

# Beta talasemia mayor

(ENFERMEDAD DE COLLEY)

## Consideraciones sobre biología molecular y estudio de una nueva familia

German F. Sáenz\*

Marta Navarrete\*\*

Luis Mora\*\*

Javier Jiménez\*

Alberto Gerardo Montero\*

Guido Arroyo\*

### RESUMEN

En un niño de un año de edad, procedente de Nicaragua, severamente anémico, se puso en evidencia un caso de beta-tal homocigota de la variedad beta<sup>+</sup>-tal, a juzgar por los resultados del hemoglobinograma. Se destaca en sus padres la herencia de beta-tal menor de la variedad HbA<sub>2</sub> alta. Se hace una breve reseña sobre la biología molecular en hemoglobinopatías y sobre algunas características clínicas y genéticas de las beta-tal.

### INTRODUCCION

En 1975, Sáenz y colbs. (25) refirieron el primer caso de enfermedad de Cooley (Beta<sup>+</sup>-talasemia homocigota) en Costa Rica en una niña caucásica de cuatro años de edad, siendo el hemoglobinograma tipo FAA<sub>2</sub>, con una proporción porcentual de las fracciones de 70, 25 y 5, respectivamente. Los padres, eran poseedores de fenotipo AA<sub>2</sub>, con niveles de la Hb A<sub>2</sub> de 7 y 8%, característicamente de la clásica variedad menor de Beta talasemia. Novedosas técnicas en biología molecular han sido recientemente aplicadas al estudio de los genes de globina humana y a los productos de esos genes. Estas incluyen el análisis directo de la secuencia de nucleótidos de los mRNA de globina; síntesis de copias radioactivas de DNA

(cDNAs) a partir de mRNA de globina con el uso de la enzima viral transcriptasa reversa, y el uso de estos cDNAs como modelos o pruebas para hidridación molecular o como sustratos para análisis de secuencia de nucleótidos; clonaje de cDNAs sintético de globina o de los genes cromosómicos de globina humana usando la tecnología del DNA recombinante; uso de las técnicas de mapeo de genes que utilizan la digestión del DNA celular total con nucleasas específicas llamadas endonucleasas de restricción, y el subsecuente análisis de los fragmentos del DNA obtenidos por la novedosa técnica de "gel blotting" (gel secante). Más recientemente estas secuencias sintéticas individuales de cDNA han sido clonadas dentro de bacterias, usando plásmidos como vectores (35). La aplicación de todas esas técnicas ha permitido una generosa información acerca de la organización cromosómica de los genes de globina humana y de los mecanismos moleculares asociados con las anomalías en la expresión de los genes de globina que originan los diferentes cuadros de las hemoglobinopatías, sean debidas a defectos en la estructura de una determinada cadena de globina (Hbs anormales) o de los niveles de síntesis de las varias cadenas (talasemias). Estos hechos han logrado, asimismo, demostrar que los genes de globina no alfa (gama, delta, y beta) existen estrechamente ligados a lo largo del cromosoma 11, en tanto que los frecuentemente duplicados

\*Centro de Investigación en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA); Cátedra de Hematología, Universidad de Costa Rica, Hospital San Juan de Dios.

\*\*Unidad de Investigación, Hospital Nacional de Niños "Carlos Sáenz Herrera" (Caja Costarricense del Seguro Social).

genes alfa se hallan en el cromosoma 16; que se han perdido los genes en ciertos fenotipos de Beta<sup>0</sup>-tal y en la mayoría de las expresiones genéticas de la delta-beta-tal y de la PHHbF (persistencia hereditaria de Hb Fetal), al igual de lo que acontece con los diversos cuadros genéticos de alfa-talasemia, en los cuales se puede correlacionar la clínica de los mismos con el número de genes de alfa globina presentes en el genoma diploide. Estos procedimientos de biología molecular han permitido, entre otros sorprendentes resultados, el diagnóstico prenatal de beta-tal con el uso de núcleos de fibroblastos obtenidos de líquido amniótico (13).

En la presente comunicación exponemos un estudio familiar que pone en evidencia un nuevo caso de beta-talasemia homocigota en una familia de extracción nicaragüense estudiada en nuestros servicios.

#### MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron las técnicas estandar de hematología (8) y de bioquímica hematólogica (27). La electroforesis de Hb se llevó a cabo a pH 8.6 en tampón de Tris-EDTA-Borato en placas de acetato de celulosa Titan III de la casa Helena y de acuerdo al método de Schneider (28), y a pH de 6.2 en geles de agar (24). La HbA<sub>2</sub> se cuantificó por elución de la oxiHb luego de la separación electroforética (16) y también por microcromatografía (9). La estimación de la HbF se hizo de acuerdo con el método de Singer y cols. (30) y la HbF intraeritrocitaria se investigó de acuerdo al método de Betke, ligeramente modificado (14).

#### Material Humano

Paciente masculino de un año de edad, raza negra, procedente de Nicaragua, con cuadro de ocho meses de evolución caracterizado por palidez severa, fiebre intermitente, irritabilidad, crecimiento abdominal y orinas oscuras. Ha recibido sulfato ferroso, ácido fólico y transfusiones sanguíneas como tratamiento para su anemia.

#### Antecedentes

Padre mestizo, madre de raza negra, sanos aparentemente; un hermano falleció en el período neonatal; ignorándose la causa.

Es producto del II embarazo, a término, con control prenatal, parto hospitalario sin complicaciones.

#### Examen Físico

Temperatura 36.7°C, pulso 140/min, respiración 24/min, presión arterial 110/70, peso 9.200, talla 78 cms, circunferencia cefálica 48 cms, circunferencia torácica 43 cm y abdominal 42 cm.

Se observa niño muy pálido (4 +), hepatomegalia de 4 cm bajo el reborde costal derecho, consistencia dura, no dolorosa, bazo a 6 cm. bajo reborde costal izquierdo, consistencia dura.

#### Exámenes al Ingreso

Hb 5.6 g/dl	Bandas	0
Hto 22%	Eosinófilos	2
CHCM 25 g/dl	Mielocitos	0
Plaquetas 180.000/ul	Basófilos	1
Reticulocitos 10% (c = 5%)	Segmentados	22
Leucocitos 14.500/ul	Linfocitos	73
	Monocitos	2

Morfología glóbulos rojos: Marcada poiquilocitosis (3 +), e hipocromía (3 +), anisocitosis (3 +) dada por macrocitos con basofilia difusa (2 +) y esferocitos (+); se observa moderada cantidad de células en diana, punteado basófilo y azurófilo, anillos de Cabot, Cuerpos de Howell-Jolly y moderado número de eritroblastos. Dos meses después de su última transfusión, se refirió al CIHATA para su estudio hemoglobínico. Los resultados se indican en la sección correspondiente.

#### RESULTADOS

En el Cuadro I se indican los hallazgos hematológicos del propositus y sus padres. En todos ellos se logran demostrar cambios hematológicos característicos de los desórdenes talasémicos. Los padres resultan ser portadores del rasgo de Beta-talasemia menor tipo HbA<sub>2</sub> Alta y el paciente muestra un hemograma y un hemoglobinograma que encajan dentro de un tipo de talasemia mayor u homocigota, con un patrón hemoglobínico FAA<sub>2</sub>, con un 32% de HbA, es decir de beta<sup>+</sup>-tal de Cooley, con dos posibles genotipos.

#### DISCUSION

La condición homocigota de beta-talasemia mayor (thalassa es una palabra griega que significa mar), es una anemia eritropoyética y hemolítica severa, transfu-

sión dependiente, que ocurre en personas homocigotas o doble heterocigotas para una o más mutaciones que afectan la capacidad de síntesis de las subunidades de globina beta de la Hb, condicionando ello la producción de eritrocitos que contiene mucho menos cantidad de Hb de lo normal, es decir, son células hipocrómicas (< de 28 pg de Hb) (10,20). Sin embargo, lo más importante para el entendimiento de la fisiopatología de este desorden es que la síntesis de cadenas alfa continúa a un ritmo normal, por lo que la ausencia de cantidades adecuadas de globina beta, provoca la precipitación del exceso de alfa globina en forma de inclusiones insolubles (1,3,4,10,12,17). De este fallo biosintético se origina la severa eritropoyesis ineficaz y el acortamiento de vida de los eritrocitos. Se suscitan entonces los siguientes fenómenos en tres compartimientos (20): en médula ósea, hiperplasia eritrocítica, eritropoyesis ineficaz, expansión de los espacios medulares y, finalmente, osteoporosis. En sangre periférica, anemia microcítica hipocromica, poiquilocítica y dianocítica y, en bazo, secuestación de glóbulos rojos con inclusiones, lo cual es en parte debido a la incapacidad de esas células de retornar a la circulación sinusoidal. Ello conlleva a esplenomegalia, la cual es gigantesca en la evolución natural de la enfermedad. La talasemia mayor clásica usualmente se diagnostica en los primeros 18 meses de vida, siendo usualmente letal en las primeras dos décadas (2,5,6). En un niño normal, durante sus primeros seis meses de vida la síntesis de HbF cae a muy bajos niveles, siendo reemplazada por la HbA. Como la talasemia mayor clásica está asociada con un daño severo en la síntesis de cadenas beta, conforme el niño se hace más dependiente de dicha síntesis, se hace al mismo tiempo más anémico. La producción de células que contiene HbF permanecen en talasemia mayor a niveles considerablemente mayores que aquellos que se observan en niños normales de edad comparable, pero tal magnitud de la fetal es insuficiente para prevenir la aparición de anemia severa. Por otro lado, hay heterogeneidad de la HbF en las células talasémicas. Aquellas que contienen más HbF sobreviven más tiempo en la circulación probablemente en vista del menor desequilibrio entre las cadenas alfa y las

