenorrhea before the age of forty (40) and can present diverse aetiologies. There is innumerable evidences suggesting that auto immunity is a factor which responsible for this disfunction. To detect this antibody, several techniques have been used, however the prevalence in the population of women who have premature ovarian failure has not been established yet. Human ovarian tissue was used with the purpose to extract soluble antigens to be able to use them in the detection of serum antibodies by means of simple immuno-diffusion and immunoblotting methods. 5/35 (14%) patients presented reaction by immunodifusion and specific reactivity was found for a protein with molecular weight of 30 kDa in 14/35 (40%) patients using immunoblotting. Nevertheless, even classificating these patient in two groups depending on the presence or not, of reactivity for peptide of 30 kDa, no diference with the regard the age of menarc, the age of onset of symptoms and the level of gonadotrophins was found. Later studies such as the characterization of biological properties of these antibodies and isolation of peptide of 30 kDa, could bring important aid for the understanding of premature ovarian failure.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais: falência ovariana precoce

1.1.1. Conceito e incidência

A falência ovariana precoce é caracterizada por amenorréia hipergonadotrófica e hipoestrogenismo em mulheres com menos de 40 anos de idade (DE MORAES-RUEHSEN & JONES, 1967; STARUP & SELE, 1973; JACOBS, 1976; COULAM, 1982), sendo geralmente acompanhada dos sintomas típicos do período menopausal. Segundo GOLDENBERG, GRODIN, RODBARD (1973), para se considerar falência ovariana, o valor sérico do Hormônio Foliculo-Estimulante deverá estar acima de 40mUI/ml. Como consequência da interrupção da função ovariana precocemente ao período esperado pela mulher, algumas complicações poderão ocorrer, desde a esterilidade até sintomas de hipoestrogenismo, incluindo o grande impacto psicológico que este distúrbio pode causar, principalmente naquelas pacientes mais jovens que desejam engravidar.

Diversos autores avaliaram a idade em que a mulher inicia naturalmente a menopausa (COUNCIL OF THE MEDICAL WOMAN'S FEDERATION, 1933; FRERE, 1971; KRAILO & PIKE, 1983). Para investigar a ocorrência espontânea da falência ovariana precoce na população geral, COULAM e cols. (1986), realizaram estudo longitudinal em 1.858 mulheres, que foram seguidas desde 1950 para determinar a idade de início da menopausa. Os autores observaram risco relativo de 1% para o aparecimento da menopausa até os 40 anos de idade. Neste estudo, mostraram que a incidência da falência ovariana por 100.000 mulheres/ano foi de 10 para idades entre 15 e 29 anos, 76 para idades entre 30 e 39 anos e atingiu 881 no grupo com idades entre 40 e 44 anos. Adicionalmente, STARUP e cols. (1978); BACHMANN & KEMMANN (1982) demonstraram que entre todas as pacientes com amenorréia a incidência de falência ovariana precoce varia de 2 a 10% dos casos.

1.1.2. Aspectos clínicos e investigação diagnóstica

As características clínicas apresentadas pelas pacientes com falência ovariana precoce assemelham-se àquelas com menopausa fisiológica, estando relacionadas com a diminuição dos níveis estrogênicos, podendo ocorrer instabilidade vasomotriz com ondas de calor e sudorese excessiva, atrofia de

vagina, vulva e uretra, além de osteoporose. Devido à repercussão psicológica, estas pacientes também apresentam ansiedade, tensão emocional, depressão e irritabilidade. STARUP & SELE (1973) demonstraram que o início da menarca nestas pacientes, quando comparado com a população normal, não estava alterado. REBAR & CONNOLLY (1990) revisando a literatura dirigida à menopausa precoce, concluíram que a amenorréia ocorre em média com 27,2 anos de idade e que 85% destas pacientes apresentam sintomas de deficiência estrogênica. Quanto à osteoporose, 59,1% apresentaram resultados de densidade óssea abaixo de 90% quando comparados com pacientes-controles.

A avaliação das pacientes com menopausa precoce deve iniciar-se com história clínica e exame físico completos, buscando informações que indiquem uma ou outra etiologia. O cariótipo deve ser realizado, mesmo nas pacientes com amenorréia secundária, com o objetivo de descartar alterações genéticas (ALPER, GARNER, SEIBEL, 1986). A realização de exames específicos procurando distúrbios imunológicos torna-se necessário, principalmente, naquelas pacientes onde a etiologia não está estabelecida (REBAR & CEDAR, 1992). Quanto à biópsia de ovário, sua indicação ainda não é justificável (FOX, 1992). AIMAN & SMENTEK (1985) apresentaram caso clínico de duas pacientes que engravidaram, apesar das biópsias

ovarianas não demonstrarem presença de oócitos viáveis. REBAR & CONNOLLY (1990) publicaram a mesma experiência. O corte histológico de biópsia ovariana representa, em média, 0 a 15% do tamanho ovariano normal, e a ausência de folículos no tecido biopsiado não significa, necessariamente, ausência completa de folículos. Além disso, a presença folicular no tecido não garante a resposta terapêutica, como demonstrado por JEWELWICZ & SCHWARTZ (1986). O risco cirúrgico em si e o de aderência local no pós-operatório também não aconselham a realização da biópsia ovariana.

1.1.3. Etiologia

Dentre as possíveis etiologias da falência ovariana precoce, algumas são consequências iatrogênicas, cirúrgicas ou decorrentes da terapêutica radioativa e/ou quimioterápica. Doses de radiação de 250 a 500 rads provocam dano irreversível ovariano em aproximadamente 66% das pacientes, enquanto 800 rads ocasionam menopausa artificial em 100% delas; por isso, a proteção pélvica é fundamental para a realização de radioterapia (BAKER, MORGAN, PECKHAN, 1972). A quimioterapia com MOPP (mustina, oncovin, procarbazona e prednisona) ou MVPP (mustina, vimblastina, procarbazona e prednisona) resultam em 15 a 62% de falência ovariana (WHITEHEAD e cols., 1983; SCHILSKY, SHERINS, HUBBARD, 1988). Outro grupo de

alterações que podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de falência ovariana precoce são as aberrações cromossômicas (FITZGERALD, DONALD, MCCORMICK, 1984). A falência gonadal é encontrada mais comumente em pacientes portadoras do cariótipo 45X0, 47XXX e grande variedade de mosaicismos do cromossoma X. Porém, como demonstrado por DEWALD & SPURBECK (1983), apenas deleções de parte do cromossoma X podem ser responsáveis pelas alterações ovarianas. Revisando a literatura, SCHWIMMER, WHITE, MATTISON (1981) sugeriram transmissão autossômica dominante ou ligada ao sexo para explicar a recorrência familiar encontrada em algumas pacientes com falência ovariana precoce. Outras etiologias para a menopausa precoce são as ooforites infecciosas, observadas principalmente com vírus da caxumba e com bacilo da tuberculose. NOGALES-ORTIZ, TARACÓN, NOGALES (1979) demonstraram que mais de 3% das pacientes com tuberculose pélvica desenvolvem destruição ovariana. Algumas doenças metabólicas, como a galactozemia e certos defeitos enzimáticos como *deficit* de 17-hidroxilase, são causas muito raras de falência ovariana precoce (MALLIN, 1969; KAUFMAN, KOGUT, DONNELL, 1981)

1.2. Evidências para etiologia auto-imune

1.2.1. Fator bloqueador da função ovariana

GOLDENBERG e cols. (1973) avaliaram 234 mulheres amenorréicas submetidas a biópsias ovarianas. Neste trabalho, os autores concluíram que pacientes com biópsia afolicular apresentavam FSH acima de 40mUI/ml e o nível sérico era normal naquelas pacientes com oócitos em seus ovários. No entanto, logo após este estudo, inúmeros autores relataram casos clínicos de pacientes com amenorréia hipergonadotrófica que voltaram a menstruar, e engravidaram (WRIGHT & JACOBS, 1979; JOHNSON & PETERSON, 1979). REBAR, ERICKSON, YEN (1982) detectaram níveis estrogênicos dentro da normalidade em metade das pacientes com diagnóstico de falência ovariana precoce e, após biopsiarem nove destas pacientes, verificaram a presença de oócitos viáveis em quatro. AIMAM & SMENTEK (1985) avaliaram 157 pacientes com amenorréia e aumento das gonadotrofinas séricas submetidas à biópsia ovariana e verificaram oócitos intrafoliculares em 18% delas. Todas estas observações demonstram a existência de subgrupo de pacientes com oócitos viáveis nos seus ovários e, portanto, possibilidade de gravidez. Neste subgrupo existiria fator bloqueador do funcionamento ovariano

que poderia provir do sistema imunológico (CHIAUZZI e cols., 1982), como ocorre em outras glândulas do organismo.

1.2.2. Relação com outras doenças auto-imunes

A falência ovariana precoce pode estar associada à outras doenças auto-imunes. Alguns levantamentos estatísticos mostram frequências de associação variando entre 13% e 66% dos casos (ALPER & GARNER, 1985; PEKONEN e cols., 1986). Estas associações sugerem a doença auto-imune como fator etiológico do distúrbio ovariano. A primeira descrição de associações entre doenças endócrinas auto-imunes foi de SCHIMIDT (1926)¹, descrevendo paciente com doença de Addison e tireoidite crônica. CARPENTER e cols. (1964) revisando a síndrome de Schmidt na literatura médica, incluíram diabetes mellitus nesta associação. A falência ovariana precoce só integrou a síndrome poliglandular auto-imune a partir de IRVINE, CHAN, SCARTH (1968), que descreveram amenorréia em 24% das pacientes com doença de Addison. Estes autores verificaram que as alterações menstruais seriam independentes do hipocortisolismo, pois persistiam após a reposição hormonal

¹SCHIMIDT apud DEFTOS, L.J.; CATHERWOOD, B.D.; BONE III, H.G. - Multiglandular endocrine disorders. In: FELIG, P.; BAXTER, J.D.; BROADUS, A.E.; FROHMAN, L.A. - **Endocrinology and metabolism**. 2.ed. New York, McGraw-Hill Book Company, 1987. p.1662-91.

com corticosteróides. As doenças mais comumente associadas à falência ovariana precoce são hipotireoidismo primário , doença de Addison (IRVINE & BORNES, 1975) , pseudo-hipoparatiroidismo (WOLFSDORF e cols., 1978) e diabetes méllitus (BOTTAZZO, FLORIN-CHRISTENSEN, DONIACH, 1974).

