

Datos Numéricos y Estadísticos Mínimos Sobre la Indicencia de Hemoglobinas Anormales en Costa Rica

† Alvaro Rivera*

German F. Sáenz**

INTRODUCCION

El estudio de la frecuencia y distribución de las hemoglobinas anormales en un país tiene importancia desde el punto de vista clínico, porque contribuye al mejor conocimiento de los síndromes hemolíticos y de algunas otras entidades patológicas. Es de valor genético, porque siendo un "marcador" indeleble, puede servir para estudios familiares e identificación de individuos y, finalmente, tiene importancia antropológica porque puede dar información sobre la composición étnica de dicho país y/o la influencia migratoria que ha sufrido.

La porción proteica de la molécula de la hemoglobina consiste en cuatro cadenas de polipéptidos compuestos de aminoácidos que se encuentran en un orden definitivo en cada cadena, y cuya colocación está genéticamente determinada.

En los eritrocitos de adultos humanos hay tres tipos de hemoglobina: la predominante es la A que contiene dos tipos de cadenas de aminoácidos, las alfa y las beta. Las cadenas alfa poseen 141 aminoácidos y tiene cada una un peso molecular de 15.126. Las cadenas beta tienen cada una 146 aminoácidos y un peso molecular de 15.866. Las otras dos hemoglobinas, HbF (fetal) y Hb A₂ están presentes en pequeña cantidad en los adultos anormales, menos de 1% y 2,5%, respectivamente (21-28). Cada una de ellas contiene dos cadenas alfa que son idénticas a las de la hemoglobina A. La diferencia se encuentra en relación con las cadenas beta, que se denominan gama en la hemoglobina fetal y delta en la hemoglobina A₂. Por otra parte, las cadenas gama y delta contienen el mismo número de aminoácidos que las cadenas beta; difieren en la composición y colocación de los mismos (29).

Durante los primeros meses de la gestación solamente cadenas alfa y gama son sintetizadas. Por lo tanto, la hemoglobina normal es hemoglobina fetal (alfa₂, gama₂). Alrededor del quinto mes empieza la síntesis de cadena beta y aparece la hemoglobina A.

* Jefe Sección de Hematología, I.C.M.R.T.

** Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Al nacimiento la hemoglobina fetal normalmente se halla entre un 60 y un 80% del total de la hemoglobina. Ya entre los 12 y 18 meses ha disminuído a menos de un 5%. Cerca de los cuatro años se encuentran los valores normales del adulto (4-23-25-26-29-41).

La llamada hemoglobina P (primitiva o embrionaria), ha sido objeto de mucha controversia. En todo caso, quienes la describen la han hallado en fetos de 7 a 12 semanas, de lo que se deduce que la velocidad de desaparición en el embrión humano depende, al parecer, del tiempo de cesación del eritroblasto primitivo (13).

En algunas anemias desarrolladas a temprana edad de la infancia, la habilidad de formar hemoglobina fetal puede ser retenida y estar presente en cantidades aumentadas en adultos con talasemia, pudiéndose también observar aumento en la fracción hemoglobina A₂ (1-4-11-12-15-22-23).

Las variantes anormales de hemoglobina que se han descrito presentan diferencias en su composición de aminoácidos y, en la mayoría de los casos, un solo aminoácido en una de las cadenas de polipéptidos, es la única diferencia con respecto a la hemoglobina A.

Como estas diferencias estructurales se reflejan frecuentemente en el comportamiento electroforético de las hemoglobinas, la electroforesis es uno de los métodos más importantes para el estudio de las mismas. Sin embargo, como las diferencias entre las hemoglobinas son en ocasiones demasiado sutiles para permitir su detección solamente por electroforesis, la identificación de ellas no debe basarse en un solo método, sino en grupos de ellos, seleccionados entre los que pueden proporcionar toda la información requerida para identificar la hemoglobina lo más completamente posible (14-19-31).

