

POLIMORFISMO DE LAS CADENAS GAMMA DE LA HEMOGLOBINA FETAL EN PORTADORES DE HEMOGLOBINOPATIAS: UN ESTUDIO PRELIMINAR.

Dafne Picado¹, Mario Chaves²

RESUMEN

En el presente estudio se analizó el poliformismo de la hemoglobina fetal en recién nacidos y adultos normales, así como en una muestra de portadores de hemoglobinopatías, procedentes de distintos centros hospitalarios del país. Se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida y el análisis densitométrico para la valoración de las cadenas gamma de la hemoglobina fetal. El estudio mostró en los portadores del fenotipo SF un patrón típicamente fetal (0,56-1,03), en tanto que en el AS fue en el ámbito normal (0,2-0,47). En los SS se observó una inversión de la relación con predominio de la cadena ζ y (1,35-1,54). Para los casos de β -talasemia se evidenció una gran variabilidad en la relación de las cadenas y (0,38-0,95), dado probablemente por la heterogeneidad genética de este trastorno; se halló igualmente este comportamiento en los AF (0,23-0,91). En FA la relación fue 1,27-2,56. Finalmente se considera necesario ampliar la experiencia para conocer mejor el comportamiento del poliformismo de las cadenas y de la HbF en nuestra población y su implicación en

la expresión clínica de las distintas hemoglobinopatías. (*Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1996, 17-2:17-26).

Palabras Clave: Hemoglobina F, cadenas gamma, hemoglobinopatías

INTRODUCCION

Durante el desarrollo embrionario del ser humano y bajo condiciones normales las hemoglobinas (Hbs) predominantes son la Gower I (Z_2, ϵ_2), Gower 2 ($\alpha_2 \epsilon_2$) y Portland ($Z_2 \gamma_2$) (1,2); pero cuando se inicia la síntesis de Hb en los hemocitoblastos formados en el hígado y la médula ósea, la biosíntesis de las cadenas Z y ϵ cesa, para dar inicio a la síntesis de cadenas γ, δ, β por lo que aparecen las Hbs F($\alpha_2 \gamma_2$), A ($\alpha_2 \beta_2$) y A₂ ($\delta_2 \beta_2$). Los genes β, γ y δ se hayan íntimamente ligados en el cromosoma 11, mientras los genes α se encuentran en el cromosoma 16 (1,2).

Al nacimiento cerca de un 15% de la Hb es A y el resto es Hb F con trazas de Hb A₂ alrededor de los 8-12 meses la Hb F ha disminuído a menos de un 5% y a los 2 años se encuentra en valores cercanos a los del adulto. En el adulto la Hb predominante es la Hb A, la Hb A₂, se encuentra en un promedio del 3%, en tanto la Hb F no sobrepasa el 2% (2).

La Hb F está relacionada con la gestación y los primeros meses del período postnatal. Parece improbable que la presencia de variantes de cadena

¹ Laboratorio Clínico, Hospital William Allen, C.C.S.S., CIHATA- Cátedra de Hematología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

y tenga efectos adversos en el feto y en el recién nacido. Las variantes de Hb E se presentan por una sustitución del aminoácido en la posición 136 o bien en la 137. La primera hace que en las cadenas γ se encuentren dos diferentes tipos de residuos: la glicina en la posición 136 da origen a la $G\gamma$ y la alanina, en dicha posición, origina $A\gamma$. La frecuencia de otras variantes de cadena γ , como $I\gamma$ y $T\gamma$ es muy baja; aproximadamente 0,05% (1,2,3,).

Estas no son las únicas variantes que podemos encontrar, pues es posible hallar el reemplazo de una treonina por una isoleucina en la posición 75, como es el caso de la Hb F-Sardinia. Sin embargo se ha observado la presencia $I\gamma$ y $T\gamma$ en un buen porcentaje de pacientes normales, por lo cual no se considera una anomalía (3,4,5,6,7,8,9,10).

