

## DIAGNOSTICO NEONATAL DE ALFA-TALASEMIA EN POBLACION CAUCASICA

*German F. Sáenz\**, *Enrique Blanco\*\**, *Javier Jiménez\**, *Gerardo Montero\**,  
*Eliécer Valenciano \**, *Guido Arroyo \**, *Evangelista Sánchez\**

### Resumen

*En 671 muestras de cordón umbilical de niños recién nacidos a término de población caucásica o caucasoide del área de Cartago, se pudo constatar una frecuencia de 2,53 por ciento de hemoglobina Bart, presuntivamente relacionada con casos no homogéneos de alfa-talasemia. Se comenta la genética molecular de las alfa-talasemias y el valor diagnóstico de los niveles de la hemoglobina Bart al nacimiento por diversas técnicas electroforéticas, siendo la más sensible el gel de almidón con tampón a pH alcalino. En una de tres familias estudiadas, pudo confirmarse la existencia de alfa talasemia en un propositus de 14 meses que al nacimiento mostró hemoglobina Bart de aproximadamente un 4 por ciento. (Rev Cost Cienc Méd Dic 1980; 1(2): 97- 104).*

### Introducción

El diagnóstico prenatal y neonatal de errores innatos del metabolismo se ha convertido en práctica diaria en centros médicos de pediatría de países desarrollados. La justificación de estas investigaciones es un hecho indiscutible por sus alcances médicos y genéticos, pues un diagnóstico precoz de enfermedades genéticas ofrece una oportunidad insoslayable para el tratamiento temprano y el abordaje adecuado hacia la prevención de casos ulteriores a través del consejo genético (36). Para el diagnóstico prenatal de talasemia los procedimientos comprenden la obtención de sangre fetal y su incubación con leucina marcada a fin de determinar posteriormente las cantidades relativas de síntesis de cadenas alfa, beta y gamma (1, 2, 5, 7, 8, 18, 21). Recientemente se ha utilizado el extraordinario método de hibridación con cDNA—DNA con DNA de fibroblastos obtenidos de líquido amniótico para el diagnóstico antenatal de alfa-talasemia (16, 22, 25, 43), así como de beta talasemia y hemoglobina S (20).

Estos procedimientos biosintéticos han servido no sólo para la elucidación de trastornos hereditarios de gran importancia clínica, sino también --en el caso de las talasemias— para la demostración del número de genes comprometidos en la síntesis de determinadas proteínas (19, 22, 28, 38).

Al margen de tan relevantes investigaciones prenatales de enfermedades talasémicas, se han establecido técnicas muy sencillas para el diagnóstico neonatal de estos trastornos con sangre de cordón umbilical. En un trabajo preliminar, Sáenz *et al.* (32) habían demostrado en nuestro país la validez de estos procedimientos en una población de recién nacidos de la ciudad de Nicoya. En el presente trabajo, se indica un protocolo analítico mejorado para el estudio de hemoglobinopatías —con especial referencia de las alfa -talasemias en sangre de cordón de nulos de la ciudad de Cartago, con un fenotipo familiar racial básicamente caucásico o caucasoide.

---

\* Centro de Investigación en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines, Universidad de Costa Rica, Servicio de Hematología, Hospital San Juan de Dios.

\*\* Laboratorio Clínico, Hospital Max Peralta, Caja Costarricense de Seguro Social.

## Material y métodos

Se estudiaron 671 muestras consecutivas de sangre de cordón umbilical de niños nacidos a término en el Hospital Max Peralta de la ciudad de Cartago, Costa Rica. Las muestras de sangre se colectaron con anticoagulante de EDTA - 2Na. A todas se les practicó hemolizado rápido con el uso de una gota de sangre parcialmente empacada y cuatro de una solución hipotónica de EDTA · 2(0,025%), más 2 ml de KCN al 5 por ciento por cada 100 ml de la solución quelante. En las situaciones en que se observó la presencia de una hemoglobina anormal, se realizó hemolizado total de Singer *et al.* (35), añadiendo también KCN (0,05 ml por cada ml de hemolizado al 9-11 g/dl), con el fin de evitar la formación de metahemoglobina.