no alfa (alfa/beta,delta,gama) (5). En pacientes con una anemia menos severa, posiblemente debida a una menor depresión en la síntesis de beta cadenas, la enfermedad no puede ser reconocida sino hasta más tarde de su vida. Asimismo, los niños que no exhiben los signos clínicos de anemia hasta los 8-10 años de edad, usualmente tienen una forma moderada de beta-talasemia, la denominada "talasemia intermedia" (6). En la talasemia clásica mayor los niños inicialmente muestran solamente signos de su severa anemia crónica. Ellos son pálidos y pueden tener hepatosplenomegalia. Cuando la anemia progresa, los cuadros más típicos de la enfermedad aparecen. En vista de la anemia crónica, la eritropoyesis activa continúa en áreas de reserva de la médula ósea. La marcada expansión del tejido eritropoyético es especialmente notable en el cráneo, en particular en los huesos temporales y parietales, así como un sobrecrecimiento de los huesos faciales. Ocasionalmente, la esplenomegalia puede acompañarse de inflamaciones de la cápsula (periesplenitis) y de infartos en el órgano. Ambos procesos están asociados con dolor en el cuadrante superior. Con frecuencia se establece el cuadro de hiperesplenismo, el cual puede justificar la esplenectomía. La hepatomegalia (hemopoyética y hemocaterética) a menudo se presenta en la infancia, pero usualmente no es muy marcada, a no ser luego de la esplenectomía. Asimismo, conforme el niño crece la sobrecarga de hierro de su organismo se hace cada vez más manifiesta, tanto por el aumento de la absorción intestinal como por el hierro exógeno derivado de las múltiples transfusiones sanguíneas. La mortalidad por esta hemocromatosis secundaria es alta (6).

Hay un temprano depósito de hierro en el miocardio, aún antes del desarrollo de las manifestaciones clínicas, la cual causa una función cardíaca defectuosa. Para esta hemosiderosis en particular, como también para la del resto de la economía, se está tratando de imponer agentes quelantes de Fe tanto por vía subcutánea como también, promisoriamente, por vía oral (20). Cualquier persona que padezca de beta-talasemia mayor podrá esperarse —a menos que se mantenga viva por transfusiones constantes—, que muera en la infancia. Dos factores determinan la severidad clínica de un caso de beta talasemia mayor en

**Cuadro I**  
**HALLAZGOS HEMATOLOGICOS EN LA FAMILIA DEL PROPOSITUS B.I.S. (II-1)**

Designación Pedigree	Nombre	Edad	Sexo	Hto ml/dl Hbg/dl	CHCM (g/dl)	F.O.	Reticul. Correg. (%)	Patrón Electrof.	HbF (%)	HbA <sub>2</sub> (%)	Cambios Morfología Eritrocitos
I-1	W.I.T.	35	M	35/10.5	26	↓	1.0	AA <sub>2</sub>	1.6	6.30	+
I-2	V.S.N.	33	F	33/9.6	30	↓	1.8	AA <sub>2</sub>	2.2	6.40	+
II-1	B.I.S.	1	M	14.5/3.8	26	↓ ↓	4.0	FAA <sub>2</sub>	61.8	6.10	++++

**Cuadro II**  
**CATEGORIAS PRINCIPALES DE LOS SINDROMES DE BETA-TAL MAYORES**  
**Y SUS DEFECTOS BIOQUIMICOS Y MOLECULARES ASOCIADOS**