Entre los métodos valiosos para la identificación posterior de una hemoglobina, que resultan menos adecuados para el laboratorio ordinario, de análisis, figuran: análisis con rayos X, cristalografía, inmunoquímica, estudios de estructura proteica, cualitativos y cuantitativos, estudio de composición y distribución de aminoácidos, cromatografía, espectrofotometría, etc. (1-5-6-14-17-19-20-28-30-32-33-38-42-43-45).

El fraccionamiento electroforético de hemoglobina fue descrito primeramente por PAULING *et al.* en 1949 (35), con el descubrimiento de una hemoglobina anormal, asociada con el fenómeno de drepanocitosis, formulándose así el concepto de enfermedad molecular. El conocimiento de este hecho revolucionó a la medicina, pues en un principio fue sorprendente el aceptar que el simple cambio de un aminoácido por otro en una de las cadenas de la globina, fuese la diferencia entre salud y enfermedad y, en ocasiones, enfermedad mortal.

De esta suerte la aplicación clínica primaria de la electroforesis de la hemoglobina lo fue en la diferenciación de algunas anemias hemolíticas (2-3-14-16-28-35-39). A la vez, dicho análisis ha sido de gran ayuda en el diagnóstico de tipos específicos de metehemoglobinemia, reacciones a drogas hemolíticas y trastornos no isoimunes de hidropesía fetal (eritroblastosis fetal) (18).

Hasta el año 1967 alrededor de 80 hemoglobinas anormales habían sido descritas, sin contar las variantes de las hemoglobinas A₂ y F, y el defecto bioquímico ha sido aclarado por lo menos en 61 de ellas (9).

Después del hallazgo de PAULING *et al.* (35), fueron descubiertos otros

tipos de hemoglobinas anormales, y al confirmarse que la presencia de las hemoglobinas puede ser detectada por electroforesis en papel filtro, fue posible para muchos laboratorios de hematología, participar en la búsqueda de nuevas hemoglobinas.

Las variantes de hemoglobina anormal son generalmente referidas a las letras del alfabeto y el orden alfabético se ha aplicado de acuerdo al momento en que se han descubierto: A, C, D, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, S. etc. Las letras B y V se han omitido para evitar confusión con la "hemoglobina B", el viejo término para hemoglobina S (10-34).

Otras hemoglobinas se han descrito pero no han sido situadas alfabéticamente, denominándose según el nombre de la región donde se descubrieron, el nombre o apellido del paciente o del investigador (Boston, Norfolk, Saskatoon, Leipzig, Stanleyville, Bart, Lepore, Zurich, Gower, etc). (41).

La mayoría de las hemoglobinas anormales son variantes de la hemoglobina adulta (hb. A), siendo las variantes de las hemoglobinas F y A₂ poco conocidas (1 - 2).

Otro adelanto en el conocimiento de los tipos de hemoglobina fue dado por SINGER et al. en 1951 (38) al describir un método para la identificación y cuantificación de la hemoglobina fetal.

SMITHIES en 1955, citado en SUNDERMAN (40), usando buffer de EDTA a pH 8,2 aplica la electroforesis en gel de almidón para la identificación de hemoglobinas anormales.

En 1955 PETERSON et al. y SOBER et al., citados en HISMAN et al. (21) y finalmente ORNSTEIN, citado en SUNDERMAN (41), señala las ventajas del uso de discos de gel de acrilamida para la separación electroforética de proteínas séricas y de hemoglobinas. Se han indicado nuevos derivados de la celulosa para electroforesis, los cuales contienen grupos carboximetil (CM), fosfato (P) y dietilaminoetil (DEAE). Estas sustancias presentan relativamente gran capacidad para absorción de proteínas; sin embargo, la elusión puede ser efectuada bajo condiciones estándar (8 - 21 - 37).

El uso de algunas de estas sustancias, especialmente de la carboximetil-celulosa (CMC), parece ofrecer mejores posibilidades para la separación nítida de hemoglobinas.

En 1957 KOHN citado en SCHERR (37), en el Queen Mary's Hospital de Roehampton, Inglaterra, describe el uso del acetato de celulosa como medio de sostén para efectuar la electroforesis de proteínas, obteniendo mayor sensibilidad que la obtenida con el papel o medios similares.

