

Estudio comparativo entre la persistencia de hemoglobina fetal y δ -talasemia (delta-beta) talasemia

Por los Dres.:

ERNESTO DE LA TORRE MONTEJO,^(*) RAÚL PÉREZ ATENCIO^(**)
Y BRUNO COLOMBO^(***)

INTRODUCCION

El término talasemia se aplica a un grupo de alteraciones hematológicas, genéticamente determinadas, caracterizadas por la dificultad para la formación de hemoglobina normal, como consecuencia de la supresión completa o parcial de la síntesis de una de las cadenas de la globina.^{3,20} Hasta el momento actual esta supresión ha sido descrita en las cadenas α 23, 24 β 15, 34 y δ 17, 33. De ahí las denominaciones de α , β y δ talasemia. Habitualmente estos trastornos tienen repercusión sobre la morfología del eritrocito, cuya traducción principal aunque no única es la presencia de células en diana (*Target Cells*). Además se observa una disminución de los índices de los glóbulos rojos.³⁴

Se sabe ya, que la disminución o supresión de la síntesis de las cadenas de la

globina depende de distintos mecanismos genéticos, lo que determina la existencia de diferentes tipos de talasemia.¹⁶ La mejor conocida es la β talasemia que en su forma clásica heterocigótica, se caracteriza por un aumento del porcentaje de hemoglobina A₂ (Hb A₂), manteniéndose los valores de la hemoglobina fetal (Hb F) dentro de la normalidad o ligeramente aumentados,¹⁶ no obstante se han informado casos con un porcentaje elevado de Hb F. Entre éstos ha sido muy estudiado un defecto originalmente llamado F-talasemia¹³ y más tarde δ - β talasemia para indicar la supresión de la síntesis de ambas cadenas.^{5,10,31} Esta última denominación es más aceptada, ya que ha sido demostrado que en unos pocos casos la cantidad de Hb F es normal.¹⁴ Sin embargo en la forma más frecuente de δ β talasemia heterocigótica existe un porcentaje elevado de Hb F, entre 3.5% y 20%.^{24,37,39} En el homocigótico la Hb F representa un 100%.⁸

Otra anomalía congénita en la síntesis de hemoglobina, caracterizada por la persistencia en la vida adulta de una cantidad aumentada de Hb F, es la llamada persistencia hereditaria de la Hb F.²¹ En este caso el porcentaje de Hb F

(*) Médico Especialista en Pediatría, Director del Instituto de Hematología e Inmunología, Hospital Infantil "William Soler", Avenida de San Francisco No. 10,112, Habana 8, Habana, Cuba.

(**) Especialista en Laboratorio, Responsable del Laboratorio del Hospital Infantil "William Soler", Avenida de San Francisco No. 10,112, Habana 8, Habana, Cuba.

(***) Bioquímico en el Instituto de Hematología e Inmunología en el Hospital Infantil "William Soler", Avenida de San Francisco No. 10,112, Habana 8, Habana, Cuba.

oscila entre 12 y 38% en el heterocigótico¹⁸ y 100% en el homocigótico.⁴

Este trabajo tiene por finalidad describir un caso de $\alpha\beta$ talasemia y otro de persistencia hereditaria de la Hb F; mostrar sus analogías y diferencias, sus relaciones con otras hemoglobinopatías y discutir las bases genéticas de estas dos anormalidades.

MÉTODOS

La hemoglobina se determinó por el método de la cianometahemoglobina; la Hb F por el método de la desnaturalización alcalina en un minuto de Singer.²⁰

Para la determinación de la hemoglobina acidoresistente se utilizó la técnica de elución en un "buffer" de citrato.²⁵

La distribución de la Hb F en las células se obtuvo determinando su porcentaje en distintas capas de glóbulos rojos después de una serie de centrifugaciones como ha sido descrito por *Comings* y *Motulsky*.¹⁰

La electroforesis en almidón se realizó en un sistema de "buffers" discontinuos según el método de *Poulik*,²⁸ coloreándose el gel en bencidina.

La Hb A₂ se determinó utilizando el método de *Kunkel* modificado.²⁷

CASOS CLINICOS

Caso A:

Paciente que es ingresada a la edad de siete meses por presentar fiebre de dos semanas de evolución. El examen físico mostró una niña entrófica con mucosas pálidas, algunos estertores roncacos a la auscultación pulmonar, punta de bazo palpable e hígado dos centímetros el borde inferior por debajo del reborde costal. Durante el ingreso se constató otitis media purulenta y sinusitis maxilar, siendo tratada adecuadamente con antibióticos, desapareciendo el cuadro febril. El estudio hematológico mostró

una anemia con cifras de hemoglobina entre 6 y 7 g. %, constantes normocíticas hipocrómicas, hierro sérico de 56 mc. Al encontrarse una prueba de falciformación positiva y reticulocitosis de 8%, se indicó electroforesis de hemoglobina, la cual fue informada como SS, dándole el alta con anemia a hematíes falciformes; dos semanas después es ingresada de nuevo por presentar historia de fiebre y dolor en ambas rodillas. En la sala se constató una infección respiratoria superior y rápidamente cedió la fiebre al tratamiento antibiótico, siendo dada de alta a los 11 días.

Es ingresada dos meses después al ser vista en consulta externa y encontrarse conteo de reticulocitosis de 1.2%, planteándose la posibilidad de una crisis aplásica. El medulograma mostró hiperactividad eritropoyética, la coloración de Perls fue negativa en médula, el hierro sérico fue de 30 mc.

