

FRECUENCIA DE LA BETA TALASEMIA Y OTRAS HEMOGLOBIOPATIAS EN POBLACION COSTARRICENSE DE RAZA NEGRA

German F. Sáenz*, Mario Chaves*, Wálter Rodríguez*, German Sánchez**,
Alberto Barrantes**, Mario Barrenechea***, Alberto Montero* y Eugenia Quintana*.

RESUMEN

En un total de 2616 individuos de raza negra de la provincia de Limón, se logró demostrar una frecuencia de β talasemia menor clásica del 0,50 por ciento, en tanto lo fue de 0,27 por ciento para la variante F-talasemia (& 13). En tres casos (0,11%), se observó el genotipo africano de PHHbF, y en 36 (1,38%), se destacó la existencia de la variante A2 de la Hba2. Como se trató de una población que recurría a la consulta externa del hospital, no es de extrañar el hallazgo de 12 casos (0,46%), de drepanocitosis. Se detectó un total de 243 casos de Hbas (9,28%), 66 de HbaC (2,52%), 1 de HbCC (0,04%), 1 de Hbs/ β + tal (0,04%), tres ejemplos de factible HbG Philadelphia, y 5 de Hb Korle-Bu. A través de la cuantificación de la HbS en los Heterocigotos (HbAS), se puede inferir la existencia de aproximadamente un 10 por ciento de a+tal homocigota (a-/a-). En la población estudiada pudo establecerse, en forma cercana, un 12 por ciento de deficiencia de hierro. (Rev. Cost. Cienc. Méd, 1990; 11(1):

* Centro de Investigación de Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA), Cátedra de Hematología, Depto. De Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

** Servicio de Hematología, Hospital Calderón Guardia, San José, Costa Rica.

***Lab Clínico, Hospital Tony Facio, Limón, Costa Rica.

INTRODUCCION

En la literatura costarricense hay buena información sobre el hallazgo y frecuencia de hemoglobinas anormales en raza negra (19,30,35) y negroide (20,29,31,42). Poco se conoce, sin embargo, sobre la prevalencia en esa etnia de genes beta talasémicos y de la Persistencia Hereditaria de la Hb Fetal (PHHbF), existiendo eso sí, un buen indicador de la frecuencia de alfa talasemia (a Tal) (30). Por otra parte sólo hay datos aislados sobre la existencia de dos hemoglobinas relativamente frecuentes en esa raza, la GPhiladelphia y la Korle-Bu (5,28). Con el deseo prioritario de destacar la frecuencia de beta-talasemia (β Tal), se realizó un trabajo analítico para tal fin, que permitiría, al mismo tiempo, obtener cifras relativas de otros trastornos hereditarios de la Hb, así como de la deficiencia de hierro en dicha población.

MATERIALES Y METODOS:

Se estudió a 2616 sujetos de raza negra, niños y adultos, de uno y otro sexo, que asistieron a la consulta externa del Hospital Tony Facio de Limón, Costa Rica, tomándose la precaución de no repetir los análisis a una misma persona. Las muestras de sangre se colectaron con EDTA-2Na y se mantuvieron en refrigeración el mayor tiempo posible, antes de su análisis. Dentro de

las primeras 24 horas de recogidos especímenes, se les practicó la prueba de fragilidad osmótica al 0,36 por ciento de NaCl (F.O) (9), con el fin de detectar rápida y sensiblemente, la resistencia osmótica aumentada, propia de los síndromes talasémicos menores, de las Hemoglobinas insolubles y de la anemia ferropriva (33). Simultáneamente, se determinó la tasa de Hb, el índice hematocrito y se preparó una extensión sanguínea para el estudio citomorfológico. Para estos y otros análisis se siguieron los métodos convencionales (3,27).

La electroforesis de la Hb se llevó a cabo en acetato de celulosa (Titan III, Helena Laboratories), con tampón de tris EDTA-borato a pH 8,6 (3,7) así como en Gel de agar citrato de capa fina pH6,2 (18). La cuantificación de la HbA2 se realizó de rutina a todas las muestras por microcromatografía, con DE-52 con tapón de tris-HCl, pH 8,30 (4), y para confirmación, por electroforesis - elución (13). La HbF se cuantificó por el método de la desnaturalización alcalina de Singer et al. (41).