La electroforesis de hemoglobina se llevó a cabo en placas de acetato de celulosa (TITAN III, Helena) y tampón de Tris-Edta-Borato a pH 8,6 (34), con tinción primaria a base de Ponceau y posterior sobretinción con bencidina, y a pH 7, en tampón de fosfatos (23); en gel de almidón de capa fina (9, 10), y en gel de agar, con amortiguador de citrato, pH 6,1 (31). La apreciación de la hemoglobina Bart se hizo en los geles de almidón al compararse su cantidad con patrones conocidos de Hb A<sub>2</sub> en concentraciones de 2 y 5 por ciento bajo as condiciones de la técnica electroforética. Los estudios hematológicos de rutina se efectuaron con los métodos convencionales (17).

## Resultados

En el Cuadro I se indican los hallazgos hemoglobínicos encontrados en 671 muestras de cordón umbilical.

CUADRO I

Anormalidades hemoglobínicas detectables por electroforesis  
en 671 muestras de cordón umbilical

Patrón Hb	Genotipo Adulto	No.	% de 671	Fenotipo Presuntivo Alfa-Tal.
FA	AA	652	97,17	—
FA-Bart	AA	17	2,53	14 (alfa-tal-2) 3 (alfa-tal-1)
FA-S	AS	2	0,30	—

Aparte de los dos casos comprobados de fenotipo hemoglobínico AS en recién nacidos caucasoides, debemos destacar del cuadro anterior que de los 17 casos con presencia de

hemoglobina Bart por electroforesis, 14 de ellos se consideraron dentro de la categoría de alfa-talasemia tipo 2 (gene silencioso o benigno) y 3 de ellos como poseedores de alfa-talasemia tipo 1 (gene severo), al semicuantificarse la hemoglobina Bart por apreciación contra patrones de concentración hemoglobínica conocida. Debemos destacar que si bien es cierto la corrida electroforética en acetato de celulosa es adecuada para evidenciar componentes menores de la hemoglobina —sean lentas o rápidas—, es superior la sensibilidad, para estos efectos, de la electroforesis en gel de almidón, por lo que las cifras señaladas en el Cuadro 1 corresponden a las obtenidas con este último procedimiento. La concordancia entre los dos procedimientos electroforéticos fue de 82 por ciento, al dejar de percibirse tres casos presuntivos de alfa-tal-2 en acetato de celulosa.

A los 14 meses de nacidos, se estudiaron los tres propositus poseedores presuntivos de alfa-tal-1 y a sus familiares, con el fin de investigar posibles alteraciones hematológicas tipo talasemia. En dos de las familias pudo demostrarse deficiencia de hierro tanto en los propositus como en otros miembros, hecho que impidió la correcta valoración de talasemia. En la tercera familia, sí se hizo evidente en el propositus la persistencia de un cuadro talasémico menor, aunque no se detectara el estigma en sus padres, ni claramente en un hermano de más edad. En el Cuadro II se indican los valores hematológicos de la familia en cuestión. En el propositus de ésta, no pudo demostrarse hemoglobina H (la contrapartida adulta de la hemoglobina Bart) ni cuerpos de inclusión.

