

ASSOCIAÇÃO ENTRE GRUPOS SANGÜÍNEOS DO SISTEMA ABO E DOENÇA
DE von WILLEBRAND TIPO I

ELIANE BANDINELLI

Dissertação apresentada ao curso
de Bacharelado em Ciências Bioló
gicas da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, para obtenção
do título de Bacharel em Ciên-
cias Biológicas, ênfase Genética.

ORIENTADOR: Prof. RIVO R. FISCHER

Porto Alegre
1988



Aos meus pais, por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Rivo R. Fischer, pela competente orientação, estímulo e amizade.

Ao prof. Israel Roisenberg, pelo estímulo, confiança e amizade.

Aos amigos Cláudia Lerner e André S.K.Fonseca, pela colaboração na obtenção de alguns dados, apoio e carinho.

Ao Alexandre Rieger, pelo estímulo, críticas, sugestões e amizade.

A prof^a.Dr^a. Sídia M. Jacques-Callegari, pela ajuda na parte estatística do trabalho.

Aos demais colegas do laboratório de coagulação, pelo estímulo e amizades dispensados.

A PROPESP, pela concessão da bolsa de iniciação científica.

1.	INTRODUÇÃO	5
1.1.	Doença de von Willebrand e o complexo Fator VIII/ Fator von Willebrand.....	5
1.2.	O sistema ABO de grupo sanguíneo e o VIII/vWF	6
2.	MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1.	Testes laboratoriais.....	9
2.2.	Obtenção do índice de sintomas hemorrágicos (IS) e classificação dos indivíduos em sintomáticos ou assintomáticos	10
2.3.	Classificação das famílias com DvW e métodos de aná lise dos resultados	11
3.	RESULTADOS	13
4.	DISCUSSÃO	20
5.	RESUMO E CONCLUSÕES	23
6.	SUMMARY AND CONCLUSIONS	24
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
	APÊNDICE	29

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de von Willebrand e o complexo Fator VIII/ Fator von Willebrand

Doença de von Willebrand (DvW) é uma designação que engloba os defeitos genéticos relacionados com o Fator von Willebrand (vWF). O vWF constitui juntamente com o Fator VIII, o complexo molecular VIII/vWF, importante na hemostasia.

O vWF é uma glicoproteína plasmática que consiste de uma série de multímeros com peso molecular variando de 500 kDa a mais de 12.000 kDa, mantidos juntos por pontes dissulfídicas (Counts et al., 1978; Perret et al., 1979; Hoyer & Shainoff, 1980). Sua síntese é realizada em células endoteliais (Jaffe et al., 1973) e em megacariócitos (Nachman et al., 1977; Sporn et al., 1985). O gene estrutural que o codifica está localizado no cromossomo 12 (Verweij et al., 1985). A individualização dos multímeros pode ser obtida por análise do vWFag (antígeno do vWF) em SDS-agarose. Esta técnica é importante quando se faz necessária a determinação dos diferentes tipos de DvW e tem boa correlação com um método mais simples de análise que é a imunoeletroforese cruzada (CIE) do vWFag (Howard et al., 1988).

O vWF participa na hemostasia primária mediando a adesão das plaquetas ao subendotélio exposto, o que leva à formação do tampão plaquetário no sítio de lesão vascular. *In vitro*, o vWF é capaz de promover a agregação plaquetária em presença do antibiótico ristocetina, função designada como cofator ristocetina (vWFRC_o) (Howard & Firkin, 1971). Por outro lado, o vWF interfere com a atividade do Fator VIII no mecanismo de coagulação sangüínea.

O Fator VIII é uma glicoproteína codificada por um gene localizado no cromossomo X. A proteína madura possui 2.332 aminoácidos e tem peso molecular de 265 kDa (Vehar et al., 1984). O Fator VIII tem importante atividade na via intrínseca da coagulação sangüínea acelerando a clivagem enzimática do Fator X em Fator X ativado, pela formação de um complexo com íons cálcio, fosfolípídios e Fator IX ativado (Bloom, 1981).

O Fator VIII pode ser identificado pela sua atividade coagulante (VIII:C) no plasma, a qual está reduzida em certos casos de DvW e hemofilia A ou até mesmo ausente nesta última.

No plasma, o Fator VIII e o Fator von Willebrand circulam sob a forma do complexo não covalente VIII/vWF. Detalhes do estudo de Owen e Wagner, (1972) (citado por Hamer et al., 1987) mostraram que forças eletrostáticas e hidrofóbicas estão envolvidas na ligação entre o Fator VIII e vWF.

Weiss et al., (1977) observando que, *in vitro*, a presença de vWF purificado reduzia a taxa de perda de atividade coagulante do Fator VIII a 37°C, propuseram que o vWF teria uma ação estabilizadora sobre o Fator VIII. Como consequência, em indivíduos com níveis muito baixos de vWF há também um decréscimo no nível circulante de VIII:C, mesmo quando existe a capacidade genética de produzir o Fator VIII. É o que acontece em certo tipo de DvW. Entretanto, a assim chamada DvW compreende também outros defeitos relacionados com o vWF. Conforme a natureza destes defeitos, as formas de DvW têm sido assim classificadas:

a) DvW tipo I: caracterizada principalmente por apresentar a quantidade total de vWF diminuída. Alguns subtipos apresentam proporções reduzidas, mas nunca ausentes, dos múltiplos maiores. Até agora, 3 subtipos foram identificados e designados: IA, IB, IC (Hoyer et al., 1983; Ciavarella et al., 1985).

b) DvW tipo II: caracterizada pela ausência, no plasma, dos múltiplos maiores, e em alguns subtipos, também dos intermediários (Ruggeri & Zimmerman, 1980). Subtipos têm sido descritos em função da variação nos padrões de múltiplos no plasma e no vWF plaquetário. São eles: IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, IIG, IIH, todos com padrão de herança autossômica dominante com exceção do subtipo IIC, no qual o padrão é recessivo (Ruggeri & Zimmerman, 1987).

c) DvW tipo III: caracterizada pela ausência ou níveis muito baixos de vWF, tem padrão de herança autossômica recessivo (Zimmerman & Ruggeri, 1987).