Se administró tratamiento con hierro aumentando los reticulocitos y la Hb 2 gr., siendo dada de alta. Durante los últimos dos años la niña ha sido seguida por consulta externa, presentando muy buen estado general, cifra de reticulocitos entre 3 y 6%, ocasionales infecciones respiratorias superiores parasitismo intestinal a *Ascaris* y *Tricocefalo* parasitismo en la cifra de hemoglobina es de 11.6 g. %.

Caso B:

Paciente de 11 años de edad que al hacerle un hemograma previo a una amigdalectomía, se le dijo a la madre que tenía anemia, siendo tratado con preparados de hierro. Vit. B12 y ácido fólico, no mejorando la anemia. Posteriormente es estudiado en otro Hospital de donde es remitido a este Centro. No hay historia de dolores óseos y ocasionalmente dolores abdominales, casi siempre acompañados de diarreas.

A los 7 y 10 años le fue diagnosticado hepatitis, en la última ocasión fue remitido al Hospital antifeccioso, donde este diagnóstico fue descartado.

El examen mostró un niño de la raza negra con peso de 30.5 Kg. y talla de 140 cm. con mucosas pálidas. El resto del examen fue esencialmente normal, no constatándose hepatoesplenomegalia. El estudio hematológico se muestra en la tabla II.

El estudio radiológico mostró signos de osteoporosis marcada con lesiones lacunares en los huesos largos.

Tabla I

Datos hematológicos en la familia A

	Edad	Hb Gm%	Hto	Htles mm ³ 10 ⁶	Ret%	HbF	H	M	PK	D	A	Otros
Padre	36a	13.8	45	4.89	1.6	21.9	+	+	+	+	+	—
Madre	31a	11.8	41	4.46	1.8	0.80	+	-	-	-	-	—
Hno Varón	7a	12.2	40	4.31	1.0	0.56	+	+	-	-	+	—
Hermana	5a	11.0	38	4.21	1.2	1.48	+	-	-	-	-	—
Proposito	3a	11.2	37	4.08	2	3.427	++	+	+	+	+	—

H: Hipocromia
 M: Microsítosis
 PK: Poikilocitosis
 D: Hematies en diana
 A: Anisocitosis

Tabla II

Datos Hematológicos en la familia B

Edad	Edad	Hb Gms%	Hto	Htles mm ³ 10 ⁶	Ret %	HbF %	HbA ₂ %	Datos morfológicos					
								H	M	PK	D	A	Otros
Padre	51a	13	40	4.41	2.0	6.96	2.15	+	-	-	-	+	Punteado Basófilo
Madre	39a	11.2	35	3.85	1.4	1.23	3.98	+	-	-	-	+	Punteado Basófilo Crenocitos
Hermano	8a	10.2	36	4.07	3.0	1.44	3.72	++	+	+	-	+	Punteado Basófilo Crenocitos Esquistocitos
Proposito	13a	8.4	29	3.24	4.2	6.854	2.75	+++	++	++	++	+++	Punteado Basófilo Crenocitos Esquistocitos Células Barr Microcitos Anisocromia

H: Hipocromia
 M: Microsítosis
 PK: Poikilocitosis
 D: Hematies en diana
 A: Anisocitosis

RESULTADOS Y DISCUSION:

Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal: Esta anomalía fue descubierta en Nigeria por Edington y Lehman¹² siendo informada más tarde en Jamaica²⁵ y EE.UU.^{11,19,20} Solamente ha sido descrito un caso homocigótico, con un 100% de Hb F, que se demostró te-

nía una constitución química igual a la Hb F del cordón umbilical.⁴ No había evidencias de hemólisis ni de alteraciones desde el punto de vista clínico.

Se han informado casos heterocigóticos, en los que el gene que determina la persistencia de Hb F, se encuentra combinado con el gene para la Hb S, Hb C y talasemia.^{7,11,12}

En la familia A de nuestro estudio, el padre del paciente es portador de una persistencia hereditaria de Hb F heterocigótica, no tiene anemia y está clínicamente asintomático; el porcentaje de Hb F fue de 21.9%. Se ha señalado que en estos casos, la distribución de Hb F en los glóbulos rojos es homogénea^{29,32} lo cual tiene una significación diagnóstica importante. Esta distribución uniforme, común a todas las células, demuestra que no se trata de peculiaridad de una clona en particular, como en el caso de anemias graves, sino como una manifestación primaria del gene que regula la persistencia de Hb F.³²

El paciente muestra las características de un doble heterocigótico; persistencia de Hb F/S, el porcentaje de Hb F fue de un 34.27%. La presencia de las dos hemoglobinas es claramente visible por electroforesis en gel de almidón (Fig. 1). La primera banda corresponde a la Hb y la segunda a la Hb S.

En cuanto a esta última, fue demostrada su identidad por la prueba de solubilidad y además por una falciformación positiva. La Fig. 1 muestra también la separación electroforética de las hemoglobinas de un hemolizado de la madre del paciente. Se demostró que la banda presente en la posición de la Hb S correspondía a ésta por las pruebas ya mencionadas, confirmando que la madre es una portadora del gene sicklémico (AS).

Los individuos heterocigóticos muestran persistentes de la Hb F como ya ha sido reportado, no presentan manifestaciones clínicas.¹¹ El paciente desde el punto de vista clínico es normal, sus datos hematológicos están señalados en la tabla I.