En 1958, HISMAN et al. (21), desarrollan un método para la separación de hemoglobinas humanas, aplicando carboximetil celulosa en cromatografía, detectando y cuantificando diferentes tipos de hemoglobinas.

En 1958 KUNKEL y WALLENUS (27) describen la hemoglobina A₂ usando la técnica del bloque de almidón (starch block), con un buffer de barbital a pH 8,6. Posteriormente se han descrito otros métodos (42 - 44).

GRAHAM & GRUMBAUM en 1963 (15), señalan un método rápido por microelectroforesis para la cuantificación de hemoglobinas en acetato de celulosa.

BRIEVE et al. en 1963 (7), describen un método rápido, cualitativo y

cuantitativo, para fraccionamiento de hemoglobinas: método muy semejante al utilizado en nuestro estudio.

Obviamente, en la literatura se han descrito un número grande de métodos para el estudio de hemoglobinas. Nosotros hemos tratado de hacer una pequeña reseña histórica de los métodos más importantes que se han aplicado en el estudio de las mismas.

El fundamento de nuestro estudio se basa en la obtención de datos numéricos y estadísticos sobre la distribución y presencia de hemoglobinas anormales en trece poblaciones de Costa Rica, con miras a obtener datos parciales sobre su distribución en nuestro país, con un pequeño enfoque antropológico e histórico.

MATERIAL Y METODOS

I. Material humano.

Fueron utilizadas muestras de sangre extraídas por punción venosa, coleccionadas en tubos al vacío (Vacutainer) con EDTA, de 947 personas de 13 poblaciones distribuidas en todo el territorio de Costa Rica.

Se trataba de adultos con representación de los dos sexos, dándole prioridad a padres y madres en aproximada proporción, y con aparentes condiciones de buena salud.

II. Métodos.

A cada una de las muestras se les determinó:

A—Hemoglobina total, como cianometahemoglobina.

B—Hematocrito (micrométodo).

C—Frotis sanguíneos teñidos con Wright, para morfología de eritrocitos.

D—Electroforesis, utilizando membranas de acetato de celulosa:

1. Método cualitativo mediante el uso de microcapilares (36).
2. Método cuantitativo (10).

E—A las muestras con hemoglobinas anormales, se les cuantificó hemoglobina A₂ por el método con acetato de celulosa, hemoglobina fetal por el de SINGER et al. (38), y a las que correspondiera, se les practicó la prueba de solubilidad de la ferrohemoglobina de Itano (24).

En la Figura 1, se presentan las 13 poblaciones estudiadas en nuestro país, distribuidas por provincia.

En el Cuadro 1, se indica la distribución porcentual de hemoglobinas anormales encontradas en 947 personas, 450 del sexo masculino y 497 del femenino. Asimismo, señalamos en el mismo cuadro, los casos positivos por hemoglobina anormal, 10 correspondientes al sexo femenino y 3 al masculino. La distribución porcentual de las hemoglobinas y sus combinaciones, fue la siguiente: AA 98,6%; AS 1,05%; AC 0,1% y un 0,2% de una hemoglobina sujeta

a mayor estudio y que nosotros llamamos rápida por su comportamiento electroforético en dos de los casos.

El porcentaje total de hemoglobinas anormales encontradas en las poblaciones estudiadas fue 1,4.