VAZQUEZ & KENNY (1973); WILLAMSON e cols. (1980); MIGNOT e cols. (1989) descreveram a associação da falência ovariana precoce com doenças auto-imunes não órgão-específico que incluem artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico e miastenia graves. Outras doenças que envolvem o sistema imune também podem estar associadas: púrpura trombocitopênica idiopática, candidíase mucocutânea, asma, vitiligo, entre outras (COLLEN, LIPPE, KAPLAN, 1979). Além destas associações clínicas, CORSON & REBAR (1982); MIGNOT e cols. (1989) demonstraram a presença de auto-anticorpos específicos contra glândulas sem distúrbios funcionais em aproximadamente 30% dos casos de falência ovariana precoce.

1.2.3. Presença de infiltrado linfocitário nos ovários

Outro fator que sugere etiologia auto-imune para alguns casos de amenorréia hipergonadotrófica é a verificação de infiltrado linfocítico no ovário

destas pacientes. O exame histológico apresenta infiltrado de células mononucleares ao redor dos folículos atresicos e em desenvolvimento, porém este infiltrado é raramente encontrado nos folículos primordiais (GLOOR & HURLIMANN, 1984; RUSSEL & BANNATYNE, 1989). Inicialmente, este infiltrado aparece nas camadas de células tecais e, posteriormente, atinge a camada de células granulosas, sem acometer o estroma ovariano, sendo que na região hilar discreto infiltrado pode ser observado. Além desses achados mais comumente encontrados, BANNATYNE, RUSSEL, SHEARMAN (1990) descreveram granuloma perifolicular em um caso de ooforite auto-imune. SEDMAK, HART, TUBBS (1987), em estudos imunocitoquímicos, identificaram as células presentes nos infiltrados ovarianos como sendo: linfócitos B policlonais, linfócitos T4 e T8 positivos (com predominância do primeiro), macrófagos e, ocasionalmente, células Natural Killer, sugerindo a existência de citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpos. A provável ocorrência de defeito da célula supressora de antígeno específico é sugerida pelos autores. Segundo eles, determinado antígeno específico ovariano poderia permitir que clones de células T Helper estimulassem a produção de anticorpos por linfócitos B sensibilizados (REBAR & CEDAR, 1992). O mecanismo de citotoxicidade destes anticorpos poderia ser, via fixação de complemento ou através das células Natural Killer, que possuíssem receptores

de superfície para a região FC da imunoglobulina G. A citotoxicidade celular dependente de anticorpos ocorre quando altos títulos de anticorpos ligam-se ao tecido-alvo, propiciando lesão celular pelas células Keller. VOLPÉ (1985) propôs um mecanismo similar para doença auto-imune tireoidiana.

1.2.4. Outras alterações imunológicas

Nas pacientes com falência ovariana precoce outras alterações sugerem desequilíbrio do sistema imune. EDMONDS e cols. (1973); PEKONEN e cols. (1986) demonstraram a liberação aumentada por linfócitos periféricos do fator de inibição de migração dos leucócitos, após exposição ao extrato de proteínas de ovário humano. Este fator de inibição de migração é uma linfocina liberada por linfócitos T sensibilizados, em resposta a um antígeno específico, sugerindo mecanismo de hipersensibilidade mediada por célula. RABINOWE, RAVNIKAR, SRIKANTA (1986), baseados em estudos utilizando anticorpo monoclonal murino contra região polimórfica do antígeno Ia do linfócito T, demonstraram a existência de alteração na população de linfócitos T em alguns pacientes com falência gonadal precoce. A relação entre endocrinopatias auto-imunes e antígenos HLA é bem estabelecida, sugerindo susceptibilidade genética a doenças auto-imunes. WALFISH, GOTTESMAN, SHEWCHUK (1983) demonstraram associação entre HLA-DR3 e falência

ovariana precoce. Embora pouco se saiba sobre a relação do timo com doenças auto-imunes, esta relação, em especial com o sistema reprodutivo, começa a ser citada. MILLER & CHATTEN (1967) verificaram que pacientes atímicas por distúrbios congênitos, que morriam antes da puberdade, apresentavam ovários destituídos de oócitos na autópsia. Experimentalmente, LINTERN-MOORE & PANTELOURIS (1975) documentaram que ratos atímicos apresentavam falência ovariana precoce. Posteriormente, REBAR, MORANDINI, BENIRSCHKE (1980) demonstraram que transplante tímico previne a perda de oócitos por estes ovários. Mais recentemente, MIYAKE e cols. (1988), estudando ratos timectomizados aos três dias de vida, demonstraram alta incidência de ooforite auto-imune. Estes ratos apresentaram amadurecimento sexual atrasado, irregularidade nos ciclos de *estrous* e falência gonadal precoce comprovada com estudos histológicos seriados, sendo que, dois meses após a puberdade, seus ovários encontravam-se comprometidos e os anticorpos antiovário estavam presentes no soro destes animais. Os autores concluíram que este modelo experimental pode servir para o estudo da falência ovariana precoce nos humanos.

1.2.5. Resultados com tratamento imunossupressivo na falência ovariana precoce

COULAM, KEMPERS, RANDALL (1981), estudando paciente amenorréica com infiltrado linfocítico no ovário, demonstraram recuperação da capacidade menstrual após corticoterapia, podendo sugerir defeito de imunorregulação nas pacientes com falência ovariana precoce. COWCHOCK, MCCABE, MONTGOMERY (1988) relataram caso clínico de paciente com falência ovariana precoce e insuficiência adrenal utilizando hormonioterapia de reposição que engravidou após utilização de altas doses de corticosteróides devido crise addisoniana. Os autores propuseram que pulsoterapia com altas doses de corticosteróides pode ter induzido ovulação nessa paciente. A plasmaférese também foi capaz de reverter o quadro de amenorréia em pacientes com falência gonadal (BATEMAN, NUNLEY, KITCHIN III, 1983). Estes autores concluíram que terapêutica imunossupressiva pode ser justificável nas pacientes com falência ovariana precoce que apresentam evidências de etiologia auto-imune.

1.3. Anticorpo antiovário e antígenos correlatos

1.3.1. Histórico

A detecção do anticorpo antiovário caracterizando a doença ovariana auto-imune teve início com os trabalhos de VALLOTON & FORBES (1966). Ao estudar anticorpos antinucleares, estes pesquisadores foram os primeiros a descrever o anticorpo antiovário, através da reação de imunofluorescência indireta no citoplasma de células ovarianas de coelhas. No ano seguinte, estes autores descreveram anticorpos séricos antiovarianos em pacientes com disgenesia gonadal (VALLOTON & FORBES, 1967). IRVINE e cols. (1968), estudando a associação entre doença de Addison e a falência ovariana precoce, verificaram a presença deste auto-anticorpo, estabelecendo o conceito de anticorpo anticélula produtora de esteróide, devido à reatividade cruzada que existe entre adrenal, ovário, tecido testicular e placentário. DE MORAES-RUEHSEN, BLIZZARD, GARCIA-BUNUEL (1972) descreveram, pela primeira vez, a relação entre falência ovariana prematura e anticorpo antiovário, confirmada posteriormente por outros autores (FRIEDMAN e cols., 1972; FORBES, LAKE, BLOCH, 1976). COULAM (1983), baseado na presença de infiltrado linfocitário ovariano e anticorpos antiovário circulantes, reforçou a existência de mecanismo auto-imune na menopausa precoce. Desde

então, inúmeros pesquisadores vêm trabalhando na tentativa de identificar métodos mais adequados para a detecção destes anticorpos e isolar os antígenos responsáveis por esta resposta imunológica.

1.3.2. Métodos de detecção

Com o objetivo de elucidarem os mecanismos envolvidos na auto-imunidade ovariana, vários autores têm relatado suas experiências com inúmeros métodos de detecção do anticorpo antiovariano. As espécies animais mais empregadas como fonte antigênica ovariana foram bovina, suína, murina, e humana. Em revisão da literatura, MONCAYO & MONCAYO (1992) observaram que estes anticorpos são dirigidos contra três tipos principais de alvos ovarianos, componentes do microssoma ovariano, zona pelúcida do ovo e receptores hormonais de LH e FSH.

Dentre as técnicas de detecção destes anticorpos, a imunofluorescência indireta tem sido a mais utilizada. Através deste método, ANDERSON e cols. (1968) originalmente descreveram o anticorpo anticélula produtora de esteróides contra antígenos citoplasmáticos da adrenal. IRVINE & BORNES (1975); ELDER, MACLAREN, RILEY (1981) demonstraram que este anticorpo é detectado em pacientes com doença de Addison associada à amenorréia primária e, em aproximadamente 60%, à amenorréia secundária. No

entanto, o anticorpo aparece em apenas 3% a 9% das pacientes com falência ovariana precoce isolada (SCHERBAUM & BERG, 1982; RABINOWE e cols., 1989), demonstrando sua ineficiência para avaliar auto-imunidade ovariana quando a doença de Addison não está presente. Empregando esta mesma técnica, porém utilizando antígeno específico ovariano humano, DAMEWOOD e cols. (1986) avaliaram 27 pacientes com falência gonadal precoce e encontraram positividade em 14 delas.