Cuando el caso lo exigió, se efectuó tinción - elución citológica de la HbF (10). Las fracciones hemoglobínicas anormales (S, C, y otras) se cuantificaron tanto por electroforesis - elución, como por microcromatografía. La protoporfirina eritrocítica ligada al zinc (PP-Zn) se midió con base en el uso de un hematofluorómetro (AVIV Laboratories, Lakewood, N.J). En todos los patrones electroforéticos de la hemoglobina con fracciones lentas tipo HbS o HbC, se efectuó la prueba de solubilidad (17). En algunos casos hubo oportunidad de realizar electroforesis de globina a pH alcalino, de acuerdo con Schneider (37), en fracciones lentas con migración semejante a la HbS, que presumiblemente podrían corresponder a hemoglobinas Korle-Bu o G-Philadelphia.

RESULTADOS:

En el cuadro 1 se indican los hallazgos encontrados en la población estudiada. El abordaje diagnóstico de B Tal clásica se inició con la obtención de una F.O. disminuida, un desfase de la relación Hb/Hto (CHCM<31%), y un riguroso análisis del frotis sanguíneo para la detección de microcitosis hipocrómica.

A ello se le unió la cuantificación de la HbA2, la cual se estableció, como valor de referencia y para fines diagnósticos, a un nivel no inferior al 3,8 por ciento, encontrándose los 12 casos detectados (0,46%) en un ámbito del 3,8 al 5,5 por ciento (x: 4,7%). Para el pesquizaje de F Tal, se siguió la misma conducta analítica, cuantificándose la HbF, si en el patrón electroforético se observaba incremento de esa fracción. Siete casos (0,27%) cumplieron con tales parámetros diagnósticos con HbF mayor del 7 por ciento y una distribución celular heterogénea. En los 19 casos de talasemia (12 clásica y 7.F Tal), hubo una buena correlación de aquellos parámetros, aunque es posible que la cifra de 0,46 por ciento de B Tal clásica (12/19) esté subestimada, por cuanto en aproximadamente el 11,6 por ciento de la muestra global (n=2616) pudo detectarse una deficiencia de hierro, situación que podría deprimir la síntesis de la HbA2, parámetro indispensable para el diagnóstico de certeza del rasgo de B Tal. La cifra de B Tal subió a 0,5 por ciento al incluirse un caso doble heterocigoto SI B+Tal. Se encontró un 10 por ciento de falsos positivos por F.O., la mayoría de ellos con anemia por deficiencia de hierro no relacionada con la existencia de hemoglobinas S ó C. La demostración de deficiencia de hierro se hizo con base en los niveles de hemoglobina, el valor de la CHCM, la morfología eritrocítica, el nivel elevado de la PP-Zn y la ausencia de marcadores de B Tal. Los casos de PHHbF se diagnosticaron con base en los niveles incrementados de HbF (> del 12%), ausencia de una F.O. anormal, morfología eritrocítica normal y

una distribución homogénea de la HbF en los eritrocitos. Las hemoglobinas anormales GPhil y Korle-Bu se diagnosticaron presuntivamente como tales con base en sus características de solubilidad, patrón electroforético a pH alcalino y ácido, y presencia (G-Phil) o ausencia (Korle-Bu) de una banda extra de HbA2 en acetato de celulosa. En 4 de los 8 casos encontrados con esas variantes pudo corroborarse aún mejor su identidad por el patrón electroforético de las cadenas de globina. En todos los patrones con hemoglobinas S y C se realizó la prueba de solubilidad y su confirmación se efectuó por el patrón electroforético en gel de agar ácido (18). Una investigación posterior permitirá el estudio por isoelectroenfoque y análisis estructural, de 7 casos de patrón presuntivo HbAS en los que pudo constatar una ligera anemia, basofilia difusa y en algunos pocos eritrocitos drepanocitoides, tal y como se ha señalado para la variante HbS-Antillas (15). La cuantificación de la HbS por electroforesis-elución permitió demostrar la factible existencia de un 9,55 por ciento de alfa Tal asociada, presumiblemente mediada por el determinante α^0 Tal, pues los valores de esa hemoglobina se encontraron en un ámbito de 25,8 a 29,4 por ciento, con un valor medio de 27,6 por ciento. Estas cifras se indican para el genotipo HbAS en el que coexiste en forma concomitante alfa+ Tal homocigota (α/α) (α^0), genotipo α Tal característico de raza negra (39), siempre y cuando no medie deficiencia de hierro (1), tal y como se estableció en nuestros casos.

