
Detección de β Talasemia mediante la técnica de Amplificación Refractaria de Sistemas de Mutaciones (ARMS- PCR).

Martha Bravo¹, Raquel Salazar², Anabel Arends¹, Maritza Alvarez¹, Dalia Velázquez¹, José M. Guevara-I¹ y Omar Castillo¹.

¹Laboratorio de Hemoglobinas Anormales, Servicio de Hematología "Dr. Tulio Arends" Hospital Universitario de Caracas, Caracas.

²Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná, Estado Sucre. Venezuela.

Palabras clave: Talasemia, mutaciones, ARMS-PCR, Venezuela.

Resumen. Se empleó la técnica de amplificación refractaria de sistemas de mutaciones para determinar los tipos de mutaciones que causan Talasemia (Tal) en la población venezolana. Ochenta pacientes seleccionados al azar de un total de 159 catalogados como Talasémicos por presentar anemia hemolítica y niveles elevados de Hb A₂, fueron estudiados por medio de la técnica de Amplificación Refractaria de sistemas de Mutaciones (ARMS- PCR). Este es un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa, capaz de detectar diversas mutaciones puntuales y pequeñas deleciones o inserciones en el gen globina, con el empleo de oligonucleótidos de secuencia específica. En 43/80 pacientes catalogados con las distintas presentaciones clínicas de Talasemia y en 37/80 pacientes heterocigotos compuestos para hemoglobinopatías estructurales y Talasemia, la mutación más comúnmente encontrada fue la -29, (de origen africano), seguida de la CD39 (de origen mediterráneo); también se encontró la -88, la IVSI-6 y con menor frecuencia la IVSI-110. La técnica ARMS - PCR es un método útil y rápido que permite detectar todas las mutaciones Tal presentes y hacer un diagnóstico diferencial entre los pacientes con Talasemia menor y sujetos normales con Hb A₂ elevada, lo cual es importante en los estudios poblacionales, y además permite precisar el diagnóstico de los pacientes que presentan hemoglobinopatías estructurales con niveles elevados de Hb A₂.

β Thalassemia detection by the amplification refractory mutation system technique (ARMS- PCR).

Invest Clin 1999; 40(3) 203-213.

Key words: Mutations, Thalassemia, ARMS-PCR, Venezuela.

Abstract. Thalassemia (Thal) mutations were studied in DNA from 80/159 patients with hemolytic anemia and high levels of Hb A₂ by the amplification refractory mutation system technique (ARMS- PCR). This method detects point mutations and insertions or deletions of just a few nucleotides in the globin gene by the polymerase chain reaction of allele-specific priming. In 43/80 patients with different clinical presentations of Thalassemia and 37/80 compound heterozygous for hemoglobinopathies and Thalassemia the most frequent mutation found was the -29 (of African origin), followed by the CD39 (of Mediterranean origin) and in a lower frequency also was found the -88, the IVSI-6 and the IVSI-110. We conclude that this technique is an useful approach in determining the thalassemia mutations in population surveys, because it allows to make a differential diagnosis between Thalassemia minor and individuals with high levels of Hb A₂. It helps to clarify the diagnosis of patients with structural hemoglobinopathies that also presents high levels of Hb A₂.

Recibido: 20-5-99. Aceptado: 2-9-99.

INTRODUCCIÓN

A escala mundial, con el nacimiento de la biología molecular y la tecnología del ADN recombinante, han surgido nuevos métodos que han permitido el estudio de enfermedades a nivel molecular, lo cual ha conducido al avance de la ciencia a pasos agigantados. Entre estas técnicas se encuentran la amplificación refractaria de sistemas de mutaciones (1), la "dot blotting" reversa (2), la electroforesis en gradiente de desnaturalización (3), la GAP-PCR (4) y la hibridación con oligonucleótidos alelo específico (5), entre otras. Estos métodos han sido utilizados en el estudio de muchas enfermeda-

des hereditarias, como la Fibrosis Quística (6), la talasemia (4), las hemoglobinopatías estructurales (7) y la Talasemia (8).