A hemaglutinação passiva foi utilizada para avaliar a presença de anticorpo antiovariano, por MATHUR e cols. (1982), em pacientes com endometriose. Os autores demonstraram títulos de anticorpos antiovário elevados em seis de 15 pacientes estudadas, sendo que quatro delas apresentavam endometriose ovariana. ZBROJA-SONTAG, SIKORSKI, KADEL (1982), através deste método, comprovaram a presença destes anticorpos no soro de pacientes com outras doenças ovarianas que não a falência gonadal.

DAMEWOOD e cols. (1986), com a técnica de imunoperoxidase, mostraram pela primeira vez reatividade específica de anticorpos contra oócitos.

LUBORSKY e cols. (1990), empregando método de ELISA, desenvolveram um imunoensaio para detectar anticorpos antiovário.

Realizaram este experimento utilizando homogeneizado de ovário e oócito humano como substratos antigênicos, encontrando 47% de positividade para ovário e, coincidentemente, a mesma taxa para oócito, sendo que 69% das pacientes apresentaram reatividade para ao menos um dos experimentos.

O método de imunocitoquímica não é ideal para o tecido ovariano, devido à falta de uniformidade representativa. Cada região do ovário reage de um modo, em decorrência dos folículos estarem distribuídos em estágios funcionais diferentes. Este método, no entanto, tem contribuído de forma decisiva na identificação das linhagens celulares envolvidas neste processo, sejam ovarianas ou imunológicas (SEDMAN e cols., 1987).

Existem poucos relatos na literatura sobre a detecção e o isolamento dos antígenos ovarianos responsáveis pela indução da doença auto-imune ovariana. MONCAYO e cols. (1989) utilizaram cromatografia de afinidade para isolar antígenos que seriam reconhecidos por estes anticorpos, verificando a ligação dos auto-anticorpos com um complexo peptídico de peso molecular entre 2 a 36kDa e com outro de 70kDa, ambos de natureza glicoprotéica. Contudo, os autores concluíram que o papel dos anticorpos antiovario na indução ou manutenção da falência ovariana precoce permanece para ser elucidado.

Os métodos de detecção do anticorpo antiovariano tem evoluído nos

últimos anos, porém o significado exato destes anticorpos no soro dessas pacientes ainda é controverso. A procura de novos métodos de pesquisa para este anticorpo e seu antígeno correlato, associado ao seguimento dessas pacientes soro-positivas, contribuirá de maneira decisiva para o melhor entendimento dessa disfunção ovariana de provável origem auto-imune.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- 2.1. Extração e solubilização de antígenos ovarianos com carbonato de amônia, a partir de ovários humanos.
- 2.2. Detecção de auto-anticorpos no soro de pacientes com falência ovariana precoce, através dos métodos de imunodifusão simples e *immunoblotting*.
- 2.3. Caracterização clínica e laboratorial das pacientes com falência ovariana precoce e relação com a presença ou não de auto-anticorpos séricos.

Vencidos esses objetivos, acredita-se poder contribuir com subsídios que, somados a outros na literatura, proporcionarão evolução no entendimento da imunopatologia das disfunções ovarianas.

CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

3.1.1. População de referência

Mulheres da região de Campinas (SP) atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.1.2. Populações de estudo

3.1.2.1. Pacientes com falência ovariana precoce

A população de estudo era de 35 pacientes do sexo feminino, com idades entre 22 e 39 anos, que foram atendidas nos seguintes Ambulatórios:

Ambulatório de Doenças Gerais da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Ambulatório de Ginecologia Endocrinológica, realizado pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FCM da UNICAMP e Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da FCM da UNICAMP.

3.1.2.2. Pacientes-controles

Eram coletadas amostras séricas de 16 mulheres com idades pareadas com as das pacientes.

3.1.3. Seleção dos pacientes

3.1.3.1. Critérios de inclusão

- Pacientes com queixa de amenorréia há pelo menos seis meses e com idade cronológica inferior a 40 anos.
- Dosagem das gonadotrofinas aumentada, sendo que o valor do hormônio folículo-estimulante necessita apresentar-se acima de 40mUI/ml.
- Cariótipo feminino normal 46XX, com nenhuma alteração cromossômica.

3.1.3.2. Critérios de exclusão

- Pacientes com doenças degenerativas e infecciosas, além de desnutrição e alcoolismo crônico.
- Utilização de medicamentos com interferência no sistema hipotálamo-hipofisário ovariano.
- Pacientes com uso anterior de quimio ou radioterapia de qualquer natureza.
- Antecedentes de infecção pélvica.
- Presença de distúrbio endocrinológico que não compensado com tratamento adequado.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Obtenção e armazenamento das amostras de soro

As amostras de sangue eram coletadas por venopunção, sem anticoagulante, e os soros eram separados por centrifugação e armazenados a -20°C até sua utilização.

3.2.2. Análises sorológicas

Os níveis séricos das gonadotrofinas hormônio folículo-estimulante e hormônio luteinizante eram avaliados usando-se o método imunoenzimático fluorimétrico através de “kits” comerciais. O diagnóstico de falência gonadal era definido pelos níveis do hormônio folículo-estimulante acima de 40 mUI/ml.

3.2.3. Coleta e armazenamento do tecido ovariano

O tecido ovariano proveniente de pacientes com carcinoma mamário que realizaram ooforectomia era coletado num frasco estéril vazio e transportado imediatamente para o laboratório de anatomia patológica do Departamento de Anatomia Patológica da FCM/UNICAMP. Após exame de congelação, o material que apresentasse qualquer alteração suspeita era retido por completo e o material que não apresentasse alterações era cortado em fatias. Algumas destas fatias permaneciam no laboratório, para posterior estudo, e as restantes eram postas à disposição, as quais eram colocadas em frasco estéril contendo solução fisiológica e armazenadas a -20°C , até utilização.

Todas as pacientes que realizaram ooforectomia, com posterior utilização do tecido ovariano, estavam em idade fértil e menstruavam regularmente sem uso de medicações. Nenhuma delas apresentavam outras doenças que não o carcinoma mamário, e não tinham utilizado quimio ou radioterapia. Algumas estavam na fase folicular do seu ciclo menstrual e, outras, na fase lútea.

3.2.4. Preparo do tecido ovariano e solubilização antigênica

Após descongelamento do tecido ovariano em banho a 36°C, era lavado três vezes em PBS e, imediatamente, era iniciada sua dissecação. O tecido conjuntivo adjacente era eliminado e o tecido ovariano cortado em pequenos fragmentos. Este material era suspenso em tampão de carbonato de amônia 1M (10ml para 3g de peso úmido deste macerado) para extração de antígenos solúveis e homogeneização em blender por 10 minutos. Após este procedimento eram adicionados 6ml de carbonato de amônia à suspensão e distribuídos em dois tubos de ensaio, assim permanecendo a 4°C durante um dia, sendo ressuspensos de forma manual periodicamente. Após este período, o homogeneizado era centrifugado duas vezes a $3000 \times g$ por 20 minutos, sendo o sobrenadante estocado a -80°C, para posterior utilização.

3.2.5. Inibidores de proteases

Solução inibidora de proteases (NaCl 1M, Tris-Hcl 50mM, Phenyl-methyl-sulphonyl fluoride- Sigma P-7626, EDTA 20mM, ácido épsilon amino capróico 50mM, pH 7,5) era adicionada a todos os extratos antigênicos ovarianos

3.2.6. Dosagem de imunoglobulinas no extrato ovariano

Com o objetivo de verificar a presença contaminante de imunoglobulinas no extrato de tecido ovariano solubilizado (ETOS), procedeu-se à dosagem dos isótopos IgG, IgA e IgM através do método nefelométrico (Array Protein System, Beckman, EUA).

3.2.7. Dosagem de proteínas

A dosagem protéica dos extratos ovarianos era realizada pelo método LOWRY modificado (HARTREE, 1972), utilizando soroalbumina bovina como proteína de referência. Amostras da solução-padrão de albumina (2,6 mg/ml) eram diluídas para 1ml de água, obtendo-se concentrações finais que variavam entre 13 e 117µg/ml. Tais amostras eram tratadas com 0,9ml da solução "A" (tartarato de sódio e potássio 2g, carbonato de sódio 100g,

NaOH 1N 500ml e água destilada *qsp* 1000ml) e aquecidas em banho a 56°C por 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, os tubos recebiam 0,1ml da solução “B” (tartarato de sódio e potássio 2g; sulfato cúprico 1g; NaOH 1N 10ml; água destilada *qsp* 100ml), com a qual permaneciam reagindo por 10 minutos. Eram então adicionados vigorosamente 3ml da solução “C” (Folin-Ciocalteu 1/15 em água destilada), de maneira que o jato líquido de reagente forçasse uma mistura rápida. Os tubos de ensaio eram novamente aquecidos a 56°C por 10 minutos.

Ao atingirem a temperatura ambiente, as amostras eram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 650nm. Os dados obtidos permitiam construir curva de referência na qual eram determinadas as concentrações protéicas das amostras experimentais, tratadas por procedimento idêntico.

3.2.8. Imunodifusão

Preliminarmente, para a determinação da presença do anticorpo antiovariano no soro das pacientes com falência gonadal precoce, era utilizado método de imunodifusão simples em agarose (SHEIDEGGER, 1955).

3.2.9. Eletroforese analítica em gel de poliacrilamida - SDS

Utilizando o ETOS como substrato, eletroforese em gel de poliacrilamida era realizada em placa vertical de acordo com o método de LAEMMLI (1970), modificado por SAUAIA & LAICINE (1977) e com adaptações do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia. As amostras de material eram aquecidas em água fervente por 1 minuto, em presença de duodecil-sulfato de sódio (SDS) a 2% em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%, sendo adicionado 2-mercaptoetanol a 10% quando se desejava a redução protéica. Eram aplicados 5µg de material protéico por poço para a análise tintorial e 15µg nas corridas destinadas à eletroforese de transferência.

A dimensão do gel era de 7,0cm X 8,5cm X 0,75mm, concentração de 12% para o gel de separação e de 5% para o de empilhamento. A eletroforese era realizada sob corrente contínua (30mA) com voltagem inicial de aproximadamente 40 V e final de 150 V. A migração protéica era interrompida quando o corante azul de bromofenol distava 1cm da borda inferior do gel de separação, ou seja, cerca de 1 hora após o início do procedimento.