	Anemia	HbA (cadenas beta)	HbA <sub>2</sub> (cadenas delta)	Síntesis de HbF (cadenas gama)		Desequilibrio Sintético alfa/no alfa	mRNA (beta)	DNA (genes beta)
				cantidad	distribución			
beta <sup>+</sup> -tal	Severa	↓	+	+	heterog.	++++	↓	+
beta <sup>o</sup> -tal	Severa	0	+	+	heterog.	++++	a) 0 b) ↓	+ +
delta-beta-tal	Moderada	0	0	++	heterog.	++	0	0
PHHbF	No hay	0	0	++++	uniforme	+	0	0

+ = Presentes o grado de alteración.

particular (15). El primero es el grado de la depresión de beta cadenas, y el segundo, el grado de producción de HbF. El grado de formación de cuerpos de inclusión, la anemia hemolítica y la eritropoyesis ineficaz a menudo se ven modulados en la beta-tal homocigota por un incremento en el grado de síntesis de HbF. Esta condición permite que disminuya la cantidad de cadenas alfa libres capaces de formar cuerpos de Heinz. En muchos casos (5) las manifestaciones moderadas de beta-tal homocigota se atribuyen a esos inusuales altos niveles de síntesis de cadenas gama, fenómeno que probablemente esté influenciado por la naturaleza del defecto talasémico.

En el propositus que nos ocupa aparentemente ambos factores han venido poniéndose en juego, tal vez con mayor importancia el primero de ellos, (asumiendo que posiblemente un 50% de su HbA sea de su última transfusión dos meses antes del diagnóstico) originándose una eritropoyesis francamente ineficaz con la factible contribución de una síntesis baja de HbF, dado los hallazgos obtenidos que evidencian la severidad del cuadro anémico, como si se tratara de un paciente con beta<sup>0</sup>-talasemia para el que se dice que presenta una enfermedad clínica mucho más severa que la beta<sup>+</sup>-talasemia (29), que es el tipo que presenta nuestro paciente.

No debe descartarse en el propositus sus prematuras y francas manifestaciones clínicas, que hacen sospechar no sólo un trastorno beta-talasémico severo, sino también una participación esplénica deletérea muy precoz. Este caso ilustra una vez más la heterogeneidad clínico-genética de la beta-tal en diferentes partes del mundo, por lo que su reconocimiento podría ser de interés antropológico (7,15,19,23,32).

La naturaleza de la defectuosa expresión genética en las formas más comunes de beta-tal (tipo HbA<sub>2</sub><sup>↑</sup>), las cuales se caracterizan por la presencia de genes beta intactos (4,11,21,22,31,34) es un metabolismo anormal del mRNA, que en el caso de la beta<sup>0</sup>-tal (en donde no hay síntesis de cadenas beta) se postulan dos defectos diferentes: ausencia de mRNA (tipo I), o presencia del mensajero, pero éste es inestable o es bloqueado desde su traducción (tipo II). En beta<sup>+</sup>-tal hay disminución de la síntesis de

cadena beta (5 a 30% de lo normal) por una deficiencia proporcional de beta mRNA, por lo que los hallazgos hematológicos naturales o bio-sintéticos permiten sugerir que ello se deba a una disminución cuantitativa de beta mRNA funcional y no a una lesión molecular por defecto de traducción.

En el Cuadro II se indican los principales subgrupos clínicos de beta-tal y sus manifestaciones bioquímicas, como también sus defectos moleculares asociados en el estado homocigoto (4,11).

La cantidad de síntesis de beta cadenas varía marcadamente de familia a familia, pero es estable dentro de una familia dada, hecho que indica que la base molecular de este desorden es probablemente heterogénea, a pesar de que todos presentan un defecto bioquímico común cual es una deficiencia de mRNA de beta cadenas. Por otra parte, en beta<sup>0</sup>-tal, la cual comprende aproximadamente el 10% de los casos de beta-tal homocigota (19), hay total ausencia de síntesis de cadena beta. Esta condición (beta<sup>0</sup>/beta<sup>0</sup>) se encuentra en muchos grupos raciales diferentes, habiendo descrito varios subtipos clínicos y genéticos, los cuales pueden ser el producto de diferentes bases moleculares, sugiriéndose que defectos transcripcionales pueden estar asociados con los diferentes subtipos de beta<sup>0</sup>-tal, al menos en la gran mayoría de las poblaciones estudiadas (7,11,18,19,23,33).