Cuadro 1

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE HEMOGLOBINAS ANORMALES

Localidad	N° Examinados			N° Positivos			Patrón Electroforético			
	M	F	Tot	M	F	Tot	AA	AS	AC	A-rap?
							%	%	%	%
San Isidro (H)	31	33	64	—	2	2	96,9	3,1	—	—
Juan Viñas (C)	26	29	55	—	—	—	—	—	—	—
Venecia (A)	36	43	79	—	—	—	—	—	—	—
Puriscal (SJ)	33	24	57	—	—	—	—	—	—	—
B° El Carmen (P)	32	37	69	—	2	2	97,1	2,9	—	—
Sardinal (G)	40	33	73	1	2	3	95,7	2,7	1,4	—
Palmare (SJ)	38	43	81	—	—	—	—	—	—	—
Cot (C)	32	36	68	—	—	—	—	—	—	—
Tilarán (G)	43	50	93	—	1	1	98,9	1,1	—	—
San Pedro de									—	
Poás (H)	34	38	72	—	—	—	100,0	—	—	—
Sta. María de										
Dota (SJ)	52	62	114	—	1	1	99,1	0,9	—	—
Barrio Iglesias										
Flores (SJ)	21	34	55	—	—	—	—	—	—	—
Siquirres (L)	32	35	67	2	2	4	94,0	3,0	—	3,0
TOTAL	450	497	947	3	10	13	98,6	1,05	0,1	0,2
Total de hemoglobinas anormales				1,4%						

En el Cuadro 2 se señala la distribución por raza y sexo, de las personas estudiadas y de las encontradas positivas. Se evidencia el predominio de la raza blanca sobre las otras, cuando observamos que 922 fueron de raza blanca, 22 de negra, 2 indígenas y 1 mestizo, con la siguiente distribución de positividad: 13,6% para la raza negra y 1,1 para la raza blanca.

CUADRO 2

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE HEMOGLOBINAS ANORMALES
SEGUN RAZA Y SEXO

Raza	Total			Nº Positivos			% Positivos		
	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total
Negra	12	10	22	1	2	3	8,3	20,0	13,6
Blanca	428	494	922	2	8	10	0,5	1,6	1,1
Mestiza	1	—	1	—	—	0	0	0	0
India	—	2	2	—	—	0	0	0	0

En el Cuadro 3 se expresan los resultados de los exámenes de laboratorio practicados a los 13 casos positivos por hemoglobinas anormales. Salvo dos casos (Nos. 3 y 13) que mostraron un moderado cuadro de anemia y uno con ligera disminución de los valores eritroides, no se encontró en el resto de los 13 casos ninguno con valores bajos de hemoglobina o de hematocrito. De igual manera no se hallaron valores significativamente altos de hemoglobina fetal. La prueba de la solubilidad de la ferrohémoglobina fue positiva (precipitado) en todos los casos en que se constató electroforéticamente la presencia de hemoglobina S. En los tres casos en que no fue la hemoglobina S la encontrada, se demuestra el valor de esta prueba, pues su resultado se corroboró con la presencia, en uno de ellos, de la combinación AC y en los dos restantes, de A-Hemoglobina rápida.

CUADRO 3

RESULTADOS OBTENIDOS EN 13 CASOS
CON HEMOGLOBINA ANORMAL

Nº	Nombre	Sexo	Raza	Edad (Años)	Determinaciones				
					Hb g%	Hto ml/100 ml.	Hb F. %	P. sol.	P. elect.
1	A. V.	F	B	25	12,8	39,0	0,8	ppdo	A S
2	R. Z.	F	B	49	15,4	43,0	1,3	ppdo	A S
3	A. M.	F	B	39	9,1	30,5	3,2	ppdo	A S
4	E. S.	F	B	21	11,8	35,0	1,4	ppdo	A S
5	B. M.	F	B	59	13,5	36,0	0,4	ppdo	A S
6	M. J.	F	B	55	11,8	36,0	0,7	ppdo	A S
7	F. G.	F	B	37	11,0	33,5	0,9	ppdo	A S
8	J. H.	F	N	29	12,5	38,0	1,6	ppdo	A S
9	E. L. R.	M	B	34	16,2	47,0	0,6	ppdo	A S
10	E. L.	M	N	16	14,3	37,0	0,3	ppdo	A S
11	C. O.	M	B	31	12,7	39,5	1,3	—	A C
12	O. V.	F	B	33	8,2	28,5	0,4	—	A-Ráp?†
13	V. F.	F	N	12	11,7	35,5	2,9	—	A-Ráp?