Ao término da eletroforese, os géis destinados à análise tintorial do material eram corados em solução de coomassie blue 0,2% diluída em ácido acético glacial 10%, metanol 45% e água destilada *qsp*, sendo o excesso de corante retirado com solução de metanol 45%, ácido acético glacial 10% e água destilada *qsp*. Quando se desejava maior sensibilidade na detecção de bandas protéicas, utilizava-se a coloração pelo método da prata (MORRISSEY, 1981). Os géis destinados à eletroforese de transferência eram lavados em tampão Tris 20mM, glicina 150mM, metanol 20%, pH 8,3 por 15 minutos, com o objetivo de retirar o excesso de SDS.

Os pesos moleculares das proteínas separadas eletroforeticamente eram calculados por comparação com solução-padrão contendo miosina de músculo de coelho de 205kDa, β -galactosidase de *Escherichia coli* de 116 kDa, fosforilase de músculo de coelho de 97,4kDa, albumina bovina de 66 kDa, ovoalbumina de 45kDa e anidrase carbônica de eritrócitos bovinos de 29 kDa (MW-SDS-200, Sigma Chemical Company, EUA).

3.2.10. Eletroforese de transferência seguida de “immunoblotting”

O material proveniente da eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS era transferido eletroforeticamente (90 minutos a 4°C, 150 mA/gel) para membrana de nitrocelulose (Trans-Blot Transfer Medium, 0,45 micron, Bio-

Rad, EUA), com dimensões idênticas àquelas do gel de separação, conforme técnica de TOWBIN, STAEBELIN, GORDON (1979), modificada por BURNETTE (1981) e com adaptações do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia - UNICAMP. O tampão de eletroforese de transferência era composto de Tris 20mM, glicina 150mM e metanol 20%, pH 8,3.

Após a transferência, os sítios adicionais de ligação na membrana eram bloqueados por incubação do mesmo em solução contendo soro fetal bovino 3%, gelatina 0,3%, Tween 0,05% (diluídos em PBS pH 7,3), durante 1 hora. Após três lavagens de 10 minutos em PBS, as fitas de nitrocelulose eram incubadas por 3 horas com os soros para teste na diluição 1/1000 (soro fetal bovino 1%, gelatina 0,1%, Tween 0,016%). Os soros eram retirados, as fitas lavadas como anteriormente e colocadas em contato com conjugado anti-IgG humana ligado à peroxidase (Abbot Laboratórios do Brasil, titulação aproximada de 1/2000) durante 1 hora, protegidas da luz. Em seguida a novo ciclo de lavagens, as membranas eram submersas em solução de diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., 50mg/100ml de PBS) por 30 minutos e o substrato revelado em presença de H₂O₂ e solução de cloreto de cobalto e sulfato de níquel 1% (DE BLAS & CHERWINSKI, 1983; ZOLLNER, 1990). A reação era bloqueada pela adição de água deionizada.

3.2.11. Reagentes utilizados

Todos os reagentes utilizados, cujas procedências não foram citadas, eram *pro análise*.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Dosagem protéica e determinação de imunoglobulinas contaminantes

Após preparo do tecido coletado, foram obtidos os extratos de tecido ovariano solubilizado (ETOS). A concentração de proteínas determinada neste extrato foi de 7,2mg/ml. As concentrações de imunoglobulinas contaminantes foram definidas através de ensaio nefelométrico que determinou a presença de imunoglobulinas G na concentração de 14,1mg/dl e ausência de imunoglobulinas A e M.

4.2. Imunodifusão simples

Dos 35 soros de pacientes testados, 5 (14%) apresentaram linhas de precipitação, representando a reação do extrato antigênico com anticorpos existentes no soro das pacientes com falência ovariana precoce (FIGURA 1, PÁGINA 31). Nenhum dos soros controles apresentou reatividade.

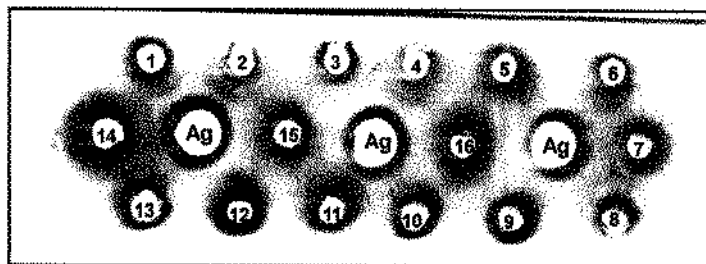


Figura 1: Imagem representativa de placa de imunodifusão simples em gel de agarose 1%, demonstrando linha de precipitação entre antígeno e anticorpo (seta).

Poço contendo 30 microlitros de extrato antigênico (ETOS).

Poço contendo 20 microlitros de soro dos pacientes (1-16).

Observar flecha indicando linha de precipitação.

4.3. Eletroforese analítica

As eletroforeses em gel de poliacrilamida SDS 12%, com ETOS, revelaram bandas protéicas de peso molecular variando entre 220 e 20kDa (FIGURA 2, PÁGINA 33).

4.4. Eletroforese de transferência seguida de *immunoblotting*

4.4.1. Procedimentos-controles

Estes procedimentos permitiram verificar reatividade considerada inespecífica, do anticorpo conjugado diretamente ou dos soros de mulheres sadias, com bandas protéicas de 63kDa, 78kDa, 95kDa e 117kDa. A reatividade encontrada na banda de 63kDa era mais intensa que as demais, mas todas foram consideradas inespecíficas.

Devido à constatação da presença de IgG contaminantes no ETOS, submeteu-se a imunoglobulina G (Sandoz) como substrato para o *immunoblotting* e encontrou-se reatividade do anticorpo conjugado com as bandas de 34kDa, 50kDa, 53kDa, 63kDa, 118kDa e 188kDa (FIGURA 3, PÁGINA 34).

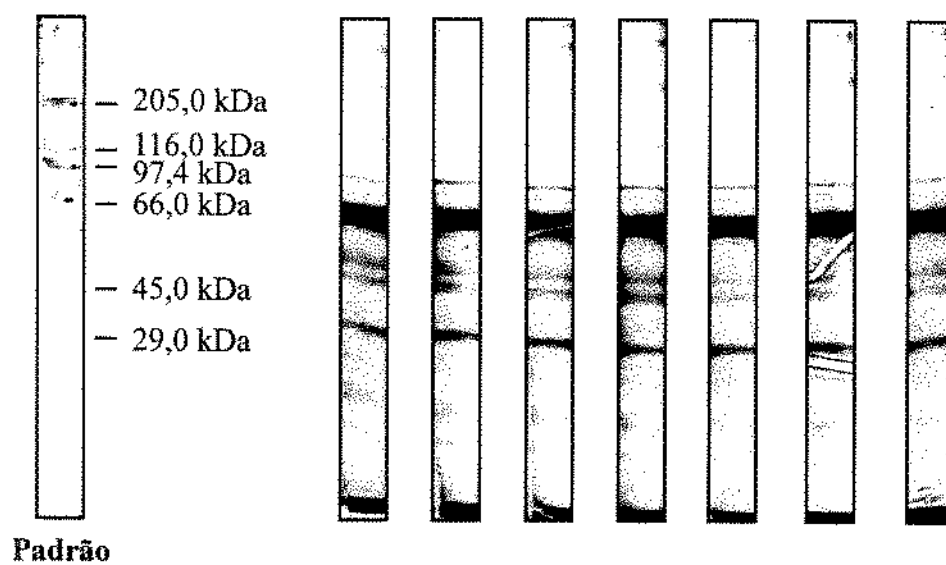


Figura 2: Imagem representativa de eletroforese analítica em gel de poliacrilamida com ETOS, revelando bandas protéicas de peso molecular variando entre 220 e 20 kDa.

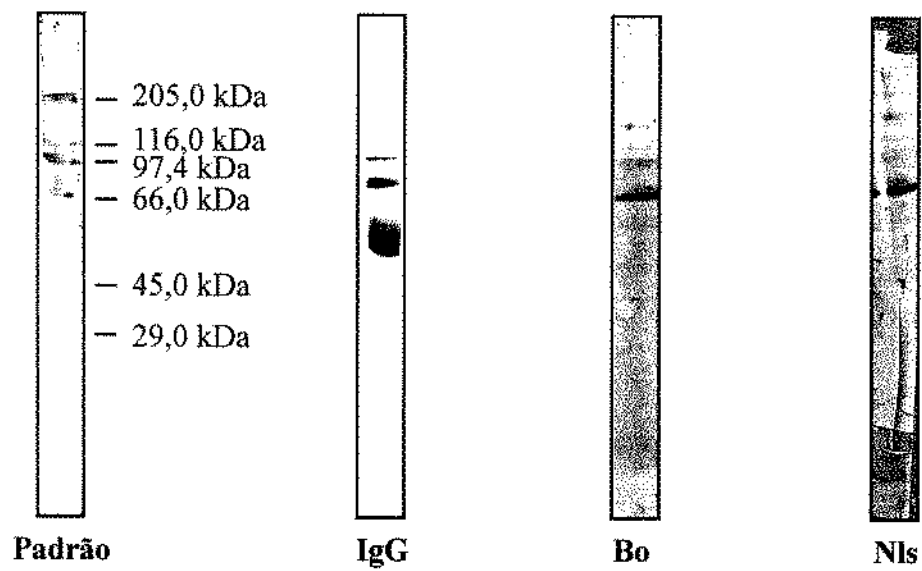


Figura 3: Comparação entre procedimentos controles:

IgG- Immunoblotting utilizando IgG como extrato antigênico

Bo - Branco - para avaliar reações inespecíficas

Nls - Controles Normais

4.4.2. Immunoblotting de soros de pacientes com falência ovariana precoce

Através de *immunoblotting*, utilizando o soro das pacientes, verificou-se reatividade anticórpica para diversos peptídeos antigênicos, com variação de peso molecular entre 30kDa e >205kDa. A banda de 63kDa foi a mais intensa em todos os casos, assim como tinha ocorrido nos controles normais, sendo também considerada inespecífica. Além das bandas inespecíficas, encontrou-se reatividade a alguns peptídeos ou grupamentos protéicos de peso molecular maior, no entanto estas reações ocorreram esporadicamente (TABELA 1, PÁGINA 38).