1.2. O sistema ABO de grupo sanguíneo e o VIII/vWF

Na população normal, tem sido reiteradamente constatada a associação entre Fator VIII e grupos sanguíneos do sistema ABO, estando os níveis médios deste fator mais reduzidos nos indivíduos do grupo O (Preston & Barr, 1964; Veltkamp et al., 1972; Stormorken & Erikssen, 1977).

Da mesma forma, o achado de proporções aumentadas de indivíduos do grupo A entre os afetados por doenças tromboembólicas e de indivíduos do grupo O entre os afetados por úlcera duodenal hemorrágica foi relacionado com o maior nível médio de Fator VIII nos indivíduos A do que nos indivíduos O (Mourant et al., 1971).

Embora tenha sido constatada a presença de antígenos do sistema ABO em concentrados ricos em VIII/vWF (Sodetz et al., 1979; Mazurier et al., 1981), até o presente momento não há explicação satisfatória sobre a causa da associação entre ABO e Fator VIII.

Entretanto, através do estudo de gêmeos, Ørstavik et al. (1985) verificaram que a menor concentração plasmática de Fator VIII nos indivíduos do grupo O parece decorrer diretamente do nível de vWF e indiretamente do Fator VIII mesmo, sendo o efeito do grupo sanguíneo responsável por 30% e 12% da variação geneticamente determinada nos níveis de vWFAg e de Fator VIII, respectivamente.

Recentemente, constatou-se uma proporção aumentada de indivíduos do grupo O entre os afetados por DvW tipo I, enquanto que nos afetados por DvW tipo II tal distorção não se verificava (Fischer et al., 1987). Este mesmo efeito foi observado por Gill et al. (1987), que também demonstraram que os limites de variação dos níveis de vWFAg não são os mesmos para grandes amostras de indivíduos normais, diferenciadas por grupo sanguíneo. Considerando que um dos principais critérios para o diagnóstico da DvW tipo I é a ocorrência de um nível de vWF inferior ao limite normal, os autores sugeriram que alguns portadores do gene poderiam ter o diagnóstico mascarado em função do grupo sanguíneo. Por outro lado, propõem que certos indivíduos do grupo O com níveis muito baixos de vWF poderiam estar sendo erroneamente classificados como afetados, com base no critério quantitativo, apesar de não serem portadores do gene. Esta suposição, coincidente com a que nos levou ao estudo acima mencionado, ainda carece de confirmação.

Com o objetivo de avaliar esta hipótese, no presente trabalho um total de 107 indivíduos pertencentes a 36 genealogias com ocorrência definitiva de DvW tipo I e de 39 indivíduos

pertencentes a 23 famílias com ocorrência presumível de DvW tipo I, classificados em 0 e não-0 em função do grupo sanguíneo (indivíduos 0 e indivíduos N0) e divididos em sintomáticos e assintomáticos, foram analisados quanto à distribuição dos grupos sanguíneos, aos níveis médios de vWF_{Ag} e VIII:C e à intensidade dos sintomas. Amostras constituídas por 70 pessoas adultas normais (25 homens e 45 mulheres), por 57 hemofílicos A previamente diagnosticados e por 34 membros de 19 genealogias com diagnóstico de DvW tipo II, classificadas pelos mesmos critérios, foram utilizadas como controles para esta análise.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Testes laboratoriais

Para os testes laboratoriais, o sangue foi coletado por punção venosa e misturado com citrato de sódio a 0,13M na proporção de 9 volumes de sangue para 1 volume de anticoagulante. O plasma, pobre em plaquetas, foi obtido por centrifugação a 1.050g, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. O plasma controle liofilizado era uma mistura de plasmas de 16 indivíduos normais obtidos da mesma maneira, cujo pH era ajustado para 7,3 com HEPES antes da liofilização. Admitia-se que este controle continha o nível médio de cada um dos fatores plasmáticos de coagulação. Os testes laboratoriais foram realizados como segue:

a) Dosagem de Fator VIII:C: foi utilizado o método em um estágio, baseado no Tempo de Tromboplastina Parcial ativado pelo caulim (Austen & Rhymes, 1975). Nesta técnica, diferentes diluições de plasma a testar são comparadas com diluições do plasma controle quanto aos tempos necessários para corrigir a atividade coagulante deficiente de um plasma substrato pobre em Fator VIII. O plasma substrato era plasma liofilizado de hemofílico A severamente afetado. O plasma a testar era examinado nas diluições 1/5, 1/10 e 1/20. O plasma controle era testado nas diluições 1/5, 1/10, 1/20 e 1/40, de forma a obter-se uma linha de regressão duplo-logaritmica para a leitura de valores de VIII:C superiores a 12,5% e nas diluições 1/40, 1/100 e 1/500 para a leitura de valores de VIII:C inferiores a 12,5%.

b) Dosagem de vWFAg: a quantificação do vWFAg foi realizada por eletroimunoensaio (EIA) em suporte de gel de agarose imune, segundo a técnica descrita por Zimmerman et al. (1971), porém utilizando tampão tris-tricina pH 8,6 preparado conforme o descrito por Monthony et al. (1978). A agarose foi usada na concentração de 0,8% e o anticorpo heterólogo de coelho a 0,3%. A migração eletroforética era realizada a 2V/cm durante 18 horas aproximadamente.

c) Análise qualitativa do vWFAg: foi realizada por imunoeletroforese cruzada (CIE) conforme Laurell (1965), porém utilizando o tampão tris-tricina acima mencionado. Na primeira dimensão a migração eletroforética era realizada a 7,5 V/cm.

durante 1 hora, sendo que no tampão do gel o pH foi modificado para 9,5 pela eliminação do lactato de cálcio e pela adição de hidróxido de sódio 2N. Na segunda dimensão a migração era realizada a 2V/cm durante 18 horas. A agarose foi utilizada na concentração de 1% em ambas as dimensões e o gel imune usado na segunda dimensão continha uma concentração de 0,3% do anticorpo heterólogo de coelho.

c) Tipagem do grupo sanguíneo ABC: nas amostras recém-coletadas foi realizada pelo método em lâmina, com antisoros comerciais anti-A, anti-B e anti-AB. Nas amostras anteriores a 1985, mantidas a -20°C, foi utilizado o método indireto: a um tubo de ensaio contendo uma gota de suspensão de hemácias de indivíduos de grupo A ou B, lavadas com solução fisiológica, era adicionada uma gota do plasma a tipar; a mistura era centrifugada a 40g durante 4 minutos e logo observada para ocorrência de aglutinação. Plasma controle que havia sido estocado na mesma época e condições, foi utilizado como controle de aglutinação positiva.