## Discusión

El diagnóstico neonatal de talasemia ha venido haciéndose un procedimiento de rutina en algunos centros de hematología pediátrica y, especialmente, en aquellas regiones del mundo en donde prevalecen estos desórdenes (4, 29). La alfa-talasemia se caracteriza por una disminución o una ausencia de la biosíntesis de globina alfa. En la mayoría de las poblaciones parece haber 2 genes de globina alfa por cromosoma, por lo que existirían teóricamente cuatro condiciones de alfa-talasemia que se caracterizarían por la pérdida de uno a cuatro genes de los loci (16, 27, 38). Estudios de hibridación con cDNA (complementario) de globina alfa han confirmado que la mayoría de las alfa-tal son debidas a pérdida de uno o más genes (3, 11). Cuando se pierde un sólo gene se presenta el caso del “portador silencioso” o fenotipo de alfa-tal leve o tal-2, llevando el cromosoma con tal pérdida otro gene normal de cadenas alfa. Si se pierden dos genes, se presenta el caso del “rasgo de alfa-tal”, tal-1 ó gene severo, situación que por lo regular sucede en el mismo cromosoma (24). Esta condición se asocia con anomalías morfológicas del eritrocito pero sin anemia significativa. Una condición homocigota por alfa-tal-2 resultará en un síndrome fenotípicamente similar al provocado por la forma severa o alfa-tal 1. Si se han perdido 3 genes de globina alfa, resulta un cuadro de anemia hemolítica importante de estirpe hipocrómico poiquilo-anisocítico, denominado enfermedad por hemoglobina H. La hemoglobina H es un tetrámero de cadenas beta (beta 4), el cual se acumula en vista de la escasez de cadenas alfa. Esta hemoglobina es de carácter inestable, precipitando en las células con el consiguiente cuadro de hemólisis, usualmente moderado. En Costa Rica hemos encontrado este síndrome (33) en una familia de extracción asiática. Lo usual es que este síndrome sea el producto de la herencia de un gene de alfa-tal-1 (pérdida de dos genes) y de un gene de alfa-tal-2 (pérdida de un gene), con producción de hemoglobina A gracias a la actividad de un solo gene alfa. Por último, la pérdida de los cuatro genes alfa se asocia con muerte fetal en útero (*Hydrops fetalis* de alfa-talasemia), por un síndrome homocigótico del gene alfa-tal-1,

**CUADRO II**  
**VALORES HEMATOLOGICOS EN LA FAMILIA DE UN PROPOSITUS (RAR)**  
**CON HEMOGLOBINA BART AL NACIMIENTO**

Designación pedigree	edad/ sexo	Hto (%) Hb (g/dl)	Erit. 106/ul	VCM (fl)*	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Alteraciones morfológicas	F. O.	Hb A <sub>2</sub> (%) Hb F (%)	FeS/CTFFeS (mcg/dl)/ I. S. (%)
LAC	22/M	48/15,6	5,1	94	31	33	—	NI	3,0/0,9	73/310/23
MRV	22/F	40/12,5	4,4	90	28	31	—	NI	3,0/1,2	83/330/25
RAR	1,2/M	35/10,5	5,1	69	21	30	+	↓	2,1/2,3	68/301/24
LAR	5/M	36/11,5	4,5	80	26	32	+ —	NI	2,6/2,4	72/301/24

Semiología = F. O. (Fragilidad Osmótica); + = presentes; ↓ = disminuida.

\* Nota del Editor: "fl" corresponde a la abreviatura de femtolitros, unidad del Sistema Internacional de Unidades equivalente a micras cúbicas ( $\mu^3$ ).

caracterizado por fallo cardíaco congestivo debido a la severa anemia. Los estudios de biología molecular con el uso de mapeos del DNA con endonucleasas de restricción han confirmado la pérdida de genes alfa asociados con las varias formas genéticas y hematológicas de alfa-talasemia (26). Al menos, estas consideraciones genético-moleculares de la alfa-talasemia son aplicables en poblaciones orientales, siendo algo diferentes en poblaciones mediterráneas y de raza negra (3, 11), lo que explicaría la ausencia del *hydrops fetalis*, y aún de enfermedad por hemoglobina H, en dichas poblaciones. En la negra se ha demostrado que al contrario de la oriental —en la cual es frecuente que se hayan perdido dos genes en un mismo cromosoma—, lo usual es que se pierda uno sólo en cada uno de los dos cromosomas, por lo que la incidencia del portador silencioso (alfa-tal-2) y del portador o rasgo (alfa-tal -) sea significativa en estos grupos poblacionales (3).