O complexo peptídico de aproximadamente 30kDa foi considerado “marcador suspeito” e reagiu com 14 soros de pacientes com falência ovariana precoce. Este fragmento não apresentou reatividade aos soros-controles. (FIGURA 4, PÁGINA 39).

4.5. Correlação entre “fragmento” 30kDa e falência ovariana precoce

No grupo de estudo a idade das pacientes ao procurar o Serviço de Gineco-Endocrinologia foi em média de 29,4 anos (de 18 a 39 anos), com menarca em média aos 12,9 anos de idade (de 9 a 16 anos). Apenas uma paciente apresentava amenorréia primária como queixa clínica e, as demais, amenorréia secundária.

Os níveis do FSH eram maiores que 40mUI/ml em todas as pacientes, tendo sido em média de 80mUI/ml (de 40 a 180mUI/ml). O LH apresentou variação de 11,7 a 150mUI/ml, com valor médio de 50mUI/ml.

Para avaliar a possível relação entre essas características e a presença de anticorpo antiovário, as pacientes foram divididas em dois grupos de acordo com a presença ou não de reatividade para a banda de 30kDa. Os dados clínicos e laboratoriais foram comparados entre os grupos, não apresentando diferenças entre eles (TABELA 2, PÁGINA 40).

4.6. Relação entre auto-anticorpos com outras doenças auto-imunes

De 35 pacientes com falência ovariana precoce, seis pacientes apresentaram outras doenças auto-imunes. Uma paciente apresentou doença de Addison e hipotireoidismo primário, outra apenas a doença de Addison e três pacientes somente o hipotireoidismo primário auto-imune. Em apenas uma foi diagnosticado lúpus eritematoso sistêmico.

A paciente que apresentou duas doenças auto-imunes associadas com falência ovariana precoce e uma paciente com hipotireoidismo apresentaram anticorpos que reagiram formando linha de precipitação à imunodifusão e detectaram o peptídeo de 30kDa ao *immunoblotting*. A paciente com lúpus eritematoso sistêmico reagiu apenas com o peptídeo, mas não desencadeou a

formação de linha de precipitação na imunodifusão. No soros das outras três pacientes que possuíam doenças auto-imunes associadas com a falência gonadal não foram detectados anticorpos antiovário (TABELA 3, PÁGINA 41).

TABELA 1
FREQÜÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DA REATIVIDADE DE
SOROS DAS PACIENTES E CONTROLES AO ETOS

Fragmentos peptídicos	Pacientes N = 35	Controles normais N = 16
> 205	2 (6%)	1 (6%)
190	2 (6%)	--
170	2 (6%)	--
150	5 (14%)	1 (6%)
135	4 (11%)	2 (12%)
117	7 (20%)	7 (44%)
95	11 (31%)	9 (56%)
80	17 (49%)	11 (69%)
63	35 (100%)	16 (100%)
50	1 (3%)	--
30	14 (40%)	--

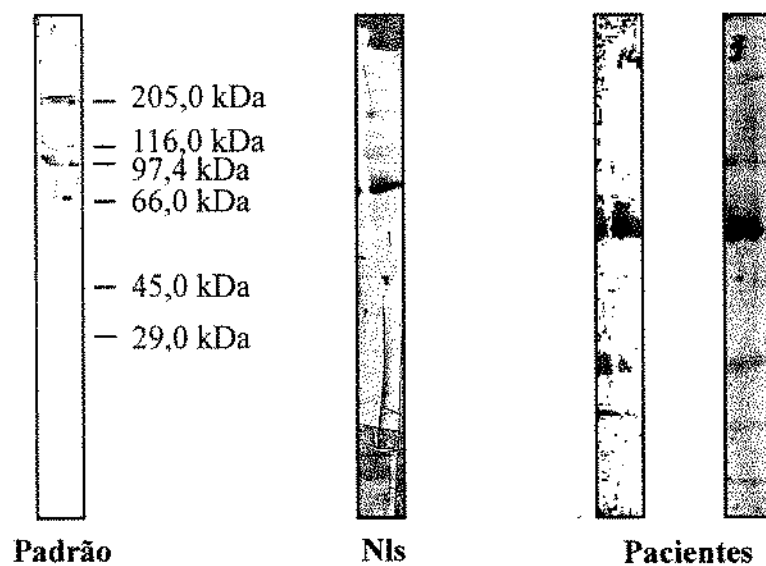


Figura 4: Exemplos de resultados obtidos em 1 soro controle e 2 soros de pacientes com Falência Ovariana Precoce.

TABELA 2

**COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS I E II QUANTO À MÉDIA DOS
PARÂMETROS: IDADE DA MENARCA, IDADE DE INÍCIO DOS
SINTOMAS E NÍVEIS DE FSH E LH**

	grupo I* N = 14	grupo II** N = 21
Idade Menarca	12,8 (9 a 16 anos)	13,0 (9 a 16 anos)
Idade de início dos sintomas	28,9 (18 a 39 anos)	29,7 (21 a 38 anos)
FSH	77,0 (41,5 a 150mUI/ml)	82,5 (50 a 189mUI/ml)
LH	52,3 (15,5 a 150mUI/ml)	49,1 (11,7 a 150 mUI/ml)

* grupo I - Pacientes que reagiram a peptídeos de 30kDa

** grupo II - Pacientes que não reagiram a peptídeos de 30kDa

TABELA 3

RESULTADOS DE IMUNODIFUSÃO SIMPLES E
***IMMUNOBLOTTING* EM SEIS PACIENTES QUE APRESENTAVAM**
OUTRAS DOENÇAS AUTO-IMUNE ASSOCIADAS

Doenças associadas	Imunodifusão	<i>Immunoblotting</i>
Doença de Addison e Hipotireoidismo	(+)	(+)
Doença de Addison	(-)	(-)
Hipotireoidismo	(+)	(+)
Hipotireoidismo	(-)	(-)
Hipotireoidismo	(-)	(-)
Lúpus Eritematoso Sistêmico	(-)	(+)

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A amenorréia hipergonadotrófica em pacientes com menos de 40 anos de idade caracteriza a falência ovariana precoce. Alterações cromossômicas, iatrogenia e infecções são algumas das etiologias propostas para esta disfunção. Atualmente, existem inúmeras evidências sugerindo distúrbio auto-imune como responsável pela etiologia em subgrupo destas pacientes: associação com outras doenças auto-imunes, infiltrado linfocítico nos ovários, reversão de quadro clínico pós-terapia imunossupressiva e detecção de anticorpo antiovário nos soros destas pacientes.

Vários métodos têm sido empregados para a detecção desse anticorpo. Utilizamos as técnicas de imunodifusão simples e eletroforese seguida de *immunoblotting* para detectar a presença de anticorpo contra antígeno solúvel ovariano nos soros de 35 pacientes com falência ovariana precoce.

Estudos visando à auto-imunidade ovariana indicam a presença de diversos antígenos gonadais envolvidos com a resposta imunológica na falência ovariana precoce, tais como células da granulosa, células da teca, receptores das gonadotrofinas, oócitos e componentes microssomais da célula produtora de esteróides (ELDER e cols., 1981; MATHUR e cols., 1982; TANG & FAIMAN, 1983). Podemos inferir, portanto, que a utilização do homogeneizado ovariano humano é vantajosa quando comparada com outros métodos que utilizam cortes histológicos para a pesquisa antigênica. No homogeneizado, temos grande diversidade antigênica, que permite a pesquisa de anticorpos contra extrato antigênico mais abrangente, contudo os antígenos responsáveis pela resposta imunológica na falência ovariana precoce ainda não foram isolados.

Utilizando extrato antigênico solúvel como substrato, primeiramente avaliamos os soros de 35 pacientes pelo método de imunodifusão simples em gel de agarose a 1%. Embora saibamos que esta técnica não apresenta alta sensibilidade, encontramos linha de precipitação em cinco dos soros testados, indicando que estas pacientes apresentam anticorpos com propriedades físico-químicas para desencadear uma reação antígeno anticorpo com capacidade de precipitação.

Investigamos a presença de anticorpo antiovário nestes soros utilizando o método de *immunoblotting*, que se caracteriza pela associação do poder analítico das técnicas de eletroforese, com a alta especificidade da reação antígeno-anticorpo (STOTT, 1989). Os soros das cinco pacientes que apresentaram linha de precipitação com o método de imunodifusão simples também apresentaram reatividade específica no *immunoblotting*. Além dos cinco casos, pudemos verificar reatividade à banda de 30kDa em mais nove, totalizando 14 (40%) soros reagentes. Nenhum dos 16 controles investigados apresentou reatividade para este peptídeo.

MONCAYO e cols. (1989) desenvolveram sistema de ELISA para detecção de anticorpos antiovário, utilizando como substrato corpo lúteo bovino. Obtiveram fração solúvel e fração de membrana extraída com triton a 1%, sendo que estes antígenos foram posteriormente isolados por cromatografia de afinidade. Os autores conseguiram revelar, através deste método, complexo antigênico de peso molecular entre 2 e 36kDa. Portanto, é possível que exista conformidade entre o peptídeo de 30kDa do nosso estudo com este complexo antigênico.