La presencia de síntesis de HbF en personas normales y en diferentes hemoglobinopatías y trastornos afines se postula por la presencia hipotética de un gen controlador que tendría las funciones de activar los genes de β y δ de la globina y de suprimir la actividad de los genes de γ (3).

La relación normal entre las cadenas $G\gamma$ y $A\gamma$ de la HbF del recién nacido es aproximadamente 7:3, con valor entre 0,69 - 0,72, que posterior a las 11 semanas declina hasta alcanzar una relación de 4:6 con valores de 0,4. En el adulto los valores de la relación de cadenas gamma va de 0,25 a 0,71 (3). La existencia de altos niveles de HbF se puede presentar en ciertos desórdenes genéticos como la anemia drepanocítica, la β -talasemia, y la $\delta\beta$ talasemia; así como también en una condición denominada persistencia hereditaria de HbF (PHHF); ésta última se produce debido a la mutación o pérdida de un gen controlador; ya que estos genes de PHHF reducen o

eliminan la actividad de los genes contiguos de las cadenas β y δ aumentando la producción de las cadenas γ y en el mismo grupo de genes de cadena no α (4,11,12,13,14,15,16,17,18). Se ha encontrado que en los heterocigotos sanos para la Hb S tienen una relación muy variable, que se ha asociado a la presencia de haplotipos específicos, a delecciones o a la presencia de tres genes $G\gamma$ (9, 10, 15).

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 38 muestras enviadas al CIHATA portadoras de alteraciones de la hemoglobina, provenientes de los servicios de hematología de los Hospitales de la Caja Costarricense del Seguro Social. Se tomaron como controles 30 donadores de sangre del Banco de Sangre del Hospital San Juan de Dios.

Las muestras se tomaron con EDTA-K₃, como anticoagulante y se sometieron a los flujogramas analíticos para ser estudiadas mediante electroforesis de hemoglobina a pH 8,6 en acetato de celulosa (19), cuantificación de Hb A₂ por microcromatografía de intercambio amiónico (20) y cuantificación de Hb F por el método Singer et al. (21).

La determinación de cadenas $G\gamma$ / $A\gamma$ se realizó en geles de poliacrilamida con Tritón X-100, Urea 8 M y ácido acético glacial (22,23) a la que se le practicaron algunas modificaciones como son: el cambio del Triton X-100 del método de Ibarra (24) por NonidetNP 40 (22). Su uso produjo resultados comparables con los descritos por Ibarra. Los geles fueron teñidos con Azul Coomassie G a una concentración de 0,05 g/dl. La cuantificación se hizo mediante la densitometría a una longitud

de onda de 550 nm (Helena, Laboratories). El área de cada cadena fue calculada y utilizada en la obtención de la relación G_{γ}/A_{γ} . Los porcentajes de

cadena A_{γ} y G_{γ} y su relación se calcularon utilizando la siguiente fórmula (24).

$$\% G_{\gamma} = \frac{\text{Area } G_{\gamma}}{\text{Area } A_{\gamma}} \times 100$$

$$\% A_{\gamma} = 100 - \% G_{\gamma}$$

$$G_{\gamma}/A_{\gamma} = \frac{\% G_{\gamma}}{\% A_{\gamma}}$$

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la relación G_{γ}/A_{γ} se observan en los cuadros del 1 a 6, correspondientes a cada uno de los tipos de hemoglobinopatías analizados que fueron comparados con el patrón de G_{γ}/A_{γ} de un adulto normal y un patrón de la misma relación de un recién nacido. Los datos se analizaron estadísticamente mediante la *t de student*.

En los fenotipos hemoglobínicos SF que se muestran en el cuadro. los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al grupo control de recién nacidos, pero para el grupo control de adultos ($p < 0.05$), evidenció un patrón claramente de tipo fetal en la relación G_{γ}/A_{γ} .

El cuadro 2, correspondiente al fenotipo AS, mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con el control de recién nacidos, en tanto que la comparación con el grupo control de adulto no evidenció diferencia significativa ($p > 0.05$).