En la Fig. 2 se muestra la lámina de periferia y elusión de hemoglobina en el padre y paciente. En la Fig. 4 se muestra la distribución de la Hb F en eritrocitos de diferente edad.

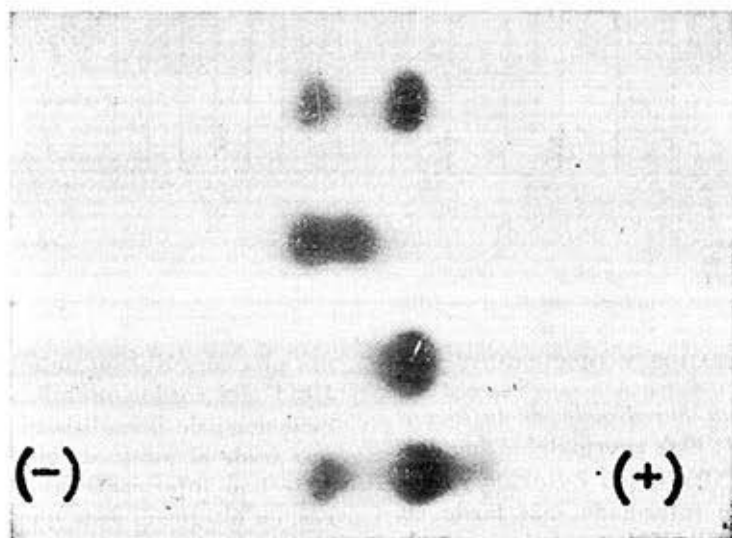


Fig. 1. Electroforesis en gel de almidón a pH 3.6 de hemolizados de la familia A: de arriba para abajo: madre, propósito, padre, control A/S.

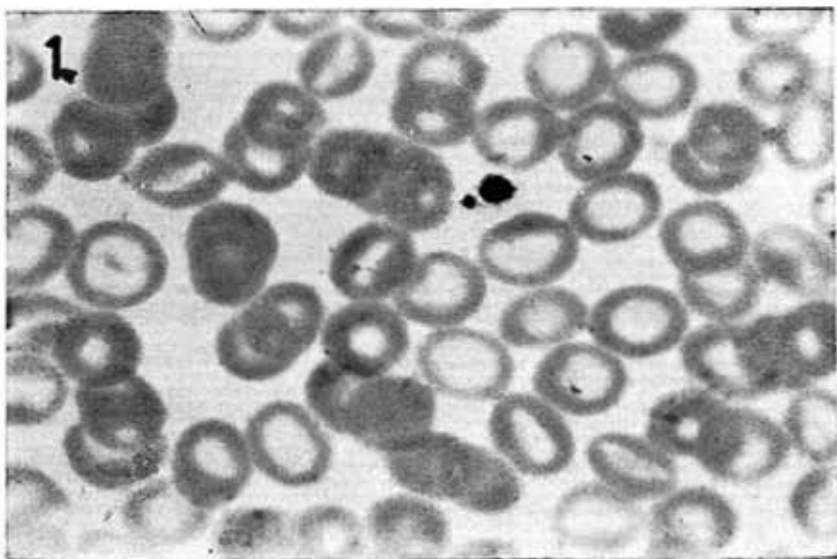


Fig. 2. Caso A: Lámina de periferia del padre.

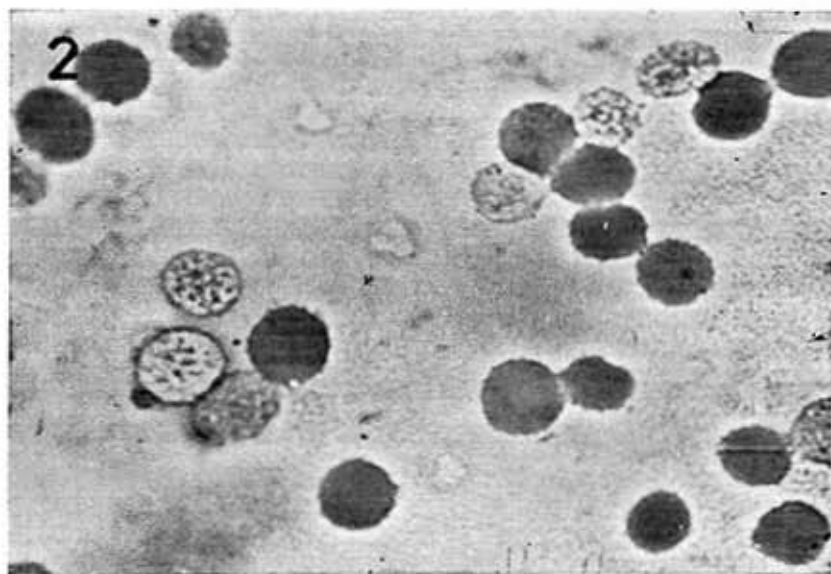


Fig. 2. Caso A: Lámina de elusión del padre.