2.2. Obtenção do índice de sintomas hemorrágicos (IS) e classificação dos indivíduos em sintomáticos ou assintomáticos

A obtenção do IS foi baseada, parcialmente, no método utilizado por Goldin et al. (1980), segundo o qual cada indivíduo era classificado para presença (valor 1) ou ausência (valor 0) de cada um dos seguintes nove sintomas: S1 = equimoses e/ou hematomas freqüentes; S2 = epistaxes freqüentes em alguma época da vida; S3 = sangramento gengival freqüente e insólito; S4 = distúrbios hemorrágicos relacionados à menstruação; S5 = sangramentos insólitos em extrações dentárias; S6 = sangramentos insólitos em partos ou cirurgias; S7 = transfusões devido a hemorragias; S8 = sangramentos insólitos após ferimentos; S9 = outros episódios hemorrágicos insólitos. Considerando que muitos desses sintomas são dependentes de idade, o escore do indivíduo (somatório dos valores obtidos considerando a presença ou ausência dos referidos sintomas) era multiplicado pelo inverso da sua idade em anos, obtendo-se deste modo o IS individual.

Foram considerados como sintomáticos os indivíduos que apresentavam IS iguais ou superiores a 2 desvios padrão da média de IS dos indivíduos da amostra controle constituída por 70

peessoas adultas normais sem referência prévia, individual ou familiar, de hemorragias anormais e como assintomáticos os indivíduos com IS inferiores a esse limite. Os dados sobre sintomas foram obtidos a partir de uma ficha de entrevista padronizada (vide apêndice 1).

2.3. Classificação das famílias com DvW e métodos de análise dos resultados

Classificação das famílias com DvW: o critério básico de classificação foi a ocorrência de indivíduos sintomáticos, associada com anormalidades no vWFAg.

a) Famílias com DvW tipo I definitivo: eram aquelas nas quais havia pelo menos um indivíduo sintomático testado e pelo menos um indivíduo, não necessariamente o mesmo, com nível de vWFAg inferior ao limite mínimo da amostra de indivíduos normais.

b) Famílias com DvW tipo I presumível: eram aquelas onde havia pelo menos um indivíduo sintomático testado que apresentava nível de vWFAg na faixa que ia do limite inferior da amostra de indivíduos normais até 1 desvio padrão abaixo da média desta amostra, além de haver recorrência familiar e estando excluídas outras doenças hemorrágicas.

c) Famílias com DvW tipo II: eram aquelas onde havia pelo menos um indivíduo sintomático e pelo menos um indivíduo que apresentava um padrão de CIE anormal, estando o arco de precipitina deslocado anodicamente em relação ao do plasma controle.

Para a análise e comparações com as amostras controle, os membros de famílias com DvW tipo I, sempre divididos em O e NO, foram agrupados em função de diferentes critérios, a saber: sintomáticos e assintomáticos; com vWFAg reduzido e normal; sintomáticos com vWFAg reduzido e assintomáticos com vWFAg normal. As comparações das distribuições de O e NO foram analisadas por testes de qui-quadrado. As médias de vWFAg e de VIII:C foram comparadas pelo teste t, visto que estes níveis têm distribuição normal na população. As médias de IS foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney porque sua distribuição não era normal. A verificação da normalidade das distribuições de vWFAg, VIII:C e IS, bem como os testes de médias, foram realizados em

computador, conforme o programa NCSS (Number Cruncher Statistical System).

3. RESULTADOS

A amostra controle de 70 pessoas normais era constituída por 27 indivíduos do grupo O e 43 NO. O nível médio e o desvio padrão de vWFAg foram $103\% \pm 28\%$, variando de 50% a 175%. O nível médio de VIII:C e o desvio padrão foram $103\% \pm 31\%$, com variação de 41% a 189,5%. A correlação entre os níveis de VIII:C e vWFAg foi significativa ($r=0,85$), porém o IS não apresentou correlação com VIII:C ou vWFAg. A média e o desvio padrão do IS desta amostra foram $1,8 \pm 3,0$, com variação de zero a 14,29. Conseqüentemente, o valor de $IS = 8,0$ foi estabelecido como limite de discriminação entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos, sendo que três indivíduos normais apresentaram IS que ultrapassavam este limite.

Em vista dos resultados da amostra de normais, o critério usado para classificar uma família como DvW tipo I definitivo foi o da ocorrência concomitante de indivíduo(s) com vWFAg em nível inferior a 50% e de indivíduo(s) sintomático(s). Por outro lado, o critério para classificar uma família como DvW tipo I presumível foi o da ocorrência de indivíduo(s) sintomático(s) apresentando vWFAg em nível situado entre 50% e 74%, mais o registro de recorrência familiar de sintomas hemorrágicos insólitos.

A amostra controle de hemofílicos A era constituída por 57 indivíduos. O nível médio de vWFAg e o desvio padrão foram $137\% \pm 59\%$, com variação de 41% a 348%. A média foi significativamente mais elevada do que a média de vWFAg do grupo de indivíduos normais. O nível médio e o desvio padrão para VIII:C foram de $5\% \pm 7,5\%$, com variação de $< 1\%$ a 42%. Não havia correlação significativa entre os níveis de VIII:C e vWFAg. Os IS não foram considerados para este grupo uma vez que a etiologia e a sintomatologia da hemofilia A e da DvW não são equiparáveis.

A amostra controle de DvW tipo II era constituída por 34 indivíduos pertencentes a 19 famílias, sendo que 21 sintomáticos e 13 assintomáticos. O nível médio de vWFAg foi 82,5% com desvio padrão de 61% e variação de 9,5% a 359%. O nível médio de VIII:C foi 83% com desvio de 31% e varia-

ção de 33,5% a 155,5%. O IS médio foi 21,19 com desvio de 23,43 e variação de zero a 100,0. Foi observada correlação significativa entre os níveis de vWFAg e VIII:C ($r=0,71$) e entre IS e nível de VIII:C ($r=-0,42$).