La técnica de amplificación refractaria de sistemas de mutaciones (ARMS-PCR) (1) es un método de biología molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y consiste en detectar diversas mutaciones, puntuales y pequeñas delecciones o inserciones, al emplear oligonucleótidos iniciadores que en su extremo 3' contienen una mutación específica. El ADN a estudiar se hace hibridar con los iniciadores mutados y la presencia de un producto de amplificación de tamaño específico va a permitir identifi-

car dicha mutación. Se deben emplear tantos oligonucleótidos iniciadores mutantes como mutaciones se deseen estudiar. Se utiliza un par de oligonucleótidos denominados control interno, el cual va a permitir conocer si la reacción es óptima (8). Esta técnica permite realizar el diagnóstico de pacientes homocigotos y heterocigotos, para lo cual se emplean oligonucleótidos de secuencia normal que amplifica un sitio específico del gen de la globina en estudio.

La Talasemia, descrita originalmente por Cooley y Lee (1925), es un grupo heterogéneo de anemias hemolíticas hereditarias causadas por mutaciones en el gen de la globina, que trae como consecuencia alteraciones cuantitativas en la síntesis de la hemoglobina (9).

En la actualidad, se conocen aproximadamente 160 mutaciones puntuales que producen Talasemia; sin embargo, estas mutaciones son características de cada área geográfica, es decir, cada población tiene un espectro único de mutaciones Talasémicas, por lo tanto, éstas sirven como marcadores genéticos de dichas poblaciones. Las mutaciones más comunes en el mediterráneo son la CD39, IVSI-1, IVSI-6, IVSI-110, IVSIII-745, CD 8|9, CD8, IVSII-1; las más comunes en el continente africano son la -29, -88, CD24, IVSII-849, y en el continente asiático la IVSI-5, IVSI-13, CD15, CD819, CD24, entre otras (1, 2, 5,10,11,12).

Existen diferentes formas clínicas de Talasemia de acuerdo al

grado de alteración genética, siendo la Talasemia mayor o anemia de Cooley la más grave, donde los pacientes manifiestan un cuadro hemolítico muy severo desde el primer año de vida. Las otras dos formas clínicas son la Talasemia intermedia, caracterizada por una anemia hemolítica e ictericia más moderada, y la Talasemia menor, la más frecuente, caracterizada por anemia muy moderada siendo generalmente asintomática, con anormalidades morfológicas en el frotis de sangre periférica donde se observa hipocromía y microcitosis en los glóbulos rojos (13).

Uno de los principales caracteres diagnósticos de la Talasemia es la presencia de niveles elevados de hemoglobina A₂ en los individuos afectados (14). Sin embargo, se ha observado que los niveles de hemoglobina A₂ pueden estar aumentados en presencia de anemia megaloblástica, paludismo, hemoglobina S, Hepatitis viral, embarazo, esferocitosis hereditaria y en algunos casos de equistosomiasis intestinal (9,15).

En Venezuela, los estudios sobre Talasemia han sido realizados mediante análisis clínico, fenotípico y estudio al grupo familiar (16). El estudio reciente de las mutaciones en pacientes talasémicos reveló una alta incidencia de las mutaciones africanas -29 y -88, a pesar de la creencia de que el origen de la Talasemia en Venezuela era netamente mediterráneo (17). En la población venezolana es frecuente encontrar la

Talasemia asociada a otras hemoglobinopatías, principalmente a las

hemoglobinas S (HbS) y C (HbC) (18). El diagnóstico diferencial entre pacientes drepanocíticos puros y pacientes con drepanocitosis y Talasemia asociada, así como el gran número de pacientes sintomáticos catalogados como portadores en estado heterocigoto de los alelos S, fueron el motivo de incorporar la técnica ARMS-PCR, para así poder definir el diagnóstico preciso de cada uno de los pacientes, especialmente en aquellos donde el estudio familiar no es posible, como sucede en la mayoría de los casos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Entre mayo y diciembre de 1997, se tomaron muestras de sangre de 250 pacientes que fueron referidos al laboratorio de Hemoglobinas Anormales del Hospital Universitario de Caracas, por presentar anemia hemolítica con hipocromía y microcitosis. En todos ellos se cuantificaron los niveles de hemoglobina A₂ por la técnica de cromatografía de intercambio iónico (Helena Laboratories, Beaumont, Texas). En las muestras de 80 pacientes con hemoglobina A₂ aumentada, seleccionados al azar, se aplicó la técnica de amplificación refractaria de sistemas de mutaciones (ARMS-PCR) (1) La extracción del ADN se llevó a cabo utilizando un protocolo con reactivo comercial DNAzol (Gibco BRL) y su cuantificación se realizó mediante espectrofotometría a 260 nm en un equipo Genequant (Pharmacia). La reacción de PCR, para un volumen final de 25 µl contenía 2,5 µl de