A prevalência do anticorpo antiovário é muito variada, dependendo do método utilizado para sua detecção. RABINOWE e cols. (1989), utilizando microscopia para imunofluorescência indireta, verificaram presença de

anticorpo fixado no tecido ovariano em apenas 9% dos soros destas pacientes. LUBORSKY e cols. (1990), utilizando método de ELISA e empregando ovário e oócito como substratos antigênicos, conseguiram detectar estes anticorpos no soro de 69% das pacientes. No nosso estudo, 40% das pacientes apresentaram reatividade para a banda de 30kDa ao *immunoblotting*. Em 1993, MONCAYO & MONCAYO publicaram artigo de revisão sobre auto-imunidade ovariana, demonstrando a evolução nos métodos utilizados para detecção destes anticorpos e diferenças encontradas nos resultados desde 1966 até então. Baseados nesta revisão, os autores concluíram que os anticorpos antiovarianos parecem refletir a presença de processo auto-imune neste órgão.

O método de *immunoblotting* que utilizamos apresentou algumas ligações inespecíficas, demonstradas quando não utilizamos soros de pacientes no experimento. Estas ligações foram semelhantes às encontradas em todos os controles e nas pacientes com falência ovariana precoce. TOVEY, FORD, BALDO (1987) descreveram a presença de ligações não-específicas do anticorpo conjugado com enzima na técnica de *immunoblotting*. Segundo estes autores, seriam reações das enzimas com certas proteínas, visto que estas reações não são identificadas quando o anticorpo é marcado com elemento radioativo. No nosso experimento, além destas ligações, o anticorpo conjugado com enzima poderia ligar-se ao extrato antigênico ovariano, devido à

imunoglobulina no ETOS, que foi detectada através do método de nefelometria automatizada.

Para avaliar a reatividade do nosso conjugado com a imunoglobulina G, realizamos procedimento de eletroforese seguido de *immunoblotting* utilizando esta imunoglobulina no lugar do extrato antigênico. Obtivemos algumas reações semelhantes às inespecíficas e outras não. Esta variação talvez se devesse à quebra das moléculas de imunoglobulinas contaminantes no nosso extrato ou a menor concentração relativa de imunoglobulina no ETOS, quando comparada ao concentrado de imunoglobulina humana aplicado na eletroforese.

Embora esporadicamente, os soros de algumas pacientes mostraram reatividade com bandas de peso molecular maior: 205kDa, 190kDa, 170kDa, 150kDa e 135kDa. Estas reações com peptídeos de peso molecular alto podem representar agregados antigênicos ou ainda outros grupamentos antigênicos menos expressivos.

Ainda não está estabelecido o significado exato dos anticorpos específicos antiovarianos nos soros de pacientes com falência ovariana precoce. MCNATTY & SHORT (1975) comprovaram o efeito citotóxico do anticorpo anticélulas produtoras de esteróides na associação com doença de Addison. A possível alteração no sistema de autotolerância, responsável pela presença destes anticorpos, levaria à ooforite e, conseqüentemente, à

diminuição da função gonadal. No entanto, estes anticorpos não são específicos para o tecido ovariano, e estudos serão necessários para esclarecer se este fenômeno é mediado por anticorpos ou se é resultante de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo.

WHEATCROFT e cols. (1994) demonstraram presença dos anticorpos específicos antiovário no soro das pacientes com falência ovariana precoce, porém utilizando antígenos de trompas de Falópio, em vez dos ovarianos. Também constataram a presença de anticorpos no soro destas pacientes. Baseados nestes dados, os autores consideraram que a relação do anticorpo antiovário com etiologia da falência gonadal não está estabelecida, podendo estes anticorpos serem epifenomenais.

Por outro lado, LUBORSKY e cols. (1990) demonstraram diminuição na concentração de anticorpos antiovarianos em duas pacientes utilizando tratamento imunossupressivo com glicocorticóide, chegando estas a engravidarem após a queda na concentração sérica dos anticorpos. Depois da gestação, os níveis de anticorpos subiram novamente e os sintomas da falência ovariana precoce ressurgiram. Eles concluíram que estes dados servem de suporte para o conceito que anticorpos antiovário correlacionam-se diretamente com diminuição da função gonadal feminina.

Apenas a avaliação combinada de testes imunológicos, como detecção do anticorpo antiovariano, estudos da função dos linfócitos T, avaliação da expressão dos antígenos de histocompatibilidade e estudos comprovando citotoxicidade destes anticorpos, permitirá a inclusão definitiva de alguns casos de falência ovariana precoce no grupo de doenças auto-imunes e a indicação de terapêutica imunossupressiva (BETTERLE e cols., 1993).

Como demonstrado anteriormente por O'HERLIHY, PEPPERELL, EVANS (1980), também não encontramos diferenças quanto à idade da menarca e idade do início dos sintomas entre os grupos que apresentaram ou não anticorpos antiantígenos ovarianos solúveis, evidenciando que estes critérios não indicam quais pacientes apresentam estes anticorpos.

Não obstante a maioria dos estudos não comprovarem a hipótese de que as gonadotrofinas exercem influência na expressão antigênica ovariana, esta suposição ainda não foi totalmente esclarecida. Os primeiros relatos na literatura a este respeito foram de IRVINE e cols. (1968), ao demonstrarem que componentes ovarianos não apresentavam o mesmo grau de antigenicidade, propondo que a expressão antigênica ovariana poderia ser estimulada pelos níveis elevados das gonadotrofinas. BUKOVSKY & PRESL (1979) preconizaram a existência de relação entre o eixo hipotálamo-hipófise-ovariano e o sistema imunológico, sendo que uma desestabilização do sistema,

provocado pelo aumento das gonadotrofinas, permitiria o aparecimento da doença ovariana auto-imune. No final da década de 1980, verificou-se que mulheres submetidas ao tratamento com altas doses de gonadotrofinas, para fertilização "in vitro", também apresentavam prevalência do anticorpo antiovário acima do normal. MONCAYO, MONCAYO, DAPUNT (1990) realizaram análise sequencial do anticorpo antiovário nestas pacientes, antes e durante o tratamento com gonadotrofinas, identificando alta incidência de soroconversão. Eles questionaram possível influência das gonadotrofinas em induzir tais anticorpos. A utilização de doses suprafisiológicas de gonadotrofinas poderia desencadear desequilíbrio do sistema imune e conseqüente doença por auto-imunidade.

Por outro lado, DAMEWOOD e cols. (1986), com o objetivo de detectar anticorpo antiovário, estudaram 27 pacientes com falência ovariana precoce, comparando o grupo-controle de 22 pacientes menopausadas. Detectaram este anticorpo em apenas uma das mulheres na menopausa, demonstrando que as gonadotrofinas aumentadas fisiologicamente não exerciam papel desencadeador de resposta imunológica. Nos nossos pacientes, os níveis médios séricos de gonadotrofinas parecem não ter influenciado no resultado do *immunoblotting*, pois foram semelhantes nos dois grupos.

LABARBERA, MILLER, OBER (1988), revisando 119 casos de

menopausa precoce publicados na literatura médica, encontraram 17,5% de associações com outras doenças auto-imunes. Nossos resultados foram semelhantes, dentre 35 pacientes com falência gonadal precoce, seis (17%) apresentaram associação com outra doença auto-imune.

IRVINE, CHAN, SCARTH (1969); SOTSIU, BOTTAZZO, DONIACH (1980) demonstraram que anticorpos anticélulas produtoras de esteróides, que agem primariamente contra o microssoma das células da adrenal, podem apresentar reação cruzada com antígenos ovarianos. Em nosso caso, das duas pacientes com doença de Addison, uma não apresentou sororreatividade para a banda de 30kDa, demonstrando que o anticorpo antiadrenal, que provavelmente está presente no soro desta paciente, possivelmente não apresenta reação cruzada com o ETOS. Da mesma forma, pudemos verificar que os anticorpos antitiroidianos no soro de duas pacientes com hipotireoidismo primário auto-imune não reagiram contra este antígeno.

MONCAYO-NAVEDA e cols. (1989) demonstraram alta proporção de anticorpos antiovários no soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e consideraram este achado indicativo de alterações na função gonadal destes pacientes. Já em 1944, ROSE & PILLSBURY descreveram, antes da disponibilidade de agentes imunossupressivos, alterações compatíveis com ooforites em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico em atividade. A única

paciente de nossa casuística com esta doença apresentou reatividade para a banda de 30kDa, corroborando esta associação.

Com a metodologia de extração e solubilização de antígenos ovarianos, conseguimos detectar a presença de anticorpo contra peptídeo de aproximadamente 30kDa em 40% das pacientes com falência ovariana precoce. Estudos posteriores serão necessários, tanto para averiguar o valor fisiopatológico destes anticorpos, como para definitivamente isolar os antígenos responsáveis por esta auto-agressão imunológica.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- 6.1. O método de extração e solubilização de extrato ovariano humano com carbonato de amônia permitiu a obtenção de complexos antigênicos capazes de revelar a presença sérica de anticorpos antiovário em pacientes com falência ovariana precoce.
- 6.2. Através da técnica de *immunoblotting*, utilizando este extrato, pudemos detectar a presença de anticorpos dirigidos contra peptídeos de 30kDa em 14 (40%) de 35 pacientes portadoras de falência ovariana precoce.
- 6.3. A idade da menarca, idade do início dos sintomas e níveis de gonadotrofinas não foram diferentes nas pacientes que apresentaram reação à banda de 30kDa, quando comparados com as demais.

6.4. Esta metodologia permitirá a continuidade nos estudos para o entendimento da auto-imunidade ovariana com o isolamento da fração de 30kDa e a caracterização das propriedades biológicas deste anticorpo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AIMAN, J. & SMENTEK, C. - Premature ovarian failure. **Obstet. Gynecol.**, **66**:9-14, 1985.

ALPER, M.M. & GARNER, P.R. - Premature ovarian failure: Its relationship to autoimmune disease. **Obstet. Gynecol.**, **66**:27-30, 1985.

ALPER, M.M.; GARNER, P.R.; SEIBEL, M.M. - Premature ovarian failure. Current concepts. **J. Reprod. Med.**, **31**:699-74, 1986.