Los estados heterocigóticos de beta<sup>+</sup>-tal y beta<sup>0</sup>-tal no es posible distinguirlos hematológicamente hablando (10,32), a no ser con un apropiado establecimiento genético. La evidencia más sólida sobre la acción específica primaria de los genes beta<sup>0</sup> ó beta<sup>+</sup> se obtiene, por lo tanto, a partir de los hallazgos hematológicos y bioquímicos observados en el estado doble heterocigótico que incluya una variante estructural de cadena beta. Por ello, según Fessas y Loukopoulos (10), la distinción de los genes de la talasemia beta<sup>0</sup> y beta<sup>+</sup> debe llevarse a cabo solamente dentro de un marco genético apropiado, como lo fue en una comunicación nuestra a raíz del hallazgo por primera vez en nuestro medio del gene beta<sup>0</sup> en conjunción con HbS (26). Todos los demás métodos son incapaces de proporcionar esta información en los heterocigotos simples beta-tal como es

el caso de los padres del propositus, para el cual podrían señalarse dos únicos posibles genotipos dada la presencia de HbA (o sea, alguna síntesis de cadenas beta<sup>A</sup>): alfa,alfa/beta<sup>+</sup>, beta<sup>o</sup> ó alfa,alfa/beta<sup>+</sup>, beta<sup>+</sup>.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bank, A., Marks, P.A.: Excess alpha synthesis relative to Beta chain synthesis in thalassemia major and minor. *Nature*, 212:1198,1966.
- 2.- Bank, A., y Marks, P.A. Genetic control of hemoglobin synthesis and the thalassemia syndromes. *Med. Clin. N.A.*, 53:875-885, 1969.
- 3.- Bank, A., Marks, P.A. Síndromes de talasemia y regulación intracelular de la síntesis de globina. 303-314 pp. En: *Clínicas Médicas de Norteamérica*, marzo 1973. Salvat Ed.
- 4.- Bank, A. The thalassemia syndromes. *Blood*, 51:369,1978.
- 5.- Beck, W.S. Hematology. 2nd. Ed. The Massachusetts Institute of Technology; the Alpine Press, Inc., 1978.
- 6.- Bunn, H.F., Forget, B.G., Ranney, H.M. Hemoglobinopathies, Vol. XII, Chapter 2., pp. 28-94. Series: Major Problems in Internal Medicine. W.B. Saunders Co., 1977.
- 7.- Conconi, F., Bargelles, A., Pontremol, S., Vigi, V., Volpato, S., & Gaburro, D. Absence of Beta-Globin Synthesis and Excess of Alpha-Globin Synthesis in homozygous B-thalassemic subjects from the Ferrera Region. *Nature*. 217:259, 1968.
- 8.- Dacie, J.V. & Lewis, S.M. Hematología práctica, 2a. ed. VI+ 536 pp. Ediciones Toray, S.A., 1970.
- 9.- Efremov, G.D., Huisman, T.H.J., Bowman, K. Wrigtstone, R.N. Micromatography of hemoglobins. II. A rapid method for the determination of hemoglobin A<sub>2</sub>. *J. Lab. Clin. Med.*, 83:657,1974.
- 10.- Fessas, P. & Loukopoulos, D. Las beta-talasemias, capítulo 8, pp. 199-224. En: *Clínica Hematológica*, vol. 2/2 (Hemoglobinas anormales). Editores Salvat, S.A., 1976.
- 11.- Forget, B.G. Molecular Genetics of human Hemoglobin synthesis. *Ann. Int. Med.*, 91: 605, 1979.
- 12.- Huisman, T.H. & Jonxis, J.H.P. The hemoglobinopathies: Techniques of identification, 28-32 p., 1977. Marcel Dekker, Inc.
- 13.- Kan, Y.W., Trecartin, R., Golbus, M.S. & Filly, R.A. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia and sickle cell anemia: Experience with 24 cases. *Lancet*, 1: 269, 1977.
- 14.- 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.
- 15.- Lehmann, H. & Huntsman, R.G. Man's Haemoglobins. North-Holland Publishing Co., 1974.
- 16.- Marengo-Rowe, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of hemoglobins on cellulose acetate. *J. Clin. Path.*, 18:790, 1965.
- 17.- Necheles, T.F., Allen, D.M., Finkel, H.E. Clinical disorders of hemoglobin structure and synthesis. Appleton-Century-Crofts, 1969.
- 18.- Nienhuis, A.W., Anderson, W.F. El defecto molecular en la talasemia. En: *Clínica Hematológica (Hemoglobinas Anormales)*, Cap. VII, Vol.2 (2) pp.225-255, 1976. Salvat, Ed.
- 19.- Nienhuis, A.W., Turner, P. & Benz, E.J. Relative stability of alfa and beta globin messenger RNA in beta<sup>o</sup>-thalassemia. *Cell*, 14:299, 1978.
- 20.- Nienhuis, A.W., Benz, E.J., Propper, R., Corash, L., Anderson, W.F., Henry, W. & Borer, J. Thalassemia Major: Molecular y clinical aspects. (NIH CONFERENCE). *Ann. Int. Med.*, 91:883-897, 1979.
- 21.- Ottolenghi, S., Lanyon, W.G., Williamson, R., Weatherall, D.J., Clegg, J.B., & Pitcher, C.S. Human globin gene analysis for a patient with beta<sup>o</sup>/delta-beta<sup>o</sup> thalassaemia. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72:2294, 1975.
- 22.- Ramírez, F., O'Donnell, J.V., Marks, P.A., Bank, A., Musumeci, S., Schiliro, G., Pizzarelli, G., Russo, G., Luppis, B., Gambino, R.: Abnormal or absent Beta mRNA in Beta Ferrara, and gene deletion in Delta-thalassaemia. *Nature*. 263:471, 1976.
- 23.- Ramírez, F., Starkman, D., Bank, A., Kerem, H., Cividalli, G. & Rachmilewitz, A. Absence of beta mRNA in Beta<sup>o</sup>-thalassemia in Kurdish Jews. *Blood*, 52:735-739, 1978.
- 24.- Robinson, A.R., Robson, M., Harrison, A.P. & Zuelzer, W.W. A new technique for differentiation of hemoglobin. *J. Lab. Clin.*, 50: 745, 1957.