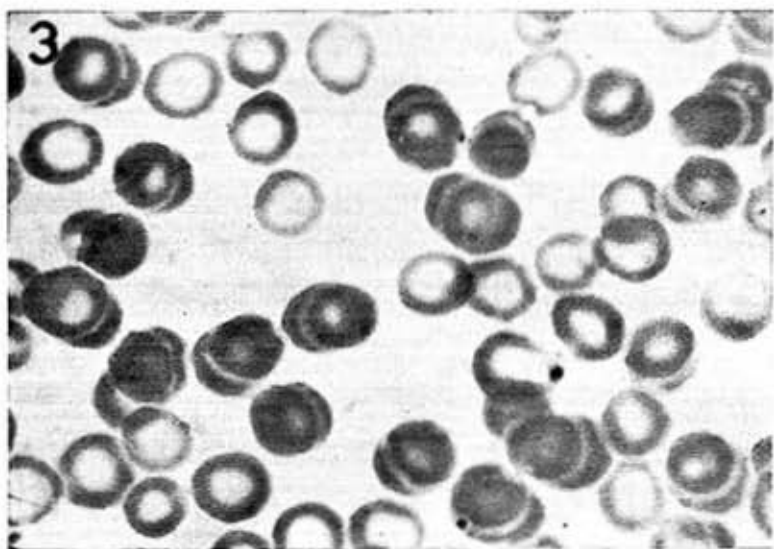


Fig. 2. Caso A: Lámina de periferia del propósito.

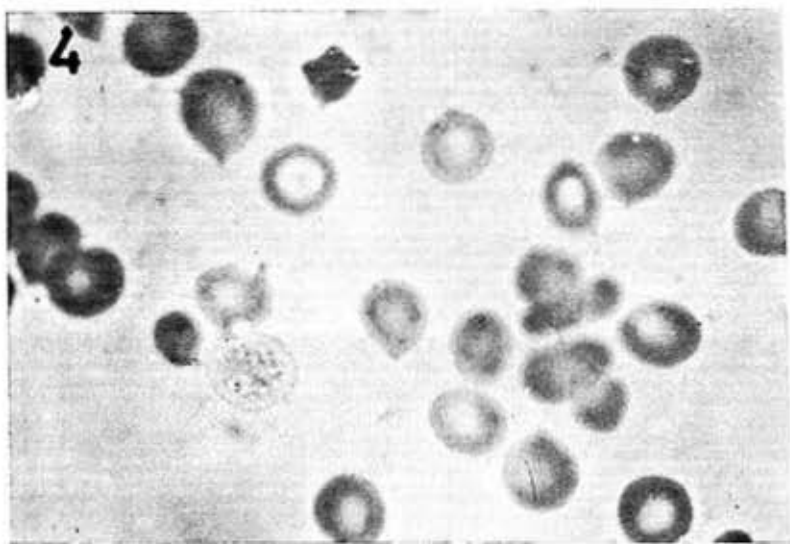


Fig. 2. Caso A: Lámina de elusión del propósito.

Es importante señalar que la composición del hemolizado de un heterocigótico con persistencia de la Hb F, es igual al del hemolizado de muchos sicklémicos.

En algunos sicklémicos el porcentaje de Hb F puede alcanzar hasta un 35-40%.⁷ Esto es de gran importancia teórica y práctica, ya que dos casos idénticos en la composición de sus hemoglobinas pueden comportarse de manera muy diferente desde el punto de vista clínico, siendo uno asintomático y padeciendo el otro de una enfermedad crónica, grave e invalidante.

La observación apunta anteriormente sobre la distribución homogénea de la Hb F, en el caso de persistencia hereditaria de Hb F (Figs. 2 y 4) en contraste con la distribución heterogénea en el caso de aumento de Hb F como consecuencia de anemias graves (sickle-mia y talasemia),^{1,7,29} es posiblemente la clave para la explicación de la ausencia de las manifestaciones clínicas en el caso de persistencia hereditaria de Hb F. Se observó que los eritrocitos con un alto porcentaje de Hb F, tienen un tiempo de vida más prolongado.^{6,7} Además un alto porcentaje de Hb F previene la falciformación.¹ En la hemoglobinopatía con persistencia de la Hb F todas las células tienen un porcentaje relativamente alto de Hb F y consecuentemente una supervivencia normal. Por lo tanto no hay falciformación ni anemia. Esto demuestra que la Hb S es funcionalmente normal y que todas las manifestaciones clínicas de los sicklémicos son consecuencia de la falciformación, ya que aunque las células tengan un alto contenido de Hb S, si este último fenómeno es prevenido, como sucede cuando hay un alto contenido de Hb F, no existen manifestaciones clínicas y el individuo es normal. Puede resultar interesante determinar la concentración de

Hb F necesaria para evitar la falciformación.

No se investigó utilizando métodos más sensibles, si el paciente tenía Hb A; pero considerando los datos electroforéticos y el porcentaje de Hb F y Hb S, parece improbable la presencia de Hb A. Esto sugiere que la persistencia de Hb F es transmitida por un gene que es un alelo del gene para la Hb A en el locus β . Esta hemoglobinopatía se transmite con carácter simple autosómico, codominante.³

El modo de acción de este gene aun no ha sido aclarado. Se ha sugerido que al igual que en la talasemia, su efecto sería simplemente el de prevenir la síntesis de cadenas β .³ Sin embargo, a pesar de que se ha demostrado que no tiene lugar la síntesis de cadenas β en posición CIS, también se ha observado que los talasémicos heterocigóticos no muestran aumento de Hb F. Por otra parte el heterocigótico, persistencia de Hb F/ β talasemia, aunque muestra niveles de Hb F muy similares a los de la talasemia mayor, es clínicamente diferente y mucho menos grave.²²

Hay otra observación que sugiere que en el caso de persistencia de Hb F hay un mecanismo diferente y es el hecho de que en los heterocigóticos para la persistencia de Hb F y en el único caso homocigótico reportado, la síntesis de Hb A₂ está disminuida en el primero y ausente en el segundo. Esto sugiere que la mutación afecta a un gene operador, que regula la síntesis de cadenas β y δ , determinada por estos dos genes estructurales que están estrechamente ligados.⁹ La explicación para la persistencia de Hb F por una sola mutación genética, sería entonces que la producción de las cadenas β δ por un lado y α por otro están recíprocamente excluidas.