Los pacientes con β -talasemia. según se ve en el cuadro 3, no presentan diferencia significativa ($p > 0.05$) con respecto al grupo control de recién nacidos, pero sí la presentan con el grupo control de adultos ($p < 0.05$).

En 3 pacientes con el fenotipo hemoglobínico FA, que se detallan en el cuadro 4. se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$) para ambos controles.

El cuadro 5 muestra un fenotipo hemoglobínico AF. Los resultados del análisis estadístico reflejan que no se presenta diferencia significativa con respecto a los resultados de ambos grupos.

Finalmente en el fenotipo SS drepanocíticos con valores bajos de Hb F (cuadro 6), se evidencia una diferencia significativa con respecto a ambos controles.

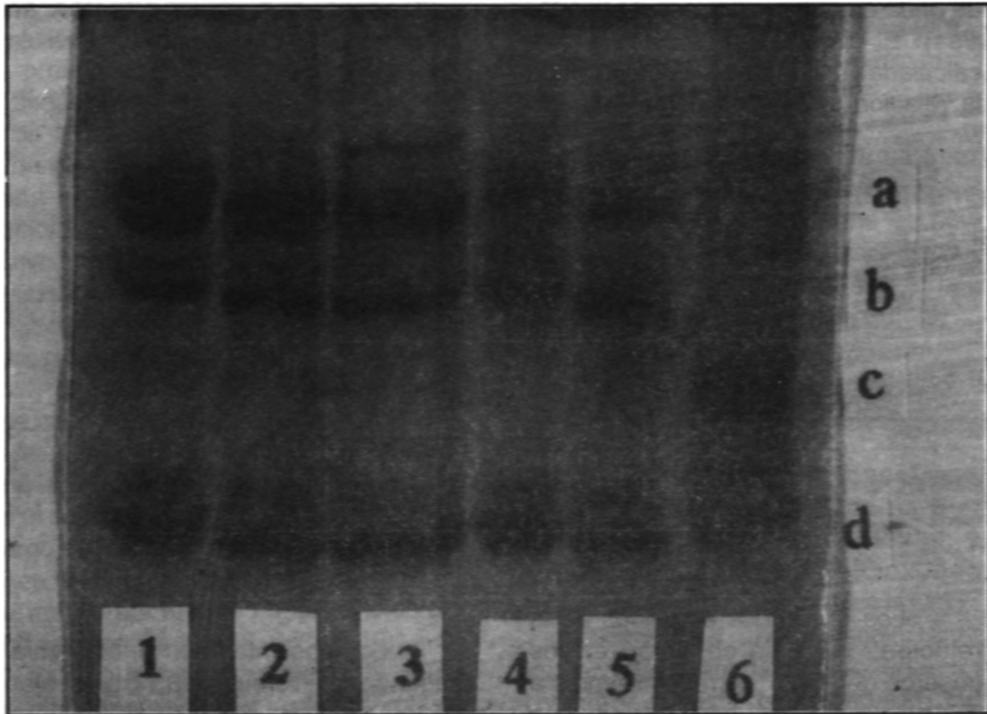


FIGURA 1

Electroforesis en gel de poliacrilamida de Hb F (según Villalobos-Arámula et al.).
1-5 Cadenas de Hb F, 6 Cadenas de Hb A. a. $\Lambda\gamma$ b. $\zeta\gamma$ c. β d. α

h

CUADRO 1

Valores de $\Lambda\gamma$, $\zeta\gamma$ y relación de cadenas $\zeta\gamma / \Lambda\gamma$ en pacientes portadores de fenotipo hemoglobínico drepanocítico tipo SF (n:7)

	%HbF	% $\Lambda\gamma$	% $\zeta\gamma$	$\zeta\gamma / \Lambda\gamma$
1	ND	62,0	38,0	0,61
2	ND	57,6	42,4	0,74
3	ND	63,9	36,1	0,56
4	ND	55,6	44,4	0,79
5	12,0	70,5	29,5	0,41
6	13,3	56,4	43,6	0,77
7	19,3	49,2	50,8	1,03