- 25.- Sáenz, G.F., Monge, B., Arroyo, G. & Alvarado, M.A. Enfermedad de Cooley (beta<sup>+</sup>-talasemia mayor) en Costa Rica. *Sangre*, 21:117, 1976.
- 26.- Sáenz, G.F., Elizondo, J. & Páez, C.A. Hallazgo del gene beta<sup>0</sup>-talasémico (supresor) en Costa Rica. Síndrome de heterocigosis doble S/Beta<sup>0</sup>-tal. *Sangre*, 23:196, 1978.
- 27.- Sáenz, G.F. & Moreira, J. Laboratorio de Hemoglobinopatías. Manual Latinoamericano. Universidad de Costa Rica; Ministerio de Salud Pública, D.P.
- 28.- Schneider, R.G. Differentiation of electrophoretically similar Hemoglobins-such as S, D, G, and P; or A<sub>2</sub>; C, E and 0 by electrophoresis. *Clin. Chem.*, 20:1111, 1974.
- 29.- Schwartz, E.: Abnormal globin synthesis in thalassemia red cells. 549-567 pp. En: Miescher, P.A., and Jaffé, E.R.: *Seminars in Hematology*. Vol. XI, núm. 4, Grune & Stratton, Inc. 1974.
- 30.- Singer, K., Chernoff, A. I. & Singer, L. Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkalidenaturation. *Blood*, 6:415, 1951.
- 31.- Tolstoshev, P., Mitchell, J., Lanyon, G., Willianson, R., Ottolenghi, S., Comi, P., Giglioni, B., Mäsera, G., Modell, B., Weatherall, D.J., Clegg, J.B. Presence of gene for Beta Globin in homozygous Beta<sup>0</sup>-thalassaemia. *Nature*, 259:95, 1976.
- 32.- Weatherall, D.J., Clegg, J.B., Robets, A.V., & Knox-Macaulay, H.H.M.: The clinical and chemical heterogeneity of the beta-thalassemsias. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 232: 88, 1974.
- 33.- Weatherall, D.J., Clegg, J.B. Molecular basis of thalassaemia major. *Am. J. Haemat.*, 31:133, 1975.
- 34.- Weatherall, D.J. The molecular basis for abnormal gene action: recent lessons from the thalassaemia model. *Clin. Sci. Molec. Med.* 52:223, 1977.
- 35.- Wilson, J.T., Wilson, L.D., De Riel, J.K., et al. Insertion of synthetic copies of human globin genes into bacterial plasmids. *Nucleic Acids Res.*, 5:563, 1978.