buffer 10X, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,1 µM/L de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores, 0,5 µl de Taq polimerasa a una concentración de 5 u/µl, 0,2 µl de mezcla de dinucleótidos 100 mM (CTP, ATP, TTP, GTP) y 1 µg de ADN. Las muestras fueron sometidas a 25 ciclos de amplificación, con un período de desnaturalización a una temperatura de 94°C por 1 minuto, de hibridación a 65°C por 1 minuto y de extensión a 72°C por 1,5 minuto, con un período final de extensión a 72°C por 3 minutos. La reacción de PCR fue llevada a cabo en un equipo termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA). Luego de la amplificación, las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, a 150 V por 35 minutos con buffer de Tris-acetato, EDTA y azul de bromofenol. El gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz UV. Posteriormente, fueron tomadas fotografías de los geles en un equipo GelDoc (BioRad). La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores mutantes usados en este estudio fueron las descritas por Old (8) y se presentan en la Tabla I. Se utilizó la clasificación descrita por Weatheral y Clegg en 1981 y Embury y colaboradores en 1994 (9,19), para todos aquellos pacientes que presentaron Hb S asociada con niveles elevados de Hb A₂. Esta clasificación fue realizada de acuerdo a los niveles de hemoglobina A como: Hb S- Talasemia, donde no hay síntesis de hemoglobina A, Hb S- + Talasemia tipo 1,

TABLA I
SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES MUTANTES

Mutaciones	Secuencias	Talla del producto
CD 39	CAGATCCCCAAAGGACTCAAAGAACCTTTGTA	436 pb
IVSI-6	TCTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTCAAATG	286 pb
IVSI- 110	ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATGGAGT	419 pb
- 88	TCACTTAGACCTCACCCCTGTGGAGCAACTCAT	684 pb
-29	CAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGTTATG	625 pb

donde la síntesis de hemoglobina A oscila entre 5 y 15% y Hb S- + Talasemia tipo 2, donde los niveles de hemoglobina A oscilan entre 20 y 30%.

RESULTADOS

De un total de 250 pacientes estudiados, 159 presentaron niveles aumentados de hemoglobina A₂ (63.6%). Se les practicó estudio mediante ARMS- PCR a 12 pacientes con Talasemia menor, a 28 con Talasemia intermedia, a 3 con Talasemia mayor y a 37 que tenían Hb A₂ aumentada y hemoglobinopatías estructurales asociadas. De éstos, uno correspondía a Hb S- +Tal tipo 1, 18 a Hb S- +Tal tipo 2, 17 a Hb S-⁰Tal y 1 paciente a Hb C-+Tal. Las mutaciones más comúnmente encontradas en los grupos estudiados fueron: la -29, (de origen Afri-

cano), seguida de la CD39 (de origen Mediterráneo) y con menor frecuencia las mutaciones IVSI-6, -88 y la IVSI-110 (Tabla II). La mutación -29 (A-G) se encuentra ubicada en la caja TATA de la secuencia promotora del gen de la globina, la mutación CD39 (C-T) afecta el codón 6 del primer exón, la mutación IVSI-6 (T-C) afecta el primer intrón en la posición 6, la mutación -88 (C-T) se localiza en la posición -88 relativo al sitio CAP del gen globina y la mutación IVSI-110 (G-A) se encuentra a nivel del primer intrón en la posición 110 del gen globina (Fig. 1).

Las Figs. 2 y 3 muestran la presencia de las mutaciones -29 a nivel de la banda de 625 pb y la mutación CD39 a nivel de la banda de 436 pb. A nivel de 861 pb se observa la banda correspondiente al control interno.