ND: no determina

CUADRO 2

Valores de A_γ y G_γ y relación G_γ / A_γ en pacientes del fenotipo hemoglobínico AS (n:4)

	HbF%	% A_γ	% G_γ	G_γ / A_γ
1	<de 1,5	68,1	31,9	0,47
2	<de 1,5	68,2	31,8	0,46
3	<de 1,5	84,1	15,9	0,20
4	<de 1,5	82,0	18,0	0,22

CUADRO 3

Valores de A_γ , G_γ y de la relación G_γ / A_γ en pacientes portadores de β -Tal menor tipo Hb A2 \uparrow (n:10)

	HbF%	%HbA ₂	% A_γ	% G_γ	G_γ / A_γ
1	ND	6,1	58,1	41,9	0,72
2	7,0	5,4	61,1	38,9	0,64
3	ND	5,5	53,0	47,0	0,89
4	2,0	4,8	60,9	39,1	0,64
5	4,1	5,7	66,5	33,5	0,50
6	ND	5,0	72,5	27,5	0,38
7	ND	4,8	56,6	43,4	0,77
8	ND	5,0	58,9	41,4	0,69
9	ND	6,1	53,8	46,2	0,85
10	ND	7,3	52,2	47,8	0,95

CUADRO 4

Valores de A_γ y G_γ y relación G_γ / A_γ en muestras con fenotipo hemoglobínico talasémico AF (n:8)

	HbF%	% A_γ	% G_γ	G_γ / A_γ
1	8,3	72,6	27,4	0,38
2	4,5	81,0	19,0	0,23
3	8,5	63,7	36,3	0,57
4	11,7	52,4	47,6	0,91
5	2,9	56,5	43,5	0,77
6	ND	78,9	21,1	0,27
7	14,0	62,2	37,8	0,61
8	12,1	60,5	39,5	0,65

CUADRO 5

Valores de $A\gamma$, $G\gamma$ y relación $G\gamma / A\gamma$ en muestras que presentan el fenotipo hemoglobínico FA indeterminado (n:3)

	HbF%	% $A\gamma$	% $G\gamma$	$G\gamma / A\gamma$
1	47,0	39,0	61,0	1,56
2	54,7	44,0	56,0	1,27
3	76,0	28,0	71,9	2,56

CUADRO 6

Valores de $A\gamma$, $G\gamma$ y relación $G\gamma / A\gamma$ en pacientes portadores del fenotipo hemoglobínico SS, drepanocítico severo (n:3)

	HbF%	% $A\gamma$	% $G\gamma$	$G\gamma / A\gamma$
1	2,1	39,4	60,5	1,54
2	5,0	42,6	57,4	1,35
3	2,5	39,5	60,5	1,53

DISCUSION

No es posible separar las cadenas $A\gamma$ y $G\gamma$, mediante métodos habituales de cromatografía y electroforesis debido a que difieren en un aminoácido neutro. Su separación exige técnicas como la cromatografía líquida de alta presión y la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Tritón, entre otras. Esta última técnica fue la que se escogió para realizar el trabajo aquí propuesto.

El objetivo primordial de este trabajo fue comparar la relación $G\gamma/A\gamma$ y sus posibles variaciones en diferentes hemoglobinopatías existentes en Costa Rica, en relación con las reportadas por otros autores.

El análisis de los resultados obtenidos en portadores del fenotipo SF presentan un patrón típicamente fetal en la relación $G\gamma/A\gamma$, siendo comparables

con los obtenidos por otros autores (3,6,9,10,24). Los niveles elevados de HbF han sido explicados por la presencia de un gen β^s en los padres que puede ser heredado a toda su descendencia. Este hecho ha sido apoyado por evidencias que afectan la producción de HbF durante la vida de adulto y que están estrechamente relacionadas con el complejo del gene de β globina. Otros estudios realizados en pacientes de raza negra sugiere un desequilibrio entre los alelos β^s y los alelos determinantes de niveles altos de HbF (10, 18, 25, 26, 27,). También se ha asociado aumentos de HbF con factores no genéticos, aunque esto no está claramente entendido (10).