Dos 107 indivíduos pertencentes a 36 genealogias com DvW tipo I definitivo, 65 foram classificados como sintomáticos e 42 como assintomáticos. Na amostra total o nível médio de vWFAg foi de 61% com desvio padrão de 40% e variação de 7% a 226,5%. O nível médio de VIII:C e o desvio padrão foram $71\% \pm 33\%$, com variação de 25,5% a 280%. A média e o desvio padrão de IS foram $23,87 \pm 47,16$ e variação de zero a 300. Havia correlação significativa entre os níveis de vWFAg e VIII:C ($r=0,67$) e entre nível de vWFAg e IS ($r=-0,22$). As correlações entre os níveis de vWFAg e VIII:C foram significativas tanto para os sintomáticos ($r=0,53$), quanto para os assintomáticos ($r=0,69$).

Dos 39 indivíduos pertencentes a 23 famílias com DvW tipo I presumível, 32 indivíduos eram sintomáticos e 7 eram assintomáticos. O nível médio e o desvio padrão do vWFAg desta amostra foram $76\% \pm 23\%$, com variação de 51% a 155,5%. A média e o desvio padrão de VIII:C foram $76\% \pm 21\%$ e a variação de 18% a 128%. A média e o desvio padrão do IS foram 19 ± 15 , com variação de zero a 75. Esta amostra não apresentou nenhuma correlação significativa entre vWFAg, VIII:C e IS. Igualmente, não havia correlações significativas entre vWFAg, VIII:C e IS dentro das amostras de sintomáticos e de assintomáticos.

A proporção sexual nas várias amostras examinadas, excluída a amostra de hemofílicos A, não apresentou diferenças significativas ($\chi^2=1,48$; $0,50 < P < 0,70$).

A tabela I mostra a distribuição dos indivíduos pertencentes às diversas amostras examinadas, em função do grupo sanguíneo. As freqüências de indivíduos O e NO nestas amostras foram comparadas com as freqüências equivalentes da amostra controle de indivíduos normais. As freqüências de O e NO nesta amostra de normais, por sua vez, não diferiam da população local.

Os testes de heterogeneidade para a distribuição dos grupos O e NO nas várias amostras examinadas, tanto nas famílias com DvW tipo I definitivo quanto em DvW tipo I total, não apresenta -

TABELA I: Proporção de grupos sanguíneos nas diversas amostras examinadas, em relação ao controle de indivíduos normais.

Amostra	O		NO		X ²	P
	N	%	N	%		
Indivíduos Normais	27	38,5	43	61,5	-	-
Hemofílicos A	24	42,0	33	58,0	0,132	> 0,99
Fam. DvW tipo II						
Sintomáticos	10	47,5	11	52,5	0,573	0,30-0,50
Assintomáticos	7	63,5	6	36,5	0,839	0,30-0,50
Fam. DvW tipo I def.						
Sintomáticos	49	75,5	16	24,5	18,550	< 0,001
Assintomáticos	28	66,5	14	33,5	8,560	0,01-0,02
vWFAg reduzido	43	78,0	12	22,0	18,970	< 0,001
vWFAg normal	33	66,0	17	34,0	8,780	0,001-0,01
Sint. vWFAg reduz.	33	76,5	10	23,5	15,080	< 0,001
Assint. vWFAg norm.	17	60,5	11	39,5	4,080	0,02-0,05
Fam. DvW tipo I pres.						
Sintomáticos	26	81,5	6	18,5	16,450	< 0,001
Assintomáticos	5	71,5	2	28,5	2,560	0,10-0,20
Fam. DvW tipo I total						
Sintomáticos	75	77,5	22	22,5	26,450	< 0,001
Assintomáticos	33	67,5	16	32,5	8,880	0,001-0,01
vWFAg reduzido	43	78,0	12	22,0	18,970	< 0,001
vWFAg normal	64	72,0	25	28,0	17,610	< 0,001
Sint. vWFAg reduz.	33	76,5	10	23,5	15,070	< 0,001
Assint.vWFAg norm.	22	63,0	13	37,0	5,190	0,02-0,05

ram valores significativos ($\chi^2=3,262$; $0,1 < P < 0,2$ e $\chi^2= 0,568$; $0,7 < P < 0,8$, respectivamente).

Das famílias com DvW tipo I foram selecionadas 11, sendo 9 definitivas e 2 presumíveis, nas quais havia, concomitantemente, pelo menos um indivíduo O e outro NO e pelo menos um sintomático e outro assintomático. Nestas famílias foram observados 23 sintomáticos O e 10 NO e 11 assintomáticos O e 10 NO. O excesso de sintomáticos O dentro destas famílias foi significativo ($\chi^2= 5,01$; $0,02 < P < 0,05$). A distribuição de grupos sanguíneos entre os assintomáticos não diferia da amostra de normais ($\chi^2=1,27$; $0,2 < P < 0,3$) mas nos sintomáticos a proporção de O estava aumentada ($\chi^2= 15,19$; $P < 0,001$).

A tabela II mostra os níveis médios de vWFAg dos indivíduos das diversas amostras examinadas, separados por grupos sanguíneos, e as comparações dos níveis médio dos indivíduos O com os dos NO.

A tabela III mostra os níveis médios de VIII:C dos indivíduos das diversas amostras examinadas, separadas por grupos sanguíneos, e a comparação dos níveis médios dos indivíduos O com os dos NO.

A tabela IV mostra os IS médios dos indivíduos das diversas amostras examinadas, separadas por grupos sanguíneos, e a comparação, por teste U de Mann-Whitney, dos IS médios dos indivíduos O com dos NO.

TABELA II: Níveis médios de vWFAg nos indivíduos O e NO das diversas amostras examinadas.

