
Anemia en poblaciones indígenas del Occidente de Venezuela.

María Diez-Ewald¹, Enrique Torres-Guerra¹, Irene Leets², Miguel Layrisse², Gilberto Vizcaino¹ y Melvis Arteaga Vizcaino¹.

Instituto de Investigaciones Clínicas, Universidad del Zulia.
Maracaibo, Venezuela e Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: Anemia, hierro, ácido fólico, vitamina B12

Resumen. El objetivo del trabajo fue estudiar la frecuencia de anemia nutricional en los indios Yucpa, habitantes de la región occidental de Venezuela. Se estudiaron 399 indios de la etnia Yucpa, habitantes de las comunidades de Aroy, Marewa y Peraya. En cada individuo se determinaron las concentraciones de hemoglobina y los niveles séricos de hierro, capacidad de saturación de transferrina, ferritina, ácido fólico y vitamina B₁₂. Además se estableció la frecuencia de anemia y déficit de nutrientes en cada comunidad. Se encontró anemia en el 71,1% de los individuos de Aroy, el 52,2% de los habitantes de Marewa y el 74,4% de Peraya. En el 48,1% de los casos de anemia no se halló deficiencia de hierro, folato o vitamina B₁₂, sin embargo el 39% de los individuos estudiados tenía anemia por deficiencia de hierro y el 12,9% tenía anemia por déficit de folato y o vitamina B₁₂. La alta frecuencia de anemia sin causa nutricional entre los indios Yucpa, se atribuye a la prevalencia de enfermedades infecciosas tales como hepatitis, parasitosis e infecciones de piel y del tracto respiratorio.

Anemia among western venezuelan indians.

Invest Clín 1999; 40(3): 191-202.

Key words: Anemia, iron, folic acid, vitamin B₁₂.

Abstract. The purpose of the study was to investigate the frequency of nutritional anemia among western venezuelan indians. Three hundred and ninety nine Yucpa indians from the communities of Aroy, Marewa and Peraya were studied. The concentrations of hemoglobin, serum iron, total iron binding capacity, serum ferritin, serum folate and serum vitamin B₁₂ and the frequency of anemia and nutrient deficiency were determined. Anemia was found in 71.7% of people from Aroy, 52.25 from Marewa and in

74.4% from Peraya. No nutrient deficiencies were found in 48.1% of cases with anemia, while iron deficiency anemia was present in 39% of the population studied, and folate and or vitamin B12 deficiency were associated with anemia in only 12.9% of cases. The high frequency of anemia, unrelated to nutrient deficiency, among the Yucpa indians, is attributed to the prevalence of chronic infectious diseases such as hepatitis and parasitic infections, as well as skin and respiratory infectious processes.

Recibido: 13-1-99. Aceptado: 29-7-99.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las tribus indígenas latinoamericanas vive en pobreza extrema y a pesar de ello, son muy escasos los estudios sobre las condiciones de nutrición de estos grupos. En Venezuela, son bien conocidos los estudios de Wilbert y col (1) en los indios Warao, que son una tribu que habita el Delta del río Orinoco en la zona oriental del país. Más recientemente, Diez-Ewald y col (2), estudiaron la prevalencia de anemia nutricional en los indios de la etnia Bari, descendientes de los Chibchas y habitantes de la Sierra de Perijá en el occidente de Venezuela. En esa misma zona, existe otra tribu indígena, los Yucpas, que son un grupo que vive en la falda oriental de la cordillera de Perijá (Fig. 1), descendientes de las tribus Caribes encontradas por los conquistadores españoles a lo largo de la costa de Venezuela (3). Estos indios viven dispersos en pequeñas comunidades rurales de no más de 300 personas, cercanas a haciendas ganaderas y áreas urbanas. De acuerdo al último censo de población el grupo total es de 4174 individuos (4). Algunos hombres trabajan

en las haciendas, pero la mayoría se queda en su comunidad realizando tareas rudimentarias de agricultura. Sin embargo, a pesar de su mayor contacto con poblaciones no indígenas, estos indios viven en condiciones bastante primitivas. Sus hábitos alimenticios consisten principalmente de carbohidratos (yuca, maíz, arroz y pasta), la proteína animal que consumen corresponde en su mayoría a sardinas enlatadas y uno que otro producto de la caza o de la pesca. Los vegetales y frutas son escasos y están representados en su mayor parte por mangos y bananos cuando están en estación. La atención que estos grupos reciben consiste principalmente de campañas de vacunación por parte del Estado, la actividad misionera y últimamente por los programas de ayuda de las compañías petroleras (Fundación Zumaque-PDVSA), que han instalado letrinas ventiladas y tuberías que llevan agua al centro del poblado. Es poco lo que se sabe del estado nutricional de estos indígenas, por lo que el propósito del presente trabajo es estudiar la frecuencia de anemia y de déficit de nutrientes necesarios para la hematopoyesis.