En el Cuadro 4 se indica la distribución hemoglobínica porcentual de cada uno de los 13 casos positivos por hemoglobina anormal. En diez de ellos se encontraron porcentajes de hemoglobina A₂ con valores desde 1,7 hasta de 3,6%, hallándose la mayoría de los casos dentro de los límites normales aceptados (18 - 23). En el caso N° 11 se destaca la presencia del combinado hemoglobínico AC, con 1,8% de A₂ y predominio de A₁ (59,3%). En el caso N° 12 no se pudo cuantificar hemoglobina A₂ (menos de 0,5%), siendo el mismo muy interesante por la combinación de hemoglobina A con una fracción mayor (59,1%) de hemoglobina electroforéticamente más rápida, todavía por dilucidarse. En el caso N° 13 se aprecia la combinación hemoglobina A - hemoglobina rápida y un 2,4% de A₂. En las combinaciones heterocigotas AS el porcentaje de la fracción S osciló entre el 28,1% y 34,3%. En todos los casos siempre fue mayor el porcentaje de hemoglobina A, lo cual podría justificar el aparente estado normal de las personas y los valores eritroides normales o ligeramente sub-normales de la mayoría de las mismas.

CUADRO 4

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FRACCIONES ELECTROFORETICAS DE CADA UNO DE LOS 13 CASOS CON HEMOGLOBINA ANORMAL

N°	Nombre	Patrón Electroforético		
		A S		
		A ₂	A ₁	S
1	A. V.	3,0	64,3	32,7
2	R. Z.	1,7	70,0	28,3
3	A. M.	3,0	66,7	30,3
4	E. S.	2,6	65,8	31,6
5	B. M.	3,2	64,5	32,3
6	M. J.	2,5	65,8	31,7
7	P. G.	3,6	65,5	30,9
8	J. H.	3,1	68,8	28,1
9	E. L. R.	3,3	63,4	33,3
10	E. L.	3,0	62,7	34,3
			A C	
		A ₂	A ₁	C
11	C. O.	1,8	59,3	38,9
			A-Ráp?	
		A ₂	A ₁	A-Ráp?
12	O. V.	—	40,9	59,1
13	V. F.	2,4	68,3	29,3

DISCUSION Y CONCLUSION

Los resultados obtenidos en 947 muestras de sangre de personas aparentemente sanas, de 13 poblaciones distribuidas en todo el territorio nacional, nos ha permitido llegar, aunque sea provisionalmente, a un mejor conocimiento del problema de las hemoglobinopatías.

Del trabajo se destaca el hecho de que, por los resultados obtenidos, se hace evidente que ciertas zonas han sufrido variaciones genéticas, notándose cómo en las localidades estudiadas de las provincias de Limón y de Guanacaste, se han encontrado las tasas más altas de hemoglobinas anormales, comparadas con el resto de las regiones del país. Asimismo, aparentemente la población negra ha aportado hemoglobinas anormales a las condiciones genéticas de nuestro país, hecho éste que, desde el punto de vista antropológico, es de gran importancia, pues nos está indicando que en dicha raza hay alteraciones genéticas, en cuanto se refiere a la síntesis de la hemoglobina.

El núcleo de la población negra estudiado pone en evidencia la alta incidencia de genes anormales para el sistema hemoglobínico, aportados por la inmigración africana.

SOLANO et al. (39) citan una referencia personal del ilustre historiador costarricense, don Carlos Meléndez, por lo que se aclara mucho la influencia que ha tenido la raza negra en cuanto a la aparición de hemoglobinas anormales en nuestro medio.

Ya a principios del siglo XIX había en Costa Rica una gran proporción de cruzamientos con negros que habían llegado a América como esclavos, procedentes sobre todo de Bantú, Angola y de El Congo, regiones de Africa, donde se han reportado las mayores frecuencias de la tara hemoglobina "S", por lo que no es sorprendente que dicha condición genética se haya difundido en nuestro país, concentrándose, como era de esperar, en las regiones más densamente pobladas por individuos de esa raza.