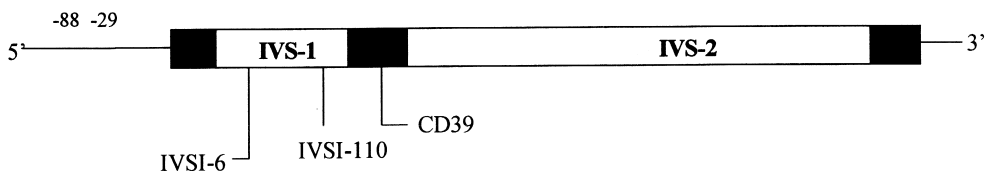


Fig. 1. Esquema representativo del Gen beta globina donde se señalan las mutaciones más frecuentes encontradas mediante la ARMS-PCR.

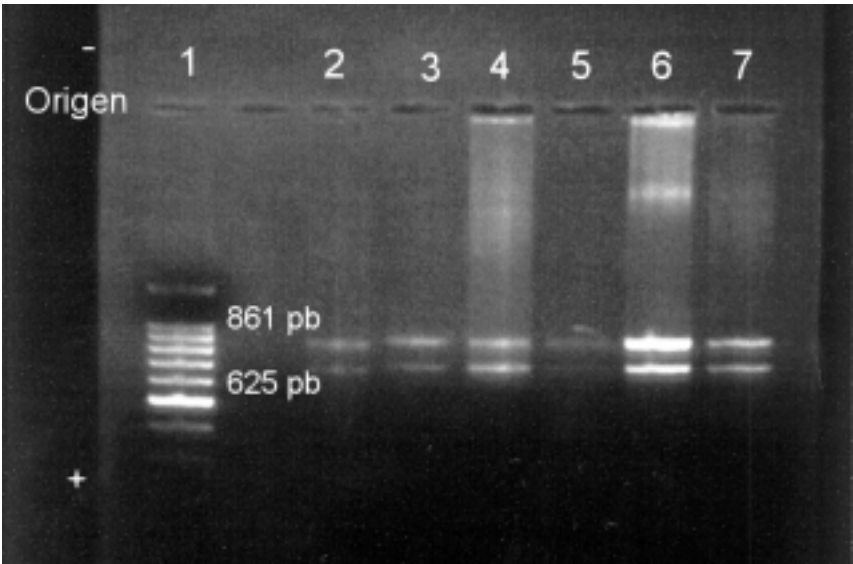


Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa, donde se demuestra la presencia de la mutación -29. A nivel de 861 pb se observa la banda control interno y a nivel de 625 se observa la banda mutante. Línea 1: Marcador de peso molecular. Línea 2-7: Pacientes en estudio.

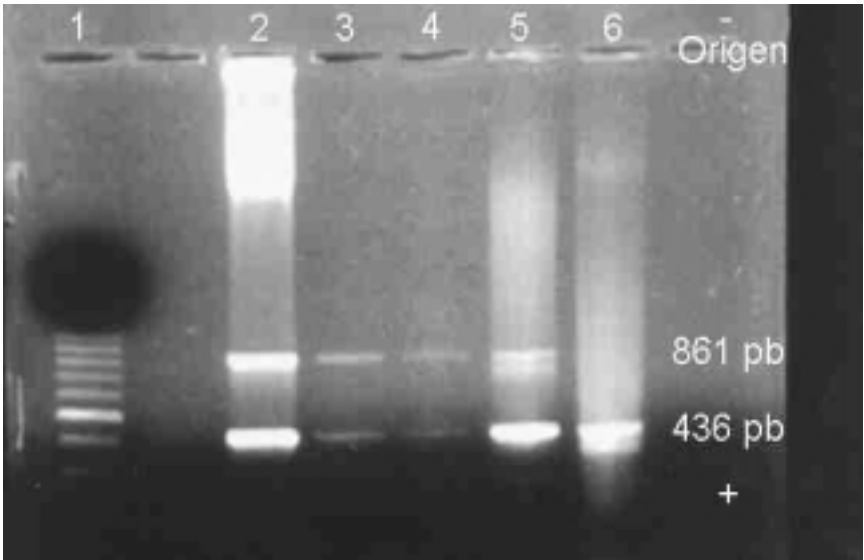


Fig 3. Electroforesis en gel de agarosa, donde se demuestra la presencia de la mutación CD 39. A nivel de 861 pb se observa la banda control interno y a nivel de 436 pb se observa la banda mutante. Línea 1: Marcador de peso molecular. Líneas 2-6: Pacientes en estudio.