La hemoglobina Bart (gamma 4) generalmente se asocia en el período neonatal con la presencia de alfa-tal (15, 32, 37, 41, 42). Dicha hemoglobina puede demostrarse sin dificultad en sistemas electroforéticos a pH alcalino, sea en acetato de celulosa (14, 34) como de almidón (9, 14, 41), y puede corroborarse por su migración anódica a pH 6,8-7,0 en tampón de fosfatos (23), por métodos inmunológicos (14, 40) y por electroforesis de globina (34). Wasi *et al.* (41) en estudios realizados en Tailandia, señalan que las cantidades de esta hemoglobina al nacimiento pueden ser de 1-2 por ciento, 5-6 por ciento y de 20-40 por ciento, correspondiendo respectivamente estos valores a los genotipos de alfa tal-2 (—, alfa/alfa, alfa), alfa-tal-1 ó rasgo (—, — /alfa, alfa), y de alfa-tal-1/alfa-tal-2 ó enfermedad por hemoglobina H (—, —, /—, alfa). Obviamente, también por métodos de biosíntesis de globina en sangre de cordón (22) se puede demostrar el desequilibrio sintético entre cadenas alfa y beta, poniéndose en evidencia un incremento del índice de la relación gama-beta/alfa, en los diversos síndromes de alfa-talasemia.

Los hallazgos aquí consignados señalan la presencia de un 2,5 por ciento de fenotipos con hemoglobina Bart en 671 muestras de sangre de cordón umbilical, con un 0,4 por ciento correspondiente, en forma presuntiva, a la forma de alfa-tal-1 (3-5 por ciento de hemoglobina Bart), y de 2,08 por ciento a la alfa-tal-2 (1-2 por ciento de hemoglobina Bart). En este último fenotipo no se presenta anemia, alteraciones eritrocíticas, cuerpos de inclusión, fracciones hemoglobínicas anormales (Bart, H) o niveles alterados de los pequeños componentes (A<sub>2</sub>, F), por lo que el diagnóstico hematológico es imposible de realizar, salvo en ocasiones por la prueba de la síntesis de globina (41). Su presencia “silenciosa” se hace evidente cuando el poseedor por ejemplo, engendra hijos con una mujer portadora del rasgo (alfa-tal-1), y aparecen en la descendencia casos de enfermedad por hemoglobina H. En la mayoría de los pacientes con el gene severo, o alfa-tal-1, si es posible encontrar una ligera anemia microcítica hipocrómica, alteraciones eritrocíticas de estigma talasémico, hierro sérico normal y patrón electroforético usualmente normal, rara vez trazas de hemoglobina H, con ocasionales cuerpos de inclusión y una fragilidad osmótica disminuida. Estos portadores del rasgo son obligadamente padres (41) de niños hidrópicos (100 por ciento hemoglobina Bart) o con enfermedad por hemoglobina H (niveles entre 5-30 por ciento del hemolizado total) (41). No teniendo entonces ningún sentido práctico estudiar posteriormente a los niños que en el presente estudio presentaron hemoglobina Bart en los límites aceptados para la forma de alfa-tal-2, nos propusimos analizar las tres familias de los propositus que habían evidenciado cantidades de hemoglobina Bart entre 3 y 5 por ciento. En dos de éstas, no fue posible obtener conclusiones analíticas pues fue evidente una deficiencia de hierro en los propositus y en algunos de las familiares, situación metabólica que enmascara al estigma talasémico, tanto beta como alfa (4, 6, 39). En la tercer familia

(Cuadro II) sí se pudo demostrar la presencia del rasgo de talasemia alfa, pues al menos en el propositus se hizo evidente el cuadro hematológico característico del trastorno heredado (4, 6, 12, 13, 29, 30). Podría conjeturarse que al menos el propositus haya heredado de cada padre un gene de alfa-tal-2, con lo cual se explicaría el nivel de su hemoglobina Bart al nacimiento y un factible genotipo alfa—/ alfa—, como el que se observa en población de raza negra (3), y que correspondería fenotípicamente al efecto de un gene alfa-tal-1. Esta explicación es factible dada la complejidad de la genética molecular en talasemias (41).