La tasa de 13,6% encontrada en la población negra estudiada, ofrece el primer dato concreto sobre la incidencia de hemoglobinas anormales en esa raza. Por otro lado, solamente se encontró un 1,1% en personas de raza blanca. En dos indígenas estudiados, y en un individuo mestizo, los resultados fueron negativos. Sin embargo, es de señalar el informe de SOLANO et al. (39) de un caso positivo por hemoglobina "S", en un indio boruca.

Si tomamos en cuenta el total de las poblaciones estudiadas, se obtiene un porcentaje total de 1,4 en cuanto se refiere a la incidencia del carácter heterocigoto, prevaleciendo la combinación AS. Estos datos no concuerdan con los obtenidos por SOLANO et al. (39), en un estudio que realizaron en la provincia de Guanacaste, en donde obtuvieron, con una población menor y en regiones diferentes, un 7,9% de individuos AS. Circunscribiéndose a las dos poblaciones guanacastecas por nosotros estudiadas, se observa que en Sardinal el porcentaje de positividad fue de 2,7% y en Tilarán de 1,1% también con un predominio de la fórmula hemoglobina AS.

ELIZONDO & SOLANO (12) reportaron un caso de hemoglobina S-talasia en un niño de la provincia de San José. En el presente estudio hacemos una contribución, con el hallazgo de un nuevo caso de hemoglobinopatía AC, esta

vez en la población de Sardinal de la provincia de Guanacaste.

En la región de Siquirres, provincia de Limón, se encontraron en este estudio, dos casos muy interesantes con patrones electroforéticos anormales de hemoglobina A-Rápida, cuyo significado aún queda por dilucidarse. En uno de ellos, los valores eritroides se hallaron ligeramente bajos y en el otro el cuadro anémico fue manifiesto. No encontramos ningún caso con valores altos de hemoglobina A₂ o de la hemoglobina fetal.

Para terminar, consideramos que este estudio, complementario de los otros muy valiosos que distinguidos compatriotas han publicado, es una pequeña contribución al mejor conocimiento de la incidencia de hemoglobinas anormales en nuestro país. Obviamente el campo de estudio es amplio y fascinante, amén de ser sumamente importante desde el punto de vista antropológico, genético y clínico. Nuestro deseo es que estas investigaciones se sigan efectuando a efecto de obtener a corto plazo, datos estadísticamente representativos del problema, dándose prioridad a las pequeñas poblaciones que tienden a desaparecer, como la indígena, así como a la que tiende a extenderse, como es la raza negra.

RESUMEN

Se hace un estudio de 13 poblaciones distribuidas en el territorio de Costa Rica, con miras a obtener datos numéricos y estadísticos sobre la presencia y distribución de hemoglobinas anormales.

Se analizaron 947 muestras de adultos: 450 de sexo masculino y 497 de sexo femenino, obteniéndose 13 casos positivos que representan el 1,4%. El procedimiento electroforético se llevó a cabo utilizando un medio de sostén de acetato de celulosa.

Las hemoglobinas anormales encontradas fueron todas en forma heterocigota: AS, AC y A-Rápida, esta última llamada así por su comportamiento electroforético.

Las poblaciones positivas fueron:

San Isidro (Prov. Heredia)	3,1% (AS)
B ^o El Carmen (Prov. Puntarenas)	2,9% (AS)
Sardinal (Prov. Guanacaste)	2,7% (AS) y 1,4% (AC)
Tilarán (Prov. Guanacaste)	1,1% (AS)
Santa María de Dota (Prov. San José)	0,9% (AS)
Siquirres (Prov. Limón)	3,0% (AS) y 3,0% (A-Rápida)

En cuanto a razas se obtuvo un 13,6% de positivos de raza negra y 1,1% en raza blanca.