Los valores de la relación $G\gamma / A\gamma$ hacen necesario realizar un estudio familiar que permita descartar o asegurar la presencia de una persistencia hereditaria de hemoglobina fetal en alguno de los casos estudiados.

En lo referente a los portadores heterocigotos de HbS que se presentan en el cuadro 2 no se encontró alteración alguna en la relación G_y / A_y lo que podríamos asociarlo a los niveles de HbF normales. Lo anterior hace suponer que el gen β^s en una dosis como la que se encuentra en el AS, no produce un desequilibrio sobre alelos y de la HbF como si lo hace la doble dosis de cadenas β^s en el paciente drepanocítico con HbF alta. Un paciente drepanocítico que no presente aumentados los niveles de HbF pareciera que no cumple esta hipótesis, por lo que este comportamiento o variabilidad se podría asociar con el haplotipo de Hbs que exhiba el paciente, a deleciones o a la presencia de tres genes G_y (28,29).

Respecto de los casos de β -talasemia analizados la relación G_y / A_y se aprecia una variabilidad del tipo activación fetal de los genes γ . Este hallazgo puede estar asociado a los reordenamientos de ADN en el cromosoma 11 en donde se encuentran los genes γ, δ y β , producidos estos por deleciones de materiales en el clusters del gene β (14). Dentro de estos reordenamientos podemos citar el *crossover* propuesto para la PHHbF/S, y la triplicación de genes γ y entre otros (14,18).

Pacientes portadores del fenotipo AF se consideraron como poseedores de posible $\delta\beta$ talasemia. Mostraron una heterogeneidad en la relación G_y / A_y de carácter bimodal y evidenciaron lo que se ha descrito por otros autores con respecto a la gran variabilidad de la expresión de los genes de HbF en estas talasemias (25,30,31).

En el fenotipo FA se manifiesta una inversión de la relación sintética, con un predominio de las cadenas G_y . Dicha inversión podría corresponder a la ya descrita en la $G_y \delta\beta$ -talasemia (30,31),

a un niño menor de 6 meses, o bien a un paciente portador de una PHHbF que ha sido transfundido. Se hace necesario realizar los estudios familiares pertinentes con el fin de poder definir cualquiera de las anteriores condiciones.

En cuanto a los pacientes portadores del fenotipo SS se observa un predominio de las cadenas G_y , lo que provoca una inversión de la relación y difieren de los hallazgos encontrados en portadores de HbS y del patrón SF. Dicha variabilidad se ha asociado a la presencia de haplotipos específicos, entre otras posibles alteraciones (28,29).

Finalmente se considera importante ampliar la experiencia para conocer mejor el comportamiento del polimorfismo de las cadenas γ y de la HbF en nuestra población y su implicación en la expresión clínica de las distintas hemoglobinopatías.

ABSTRACT

It was analyzed Hb F polymorphism in newborns, normal adults and hemoglobinopathies carriers from different hospitals. A polyacrylamide electrophoresis and densitometric quantifications, were used for the γ chains analysis. The study shows in "SF" patients a typically fetal pattern (0,56-1,03), while on their "AS" the same was normal (0,20-0,47). On the "SS" cases, it was observed an inversion on G_y ratio (1,35-1,54). On the other hand, the β -thalassemia patients show great differences on the γ chain ratio (0,38-0,95), a variation attributed to the clinical heterogeneity of this disorder. Similar findings were obtained on the "AF" patterns (0,23-0,91), while on the "FA" the ratio observed was 1.27-2,56. It is necessary to amplify this experience for obtaining

better knowledge of γ chain polymorphism of Hb F in Costa Rica and their implication on the clinical expression of the different hemoglobinopathies.