Los pacientes diagnosticados con Talasemia presentaron microcitosis, hipocromía, niveles de hemoglobina A₂ superiores a 3,4% (a excepción de dos casos) y anemia. Los niveles de hemoglobina A₂ elevados se encontraron en el rango de 3,4 - 7,1%. Del total de pacientes estudiados se observó que 31 (39%) eran portadores de dos mutaciones distintas y el resto presentaban un solo tipo de mutación (Tabla II).

DISCUSIÓN

De las mutaciones observadas en los individuos estudiados, las mutaciones -29 y -88 han sido registradas como las más frecuentes en las poblaciones de origen africano y las mutaciones CD39, IVSI-6 y la IVSI-110 como las más frecuentes en poblaciones del Mediterráneo (5,10,11,2,12). La alta frecuencia de las mutaciones de origen africano y mediterráneo en la población estudiada, además de la alta frecuencia de heterocigotos compuestos, demuestran una vez más el mestizaje característico de nuestra población, ya que se observó que individuos de rasgos caucasoides eran portadores de mutaciones africanas y viceversa, individuos de rasgos africanos eran portadores de mutaciones mediterráneas. Se utilizaron los iniciadores mutantes que permiten determinar las mutaciones Talasémicas más frecuentes en África y en el Mediterráneo, regiones que se conoce aportaron una gran cantidad de genes a nuestra población (18). Existe una relación entre el tipo de

mutación y las manifestaciones clínicas. La mutación CD39 causa una reducción notable en la síntesis del ARN mensajero, los pacientes portadores de la misma manifiestan un cuadro clínico de Talasemia Intermedia moderada o severa. Las mutaciones IVSI-6 y la IVSI-110 afectan la región consenso del primer intrón del gen globina, actuando como un sitio de corte crítico y reduce la cantidad de ARN mensajero. Los homocigotos para esta mutación presentan una clínica moderada y los heterocigotos son asintomáticos (20). Las mutaciones -29 y -88 causan una leve reducción en la síntesis del ARN mensajero; la forma heterocigota se asocia a una Talasemia Menor sin síntomas, la homocigota produce Talasemia intermedia leve, mientras que la forma heterocigota compuesta (presencia de dos mutaciones distintas) causa una enfermedad de severidad moderada dependiendo de la otra mutación asociada (21,22). Esto concuerda con el comportamiento clínico de los pacientes estudiados como puede verse en la Tabla II, donde la mayoría de los portadores del alelo mutado CD39 presentan clínica de Talasemia Intermedia a pesar de ser heterocigotos para la mutación y los asintomáticos o con Talasemia Menor presentan la -29. También puede ejercer un efecto modulador en la expresión clínica, la presencia o no de alfa Talasemia, como se comprobó en estudio realizado con anterioridad en el grupo de pacientes con Hb S- Tal (23).

TABLA II
FRECUENCIA RELATIVA DE LOS DISTINTOS GENOTIPOS OBSERVADOS EN PACIENTES CON TALASEMIA

Genotipo	β Tal Menor	β Tal Intermed.	β Tal Mayor	Hb S β° Tal	Hb S β^+ Tal tipo 1	Hb S β^+ Tal tipo 2	Hb C + Tal	Frecuencia	
								Nº	%
-29/ β^n	10	1		9		13	1	34	42,5
CD39/ β^n	1	6		2		5		14	17,5
-88/ β^n	1							1	1,3
-29,CD39/ β^n		6		2				8	10,0
-29, -88/ β^n		4						4	5,0
-29, IVSI -6/ β^n		1		1	1			3	3,8
CD39, IVSI -6/ β^n		1		2				3	3,8
CD39, IVSI -110/ β^n		1						1	1,3
-29/CD 39		8						8	10,0
CD39, -88/ β^n				1				1	1,3
-29,CD39/-29, CD 39			3					3	3,8
Total de Pacientes	12	28	3	17	1	18	1	80	