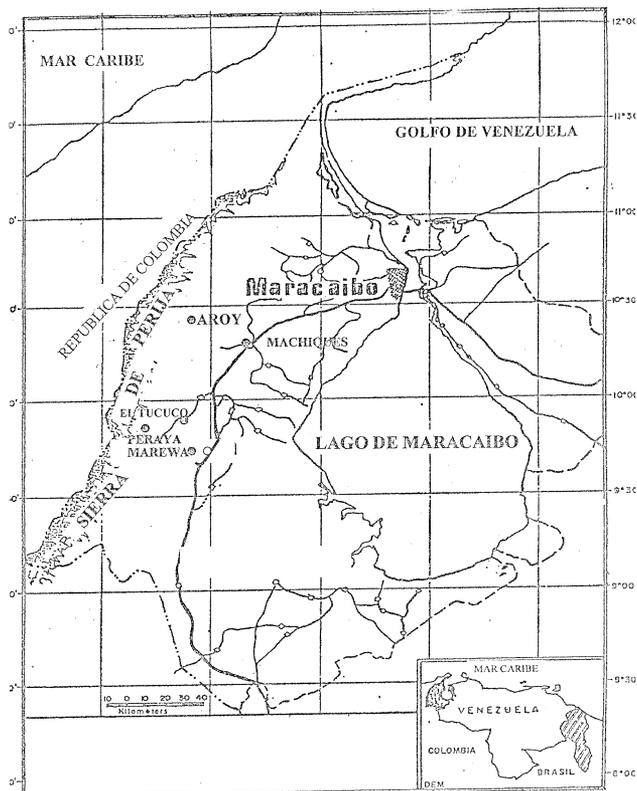


Fig. 1. Mapa del estado Zulia donde aparecen las poblaciones de Aroy, Marewa y Peraya. En el cuadro inciso se muestra el mapa de Venezuela donde el estado Zulia se observa en punteado en el Noroeste del país.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se escogieron tres comunidades: Aroy que es un pequeño poblado de difícil acceso, en la falda de la montaña y Marewa y Peraya, ambas de fácil acceso y localizadas en un valle a corta distancia de la Misión del Tukuko, donde existen facilidades para adquirir provisiones básicas.

En total se estudiaron trescientos noventa y nueve individuos de edades comprendidas entre 2 y 70

años. Ciento seis personas correspondieron a Aroy, 203 a Marewa y 90 a Peraya. Se realizó una historia clínica y examen físico de cada persona y se le extrajo una muestra de sangre venosa que se repartió en dos tubos de vidrio. Uno de los tubos contenía ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) y se destinó para la determinación inmediata de hemoglobina según Crosby y col. (5), hematocrito (microhematocrito) y la preparación de extendidos de sangre periférica; el otro tubo no contenía

anticoagulantes y estaba libre de hierro y se utilizó para la obtención de suero. Los sueros se repartieron en pequeños volúmenes, en tubos de polipropileno y se guardaron en hielo seco hasta su traslado al laboratorio, donde fueron almacenados a -70°C hasta su utilización.

El hierro sérico se midió por el método cromogénico, usando batrofenantrolina y la capacidad total de saturación con hierro se determinó mediante saturación con hierro radioactivo (6). La ferritina sérica fue medida por un método absorbente inmunoenzimático (ELISA), de acuerdo a Flowers y col (7) y las concentraciones de folatos y vitamina B₁₂ séricos se determinaron utilizando un método comercial de radioinmunoensayo (General Diagnostic Products Corporation. Los Angeles, CA. USA).

Los individuos de cada comunidad se separaron en 4 grupos eta-

rios: menores de 6 años, de 6 a 11, de 12 a 17 y 18 años o más. A partir de los 12 años de edad los grupos se separaron de acuerdo al sexo.

Se consideró anemia o déficit cuando la hemoglobina o los niveles séricos de los parámetros investigados, eran inferiores a los valores mínimos normales presentados en la Tabla I (8).

El análisis estadístico consistió en el cálculo de probabilidad mediante X^2 y el coeficiente de correlación.