DISCUSION:

Las talasemias son trastornos genéticos de la síntesis de Hb, caracterizados por una reducción en el grado de producción de una o más de las cadenas de globina, lo cual lleva a un desbalance biosintético α/β y, entre otros fenómenos anormales, a una microcitososis hipocrómica. La enfermedad talasémica exhibe una notable heterogenei-

dad a nivel molecular y, al menos en la β Tal, se han distinguido 54 diferentes puntos o errores mutacionales (8). Fenotípicamente, las β Tal se pueden clasificar en dos grupos: las β^+ Tal en las que hay una reducción de la síntesis de cadenas (β), y las β^0 Tal en las que no existe síntesis del todo (43). Una variante de la β Tal es la (β β^0)^o F Tal, en la que la característica es la presentación de niveles aumentados de HbF (43). En particular, se pueden diferenciar dos tipos de β^+ Tal: el mediterráneo, más grave (con cerca de un 10% de síntesis), y el negro β^{++} Tal, con producción de por los menos 50 por ciento de cadenas β (2). En 1967, se publicó en la literatura costarricense el primer informe sobre la presencia de un gene (3 Tal, siendo del tipo β^+ en conjunción con la HbS (46).

Posteriormente aparece otro reporte sobre la existencia del tipo Ftal (β β^0)^o(21), y luego éste en raza negra, concomitante con HbS (23). En esta misma etnia se hizo notar luego la presencia del gene supresor (β^0) detectado gracias a la concurrencia alélica del gene de la HbS (25). También en esa raza, se halla el informe de un caso de β Tal menor con alta HbF (24), y otro con el clásico patrón de HbA2 alta (26). En población híbrida-negroide del Guanacaste fue posible demostrar una frecuencia del 0,5 por ciento de β Tal menor en niños preescolares del cantón de Santa Cruz, Guanacaste (31). Al margen de aquellos esporádicos hallazgos propios de la raza negra o negroide, es más abundante lo que se ha reportado al respecto en población caucásica o caucasoide del país (32). En la presente comunicación hacemos referencia por primera vez en raza negra, y en una muestra estadísticamente representativa para los efectos, de una frecuencia del 0,50 por ciento de β Tal menor clásica con HbA alta y del 0,27 por ciento para F Tal, para una cifra global del rasgo talasémico del 0,77 por ciento. La β Tal es más común en las regiones occidentales de Africa, especialmente en Ghana y Liberia (44,45). Livingstone (12), considera que la alta frecuencia