ANDERSON, J.R.; GOUDIE, R.B.; GRAY, K.; STUART-SMITH, D.A. - Immunological features of idiopathic Addison's diseases: an antibody to cells producing steroid hormones. **Clin. Exp. Immunol.**, **3**:107-17, 1968.

BACHMANN, G.A & KEMMANN, E. - Prevalence of oligomenorrhea and amenorrhea in a college population. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **144**:98-102, 1982.

BAKER, W.J.; MORGAN, R.L.; PECKHAN, M.J. - Reservation of ovarian function in patients requiring radiotherapy for para-aortic and pelvic Hodgkin's disease. **Lancet**, **ii**:1307-9, 1972.

- BANNATYNE, P.; RUSSEL, P.; SHEARMAN, R.P. - Autoimmune oophoritis: a clinicopathologic assessment of 12 cases. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **9**:191-207, 1990.
- BATEMAN, B.G.; NUNLEY, W.C.; KITCHIN III, J.D. - Reversal apparent premature ovarian failure in a patient with myasthenia gravis. **Fertil. Steril.**, **39**:108-110, 1983.
- BETTERLE, C.; ROSSI, A.; PRIA, S.D.; ARTIFONI, A.; PEDINI, B.; GAVASSO, S.; CARETTO, A. - Premature ovarian failure: autoimmunity and natural history. **Clin. Endocrin.**, **39**:35-43, 1993.
- BOTTAZZO, G.F.; FLORIN-CHRISTENSEN, A.; DONIACH, D. - Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. **Lancet**, **ii**:1279-83, 1974.
- BUKOVSKY, A. & PRESL, J. - Ovarian function and the immune system. **Med. Hypotheses**, **5**:415-36, 1979.
- BURNETTE, W.N. - "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.**, **112**:195-204, 1981.
- CARPENTER, C.C.J.; SOLOMON, N.; SILVERBERG, S.G.; BLEDSOE, T.; NORTHCUTT, R.C.; KLINENBERG, J.R.; BENNETT, I.L.JR.; HARVEY, A.M. - Schmidt's syndrome (thyroid and adrenal insufficiency). A review of the literature and a report of fifteen new cases including ten instances of coexistent diabetes mellitus. **Medicine**, **43**:153-9, 1964.

- CHIAUZZI, V.; CIGORRAGA, S.; ESCOBAR, M.E.; RIVAROLA, M.A.; CHARREAU, E.H. - Inhibition of follicle-stimulating hormone receptor binding by circulating immunoglobulins. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **54**:1221-8, 1982.
- COLLEN, R.J.; LIPPE, B.M.; KAPLAN, S.A. - Primary ovarian failure. Juvenile rheumatoid arthritis and vitiligo. **Am. J. Dis. Child.**, **133**:598-602, 1979.
- CORSON, S.L. & REBAR, R.W. - Hypergonadotropic amenorrhoea and premature ovarian failure. A review. **J. Reprod. Medic.**, **27**:179-86, 1982.
- COULAM, C.B. - Premature gonadal failure. **Fertil. Steril.**, **38**:645-9, 1982.
- COULAM, C.B. - The prevalence of autoimmune disorders among patients with primary ovarian failure. **Am. J. Reprod. Immunol.**, **4**:63-6, 1983.
- COULAM, C.B.; ADAMSON, S.C.; ANNEGERS, J.F. - Incidence of premature ovarian failure. **Obstet. Gynecol.**, **67**:604-6, 1986.
- COULAM, C.B.; KEMPERS, R.D.; RANDALL, R.V. - Premature ovarian failure: evidence for the autoimmune mechanism. **Fertil. Steril.**, **36**:238-40, 1981.
- COUNCIL OF THE MEDICAL WOMEN'S FEDERATION: An investigation of the menopause in one thousand women. **Lancet**, **i**:106-11, 1933.
- COWCHOCK, F.S.; MCCABE, J.L.; MONTGOMERY, B.B. - Pregnancy after corticosteroid administration in premature ovarian failure (polyglandular endocrinopathy syndrome). **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **158**:118-9, 1988.

- DAMEWOOD, M.D.; ZACUR, H.A.; HOFFMAN, G.J.; ROCK, J.A.
- Circulating antiovarian antibodies in premature ovarian failure. **Obstet. Gynecol.**, 68:850-4, 1986.
- DE BLAS, A.L. & CHERWINSKI, H.M. - Detecton of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. **Anal. Biochem.**, 133:214-9, 1983.
- DE MORAES-RUEHSEN, M.; BLIZZARD, R.M.; GARCIA-BUNUEL, R.
- Autoimmunity and ovarian failure. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 112:693-8, 1972.
- DE MORAES-RUEHSEN, M. & JONES, G.S. - Premature ovarian failure. **Fertil. Steril.**, 18:440-61, 1967.
- DEFTOS, L.J.; CATHERWOOD, B.D.; BONE III, H.G. - Multiglandular endocrine disorders. In: FELIG, P.; BAXTER, J.D.; BROADUS, A.E.; FROHMAN, L.A. - **Endocrinology and metabolism**. 2.ed. New York, McGraw-Hill Book Company, 1987. p.1662-91.
- DEWALD & SPURBECK, J.L. - Sex chromosome anomalies associated with premature ovarian gonadal failure. **Semin. Reprod. Endocrinol.**, 1:79-82, 1983.
- EDMONDS, M.; LAMKI, L.; KILLINGER, D.W.; VOLPE, R. - Autoimmune thyroiditis, adrenalitis and oophoritis. **Am. J. Med.**, 54:782-7, 1973.
- ELDER, M.; MACLAREN, N.; RILEY, W. - Gonadal autoantibodies in patients with hypogonadism and/or Addison's disease. **Clin. Endocrinol. Metab.**, 52:1137-42, 1981.
- FITZGERALD, P.H.; DONALD, R.A.; MCCORMICK, P. - Reduced fertility in women with X chromosome abnormality. **Clin. Genet.**, 25:301-9, 1984.

- FORBES, A.P.; LAKE, J.R.; BLOCH, K.J. - Clinical significance of antibodies to ovarian antigens; association with cancer of the genito-urinary tract. **Clin. Exp. Immunol.**, **23**:436-43, 1976.
- FOX, H. - The pathology of premature ovarian failure. **J. Pathol.**, **167**:357-63, 1992.
- FRERE, G. - Mean age at menopause and menarche in South africa. **S. Afr. J. Med. Sci.**, **36**:21-4, 1971.
- FRIEDMAN, S.; MCCORMICK, J.N.; FUDENBERG, H.H.; GOLDFIEN, A. - Ovarian antibodies in disorders of ovarian function. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **1**:94-103, 1972.
- GLOOR, E.& HURLIMANN, J. - Autoimmune oophoritis. **Am. J. Clin. Pathol.**, **81**:105-9, 1984.
- GOLDENBERG, R.L.; GRODIN, J.M.; RODBARD, D. - Gonadotropins in women with amenorrhea. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **116**:1003-12, 1973.
- HARTREE, E.F. - Determination of protein: a modification of Lowry's method that gives a linear photometric respons. **Anal. Biochem.**, **48**:422-9, 1972.
- IRVINE, W.J. & BORNES, E.W. - Addison's disease, ovarian failure and hypoparathyroidism. **Clin. Endocrinol.**, **4**:379-85, 1975.
- IRVINE, W.J.; CHAN, M.W.; SCARTH, L. - Immunological aspects of premature ovarian failure associated with idiopathic Addison's disease. **Lancet**, **ii**:883-7, 1968.
- IRVINE, W.J.; CHAN, M.W.; SCARTH, L. - The further characterization of autoantibodies reactive with extra-adrenal steroid-producing cells in patients with adrenal disorder. **Clin. Exp. Immunol.**, **4**:489-503, 1969.

- JACOBS, H.S. - The premature menopause. In: JACOBS, H.S- **The Management of the Menopause and the Post-Menopausal Years.** Baltimore, University Park Press, 1976. p.359.
- JEWELWICZ, R.J. & SCHWARTZ, M. - Premature ovarian failure. **Bull. N. Y. Acad. Med.**, **62**:219-24, 1986.
- JOHNSON, T.R.JR. & PETERSON, E.P. - Gonadotropin-induced pregnancy following "premature ovarian failure". **Fertil. Steril.**, **31**:351-7, 1979.
- KAUFMAN, F.R.; KOGUT, M.D.; DONNELL, G.N. - Hypergonadotropic hypogonadism in female patients with galactosemia. **N. Engl. J. Med.**, **304**:994-9, 1981.
- KRAILO, M.D. & PIKE, M.C. - Estimation of the distribution of age at natural menopause from prevalence data. **Am. J. Epidemiol.**, **117**:356-61, 1983.
- LABARBERA, A.R.; MILLER, M.M.; OBER, C. - Autoimmune etiology in premature ovarian failure. **Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.**, **16**:115-9, 1988.
- LAEMMLI, U.K. - Cleavage of structural protein during the assembly of the basal of the bacteriophage T4. **Nature**, **227**:680-7, 1970.
- LINTERN-MOORE, S. & PANTELOURIS, E.M. - Ovarian development in athymic nude mice. I. The size and composition of the follicle population. **Mech. Ageing. Dev.**, **4**:385-90, 1975.
- LUBORSKY, J.L.; VISINTIN, I.; BOYERS, S.P.; ASARI, T.; CALDWELL, B.; DECHERNEY, A.H. - Ovarian antibodies detected by immobilized antigen immunoassay in patients with premature ovarian failure. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **70**:69-75, 1990.