REFERENCIAS

1. Adams J. The human γ chain of human hemoglobins. in: Hemoglobin variants in human populations. Winter, W. Vol I, CRC Press, 1986, pp 4-12
2. Forget BG. Molecular Genetics of the human hemoglobin synthesis. *Ann In Med* 1979; 91: 605-616
3. Huisman TH, Schroeder W, Harris H, Gravely M, Shelton JR, Shelton, J.B. Evans, L. The chemical heterogeneity of fetal hemoglobin in normal newborn infants and in adults. *Mol. Cell. Biochem.* 1977; 17(1): 45-55
4. Huisman TH, Schroeder W, Reese A, Wilson JB, Lam, H., Roger Shelton J, Shelton J, Baker S. The γ chain of human fetal hemoglobin at birth and in several abnormal hematologic conditions. *International Pediatric Research Foundation.* 1977; 1102-1105.
5. Schroeder WA. The human γ -chain variants. A Review. *Hemoglobin* 1977; 1(6): 513-525
6. Grifoni V, Kamuzora H, Lehmann H, Charlesworth D. A new Hb variant: HbF Sardinia y 75 (E19) Isoleusina \rightarrow Threonine found in a family with Hb G Philadelphia, β -thal deficiency and a Lepore-like haemoglobin indistinguishable from HB A2. *Acta haematologica* 1975; 53: 347-255
7. Huisman TH, Reese, L, Gravely ME, Harris H, Wilson JB. The synthesis of the γ and $\text{A}\gamma$ chain of human fetal hemoglobin in Eritroid colonies cultured from peripheral blood BFUes of normal adults and newborn and of subjects with an $\text{A}\gamma$ or a γ chain abnormal fetal hemoglobin. *Am. J. Hemat.* 1980; 19: 137-150
8. Rogers C, Kay L, Schroeder WA, Powers D. The imbalance of chain synthesis in hemoglobin F. *Hemoglobin* 1981; 5(6): 531-548
9. Bozzo M, Del Río E, Casals T, Domenech M, Ginferer E, Baiget M. Contribución al estudio del polimorfismo de la hemoglobina fetal humana. *Sangre* 1982; 27 (5): 849-854.
10. Mason K, Grandison, Y, Hayes, R.J. Serjeant, B., Serjeant, G. R. Waidya, S., Wood, W.G. Post-natal decline of fetal hemoglobin in homozygous sickle cell disease: relationship to parental Hb F levels. *Brith, J. Haemat.* 1982; 52: 455-463
11. Cabrera-Llano J, Castellanos González M, López-Hernández, N, Hidalgo, P.C. Electroforesis de 1149 muestras de sangre de cordón umbilical y evaluación de la heterogeneidad de la relación entre las cadenas γG y yA de la hemoglobina fetal. *Sangre* 1995; 40 (1): 67-69
12. Becker G, Rossi, B. The interaction of hereditary persistence of fetal hemoglobin and beta thalassaemia. *Ann. Int. Med.* 1966; 65 (5): 1071-1075
13. Basley J, Rappaport E, Schwartz E. Surrey S. The γ $\delta\beta$ -globin gene region in $\text{Gy}\beta$ + hereditary persistence