de β Tal en Liberia y en la población Nilótica del Sur del Sudán, posiblemente representa una adaptación temprana a la malaria. Schneider (38), en 250,000 individuos de raza negra, encontró una frecuencia del 0,6 por ciento, la cual parece aceptable para dicha raza en los Estados Unidos (45). Huisman et al. (7), con base en un estudio de 17.000 negros de Georgia, consideran que tal frecuencia subestima la tasa real de ese trastorno, pues posiblemente una del 1,5 por ciento sea más cercana a la realidad. Digno es de resaltar la opinión de Winter (45) en torno al diagnóstico de la β Tal en raza negra. Según el autor, este trastorno puede escapar de su detección en el heterocigoto simple, dado la moderada expresión fenotípica-hematológica. por la que su frecuencia debe ser medida más exactamente de acuerdo con la frecuencia del doble heterocigoto β tal con HbS, los llamados fenotipos HbS+HbA (β +tal) y HbSHbA (β° tal). Serjeant (40), precisamente con base en la proporción relativa de esos dos fenotipos, ha sugerido que en Jamaica el gene β +Tal ocurre en el 1 por ciento de la población, en tanto que el gene β° Tal se presenta el 0,5 por ciento. La mayoría de los sujetos de raza negra de la provincia de Limón es de origen o extracción jamaicana (32), por lo que nuestros resultados pareciera subestimar la verdadera frecuencia del rasgo talasémico en esa población, pero ello posiblemente se debe a la supradicha expresión ligera del determinante β + Tal en esa raza β ++ tal), situación que podría impedir su detección analítica en algunos casos. La PHHbF se encuentra aproximadamente en el 0,1 por ciento de los individuos de raza negra de los Estados Unidos (16) y en el 0,16 de los de Jamaica (40). Un reporte nacional (22) ya había dado cuenta de la presencia de este interesante trastorno hereditario en población de raza negra. La clásica PHHbF es la que se encuentra en raza negra, con HbF del 15 al 35 por ciento, y con una proporción relativa similar de los residuos de glicina (CGt) y alanina (At) (11). Por lo tanto, a diferencia de otros genotipos raciales de PHHbF, a ésta PHHbF

africana se le designa no solo (G+A+) si no también (β)^o por la pérdida total de los genes α y β (34). Nuestros hallazgos de un 0,11 por ciento de este trastorno es comparable a lo reportado anteriormente en la población de origen africano allende el continente. El hallazgo de 0,11 por ciento de HbG Philadelphia y de 0,19 por ciento de Hb Korle-Bu, es apreciablemente más alto de lo reportado en Jamaica por Serjeant (40), que fue de 0,042 y 0,030 por ciento, respectivamente. En todo caso, se trata de dos mutantes inócuas no infrecuentes en esa raza, y especialmente prevalentes en el Africa Occidental. Particularmente la Hb Korle-Bu es relativamente frecuente en el grupo étnico Mina de Benin, y en menor grado en Ghana y Costa de Marfil (2). En lo referente a las hemoglobinas frecuentes S y C, nuestros resultados de 9,32 por ciento para el rasgo HbAs, y de 2,52 por ciento para el AC son muy similares a lo previamente reportado en Costa Rica (19,26,30). Destacamos el hallazgo del segundo caso homocigoto por HbC luego del reporte del primer informe en 1985 (36). La frecuencia de 0,45 por ciento de drepanocitosis (HbSS), aunque es alta, es inferior a la de 1,40 por ciento se encontró en una encuesta realizada en recién nacidos de esa etnia (30), habiendo sido, por otro lado, de 0,29 por ciento en niños escolares (32). Al contrastar la cifra de 9,32 por ciento de HbAS con la de 0,45 por ciento para HbSS, se destaca una relación aproximada de un homocigoto por cada 21 heterocigotos, la cual es alta, pero cuya explicación viene dada por el tiempo de población estudiada, vale decir hospitalaria. Por el contrario, en población general, y de acuerdo con la existencia de cifras semejantes de heterocigotos, lo esperable es una razón de un homocigoto por cada 400-600 heterocigotos (14). El hallazgo de una frecuencia del 0,11 por ciento del doble heterocigoto HbSC, es menor a la encontrada en recién nacidos de esa raza, que fue de 0,70 por ciento (30) y de 0,29 por ciento en niños escolares (32). El efecto deletéreo sobre la sobrevivencia de la HbSS, así como el dado por la Hb S/ β Tal y la HbS/C,

afectan la frecuencia de estos trastornos según se le estime en recién nacidos, en comparación con una población heterogénea que asiste a consulta hospitalaria. De allí que no sorprenda el hecho de que en zonas rurales de Africa con alta frecuencia del gene HbS, casi no se observan adulto con drepanocitosis. En dos trabajos previos (32, 35) se había comprobado la alta frecuencia del marcador HbA2 (7) en raza negra, con cifras de 2,58 por ciento (32) y de 0,80 por ciento (35). Esta mutante de cadena delta de la HbA2 es casi privativa de esa etnia con alta frecuencia en Liberia, Africa Occidental (6), habiéndose encontrado en presente trabajo en el 1,69 por ciento de la muestra. Queremos destacar que al menos por los resultados obtenidos con la determinación cuantitativa de PP-Zn,