Se ha sugerido que normalmente, el gene que regula la síntesis de las cade-

nas β y δ reconoce una sustancia inductora de su propia síntesis; se producen por lo tanto cadenas β que reprime la síntesis de cadenas α y en esa forma tiene lugar el cambio de Hb F a A.⁵ Sobre esta hipótesis se sugiere que existe una alteración de este mecanismo en la persistencia hereditaria de Hb F, posiblemente por una incapacidad del gene que regula la síntesis de las cadenas β y δ de reconocer esa sustancia inductora.

F talasemia ($\delta\beta$ talasemia).

La distinción entre un heterocigótico por la presencia hereditaria de Hb F y el rasgo talasémico conocido como F-talasemia, rasgo talasémico tipo II o $\delta\beta$ talasemia, puede ser difícil. En esta última se encuentran niveles normales de Hb A₂ y niveles de Hb F entre 3.5 y 20% en el heterocigótico.

Las diferencias más importantes entre ambas son: en la $\delta\beta$ talasemia existen alteraciones morfológicas, el porcentaje de Hb F es más bajo y la distribución de la Hb F no es uniforme.

Es aun más difícil la distinción entre un doble heterocigótico, β talasemia otro rasgo talasémico y un talasémico homocigótico de severidad intermedia. (Clínicamente la primera es mucho menos severa que la segunda.⁵)

El alto porcentaje de Hb F presente en nuestro caso sugirió un síndrome de persistencia hereditaria de Hb F/ β talasemia. En efecto, se sabe que en estos casos, el gene de la persistencia de la Hb F, interactúa con el gene de la β talasemia, produciéndose como consecuencia un 70% de Hb F y un 30% de Hb A.³ Esta misma relación se puede encontrar en la talasemia mayor; pero como ya se ha señalado esta última es mucho más severa y se pudo excluir fácilmente por el cuadro clínico del paciente.

Por lo tanto quedaban dos posibilidades a excluir: o bien se trataba de un β talasemia/ $\delta\beta$ talasemia o bien de una persistencia de Hb F/ β talasemia.

El primer paso fue estudiar a la familia (tabla II). La madre mostró una cantidad aumentada de Hb A₂ con alteraciones en la morfología eritrocítica que permitieron catalogarla como una β talasemia heterocigótica típica. Por lo tanto el padre debía ser un heterocigótico para la persistencia de la Hb F o un heterocigótico $\delta\beta$ talasémico. Para poder definir cuál de estas dos posibilidades era la verdadera, se realizaron las tres investigaciones siguientes:

1. Determinación de Hb F.
2. Distribución de la Hb F en los glóbulos rojos separados por centrifugación.
3. Estudio morfológico de una extensión de sangre periférica.

La distribución de la Hb F no fue uniforme (Figs. 3 y 4) y el análisis de las extensiones de sangre periférica mostró ligeras alteraciones en la morfología de las células (Fig. 3).

Con estos resultados se concluyó que el padre del paciente era un $\delta\beta$ talasémico heterocigótico, y el paciente por lo tanto un β talasémico/ $\delta\beta$ talasémico. Sus datos hematológicos pueden ser observados en la tabla II. En la Fig. 3 se muestra la lámina de periferia y elución de hemoglobina F en el padre y paciente.

La presencia de Hb A en el paciente no permite confirmar la hipótesis de que la síntesis de esta hemoglobina está completamente suprimida en la $\delta\beta$ talasemia,¹⁶ aunque en este caso es muy probable que las cadenas β que permiten la síntesis de Hb A, estén bajo el control del gene de la β talasemia.

Por otra parte si el gene de la $\delta\beta$ talasemia suprime completamente el gen en posición Cis,¹⁶ no tiene explicación

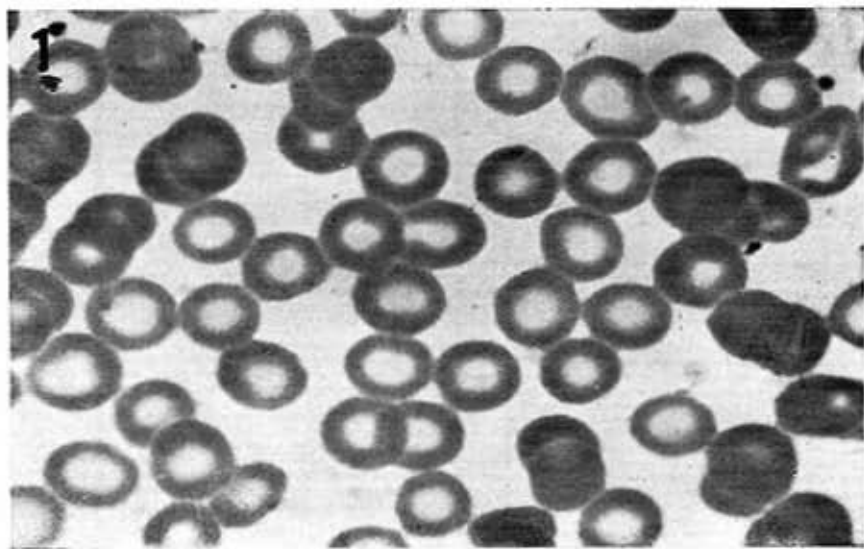


Fig. 3. Caso B: Lámina de periferia del padre.