Amostra	O			NO			t	P
	N	\bar{X}	s	N	\bar{X}	s		
Indivíduos Normais	27	87,0	21,5	43	112,5	28,0	-4,09	0,0001
Hemofílicos A	24	110,5	45,5	33	157,0	61,0	-3,15	0,0026
Fam. DvW tipo II								
Sintomáticos	10	67,5	23,5	11	61,0	36,0	0,46	0,6524
Assintomáticos	7	67,0	22,5	6	166,0	100,5	-2,37	0,0555
Fam. DvW tipo I def.								
Sintomáticos	49	48,5	24,0	16	64,5	53,5	-1,17	0,2591
Assintomáticos	28	77,0	48,5	14	92,5	58,5	-0,91	0,3666
vWFAg reduzido	43	35,0	9,5	12	28,0	16,5	1,32	0,2070
vWFAg normal	33	91,5	35,5	17	117,0	43,0	-2,21	0,0315
Sint. vWFAg reduz.	33	34,0	10,0	10	30,0	17,5	0,73	0,4803
Assint. vWFAg norm.	17	103,5	45,0	11	113,5	46,5	-0,56	0,5788
Fam. DvW tipo I pres.								
Sintomáticos	26	69,0	18,0	6	76,5	10,0	-0,97	0,3383
Assintomáticos	5	85,5	13,5	2	138,0	24,5	-3,90	0,0114
Fam. DvW tipo I total								
Sintomáticos	75	55,5	24,0	22	68,0	45,5	-1,21	0,2374
Assintomáticos	33	78,0	45,0	16	98,0	57,0	-1,33	0,1881
vWFAg reduzido	43	35,0	9,5	12	29,0	16,5	1,32	0,2070
vWFAg normal	64	82,0	30,0	25	109,0	40,5	-3,01	0,0047
Sint. vWFAg reduz.	33	34,0	10,0	10	30,0	17,5	0,73	0,4803
Assint. vWFAg norm.	22	99,5	40,5	13	117,5	44,0	-1,20	0,2304

TABELA III: Níveis médios de VIII:C nos indivíduos O e NO das diversas amostras examinadas.

Amostra	O			NO			t	P
	N	\bar{X}	s	N	\bar{X}	s		
Indivíduos Normais	27	86,5	25,5	43	113,5	30,0	-3,87	0,0002
Hemofílicos A	24	6,0	10,5	33	4,5	4,0	0,67	0,5054
Fam. DvW tipo II								
Sintomáticos	10	78,0	23,5	11	67,5	32,5	0,83	0,4146
Assintomáticos	7	86,5	16,0	6	115,5	33,0	-2,05	0,0646
Fam. DvW tipo I def.								
Sintomáticos	49	60,5	22,5	15	67,0	23,0	-0,92	0,3615
Assintomáticos	27	83,5	45,0	13	87,5	36,0	-0,27	0,7881
vWFAg reduzido	42	56,0	18,0	12	55,0	18,5	0,22	0,8269
vWFAg normal	33	86,0	42,0	15	96,5	25,0	-1,09	0,2790
Sint. vWFAg reduz.	33	54,0	17,5	10	57,5	17,5	-0,51	0,6145
Assint. vWFAg norm.	17	96,5	51,0	10	102,0	25,5	-0,35	0,7311
Fam. DvW tipo I pres.								
Sintomáticos	26	70,5	20,5	6	85,0	12,5	-1,70	0,1039
Assintomáticos	5	89,5	25,5	2	84,5	30,5	0,22	0,8347
Fam. DvW tipo I total								
Sintomáticos	75	64,0	22,0	21	72,0	22,0	-1,45	0,1479
Assintomáticos	32	84,5	42,5	15	87,0	34,5	-0,20	0,8381
vWFAg reduzido	42	56,0	18,5	12	55,0	18,5	0,22	0,8269
vWFAg normal	64	80,0	34,0	23	92,5	22,5	-1,99	0,0503
Sint. vWFAg reduz.	33	54,0	17,5	10	57,5	17,5	-0,51	0,6128
Assint. vWFAg norm.	22	95,0	46,0	12	99,0	26,0	-0,32	0,7531

TABELA IV: Níveis médios de IS nos indivíduos O e NO das diversas amostras examinadas.

Amostra	O			NO			z	P
	N	\bar{X}	s	N	\bar{X}	s		
Indivíduos Normais	27	1,53	3,2	43	1,64	2,6	-0,543	0,5872
Fam. DvW tipo II								
Sintomáticos	10	34,23	27,9	11	30,50	20,3	0,0	1,0000
Assintomáticos	7	3,96	3,06	6	2,36	2,0	1,0	0,3170
Fam. DvW tipo I def.								
Sintomáticos	49	41,0	63,50	16	23,87	15,5	0,548	0,5835
Assintomáticos	28	2,93	2,70	14	1,23	2,2	1,840	0,0656
vWFAg reduzido	43	36,76	64,0	12	21,39	19,0	0,478	0,6320
vWFAg normal	33	15,50	35,0	17	7,10	11,0	1,495	0,1349
Sint. vWFAg reduz.	33	46,65	70,0	10	26,50	18,0	0,532	0,5948
Assint. vWFAg norm.	17	2,01	2,4	11	0,370	1,2	1,670	0,0949
Fam. DvW tipo I pres.								
Sintomáticos	26	21,80	10,7	6	27,50	24,0	-0,220	0,8280
Assintomáticos	5	2,64	2,4	2	3,57	5,0	0,387	0,6985
Fam. DvW tipo I total								
Sintomáticos	75	34,5	52,0	22	25,00	17,5	0,271	0,7861
Assintomáticos	33	2,88	2,5	16	1,50	2,5	1,652	0,0985
vWFAg reduzido	43	36,50	64,0	12	21,50	19,0	0,479	0,6320
vWFAg normal	64	17,0	26,0	25	12,00	17,0	1,661	0,0966
Sint. vWFAg reduz.	33	46,5	70,0	10	26,50	18,0	0,532	0,5948
Assint. vWFAg norm.	22	2,15	2,3	13	0,86	2,2	1,553	0,1203