BIBLIOGRAFIA

1. AKSOY, M., H. LEHMAN & L. I. LUAN ENG.
1957. The recognition of haemoglobins A₂ and E.
The Lancet: 792-793.
2. ARENDS, T.
1961. Frecuencia de las hemoglobinas anormales en Venezuela.
Archivos del Hosp. Vargas, Caracas, Venezuela, 3:225-236.
3. ARENDS, T.
1961. El problema de las hemoglobinopatías en Venezuela.
Rev. Venez. Sanid. 26:61-68.
4. BEAVEN, G. H.
1960. Studies on human foetal haemoglobin. II. Foetal haemoglobin levels in healthy children and adults in certain haematological disorders.
Brit. J. Haemat. 6:201-222.
5. BICKERS, J. N.
1966. Alkali-resistant hemoglobin in Sickle Cell Disease. Ann. Int. Med. 64:1028-1033.
6. BOERMA, F. W. & T. H. J. HUISMAN.
1964. Serologic investigations of human hemoglobins. II. Antibodies produced by isolated human hemoglobin types with known structural differences. Jour. Lab. Clin. Med. 63:264-278.
7. BRIEVE, R. O. T. GÓLIAS & J. G. BATSAKIS
1965. Rapid qualitative and quantitative hemoglobin fractionation cellulose acetate electrophoresis. Am. Jour. Clin. Path. 44:695.
8. BRIEVE, R. O., & J. D. MULL.
1964. Electrophoresis of serum protein with cellulose acetate. A method for quantitation. Am. Jour. Clin. Path. 42:547-551.
9. CARTWRIGHT, G. E.
1968. Diagnostic Laboratory Hematology. Fourth edition,
XIII + 441 pp. Grune & Stratton, New York.
10. CHERNOF, A. I.
1958. The hemoglobin D syndromes. Blood 13:116-127.
11. ECHAVARRÍA, A. R. & C. MOLINA
1963. Un nuevo método de electroforesis en gel de agar para la separación de las hemoglobinas y en especial para hemoglobina A₂. Antioquia Méd. 13:507-519.
12. ELIZONDO, J. & L. E. SOLANO.
1963. Hemoglobinopatías S-C. Estudio de una familia costarricense. Acta Méd. Costarric. 8(1): 15:22.
13. GABUZDA, T. G., G. G. NATHAN & F. H. GARDNER
1963. The turnover of hemoglobins A, F, and A₂ in the peripheral blood of three patients with thalassemia. Jour. Clin. Invest. 42:1678-1688.
14. GOLDBERG, C. A. J.
1962. Hemoglobins. (XIII) 177-215 pp. En Seligson, D. Métodos seleccionados de Análisis Clínicos.

15. GRAHAM, J. J. & B. W. GRUNBAUM.
1963. A rapid method for microelectrophoresis and quantitation of hemoglobins on cellulose acetate. *Am. Jour. Clin. Path.* 39:567-578.
16. GURVARA, J. M. & T. ARENDS
1962. Frecuencia de las hemoglobinas anormales en niños de Venezuela. *Sangre* 7:386-396.
17. HELLER, P.
1966. Hemoglobinopathic dysfunction of red cell. *Am. Jour. Med.* 41:799-814.
18. HELLER, P., V. J. YAKULIS & A. JOSEPHSON
1962. Immunologic studies of human hemoglobins. *Jour. Lab. Clin. Med.* 59:401-411.
19. HIGGINS, L. G., & M. LOWERY
1963. Detection of abnormal hemoglobins. *Am. Jour. Med. Tech.* 385-388.
20. HILL, R. J., W. KONIGSBERG, G. GUIDOTTI & L. C. CRAIG.
1962. The structure of human hemoglobin. *Jour. Biol. Chem.* 237:1549-1554.
21. HISMAN, T. H. J., E. A. MARTIS & A. DOZY
1958. Chromatography of hemoglobins types on carboxymethylcellulose. *Jour. Lab. Clin. Med.* 52(2): 312-327.
22. JEBBOTSON, R. N., & B.A. CROMPTON.
1961. Quantitative determination of haemoglobin A₂ using paper electrophoresis
Jour. Lab. Clin. Path. 14:164-166.
23. INGRAM, V. M., & A. O. W. STRETTON.
1964. Human haemoglobin A₂. Chemistry, genetics and evolution.
Nature 190: 1079-1084.
24. ITANO, H. A.
1963. Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobins. *Arch. Biochem.* 47:148-159.
25. JOHNSON, T. & O. BARRET.
1961. A rapid quantitative paper electrophoresis technique for determining A₂-Hemoglobin. *Jour. Lab. Clin. Med.* 57:961-965.
26. KROSSOGLOU, K. A., I. J. WOLMAN & M. GARRISON.
1963. Fetal hemoglobin-containing erythrocytes. I. Counts of cell stained by the acid elution method compared with alkali denaturation measurements. *Blood* 21(5): 553-559.
27. KUNKEL, H. G. & G. WALLENIS
1955. New hemoglobin in normal adult blood. *Science* 122:268.
28. LEHMAN, H., & A. B. RAPER.
1965. Maintenance of high sickling rate in an african community.
Brit. Med. Jour. 333-336.
29. LINMAN, J. W.
1966. Principles of hematology. XII + 621 pp. 1st Ed.
The Mac Millan Co., N. Y.
30. MATIOLI, G. & B. THRORELLI.
1963. Kinetics of the alkali denaturation of hemoglobin in the single erythrocyte
Blood 21 (1): 1-7.