cotejada simultáneamente con el nivel de Hb, la evaluación de la morfología eritrocítica y la F.O., es posible que exista aproximadamente un 11,6 por ciento de deficiencia de hierro en la población estudiada, situación que debe analizarse, como causa de anemia nutricional o por sangrado crónico, a la luz de esta muestra poblacional particular. Finalmente, fue llamativo el hecho de algunos casos de HbAS (17/244), con índice anémico no debido a deficiencia de hierro. Es posible que ello se deba en parte, a otra alteración genética concomitante (por ejemplo. alfa Tal severa) o a una Hb electroforéticamente similar a la HbS tal y como se ha visto con el hallazgo de la Hbs_Antilles (15), la cual en el heterocigoto ocasiona drepanocitemia y anemia hemolítica crónica.

CUADRO 1

HEMOGLOBINOPATIAS EN 2616 SUJETOS DE RAZA NEGRA, BAJO CONSULTA HOSPITALARIA

genotipo hemoglobina												
AA	AS	SS	AC	CC	SC	S/β-tal	A/G-phil	A/KB*	A2	PHHbF	0-tal	F-tal
Nº 2225	243	12	66	1	3	1	3	5	36	3	12	7
% 85,05	9,28	0,46	2,52	0,04	0,11	0,04	0,11	0,19	1,38	0,11	0,46	0,27

*KB=Hb Korle-bBu

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bunn, H.F., Forguet, B.G., Ranney, H.M. Hemoglobinopathies. Vol XII. In: Major problems in integral medicine. W.B.Saunders Co., Phil, 1977, 152.
- 2) Cabanner, R.J., Fabrituis, H., Sangare, A, Kple-Faget, P. Hemoglobin variants: distribution in West Africa. In: Winter, W.P. Hemoglobin variants in human populations, vol. II. CRC Press Inc., 1986: 11-28.
- 3) Dacie, J.V., Lewis, S.M. Practical Haematology Sixth ed., Churchill Livingstone, N.Y. 1984: 22-49.
- 4) Efremov, G.D., Huisman, T.H.J., Bowman, K., Wrihstone. R.N. Microchromatography of hemoglobins. II. A rapid method for the determination of hemoglobins. J. Lab. Clin. Med. 1974; 83: 675-684.
- 5) Elizondo, J. Sáenz, G.F., Alvarado, M.A., Ramón . M. Hallazgo de Hb Korle-Bu ($\alpha_2 \beta_2$ 275 aspasn) en Costa Rica. Sangre 1976, 1: 54-59.
- 6) Huisman, T.H.J., Jonxis, J.H.P.. The hemoglobinopathies : techniques of identification. 1 ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y.; 1977:58-59.
- 7) Huisman, T.H.J., Abraham, B.L., Harris, H.F., Gravely, M.E., Henson, J., et al. Hemoglobinopathies observed in the populations of the southern United States. Hemoglobin, 1980, 4: 373-380.
- 8) Kasili, E.G. The geographical distribution of abnormal hemoglobins in Eastern Africa. In: Winter, W.P., Hemoglobin variants in human populations, vol. II.; CRC press Inc., 1986: 29-43.
- 9) Kattamis, C., Efremov, G., Pootrakul, S. Effectiveness of one tube osmotic fragility screening in detecting β -thalassaemia trait. J. Med. Genet., 1981; 18:266-270.
- 10) Kleihauer, E. Determination of fetal hemoglobin: Elution technique. In: Standardization of laboratory reagent and method for the detection of hemoglobinopathies. Publication of the Center for Disease Control, Atlanta, Ga., 1974;19-20.
- 11) Lehman, H.; Huntsman, R.G. Man's haemoglobins. 1 ed., North Holland Publishing Co., 1974; 273-376.
- 12) Livingstone F.B. Anthropological aspects of the distributions of the human hemoglobin variants. In: Winter, W.P., Hemoglobin variants in human populations, vol I. CRC press Inc., 1986; 17-28.
- 13) Marengo Rowe, A.J. Rapid electrophoresis and quantification of hemoglobins on cellulose acetate. J. Clin. Pat., 1965; 18: 790-796.
- 14) Milner, P.F. Thalassemias, hemoglobinopathies, and sickle cell disease. Hematology, vol. 2 (Ed. V. Fairbanks), John Willey and sons, Inc.; 1983; 211-220.
- 15) Monplaisir, N., Merault, G., Poyart, C., Rhoda, M.D., Craescu, C., et al. Hemoglobin S-