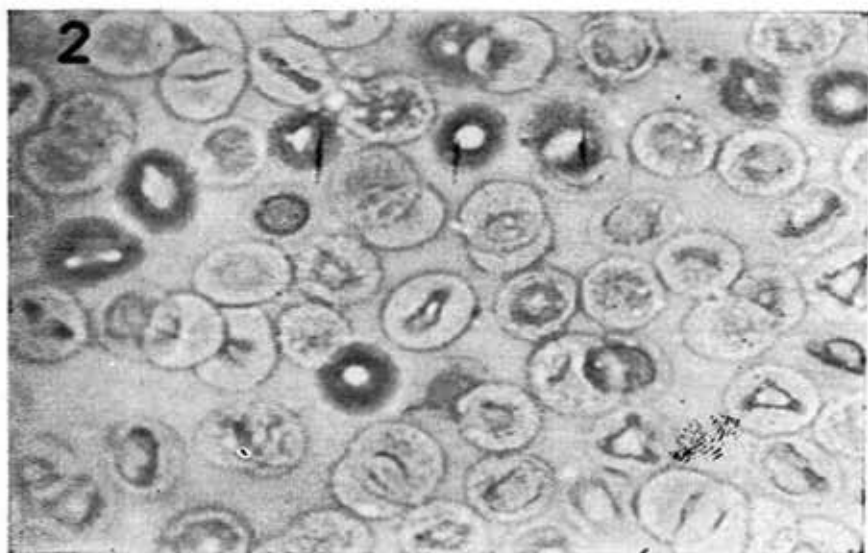


Fig. 3. Caso B: Lámina de elusión del padre.

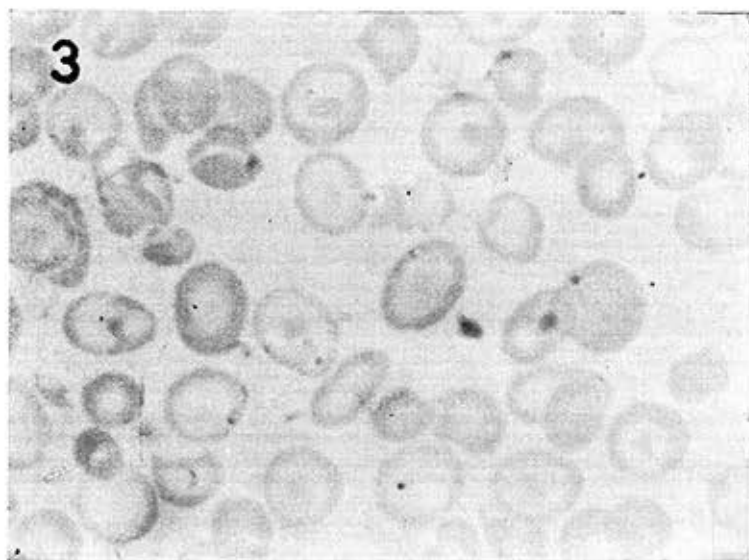


Fig. 3. Caso B: Lámina de periferia del propósito.

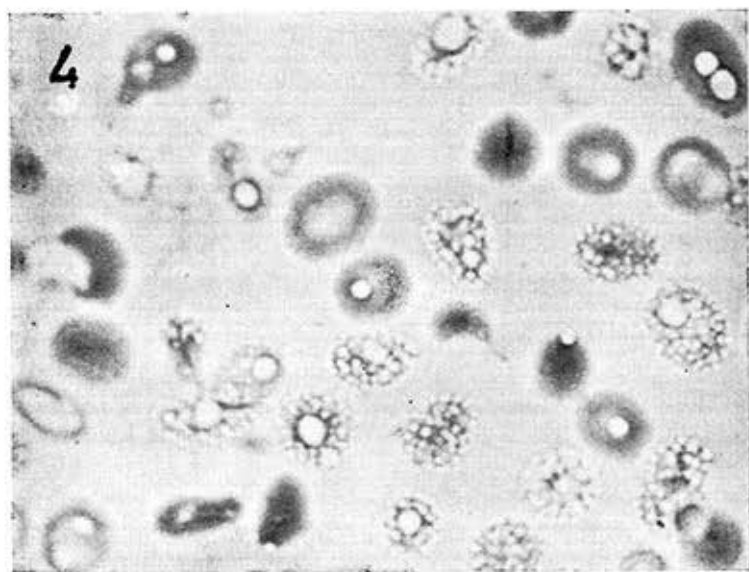


Fig. 3. Caso B: Lámina de elusión del propósito.