La técnica ARMS-PCR es un método eficaz para el diagnóstico de

Talasemia en pacientes sin posibilidad del estudio familiar, que no sólo permite determinar las mutaciones que causan Talasemia en la población Venezolana, sino también permite, en una forma sencilla y rápida, catalogar los pacientes portadores de hemoglobinopatías y Talasemia. El estudio familiar en la mayoría de los casos es difícil debido a la falta de uno de los padres. Además, mediante este método se pudo lograr determinar si las mutaciones estudiadas se encuentran en forma homocigota o heterocigota. Para ello, se emplearon oligonucleótidos iniciadores de secuencias normales en el caso de las mutaciones CD39 y la IVSI-110, lo que permitió demostrar que estas mutaciones se encontraban en forma heterocigota en la mayoría de los casos estudiados.

La Talasemia se encuentra ampliamente distribuida en muchas regiones del mundo, especialmente en aquellas donde la malaria fue una vez endémica (24,25). Los individuos afectados con malaria pueden presentar niveles elevados de HbA₂ durante la enfermedad y su recuperación (15). Por lo tanto en Venezuela, donde aun hay regiones donde la malaria tiene características endémicas, resulta particularmente útil la aplicación del método ARMS-PCR en los estudios poblacionales, a fin de poder determinar la frecuencia real de la Talasemia menor.

El diagnóstico de la Talasemia por la cuantificación de Hb A₂,

en caso de que ésta esté asociada a la Hb S, resulta difícil por el método convencional de cromatografía de intercambio iónico, ya que las hemoglobinas S y C son eluidas junto con la Hb A₂, por lo tanto, se debe recurrir al uso de columnas especiales como las columnas Sickle Tal QuiK (Helena Laboratories, Texas, USA); lo cual representa un costo significativo y no se llega a un diagnóstico molecular preciso. Sin embargo, el uso de la técnica ARMS-PCR aún cuando representa el mismo costo que las columnas de A₂ permite realizar un diagnóstico más preciso de la enfermedad.

Cuando los niveles de Hb A₂ se encuentran dentro de los valores normales (por ferropenia asociada), no es posible realizar el diagnóstico de Talasemia por el método de cromatografía, y el problema se resuelve con técnicas como la ARMS-PCR, que a nivel molecular pueden determinar los defectos que causan la Talasemia en una población, sin depender de los niveles de HbA₂.

Para poder brindar a cada paciente un enfoque terapéutico y consejo genético adecuado este estudio debe ser realizado a todo paciente con hemoglobinopatías en forma rutinaria, ya que como sabemos son enfermedades multigénicas con clínica variable dependiendo de la mutación presente.

AGRADECIMIENTOS

En memoria del Dr. Tulio Arends quien nos abrió el camino en este campo, a las Lic. Gloria García

y Olivia Loreto por su asistencia técnica y a la Sra. Trina Arends por la revisión del manuscrito. Este proyecto fue financiado con fondos del CONICIT S1-95000696, BID-CONICIT BTS 067 OC/VE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OLD J. M., VARAWALLA N. Y. & WEATHERALL D. J.: Rapid detection and prenatal diagnosis of Thalassaemia: Studies in indian and cypriot populations in the UK. *Lancet* 1990; 336:834-837.
2. SUTCHARITCHAN P., SAIKI R., HUISMAN T. H. J., KUTLAR A., MCKIE V., ERLICH H. & EMBURY S. H.: Reverse dot blot detection of the African- American Thalassaemia mutations. *Blood* 1995; 84:1580-1585.
3. LOSEKOOT M., FODDE R., HARTEVELD C. L., VAN HEEREN H., GIORDANO P.C. & BERNINI L. F.: Denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing of PCR amplifies genomic DNA: a rapid and reliable diagnostic approach to Thalassaemia. *Brist J Hematol* 1990;76:269-274.
4. BAYSAL E & HUISMAN T. H. J.: Detection of common deletion - Thalassaemia- 2 determinats by PCR. *Am J Hematol* 1994; 46:208-213.
5. SAIKI R. K., WALSH P. S., LEVENSON C. H & ERLICH H. A.: Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:6230-6234.
6. FARAIID F. CH. & WALL J.: Detection of multiple cystic fibrosis mutations by reverse dot blot hybridization: a technology for carrier screening. *Hum Genet* 1992; 89:163- 168
7. STEINBERG M. H.: DNA Diagnosis for the detection of sickle hemoglobinopathies. *Am J Hematol* 1993; 43:110-115.
8. OLD J.: Hemoglobinopathies: Community clues to mutation detection. En: Elles R. Ed. *Molecular Medicine: Molecular Diagnosis of Genetic Diseases*. Human Press Inc.1996. Tattowa, NJ.
9. WEATHERALL D. J. & CLEGG J.B.: *Thalassaemia Syndromes*. London: Blackwell Scientific publications. 1981.
10. GONZALEZ- REDONDO J. M., KUTLAR A., KUTLAR F., MCKIE V. C., MCKIE K. M., BAYSAD E. & HUISMAN T. H.: Molecular Characterization of Hb S-C Thalassaemia in American Blacks. *Am J of Hematol* 1991; 38:9-14.
11. ROPERO P., SANCHEZ J., GONZALEZ F. A., ARMADA B., BENITO A., CALDEIRA A., MARTIN G. & VILLEGAS A.: Heterogeneidad molecular de la Talasemia, *Sangre* 1994; 39: 365-368.
12. ROMANA M., KEKLARD L., GUILLERMIN E., LAVOCAT C., SAINT MARTIN C., BERCHIL C., & MERANIT G.: Molecular Characterization of Thalassaemia.