4. DISCUSSÃO

Os resultados da Tabela I mostram um aumento significativo na freqüência de indivíduos **O** nas famílias de DvW tipo I. Tal aumento não foi observado nas amostras de hemofílicos A ou de famílias DvW tipo II e, portanto, parece estar relacionado somente com os defeitos genéticos envolvidos na DvW tipo I. Entretanto, nas famílias com DvW tipo I o excesso de grupo **O** também foi observado nas amostras de assintomáticos, o que sugere que esta doença se manifestou preferencialmente em famílias onde predominavam indivíduos do grupo **O**. O excesso de **O** entre os assintomáticos poderia, então, ser explicado por um simples efeito de averiguação, isto é, se o probando é **O** a probabilidade de serem encontrados consangüíneos **O** estaria aumentada. Para esclarecer esta questão, foram analisadas apenas as 11 famílias com DvW tipo I selecionadas por apresentarem, concomitantemente, pelo menos um indivíduo sintomático e um assintomático e pelo menos um **O** e outro **NO**. No teste de associação, observou-se um excesso significativo de indivíduos **O** entre os sintomáticos. Quando comparada com a amostra de normais, a proporção de **O** e **NO** nos assintomáticos não diferia significativamente, mas nos sintomáticos havia um aumento altamente significativo do grupo **O**. Tais resultados sugerem que, dentro das famílias com DvW tipo I onde também ocorrem outros grupos sangüíneos, os portadores sintomáticos são, preferencialmente, os do grupo **O**.

Os resultados das Tabelas II e III mostram um efeito conforme o esperado, do grupo sangüíneo sobre os níveis de VIII:C e vWFAg na amostra de normais, e de vWFAg na de hemofílicos. De modo geral, nas famílias com DvW observa-se que, quando se consideram valores de vWFAg ou VIII:C que estão na faixa dos níveis médios normais, há uma tendência de as médias dos indivíduos **O** serem mais baixas do que as dos **NO**, ainda que em muitos casos as diferenças não sejam significativas. No que diz respeito aos indivíduos sintomáticos, não foram observados efeitos significativos do grupo sangüíneo sobre os níveis médios de VIII:C ou vWFAg embora, em alguns casos, uma tendência na direção esperada pudesse ser percebida. Especificamente, quando

se consideram aquelas amostras nas quais o vWFAg médio é reduzido, não se percebe qualquer efeito, ou tendência, de grupo sanguíneo. Assim, o predomínio do grupo sanguíneo O nas famílias onde se expressa a DvW tipo I e a tendência de os indivíduos O expressarem os sintomas da DvW tipo I mais frequentemente do que os NO não puderam ser explicados pelos efeitos do grupo sanguíneo em relação aos níveis de VIII:C e vWFAg.

Quanto aos resultados da Tabela IV, embora se verifique uma tendência geral de os níveis médios de IS dos indivíduos O serem maiores do que os dos NO, as diferenças não foram significativas.

Os estudos de associação entre grupos sanguíneos ABO e doenças têm gerado controvérsias não só devido às dificuldades em encontrar as bases fisiológicas para tais associações mas também pelos problemas metodológicos envolvidos (Vogel, 1970; Wiener, 1970; Mourant et al., 1978). Quanto ao presente trabalho, porém, vale lembrar que o efeito do ABO em relação à DvW tipo I também foi referido por outros autores (Gill et al., 1987; Rodeghiero et al., 1987).

Entretanto, a hipótese de que a DvW tipo I se manifestaria preferencialmente em indivíduos O por efeito deste grupo sanguíneo na redução dos níveis de VIII/vWF não foi confirmada em nossos resultados. Ainda assim, poderia ser especulado que para um portador do gene para DvW ser sintomático ele devesse ter o VIII/vWF reduzido abaixo de um determinado nível; este nível seria atingido frequentemente pelos heterozigotos O e mais raramente por heterozigotos NO. Dois fatos parecem contradizer essa especulação. Primeiramente, porque a ampla variabilidade de resultados laboratoriais, inclusive intrafamiliares, entre os afetados por DvW tipo I, já referida por Miller et al. (1979) e Abildgaard et al. (1980), demonstra que a apresentação de sintomas não depende simplesmente dos níveis de VIII/vWF. Em segundo lugar, porque também em nossa amostra de DvW tipo I presumível ocorreu um excesso de indivíduos O entre os sintomáticos, apesar de nesta amostra todos os afetados terem níveis de vWFAg dentro dos limites normais.

Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que os sintomas da DvW tipo I ocorrem mais frequen-

temente nos portadores do gene que são do grupo **O** do que nos **NO**, e que há mais indivíduos sintomáticos nas famílias com DvW tipo I em que predomina o grupo **O**. Entretanto, os sintomas apresentados pelos afetados **O** não são significativamente mais intensos do que os apresentados pelos afetados **NO**. O efeito do grupo sanguíneo sobre a expressão dos sintomas não parece estar relacionado com os níveis de VIII/vWF apresentados pelo portador do gene anormal, mas com alguma outra causa a esclarecer. Também fica por esclarecer se o que ocorre em relação à expressão dos sintomas é um efeito de potencialização nos heterozigotos que são do grupo **O**, ou um efeito de proteção nos heterozigotos que são **NO**.

De qualquer modo, o efeito do sistema ABO parece ser tão relevante para a epidemiologia da DvW tipo I que não pode deixar de ser levado em consideração. A frequência de heterozigotos para o gene da DvW tipo I poderia ser maior do que a reconhecida atualmente e a variabilidade de expressão e penetrância em portadores do gene poderia ser parcialmente explicada.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Um aumento na frequência do grupo sanguíneo O entre afetados por Doença de von Willebrand tipo I (DvW tipo I) foi previamente observado e resultados similares foram verificados em dois outros estudos com esta abordagem, ambos recentes. Como na população normal os níveis médios de fator von Willebrand e de Fator VIII são significativamente mais baixos nos indivíduos do grupo sanguíneo O do que nos não-O(NO) e na Doença de von Willebrand tipo I ocorre redução dos níveis destes fatores, foi formulada a hipótese de que portadores do gene para DvW tipo I do grupo O são mais frequentemente sintomáticos do que os NO porque têm níveis de Fator von Willebrand e Fator VIII mais reduzidos. Para averiguar tal hipótese, 146 indivíduos de famílias com DvW tipo I, classificados em O e NO e divididos em sintomáticos e assintomáticos, foram examinados quanto ao grupo sanguíneo, níveis médios de Fator von Willebrand e de Fator VIII e intensidade de sintomas. Amostras constituídas por pessoas adultas normais, por hemofílicos A e por membros de famílias com DvW tipo II foram utilizadas como controles. As principais constatações foram as seguintes:

1- Os sintomas de DvW tipo I ocorrem mais frequentemente nos portadores do gene que são do grupo O e há mais indivíduos sintomáticos nas famílias com DvW onde o grupo O é predominante.