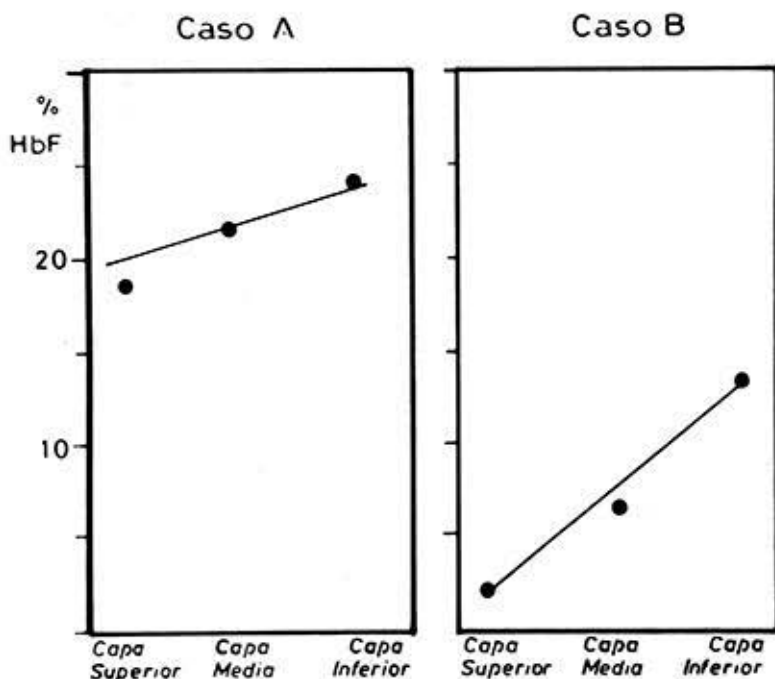


Fig. 4. Comparación en el contenido de hemoglobina fetal de hematies jóvenes (capa de arriba) y hematies viejos (capa de abajo) en caso de rasgo de persistencia de la hemoglobina fetal (padre familia A) y rasgo $\delta\beta$ talasémico (padre familia B).

el nivel normal de Hb A₂ en esta familia, a menos que admitiéramos que el otro gene δ normal de estos heterocigóticos fuera capaz de aumentar la síntesis de esta cadena para compensar la deficiencia de su alelo y elevar la cantidad de Hb A₂ a valores normales.

La prueba más clara de que el gene de la $\delta\beta$ talasemia, suprime completamente la síntesis de cadenas β y δ , es un caso reportado de $\delta\beta$ talasemia homocigótico, en el cual sólo se sintetizaba Hb F.⁸

Otros casos en los cuales existe supresión completa de las cadenas β y δ son aquellos homocigóticos para la Hb Lepore y homocigótico para la persistencia hereditaria de Hb F.^{2,4} En la prime-

ra hay una delección parcial de los genes δ y β .^{25,34} En la segunda, como ya se explicó, hay probablemente una mutación del gene operador.³⁸

En la $\delta\beta$ talasemia se podría explicar la alteración genética por los dos mecanismos anteriormente mencionados; sin embargo, ya que el cuadro clínico de esta alteración y el de la persistencia de Hb F son completamente distintos, no es probable que la alteración genética sea la misma, ya que tendría que admitir la presencia de dos genes reguladores distintos.

En el caso de la $\delta\beta$ talasemia parece probable que la alteración genética sea causada por la mutación de un gene único, que afectaría a ambas cadenas

β y δ y no por la mutación de dos genes distintos. Es improbable como ya señalamos que la afección sea debida a un gene regulador, como sucede en la persistencia de Hb F; ya que además de las diferencias en el cuadro clínico, éste implicaría que la Hb F estuviera uniformemente distribuida entre todos los hemáticos, los que tendrían la misma información genética para la inactivación del gene α , y en realidad en este caso ($\delta\beta$ talasemia) la distribución de la Hb F es heterogénea por lo que otro debe ser el mecanismo empleado. Por consiguiente, la explicación más lógica para este trastorno sería la de la delección parcial o completa de los genes β y δ ,⁸ aunque han sido sugeridas otras explicaciones.¹⁰

RESUMEN

Se presenta por primera vez en Cuba un caso de "persistencia hereditaria de la Hb F" y un caso de $\delta\beta$ talasemia. Ambos están caracterizados por un aumento de la cantidad de Hb F. El primero es asintomático, el segundo presenta un cuadro clínico moderado por lo que se plantea la dificultad en el diagnóstico diferencial.

Estos dos trastornos de la síntesis de hemoglobina han sido encontrados también en individuos portadores de otra hemoglobinopatía. En nuestros casos se discute la interacción de la persistencia hereditaria de la Hb F con la sicklemlia y de la $\delta\beta$ talasemia con β talasemia, y se discuten las bases bioquímicas y genéticas de estas dos hemoglobinopatías.

SUMMARY

The first case of "hereditary persistence of Fetal Hemoglobin" and of $\delta\beta$

Thalassaemia found in Cuba are described. In these two hematological diseases the level of Hb F is increased; the first one is almost asymptomatic while the second one presents a very moderate clinical picture: from this the difficulty of the diagnosis.

Those two cases of disorder in Hb synthesis have been found associated with other hemoglobinopathies. One of our cases is an interaction between the high fetal gene and the gene for the sicklemlia, and the other one is an interaction between $\delta\beta$ thalassaemia and β thalassaemia. A discussion of the biochemical and genetic bases of those two hemoglobinopathies is also presented.