- saemia mutations in Guadeloupe. *Am J of Hematol* 1996; 53:228-233.
13. WINTROBE M.: *Hematology Clinical*. Edit. Lea & Febiger Malvern, Pennsylvania, 1993.
 14. KUNKEL H. G. & WALLENIUS G. A.: New hemoglobin in normal adult blood. *Science* 1955; 122: 288.
 15. ARENDS T.: Estructura y Función de la Hemoglobina en: Universidad de las Naciones Unidas Edt. Estructura Genética de la población Indígena de Venezuela. Caracas, Venezuela. 1992. p 123.
 16. ARENDS T.: Hemoglobinopathies and Enzyme deficiencies in Latin American Population, en: Charles C. Thomas ed. The ongoing evolution of Latin American populations. Springfield.1971: 1-22.
 17. ARENDS A., BRAVO M, VELÁZQUEZ de L D., ALVAREZ M., LORETO O., SALAZAR R., GUEVARA J.M., CASTILLO O.: Origin and prevalence of beta thalassaemia in Venezuela. *Br J Haematol*. 1998;102(1):48 C.
 18. ARENDS T. Epidemiology of hemoglobin variants in Venezuela. *Gaceta Med. Caracas* 1984; 92:189-224.
 19. EMBURY S. H., HEBBEL R. P., MOHANDAS N. & STEINBERG M. H. Sickle cell disease. *Basic principles and Clinical Practics*. New York: Raven Press, Ltd. 1994: 213-215.
 20. CAO A., GALANELLO R. & ROSATELLI M. C.: Genotype - phenotype correlations in Thalassaemia. *Blood Rev* 1994; 8:1-12.
 21. ANTONARAKIS S., ORKIN S. H., CHENG T. C., SCOTT A., SEXTON J. P., TRUSKO S. P., CHARECHU S. & KAZAZIAN H. JR. Thalassaemia in American Black: Novel mutations in the "TATA" box and an acceptor splice site. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81:1154.
 22. ORKIN S. H. & KAZAZIAN H. H. JR.: The mutation and polymorphism of the human globin gene and its surrounding DNA. *Ann. Rev. Genet.* 1885;188: 181-171.
 23. ARENDS A., ALVAREZ M., VELÁZQUEZ de L D., CHIARIELLO A., BRAVO M., AVILA M., SALAZAR R., GUEVARA J.M., CASTILLO O.: Determination of globin gene cluster haplotypes and prevalence of β -thalassaemia in sickle cell anemia patients in Venezuelan. *Br J Haematol*. 1998;102(1):48B.
 24. ARENDS T.: Talasemia en Venezolanos nativos. *Gaceta Med. Caracas* 1960: 69: 333-338.
 25. KAZAZIAN H. JR. & BOEHM C.D.: Molecular basis and prenatal diagnosis of Thalassaemia. *Blood* 1988; 72: 1107-1116.