2- Os sintomas apresentados pelos afetados O não são mais intensos do que os dos NO.

3- O efeito do grupo sanguíneo sobre a expressão dos sintomas não está relacionado com os níveis de Fator von Willebrand ou Fator VIII.

4- O efeito do ABO poderia estar causando uma subestimativa da frequência de heterozigotos para a DvW tipo I.

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

An increase in O blood group frequency among subjects with type I von Willebrand's disease (vWd) had been previously observed and similar results were provided by the only two other papers with this approach, both recent. Since in the normal population the mean levels of von Willebrand factor and of factor VIII are significantly lower in O blood group than in non-O (NO) and since in type I vWd there is a decrease in these factors levels, the hypothesis was formulated that the carriers of type I vWd gene who belong to O group are more frequently symptomatic than the carries that are NO, because their levels of von Willebrand factor and of factor VIII are more reduced. In order to verify such hypothesis, 146 members of families with type I vWd, classified as O and NO and divided into symptomatic and asymptomatic, were examined as to blood group, mean levels of von Willebrand factor and factor VIII and symptoms intensity. Samples of normal adult persons, of A hemophiliacs and of members of families with type II vWd were used as controls. The main findings were as follows:

1-The occurrence of type I vWd symptoms is more frequent in those gene carriers that belong to group O and there are more symptomatic individuals in those vWd families in which the O group is predominant.

2- The symptoms of the O group affected subjects are not more intense than those of the NO affected.

3- The blood group effect upon the symptoms expression is not related with the levels of von Willebrand factor or factor VIII.

4- The ABO effect could be causing a subestimate in the frequency of heterozygotes for type I vWd.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABILDGAARD, C.F.; SUZUKI, Z.; HARRISON, J.; JEFcoat, K.; ZIMMERMAN, T.S. (1980) Serial studies in von Willebrand's disease: variability versus "variants". *Blood*, **56**:712-716.
- AUSTEN, D.E.G. & RHYMES, I.L. (1975) *A laboratory manual of blood coagulation*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, p.53-54.
- BLOOM, A.L. (1981) Inherited disorders of blood coagulation. In: BLOOM, A.L. & THOMAS, D.P. *Haemostasis and Thrombosis*. London, Churchill Livingstone. cap.20, p.321-370.
- CIAVARELLA, G.; CIAVARELLA, N.; ANTONCECCHI, S.; De MATTIA, D.; RANIERI, P.; DENT, J.; ZIMMERMAN, T.S.; RUGGERI, Z.M. (1985) High-resolution analysis of von Willebrand factor multimeric composition defines a new variant of type I von Willebrand's disease with aberrant structure but presence of all size multimers (type IC). *Blood*, **66**:1423-1429.
- COUNTS, R.B.; PASKEL, S.L.; ELGEE, S.K. (1978) Disulfide bonds and the quaternary structure of factor VIII/ von Willebrand factor. *The Journal of Clinical Investigation*, **62**:702-709.
- FISCHER, R.R.; BANDINELLI, E.; ROISENBERG, I. (1987) Associação entre sistema ABO e Doença de von Willebrand. *Ciência e cultura (supl.)* **39**: 790 (Abst.).
- GOLDIN, L.R.; ELSTON, R.C.; GRAHAM, J.B.; MILLER, C.H. (1980) Genetic analysis of von Willebrand's disease in two large pedigrees: a multivariate approach. *American Journal of Medical Genetics*, **7**: 279-293.
- HOWARD, M.A. & FIRKIN, B.G. (1971) Ristocetin - A new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica*, **26**: 632-369.
- HOWARD, M.A., OATES, A., FIRKIN, B.G. (1988) Comparison of two dimensional immunoelectrophoresis and multimer analysis in the study of von Willebrand factor. *Journal of Clinical Pathology*, **41**: 346-352.
- HOYER, L.W. & SHAINOFF, J.R. (1980) Factor VIII-related protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimers. *Blood*, **55**: 1056-1059.

HOYER, L.W.; RIZZA, C.R.; TUDDENHAM, E.G.D.; CARTA, C.A.; ARMITAGE, H.; ROTBLAT, F. (1983) von Willebrand factor multimer patterns in von Willebrand's disease. **British Journal of Haematology**, 55:493-507.

JAFFE, E.A.; HOYER, L.W.; NACHMAN, R.L. (1973) Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, 52:2757-2764.

LAURELL, C.B. (1965) Antigen-antibody crossed electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, 10: 358-361.

MAZURIER, C.; SAMOR, B.; MANNESSIER, L.; PARKET-GERNEZ, A.; GOUDEMAM, M. (1981) Blood group A and B activity associated with factor VIII-von Willebrand factor. **Blood Transfusion and Immunohaematology**, 24:289-297.

MILLER, C.H.; GRAHAM, J.B.; GOLDIN, L.R.; ELSTON, R.C. (1979) Genetics of classic von Willebrand's disease.I. Phenotypic variation within families. **Blood**, 54:117-136.

MONTHONY, J.F.; WALLACE, E.G.; ALLEN, D.M. (1978) A non-barbital buffer for immunoelectrophoresis in agarose gels. **Clinical Chemistry**, 24:1825-1827.

MOURANT, A.E.; KOPEĆ, A.C.; SOBCZAK, K.D. (1971) Blood groups and blood-clotting. **The Lancet**, 1:223-228.

MOURANT, A.E.; KOPEĆ, A.C.; DOMANIESWSKA-SOBCZAK, K. (1978) **Blood Groups and Diseases**. Oxford, Oxford University Press, p.1-3 e 59-63.

NACHMAN, R.; LEVINE, R.; JAFFE, E.A. (1977) Cultured guinea pig megakaryocytes. **The Journal of Clinical Investigation** 60:914-921.

ØRSTAVIK, K.H.; MAGNUS, P.; REISNER, H., BERG, K.; GRAHAM, J.B.; NANCE, W. (1985) Factor VIII and factor IX in a twin population. Evidence for a major effect of ABO locus on factor VIII level. **American Journal of Human Genetics**, 37:89-101.