RESUME

On présente par la première fois à Cuba un cas de "persistance héréditaire de l'hémoglobine foetale" et un cas de delta-beta-thalassemie. Les deux sont caractérisés par une augmentation de la quantité d'hémoglobine foetale. Le premier est asymptomatique, et le deuxième présente un cadre clinique modéré et pour ça la difficulté dans le diagnostic différentiel. Ces deux troubles de la synthèse de l'hémoglobine ont été trouvés chez des sujets porteurs d'une autre hémoglobinopathie. Dans nos cas on discute l'interaction de la persistance héréditaire de l'hémoglobine foetale avec la sicklemlie et de la delta-beta-thalassemie avec la beta-thalassemie et on discute les bases biochimiques et génétiques de ces deux hémoglobinopathies.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Allison, A. C.: Clin. Sci., 15: 497, 1956.
- 2.—Baglioni, C.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 48: 1880, 1962.
- 3.—Baglioni, C.: Correlation between Genetics and chemistry of human Hemoglobins. P. 405-475. H. Taylor (Ed.), Molecular Genetics. Academic Press New York and London, 1963.
- 4.—Baglioni, C.: Nature, 198, 1177, 1963.
- 5.—Baglioni, C.: La Talassemia, un errore quantitativo della sintesi d'Emoglobina, XXX Congresso Italiano di Pediatria, Catania, 1964.
- 6.—Bradley, T. B. and Conley, C. L.: Trans. A. Am. Physicians 73, 72, 1960.
- 7.—Bradley, T. B.; Brawner, J. N., III and Conley, C. L.: Bull. Johns Hopkins Hosp. 108, 242, 1961.
- 8.—Brancati C. and Baglioni, C.: Nature, 212, 262, 1966.
- 9.—Ceppellini, R.: In Ciba Foundation Symposium on Biochemistry of human genetics. P. 133, 1959.
- 10.—Comings, D. E. and Motulsky, A. G.: Blood, 30: 172, 1966.
- 11.—Conley, C. L.; Weatherall, D. J.; Richardson, S. N.; Shepard, M. K., and Carache, S.: Blood, 21, 261, 1963.
- 12.—Edington, G. M. and Lehmann, H.: Brit. Med. J. 2: 1328, 1955.
- 13.—Fessas, P. Beta-Chain Thalassaemias. En "Haemoglobin Collognim" Wien, Edit. Lehmann H. and Betke R., Stuttgart, Thieme. P. 90: 1962.
- 14.—Fessas, P., Forms of Thassaemias: En "Cioms Symposium on Abnormal Haemoglobin and Enzyme Deficiency: Blackwell Sci. Publications, Oxford. P. 71: 91, 1964.
- 15.—Fessas, P.: Forms of Thalassaemia in "Abnormal Haemoglobins in Africa". A Symposium Jouxis J.H.P. Ed. Blackwell, Sci. Publ., Oxford, 1965.
- 16.—Fessas, P.: The heterogeneity of Thalassaemia: XII Congresso Int. Soc. of Hematology, New York. P. 90, 1968.
- 17.—Fessas, P. and Stamatoyannopoulos, G.: Nature, 195: 1215, 1962.
- 18.—Gatto, I.: L'Evoluzione del Problema Genetico della Talassemia: La Pediatria, Fasc. III, LXXXII, 360, 1964.
- 19.—Herman, E. C. and Conley C. L.: Am. J. Med. 29: 9, 1960.
- 20.—Herman, E. C. and Conley, C. L.: Am. J. Nature, 184, 1903, 1959.
- 21.—Jacob, G. F. and Raper, A. B.: Brit. J. Haemato, 4: 138, 1958.
- 22.—Krous, A. P.; Koch, B. and Burckett, L.: Brit. Med. J. 8: 1434, 1961.
- 23.—Lie-Injo, L. E.; Lie, H. G.; Ager, J. A. M. and Leamann, H.: Brit. J. Haemat, 8: 1, 1962.
- 24.—Malamos, B.; Fessas, P. and Stamatoyannopoulos: Brit. J. Haemat. 8: 5, 1962.
- 25.—Neeb, H.; Beiboek, J. L.; Jonxis, J. H.P.; Maarssij Pesteijn, J. A., and Muller, C. J.: Trop. Geogr. Med., 13: 207, 1961.
- 26.—Niremberg, S. T.: In "Electroforesis": Manual Práctico de Laboratorio, Jims Editorial, Barcelona, 1968.
- 27.—Pérez Basnuevo, M. y Pérez Atencio, R.: Thesis de Grado, Universidad de La Habana, 1968.
- 28.—Poulik, M. D.: Nature, 180: 1477, 1957.
- 29.—Shepard, M. K.; Weatherall, D. J. and Conley, C. L.: Bull. Johns, Hopsrins Hosp. 110, 293, 1962.
- 30.—Singer, K. Chernoff, A. I. and Singer, L.: Blood, 6: 413, 1951.
- 31.—Stamatoyanno Poulos, C. Sofroniadou, K. and Akrivakis, A.: Blood, 30: 172, 1968.
- 32.—Thompson, R. B.; Mitchener, J. W. and Huisman, T. H. J.: Blood, 18, 267, 1961.
- 33.—Thompson, R. B.; Warrington, R. Odom, J. and Bell, W. N. Acta Senet 15: 90, 1965.
- 34.—Weatherall, D. J.: The Thalassaemia Syndromes, Blackwell, Sci., Publications, Oxford, 1965.
- 35.—Went., L. N. and McIver, J. E.: Blood, 13: 559, 1958.
- 36.—Wheeler, J. T., and Krevans, J. R.: J. Clin. Res. 9: 168, 1961.
- 37.—Wolff, J. A. and Ignatov, V. G.: J. Dis. Child, 105, 234, 1963.
- 38.—Zpckerkandl, E.: J. Mol. Biol. 8: 128, 1964.
- 39.—Zuelzer, W. W.; Robinson, A. R. and Booker, C. R.: Blood, 17, 393, 1961.