Se ha señalado que es posible detectar pequeñas cantidades de hemoglobina Bart en niños sanos recién nacidos (6, 12), asumiéndose que su presencia podría reflejar una temporal desigualdad en los niveles de cadenas alfa y no alfa durante la transición sintética de hemoglobina fetal a hemoglobina A. En todo caso, es claro que la presencia de hemoglobina Bart al nacimiento en especial cuando es de más de un 3 por ciento, obliga a pensar en alfa talasemia habiéndose descrito mayor incidencia del defecto cuando hay herencia concomitante de variantes de hemoglobina de cadena beta (S y C) (6). Cuando en nuestro medio hacemos el primer reporte sobre alfa-talasemia doble heterocigota (alfa 1/alfa 2-tal) o enfermedad por hemoglobina H (33), insistimos en lo apuntado por Hedge *et al.* (13) en torno a la pesquisa del rasgo de alfa-tal (tal-1), al recomendar que esta anomalía sea considerada en todos aquellos pacientes con origen étnico de “alto riesgo” (es decir asiáticos) que presentan anemia microcítica hipocrómica refractaria, luego que se ha excluido la deficiencia de hierro y el rasgo de beta-tal.

Las diferencias obtenidas en la población caucásica que se analiza en el presente trabajo con respecto al reporte que se hizo en la ciudad de Nicoya (fundamentalmente mestiza) (32), en relación a la frecuencia de hemoglobina Bart que fue de 1,12 por ciento en esta última, no nos permite inferir conclusión alguna ya que la tecnología que se utilizó fue sensiblemente superior en el presente trabajo.

#### ABSTRACT

*We have demonstrated a 2.53 percent frequency of Bart hemoglobin in 671 samples of cord blood in term newborn babies of caucasian origin, in Cartago, Costa Rica. We associate these findings with non-homogeneous alpha-thalassemia. The molecular genetics of alpha-thalassemia and the diagnostic value of Bart hemoglobin levels determined at birth by different electrophoretic techniques, especially starch gel at alkaline pH, are discussed. In one of the three families studied, we could confirm the existence of alpha-thalassemia in the 14 month-old propositus, who at birth had approximately 4 percent Bart hemoglobin.*

#### BIBLIOGRAFIA

1. Alter, B. P.; Kan, Y. W.; Frigoletto, F. D.; y Nathan, D. G. The antenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. Clin. Haematol, 1974; 3:509—526.
2. Alter, B. P.; Bernadette Modell, C.; Fairweather, D.; Hobbins, J. C.; Mahoney, M. J.; Frigoletto, F. D.; Sherman, A. S. y Nathan, D. C., 1976; Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies. A review of 15 cases. N. Engl. J. Med. 1976; 295:1437—1442.
3. Bank, A. J.; Mears, G.; y Ramirez, F. Disorders of human hemoglobin. Science, 1980; 207: 486—493.