- MALLIN, S.R. - Congenital adrenal hyperplasia secondary to 17-hydroxylase deficiency. Two sisters with amenorrhea, hypokalemia and cystic ovaries. **Ann. Intern. Med.**, 70:69-74, 1969.
- MATHUR, S.; PERESS, M.R.; WILLIAMSON, H.O.; YOUMANS, C.D.; MANEY, S.A.; GARVIN, A.J.; RUST, P.F.; FUDENBERG, H.H. - Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. **Clin. Exp. Immunol.**, 50:259-66, 1982.
- MCNATTY, K.P. & SHORT, R.V. - The cytotoxic effect of serum from patients with Addison's disease and autoimmune ovarian failure on human granulosa cells in culture. **Clin. Exp. Immunol.**, 22:378-84, 1975.
- MIGNOT, M.H.; SCHOEMACHER, J.; KLEINGELD, M.; RAMANATH RAO, B.; DREXHAGE, H.A. - Premature ovarian failure. I: The association with autoimmunity. **Europ. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, 30:59-66, 1989.
- MILLER, M.E. & CHATTEN, J. - Ovarian changes in ataxia telangiectasia. **Acta. Paediatr. Scand.**, 56:559-61, 1967.
- MIYAKE, T; TAGUCHI, O.; IKEDA, H.; SATO, I.; TAKEUCHI, S.; NISHIZUKA, Y. - Acute oocyte loss in experimental autoimmune oophoritis as a possible model of premature ovarian failure. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 158:186-92, 1988.
- MONCAYO, H.E.; MONCAYO, R.; BENZ, R.; WOLF, A.; LAURITZEN, C. - Ovarian failure and autoimmunity. Detection of autoantibodies directed against both the unoccupied luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor and the hormone-receptor complex of bovine corpus luteum. **J. Clin. Invest.**, 84:1857-65, 1989.
- MONCAYO, R. & MONCAYO, H.E. - Autoimmunity and the ovary. **Immunol. Today**, 13:255-8, 1992.

- MONCAYO, R. & MONCAYO, H.E. - The association of autoantibodies directed against ovarian antigens in human disease: a clinical review. **J. Int. Med.**, **234**:371-8, 1993.
- MONCAYO, R.; MONCAYO, H.E.; DAPUNT, O. - Immunological risks of IVF. **Lancet**, **i**:180-4, 1990.
- MONCAYO-NAVEDA, H.E.; MONCAYO, R.; BENZ, R.; WOLF, A.; LAURITZEN, C. - Organ specific antibodies against ovary in patients with systemic lupus erythematosus. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **160**:1227-9, 1989.
- MORRISEY, J.H. - Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Anal. Biochem.**, **117**:307-14, 1981.
- NOGALES-ORTIZ, F.; TARACÓN, I.; NOGALES, F.F. - The pathology of female genital tuberculosis. **Obstet. Gynecol.**, **53**:422-8, 1979.
- O'HERLIHY, C.; PEPPERELL, R.J.; EVANS, J.H. - The significance of FSH elevation in young women with disorders of ovulation. **Br. Med. J.**, **281**:1447-50, 1980.
- PEKONEN, F.; SIEGBERG, R.; MÄKINEN, T.; MIETTINEN, A.; YLIKORKALA, O. - Immunological disturbances in patients with premature ovarian failure. **Clin. Endocrinol.**, **25**:1-6, 1986.
- RABINOWE, S.L.; RAVNIKAR, V.; DIB, S.A.; GEORGE, K.L.; DLUHY, R.G. - Premature menopause: monoclonal antibody defined T lymphocyte abnormalities and antiovarian antibodies. **Fertil. Steril.**, **51**:450-4, 1989.
- RABINOWE, S.L.; RAVNIKAR, V.; SRIKANTA, S. - Monoclonal antibody defined T lymphocyte abnormalities and anti-ovarian antibodies in premature menopause. **Endocrinology**, **118** (suppl. 1):24, 1986.

- REBAR, R.W. & CEDAR, M.I. - Hypergonadotropic forms of amenorrhea in young woman. **Reprod. Endocrinol.**, **21**:173-91, 1992.
- REBAR, R.W. & CONNOLLY, H.V. - Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. **Fertil. Steril.**, **53**:804-10, 1990.
- REBAR, R.W.; ERICKSON, G.F.; YEN, S.S.C. - Idiopathic premature ovarian failure: clinical and endocrine characteristics. **Fertil. Steril.**, **37**:35-40, 1982.
- REBAR, R.W.; MORANDINI, J.C.; BENIRSCHKE, K. - Reduced gonadotropins in athymic mice. Prevention by thymic transplantation. **Endocrinology**, **107**:2130-6, 1980.
- ROSE, E. & PILLSBURY, D.M. - Lupus erythematosus (erythematodes) and ovarian function: observations on a possible relationship, with report of six cases. **Ann. Int. Med.**, **21**:1022-34, 1944.
- RUSSELL, P. & BANNATYNE, P. - **Surgical pathology of the ovaries.** Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989. p.57.
- SAUAIA, H. & LAICINE, E.M. - Vertical slab electrophoresis apparatus. **Anal. Biochem.**, **80**:125-33, 1977.
- SCHERBAUM, W.A. & BERG, P.A. - Development of adrenocortical failure in non-Addisonian patients with antibodies to adrenal cortex. A clinical follow-up study. **Clin. Endocrinol.**, **16**:345-52, 1982.
- SCHILSKY, R.L.; SHERINS, R.J.; HUBBARD, S.M. - Longterm follow-up of ovarian function in women treated for Hodgkin's disease. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **72**:926-31, 1988.

- SCHWIMMER, W.; WHITE, B.; MATTISON, D. - Familial premature menopause: Five cases in three generations (abstr.). In: Twenty-eighth Annual Meeting of the Society for Gynecological Investigation , St. Louis, MO, March 18-21, 1981. **Abstracts**. St. Louis, 1981.
- SEDMAN, D.D.; HART, W.R.; TUBBS, R.R. - Autoimmune oophoritis: a histopathologic study of involved ovaries with immunologic characterization of the mononuclear cell infiltrate. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, 6:73-81, 1987.
- SHEIDEGGER, J.J. - Une micro-méthode liminoélectrophorose. **Intern. Arch. All.**, 7:107-10, 1955.
- SOTSIOU, F.; BOTTAZZO, G.F.; DONIACH, D. - Immunofluorescence studies on autoantibodies to steroid-producing cells, and to germ line cells in endocrine disease and infertility. **Clin. Exp. Immunol.**, 39:97-111, 1980.
- STARUP, J.; PHILIP, J.; SELE, V. - Oestrogen treatment and subsequent pregnancy in two patients with severe hypergonadotrophic ovarian failure. **Acta Endocrinol.**, 89:149-57, 1978.
- STARUP, J. & SELE, V. - Premature ovarian failure. **Acta Obstet. Gynec. Scand.**, 52:259-68, 1973.
- STOTT, D.I. - Immunoblotting and dot blotting. **J. Immunol. Methods**, 119:153-87, 1989.
- TANG, V.W. & FAIMAN, C. - Premature ovarian failure: a search for circulating factors against gonadotropin receptors. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 146:816-21, 1983.

- TOVEY, E.R.; FORD, S.A.; BALDO, B.A. - Protein blotting on nitrocellulose: some important aspects of the resolution and detection of antigens in complex extracts. **J. Biochem. Biophys. Methods.**, 14:1-9, 1987.
- TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. - Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 76:4350-63, 1979.
- VALLOTON, M.B. & FORBES, A.P. - Antibodies to cytoplasm of ova. **Lancet**, ii:264-5, 1966.
- VALLOTON, M.B. & FORBES, A.P. - Autoimmunity in gonadal dysgenesis and klinefelter's syndrome. **Lancet**, i:648-51, 1967.
- VAZQUEZ, A.M. & KENNY, F.M. - Ovarian Failure and antiovarian antibodies in association with hypoparathyroidism moniliasis, and Addison's and Hashimoto's disease. **Obstet. Gynecol.**, 41:414-8, 1973.
- VOLPÉ, R. - Autoimmune thyroid disease. In: VOLPÉ, R. **Autoimmunity and endocrine disease**. New York, Marcel Dekker, 1985. p.109.
- WALFISH, P.G.; GOTTESMAN, I.S.; SHEWCHUK, A.B. - Association of premature ovarian failure with HLA antigens. **Tissue Antigens**, 21:168-71, 1983.
- WHEATCROFT, N.J.; TOOGOOD, A.A.; LI, T.C.; COOKE, I.D.; WEETMAN, A.P. - Detection of antibodies to ovarian antigens in women with premature ovarian failure. **Clin. Exp. Immunol.**, 96:122-8, 1994.
- WHITEHEAD, E.; SHALET, S.M.; BLACKLEDGE, G.; TODD, I.; CROWTHER, D.; BEARDWELL, C.G. - The effect of combination chemotherapy on ovarian function in women treated for Hodgkin's disease. **Cancer**, 52:988-93, 1983.

WILLIAMSON, H.O.; PHANSEY, S.A.; MATHUR, S.; MATHUR, R.S.;
BAKER, E.R.; FUDENBERG, H.H. - Myasthenia gravis, premature
menopause and, thyroid autoimmunity. **Am. J. Obstet. Gynecol.**,
137:893-8, 1980.

WOLFSDORF, J.I.; ROSENFELD, R.L.; FANG, V.S.; KOBAYASHI, R.;
RAZDAN, A.K.; KIM, M.H. - Partial gonadotrophin-resistance in
pseudohypoparathyroidism. **Acta Endocrinol.**, **88**:321-8, 1978.

WRIGHT, C.S.W. & JACOBS, H.S. - Spontaneous pregnancy in a patient with
hypergonadotrophic ovarian failure. **Br. J. Obstet. Gynecol.**, **86**:389-92,
1979.

ZBROJA-SONTAG, W.; SIKORSKI, R.; KADEL, E. - Antibodies to ovarian
antigens in different diseases of the ovary. **Am. J. Reprod. Immunol.**,
2:58-63, 1982.

ZOLLNER, R.L. - Isolamento e identificação de antígenos de membrana basal
pulmonar excretado na urina de ratos normais. Ribeirão Preto. 1990. [Tese
de Doutorado. Universidade de São Paulo]

* HERANI, M.L.G. - Norma para apresentação de dissertações e teses. São
Paulo, Bireme, 1985. 45p.