- Antilles: A variant with lower-solubility than hemoglobin s. and producing sickle cell disease in heterocytotes. Proc. Natl. Acad. Sci., 1986; 83:9363-9367.
- 16) Motulsky, A.G., Frequency of sickling disorders in U. S. blacks. N. Eng. J. Med., 1973; 288 :31 -37.
 - 17) Nalbandian, R.M., Nichols, B.M., Camp. F.R., Lusher, J.M., Conte, J.M. et al. Dithionite tube test. A rapid inexpensive technique for the detection of Hemoglobin S. and non-S. sickling hemoglobin. Clin. Chem., 1971; 17: 1033-1040.
 - 18) Robinson, A.R., Robson, M., Harrison, A.D., Tullzer, W.W. A new technique for differentiation of hemoglobins. J. Lab. Clin Med., 1957; 50: 745-749
 - 19) Sáenz, G.F., Arroyo, G., Jiménez, J., Gutiérrez, A., Barrenechea, M., Brilla, E., Valenciano, E. Investigación de hemoglobinas anormales en población de raza negra costarricense. Rev. Biol. Trop. 1971; 19: 251-260.
 - 20) Sáenz, G.F., Alvarado, M., Atmetlla, F., Arroyo, G., Jiménez, J., Valenciano, E. Investigación de hemoglobinas anormales en población costarricense del Guanacaste. Acta Med. Cost. 1973; 16:147-152.
 - 21) Sáenz, G.F., Alvarado, M.A., Arroyo, G.F.(delta-beta)talasemia en Costa Rica. Acta Med. Cost., 1974; 1: 63-70.
 - 22) Sáenz, G.F., Alvarado, M.A., Arroyo, G., Montero, A.G. Persistencia hereditaria de la HbF (PHHbF) en C.R. Rev. Med. Hospital Nacional de Niños, 1975; 2: 135.
 - 23) Sáenz, G.F., Sánchez, G., Monge, B. Síndromes drepanocíticos en Costa Rica IV. Hemoglobina S/β-8 (S/F-tal). Acta Med. Cost., 1976; 4: 3-11.
 - 24) Sáenz, G.F., Elizondo, J., Arroyo, G., Montero, G., Jiménez, J. Talasemia A2F en raza negra costarricense. A propósito de un caso. Acta Med. Cost., 1977; 4: 373-377.
 - 25) Sáenz, G.F., Elizondo, J., Páez, C.A. Hallazgo del gene β°-talémico (supresor) en Costa Rica. V. Síndrome de heterocigosis doble S/β° talasémico (supresor) en C.R. Sangre, 1978, 2: 196-202.
 - 26) Sáenz, G.F., Elizondo, J., Arroyo, G., Valenciano, E., Rojas, L. Jiménez, J. Hemoglobinopatías en 12.000 escolares. Acta Med. Cost. 1980; 23: 39-48.
 - 27) Sáenz, G.F., Moreira, J. Laboratorio de Hemoglobinopatías: Manual Latinoamericano. Primera, ed, Universidad de Costa Rica, Ministerio de Salud; Dept., publicaciones, San José. 1980; 75-117.
 - 28) Sáenz, G.F., Elizondo, J., Arroyo, G., Valenciano, E., Jiménez, J. Montero, G. et al Hallazgo de la hemoglobina G-philadelphia (α68(E17) asn-lis) en C.R. Consideraciones bioquímico-genéticas. Sangre, 1981; 2:224-230.
 - 29) Sáenz, G.F., Chaves, M., Castro, E., Ramón, M., Barboza, M.