4. Bunn, H. F.; Forget, B. G.; Ranney, H. M. Hemoglobinopathies. Series Major Problems in Internal Medicine. Ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, USA; 1977; Vol. XII, Chapter 2, pp 28—94.
5. Cividalli, G.; Nathan, D. G.; Kan, Y. W.; Santamarina, B.; y Frigoletto, F. D. Relation of beta to gamma synthesis during the first trimester: An approach to prenatal diagnosis of thalassemia. *Pediat. Res.* 1974; 8:553—560.
6. Clegg, J. B.; Weatherall, D. J.; Na-Nakorn, S; y Wasi, P. Haemoglobin synthesis in beta-thalassemia. *Nature.* 1968; 220:6664—6672.
7. Chang, H.; Hobbins, J. C.; Cividalli, G.; Frigoletto, F. D.; Mahoney, M. J.; Kan, Y. W.; y Nathan, D. G. In utero diagnosis of hemoglobinopathies. Hemoglobin synthesis in fetal red cells. *N. Engl. J. Med.* 1974; 290:1067—1068.
8. Chang, H.; Bernadette Modell, C.; Alter, B. P.; Dickinson, M. J.; Frigoletto, F. D.; Huehns, E. R. y Nathan, D. G. Expression of the beta-thalassemia gene in the first trimester fetus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1975; 72:3633—3640.
9. Echavarría, A.; Molina, C.; y Zapata, C. I. Hemoglobina A<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>) asociada con beta thalassemia. *Nature.* 1968; 220:664—670.
10. Efremov, G. D. Starch gel electrophoresis. In: Standarization of laboratory reagents and method for the detection of hemoglobinopathies. H. E. W. (CDC) Publication, Atlanta, Georgia, 1973; pp 37—39.
11. Forget, B. G. Molecular genetics of human hemoglobin synthesis. *Ann. Intern. Med.* 1979; 91: 605—616.
12. Friedman, S.; Hamilton, R. W.; y Schwarts, E. Beta-thalassemia in the American Negro. *J. Clin. Invest.* 1973; 52:1453—1459
13. Hedge, U. M.; White, J. M.; Hart, G. H.; y Marsh, G. W. Diagnosis of alpha-thalassemia trait from counter "S" indices. *J. Clin. Path.* 1977; 30:884—889.
14. Hicks, E. J.; Loh, W. P.; Hamilton, R.; y Horton, R. Cord-blood screening considerations: Identifications of heterozygous conditions hemoglobin Bart's and other hemoglobinopathies. *Clin. Chem.* 1973; 23(9):1551—1556.
15. Huehns, E. R.; Flynn, F. V.; y Buther, E. A. The occurrence of haemoglobin "Bart's" in conjunction with and haemoglobin H. *Brit. J. Haemat.* 1960;6:388—393.
16. Kan, Y. W.; Golbus, M. S.; y Dozy, A. M. Prenatal diagnosis of alpha-thalassemia: Clinical application of molecular hibridization. *N. Engl. J. Med.* 1965; 295:1165—1167.
17. Kan, Y. W.; Dozy, A. M.; Alter, B. P.; Frigoletto, F. D.; y Nathan, D. G. Detection of the sickle cell gene in the human fetus. Potential for intrauterine diagnosis of sickle cell anemia. *N. Engl. J. Med.* 1972;287:1—5
18. Kan, Y. W., Belevue, R.; Rieder, R. F. Prenatal diagnosis of alpha-thalassemia (Thal). *Clin. Res.* 1974; 22:374—376.
19. Kan, Y. W.; Dozy, A. M.; y Varmus, H. E. Deletion of alpha-globin genes in haemoglobin H disease demonstrates multiple of alpha-globin structural loci. *Nature.* 1975; 255:255—258.
20. Kan, Y. W.; Tracartin, R.; Golbus, M. S.; y Filly, R. A. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia and sickle cell anemia: Experience with 24 cases *Lancet.* 1977; 1:269—273.
21. Kazazian, H. H.; Kaback, M. M.; Woodhead, A. P.; Leonard, C. O. y Nersesian, W.S. Further studies on the antenatal detection of sickle cell anemia and other hemoglobinopathies. *Avd. Exp. Biol. Med.* 1972; 28:337—346.
22. Koenig, H. M.; Vedvick, T. S.; Dozy, A. M.; Golbus, H. S.; y Kan, Y. W. Prenatal diagnosis of haemoglobin H Disease. *Pediatrics.* 1978; 92:278—281.