31. MOTULSKY, A. G., P. H. MILTON & E. L. DURRUM.
1954. Paper electrophoresis of abnormal hemoglobins and its clinical applications. A simple semiquantitative method for the study of the hereditary hemoglobinopathies. *Blood* 9:897-910.
32. MURAYAMA, M.
1965. Orientation of sickled erythrocytes in a magnetic field. *Nature*, 206: 420-422.
33. MURAYAMA, M.
1966. Tertiary structure of sickle cell hemoglobin and its functional significance. *Jour. Cell. Physiol.*, 67: sup. 1. 21-32.
34. NEEL, J. V.
1956. Human haemoglobin types. *New Eng. Jour. Med.* 256(4): 161-171.
35. PAULING, L., H. A. ITANO, S. J. SINGER & C. WELLS
1949. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 110: 543-548.
36. RIVERA, A.
1967. Contribución personal.
37. SCHERR, G. H.
1961. Cellulose acetate electrophoresis in microbiology and immunology. *N. Y. Acad. Scie.* 23(6): 519-530.
38. SINGER, K., A. I. CHERNOFF & L. SINGER.
1951. Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. *Blood* 6: 413-428.
39. SOLANO, L., M. CABEZAS & J. ELIZONDO.
1966. Estudio sobre drepanocitos y hemoglobina "S" en Santa Cruz de Guanacaste. *Acta Méd. Costarric.* 9(1): 59-65.
40. SUNDERMAN, F. W.
1963. Studies of abnormal hemoglobins. I. Procedures for quantitation of hemoglobins separated by means of starch gel electrophoresis. *Am. Jour. Clin. Path.* 40: 227-238.
41. SUNDERMAN, F. W.
1964. Electrophoretic identification of hemoglobins, (secc I, cap. 10): 94-108 pp. En *Sunderman y Sunderman: Hemoglobin. Its precursors and metabolites.* XII + 360 pp., J. B. Lippincott Co., Philadelphia.
42. SUNDERMAN, F. W. & W. SUNDERMAN.
1956. Clinical applications of the fractionation of serum proteins by paper electrophoresis. *Am. Soc. Clin. Path.* 27: 125-158.
43. THOMPSON, R. B.
1963. Observation on the sickling phenomenon, *Am. Jour. Med. Tech.* 29: 379-384.
44. YAKULIS, V. J., P. HELLER, A. M. HOSPHSON & L. SINGER
1960. Rapid demonstration of A₂ hemoglobin by means of agar gel electrophoresis. *Amer. Jour. Clin. Path.* 34: 28-34.
45. ZAK, B., E. M. EGGERS, T. L. JARKOWSKI & L. A. WILLIAMS
1959. Rapid electrophoretic separation of hemoglobins. *Jour. Lab. Clin. Med.* 54: 288-290.
46. ZOMER, M. & A. RIVERA.
1967. Primer caso de hemoglobinopatía S-talasemia en Costa Rica. *Acta Méd. Costarricense* 10(1): 71-87.