- et al. Síndromes drepanocíticos en población de la provincia Puntarenas. Acta Med. Cost. 1984, 27: 179-182.
- 30) Sáenz, G.F., Chaves, M., Grant, S., Barrechenea, M, Arroyo, G., Valenciano, E. et al. Hemoglobinas anormales, α -tal, y deficiencia de G6PD eritrocitaria en recién nacidos de raza negra. Sangre, 1984; 29: 861 -867
- 31) Sáenz, G.F., Cháves, M., Briceño, J., Quintana, E., Arroyo, G., et al Polimorfismo de la hemoglobina y de la G6PD eritrocítica en población escolar de Sta. Cruz, Guanacaste. Rev. Cost. Cienc. Med., 1985; 6: 126-130.
- 32) Sáenz, G.F., Cháves, M., Las hemoglobinopatías en Costa Rica; aspectos históricos, culturales y epidemiológicos. Rev. Cost. Cienc. Med., 1986; 7: 95-106.
- 33) Sáenz, R., Jiménez, J., Cháves, M., Quintana, E., Sáenz, G.F. Estudio sobre la coexistencia de HbS y de la deficiencia de G6PD en población de raza negra. Rev. Cost. Cienc. Med., 1986; 7: 305-310.
- 34) Sáenz, F. G., Chavez, M., Montero, A.G., Jiménez, J. Síndromes de β talasemia menor o heterocigota II. Aspectos analítico-diagnóstico. Rev. Cost. Cienc. Med., 1988; 9: 83-91.
- 35) Sáenz, G.F., Cháves, M., Peña, I., Rodríguez, W., Montero, A.G., Jiménez, J. Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal y su asociación con HbS. Primer caso hallado en C.R. Sangre, 1989;35: 371 -374.
- 36) Sáenz, R.I., Sáenz, G.F., Muñoz, G., Chaves, M. enfermedad homocigota por hemoglobina c. Rev. Med. Hosp. Nac. Niños. 1984; 19:25-30.
- 37) Schneider, R.G. Differentiation of electrophoretically similar hemoglobins such as S, D, G and P; or A2, c, E and O, by electrophoresis. Clin.Chem. 1974: 20: 1111-1120.
- 38) Schneider, R.G., Hightower, B., Hosty, T.S., Ryder, H., Tomlin, G. et al. Abnormal hemoglobins in a quarter million people. Blood.1976: 48: 629-642.
- 39) Serjeant, G.R. Sickle cell disease. Oxford University Press, N.Y., 1985; 323-328.
- 40) Serjeant, G.R. Hemoglobinopathies in the Caribbean. In: Winter, W.P. Hemoglobin variants in human populations. vol II. CRC Press Inc., 1986; 91-99.
- 41) Singer, K., Chernoff, A.I., Singer, L. Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hemotologic disorders by mean of alkali denaturation. Blood. 1951; 6:415-428.

- 42) Solano, L., Cabezas, M., Elizondo, J. Estudio sobre drepanocitosis y HbS en Sta. Cruz, Guanacaste. Acta Med. Cost. 1966; 9: 59-63.
- 43) Weatherall, D.J. The diagnostic features of the different forms of thalassaemia. In: The thalassaemias: D.J. Weatherhall, Ed. Churchill-Livingstone 1983; 1-26.
- 44) Willcox, M.C. Thalassaemias in northern Liberia. A survey in the Mount Nimba area. J. Med. Gen. 1975; 12: 55-62.
- 45) Winter, W.P. Hemoglobin variants of the United States. In: Winter, W.P., Hemoglobin variants in human populations., vol I. CRC Press, Inc., 1986, 50-69
- 46) Zomer, M., Rivera, A. Primer caso de hemoglobinopatía Stalasemia en C.R. Acta Med. Cost. 1967: 19: 71-75.