23. Lehmann, H.; y Huntsman, R. G. Man's haemoglobins. North-Holland Publishing Co. Oxford, 1974; pp 417-418
24. Mears, J. G.; Ramírez, F.; y Leibowitz, *et al.* Delta-beta-thalassemia. *Nature*. 1978; 75:1222—1226.
25. Nathan, D. G. Antenatal diagnosis of hemoglobinopathies: An exquisite molecular brew, *N. Engl. J. Med.* 1976;295:1196—1201.
26. Orkin, S. H. The duplicated human alpha-globin gene lie close together in cellular DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978; 75 :5950—5956.
27. Ottolenghi, S. Lanyon, W. G.; Paul, J. *et al.* The severe form of alpha-thalassemia is caused by a haemoglobin gene deletion. *Nature*. 1974; 251:389—391.
28. Ottolenghi, S.; Comi, P.; Giglioni, B. *et al.* Alpha-beta- thalassemia is due to a gene deletion. *Cell* 1976;9:71—74.
29. Pearson, H. A.; O'Brien, R. T.; y McInstoch, S. Screening for thalassemia trait by electronic measurement of means corpuscular volume (MCV). *N. Engl. J. Med.* 1973; 288:351—353.
30. Raven, J. L.; y Dooze, J. A. Alpha thalassemia in Britain. (Letter to the editor). *Brit. Med. J.* 1973; 4:4.
31. Robinson, A. R.; Robson, M.; Harrison, A.P.; y Zuelzer, W. W. A new technique for differentiation of hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.* 1957;50:645—751.
32. Sáenz, G. F.; Alvarado, M.; Alfaro, E. *et al.* Diagnóstico neonatal de hemoglobinopatías. Hallazgos en muestras de sangre de cordón umbilical. *Sangre*. 1977; 22:339— 345.
33. Sáenz G. F.; Jiménez, E.; y Mora, L. Enfermedad por hemoglobina H en Costa Rica. *Sangre*. 1979; 24:333—339.
34. Schneider, R. G.; Haggard, M. E.; Gustavson, L. P. *et al.* Genetic haemoglobin abnormalities in about 9000 black and 7000 white newborns. Haemoglobin F Dickinson (A gamma 97 His-Ar), a new variant. *Brit. Haemat.* 1974; 28:515—520.
35. Singer, K. A.; Chernof, A. I.; y Singer, L. Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell denaturation. *Blood*. 1951; 6:413—428.
36. Serjeant, B. E.; Forbes, M.; Williams, L. L.; y Serjeant, G. R. Screenig cord-bloods for detection of sickle-cell disease in Jamaica. *Clin. Chem.* 1970. 20:666—670.
37. Schokker, R. C.; Weat, L. N.; y Bik, J. A new genetic variant of beta-thalassemia, *Nature*. 1966; 209:44 48.
38. Taylor, J. M.; Dozy, A. M.; Kan, Y. W.; Varmus, H. E. *et al.* Genetic lesion in homozygous alpha-thalassemia (hydrops fetalis). *Nature*. 1974; 251:391—393.
39. Wasi, P.; Disthasongchan, P.; y Na-Nakorn, S. The effect of iron deficiency on the levels of hemoglobins A<sub>2</sub> and E. *J. Lab. Clin. Med.* 1968; 71:85- 88.
40. Wasi, P.; y Pravatmuang, P. Immunologic diagnosis of alpha-thalassemia. *J. Med. Ass. Thail.* 1973; 56:654—657.
41. Wasi, P.; Na-Nakorn, S.; y Pootrakul, S. Las talasemias alfa, In: *Clínica Hematológica (Hemoglobinas Anormales)*. 1976; Cap. VII, Vol. 2, Núm. 2, pp. 169—198.
42. Weatherall, D. J. Abnormal haemoglobins in the neonatal period their relationship to thalassemia. *Brit. J. Haemat.* 1963; 9:265 --277.
43. Wong, V.; Ma, H. K.; Todd, D. *et al.* Diagnosis of homozygous alpha-thalassemia in cultured amniotic-fluid fibroblast. *N. Engl. J. Med.* 1978; 298:669—670.