OWEN, W.G. & WAGNER, R.H. (1972) **Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica**, 27: 502-515. Citado por: HAMER, R.J; KOEDAN, J.A.; BEESER-VISSER, N.H.; BERTINA, R.M.; von MOURIK, J.A.; SIXMA, J.J. (1987) Factor VIII binds to von Willebrand factor via its M_r -80.000 light chain. **European Journal of Biochemistry**, 166: 37-43.

PERRET, B.A.; FURLAN, M.; BECK, E.A. (1979) studies on factor VIII-related protein.II.Estimation of molecular size differences between factor VIII oligomers.**Biochimica et Biophysica Acta**, 578:164-174.

- PRESTON, A.E. & BARR, A. (1964) The plasma concentration of factor VIII in the normal population. The effects of age, sex and blood group. **British Journal of Haematology**, **10**:238-245.
- RODEGHIERO, F.; CASTAMAN, G.; DINI, E. (1987) Epidemiological investigation of prevalence of von Willebrand's disease. **Blood**, **69**:454-459.
- RUGGERI, Z.M.; & ZIMMERMAN, T.S. (1980) Variant von Willebrand's Disease. **Journal of Clinical Investigation**, **65**:1328-1325.
- RUGGERI, Z. M. & ZIMMENMAN, T.S. (1987) Classification of von Willebrand disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, **1**:353-362.
- SODETZ, J. M.; PAULSON, J.C.; Mc KEE, P.A. (1979) Carbohydrate composition and identification of blood group A, B and H oligosaccharide structures on human factor VIII/von Willebrand factor. **Journal of Biological Chemistry**, **254**: 10754-10760.
- SPORN, L.A.; CHAVIN, S.I.; MARDER, V.I.; WAGNER, D.D. (1985) Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, **76**:1102-1106.
- STORMORKEN, H. & ERIKSSSEN, J. (1977) Plasma antithrombin III and factor VIII antigen in relation to angiographic findings, angina and blood groups in middle-aged men. **Thrombosis and Haemostasis**, **38**: 864-880.
- VEHAR, G.A.; KEYT, B.; EATON, D.; RODRIGUEZ, H.; O'BRIEN, D.P.; ROTBLAT, F.; OPPERMAN, H.; KECK, R.; WOOD, W.I.; HARKINS, R.N.; TUDDENHAM, E.G.D.; LAWN, R.M., CAPON, D.I. (1984) Structure of human factor VIII. **Nature**, **312**:337-342.
- VELTKAMP, J.J.; MAYO, O.; MOTULSKY, A.G.; FRASER, G.R. (1972) Blood coagulation factors I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI, and XII in twins. **Human Heredity**, **22**:102-117
- VERWEIJ, C.L.; de VRIES, C.J.M.; DISTEL, B.; van ZONNEVELD, A.J.; van KESSEL, A.G.; van MOURIK, J.A.; PANNEKOEK, H. (1985) Construction of cDNA coding for human von Willebrand-factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene. **Nucleic Acids Research**, **13**:4699-4717.
- VOGEL, E. (1970) ABO blood groups and disease. **American Journal of Human Genetics**, **22**:464-475.

- WEISS, H.J.; SUSSMAN, I.I.; HOYER, L.W. (1977) Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. **The Journal of Clinical Investigation**, 60:390-404.
- WIENER, A.S. (1970) Blood groups and disease. **American Journal of Human Genetics**, 22: 476-483.
- ZIMMERMAN, T.S. & RUGGERI, Z.M. (1987) von Willebrand disease. **Human Pathology**, 18:140-152.
- ZIMMERMAN, T.S.; RATNOFF, O.D.; POWELL, A.E. (1971) Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease. **The Journal of Clinical Investigation**, 50: 244-254.

APÊNDICE 1

- NOME:.....Genealogia:....
1. QUEDA DO CORDÃO UMBILICAL
 sem hemorragia com hemorragia sem informação
 2. PRIMEIRA MANIFESTAÇÃO HEMORRÁGICA
 Idade:.....Tipo:.....
 3. QUEDA DA 1ª DENTIÇÃO
 Espontânea: com hemorragia sem hemorragia
 Traumática: com hemorragia sem hemorragia
 4. DENTIÇÃO DEFINITIVA
 Quantos extraiu?.....Quantos com hemorragia?.....
 Imediatamente após a extração?.....Duração:.....
 5. EQUIMOSSES
 Freqüência: inexistentes anuais mensais
 semanais
 Causas: espontâneas traumáticas
 Idade (período) predominante:.....
 6. HEMATOMAS
 Freqüência: inexistentes anuais mensais
 semanais
 Causas: espontâneas traumáticas
 Idade (período) predominante:.....
 7. HEMARTROSES
 Freqüência: inexistentes anuais mensais
 semanais
 Causas: espontâneas traumáticas
 Idade (período) predominante:.....
 8. ARTRALGIAS
 Freqüência: inexistentes anuais mensais
 semanais
 Causas: espontâneas traumáticas
 Idade (período) predominante:.....
 9. EPISTAXES ESPONTÂNEAS
 Freqüência: inexistentes anuais mensais
 Período do dia: diurnas noturnas
 Estação do ano predominante:.....
 Idade (período) predominante:.....
 10. GENGIVORRAGIAS
 Freqüência: inexistentes anuais mensais
 semanais
 Causas:.....

11. HEMATÚRIA
 não sim Especificar.....
12. MELENA
 não sim Especificar.....
13. HEMATEMESE
 não sim Especificar.....
14. CORTES E FERIMENTOS SUPERFICIAIS
 Sangramento: normal prolongado
 Especificar.....
15. CIRURGIAS E SUTURAS
 Quantas?.....Hemorragia em quantas?.....
 Especificar.....
16. OUTRAS HEMORRAGIAS:.....
17. TRANSFUSÕES
 não sim Total.....Causas.....
18. HEMORRAGIAS GINECOLÓGICAS
 Período de uso de ACO.....
 Menarca aos.....anos Menopausa aos.....anos
 Duração da menstruação....dias Intensidade: normal
 anormal
 Total de gestações:.... A termo.....Com hemorragia.....
 Abortamentos...Com hemorragia..
 Outras hemorragias ginecológicas.....