- of fetal hemoglobin. *Blood* 1982; 59 (4): 828-831
14. Bethlenfalvai N, Motulsky A, Ringelmann B, Lehmann H, Humbert J, Konotey-Ahulu FID. Hereditary persistence of fetal hemoglobin, β Thalassemia, and the hemoglobin δ - β locus: further family data and genetic interpretation. *Am. J. Genet.* 1975; 27: 140-154
 15. Metaxotou-Mavromati, A., Antonopoulou, H., Laskaru, S., Tsiarta, H., Ladis, V., Kattamis, C. Developmental changes in hemoglobin F levels during the first two years of life in normal and heterozygous β -Thalassemia infants. *Pediatrics* 1982; 69 (6): 734-738
 16. Milner, P.F., Dóbler Leibfarth, J., Ford, J., Barton, B., Grenett, H., Garver, E Increased Hb F in sickle cell anemia is determined by a factor linked to the β s gene from one parent. *Blood* 1984; 63(1): 64-72
 17. Onorata, D., Mineiro, R., Sacchetti, L., Domenica, M., Giglionni, B., Comi, P., Ottolenghi, S., Saglio, G., Guerrasio, A., Camaschella, C., Mazza, U. High Hb F levels in a sardinian family: A genetic defect intermediate between HPHF greek type and $\delta\beta$ Thalassemia? *Haematologica* 1982; 67 (4): 499-507
 18. Wood, W.G., Weatherall, D.J., Clegg, J.B., Hamblin, T.J., Edwards, J.H., Barlow, A.M. Heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin and its interaction with β thalassemia. *Brith. J. Haemat.* 1977; 36: 461-473
 19. Sáenz, G.F., Chaves, M., Rodríguez, W.E., Barrantes, A., Orlich, J. *Hematología Analítica*. 3 ed. EDNASSS, CENDEISSS, San José, C.R. 1995
 20. Huisman, T. H., Jonxis, J.H. *The hemoglobinopathies: Techniques of identification*. Marcel Dekker Inc. N.Y., 1977
 21. Singer, K., Chernoff, A.I., Singer, L. Studies on abnormal hemoglobins. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematological disorders by means of alkali denaturation. *Blood* 1951,6: 413-420
 22. Alter, B., Goff, S. Efremov, G.D., Gravely, M., Huisman, J.H. Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the Gy / Ay ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis. *Brith. J. Haematol* 1980; 44: 527-534
 23. Villalobos-Arámbula, A.R., Aguilar-Luna, J.C., Esparza. A., Perea, F.J., de Loza, R., Hernández-Córdova, Ibarra, B. Hemoglobina fetal y relación yG / yA en niños con leucemia aguda linfoblástica L1 y L2. *Sangre* 1993; 38 (1): 31-35
 24. Ibarra, B., Montes, J., Becerra, C. Hemoglobina fetal en niños con diferentes neoplasias. *Sangre* 1991, 36 (5): 383-386
 25. Huisman, T.H., Altay, C., Webber, B., Reese, L., Gravely, M.E., Okonjo, K., Wilson, J.B. Quantitation of three types of y chain of Hb F by high pressure liquid chromatography; application of this method to the HbF of patients with sickle cell anemia or the

S-HPFH condition. *Blood* 1981; 57 (1): 75-82

26. Stamayannopoulos, G., Wood, W.G., Papayannopoulos, T.H., Nute, P.E. A new form of hereditary persistence of fetal hemoglobin in blacks and its association with sickle cell trait. *Blood* 1975, 46: 683-691
27. Dover, G., y Boyer, S.H. Fetal hemoglobin-containing cell without fetal hemoglobin: a reciprocal relationship between Gamma-and Beta-globin gene expression in normal subjects and in those with high fetal hemoglobin production. *Blood* 1987; 69(4): 1109-1113
28. Chu, Z.F., Liang, C., Kutlar, F. Fetal hemoglobin heterogeneity in Chinese newborns of the Uygur and Han nationalities; comparison of babies from Xinjiang and Beijing. *Hemoglobin* 1987; 11: 123-128
29. Nagel, R.L., Rao, S.K., Dinda-Belkhdja, O., Connelly, M.M., Fabry, M.E., Georges, A. The hematologic characteristics of sickle cell anemia bearing the Bantu haplotype: The relationship between γ G and Hb F level. *Blood* 1987; 69: 1026-1030
30. Efremov, G.D., Ibarra, B., Gurgey, A., Sukumaran, P.K., Altay, C., Huisman, T.H.J. Gamma Chain heterogeneity of fetal hemoglobin in nonblack β and $\alpha\beta$ thalassemia and HPFH heterozygotes and homozygotes. *Am. J. Hemat.* 1982; 12: 367-382
31. Weatherall, D.J. The thalassemias. In: *Methods of Hematology*. Churchill Livingstone, N.Y. 1983.