RESULTADOS

La sintomatología más frecuente en los individuos de estudio, estuvo relacionada con infección parasitaria (dolor abdominal, prurito anal, diarreas con sangre, etc.). Al examen físico el hallazgo más llamativo fueron las infecciones de la piel secundarias al rascado a conse-

TABLA I
VALORES MÍNIMOS NORMALES DE HEMOGLOBINA Y NUTRIENTES
SEGÚN LA EDAD

EDAD Años	HEMO- GLOBINA g/dL	HIERRO SÉRICO μg/dL	SATURAC. DE TRANSFE- RRINA, %	FERRITINA SERICA μg/L	FOLATO SERICO μg/L	VIT. B ₁₂ SERICA mμg/L
1 - 2	10,7	30	12	10	3	150
3 - 5	10,9	30	12	10	3	150
6 - 11	11,5	50	15	12	3	150
12 - 17						
Hembras	11,7	50	15	12	3	150
Varones	13,2	50	15	12	3	150
≥ 18						
Hembras	11,7	60	16	12	3	150
Varones	13,2	60	18	12	3	150

cuencia de escabiosis. Además, se detectaron procesos infecciosos respiratorios (gripe, bronquitis) y palidez de piel y mucosas. Muchas personas refirieron haber sufrido hepatitis y la mayoría había sido vacunada contra poliomielitis, tosferina, difteria, tétanos, sarampión y tuberculosis y un número importante de adultos también había sido vacunado contra hepatitis B.

La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) fue 30,9 en Aroy, 30,5 en Marewa y 30,8 en Peraya.

En el extendido de sangre periférica el 54% de los pacientes presentaba glóbulos rojos normocíticos y normocrómicos, en el 38% había hipocromía y en el 8% restante anisocitosis y el promedio de segmentación de neutrófilos fue $3,7 \pm 0,4$. En el 77% de los pacientes provenientes de Aroy, en el 90% de los de Marewa y en el 100% de los habitantes de Peraya, la fórmula leucocitaria mostró 6% o más de eosinófilos.

Los resultados de hemoglobina, parámetros de hierro, ácido fólico y vitamina B₁₂ obtenidos en cada población, se presentan en las Tablas II, III, IV y V. En las tres comunidades se hallaron concentraciones bajas de hemoglobina. En Aroy el valor promedio de hemoglobina en la población total fue $11,0 \pm 2,9$ g/dL y se encontró anemia en el 71,7% de los casos. En Marewa el promedio de hemoglobina fue $11,6 \pm 2,6$ g/dL y el 52,2% de las personas tenía anemia. En Peraya la hemoglobina promedio fue $11,2 \pm 2,7$ g/dL y el 74,4% de los casos presentaba

anemia. La deficiencia de hierro y la baja saturación de transferrina también fueron frecuentes en las tres comunidades (28,0% y 22,2% respectivamente en Aroy, 34,5% y 31,4% en Marewa y 51,3% y 42,5% en Peraya). La ferritina sérica fue baja en el 6,0% de las personas de Aroy, en el 6,9% de Marewa y en 12,3% de Peraya. La deficiencia de folato sérico fue también parecida en Aroy y Marewa (6,0% y 6,9% respectivamente), mientras que en Peraya fue del 23,4%. La deficiencia de vitamina B₁₂ fue de 9,6% en la población de Aroy, 3,3% en Marewa y de nuevo fue mayor en Peraya con 13,4%.

En Aroy, no se hallaron diferencias estadísticas significativas en la frecuencia de anemia y déficit de nutrientes según los diferentes grupos etarios. En cambio en Marewa, las mujeres adultas tuvieron la mayor tasa de anemia y deficiencia de hierro (73,8% y 58,9% respectivamente) y las tasas más bajas se encontraron en los niños menores de 6 años (38,9% y 6,1%). Peraya fue el poblado con mayor frecuencia de anemia y deficiencia de hierro ($P < 0,05$) y aunque la frecuencia de anemia se distribuyó por igual en los diferentes grupos de edad, la deficiencia de hierro fue menor en el grupo más joven. El déficit de hierro y la baja saturación de transferrina fueron paralelos aunque esta última fue más frecuente. Cuando se comparan las deficiencias de folatos y vitamina B₁₂ en las distintas comunidades y grupos etarios no se hallaron diferencias estadísticas signi-

TABLA II
VALORES HEMATOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN DE AROY

EDAD Años	Hemo- globina g/dL	Valores Bajos %	Hierro Sérico g/dL	Valores Bajos %	Satur. de Transfe- rrina, %	Valores Bajos %	Ferritina Sérica µg/L	Valores Bajos %	Folato Sérico µg/L	Valores Bajos %	Vit. B ₁₂ Sérica mµg/L	Valores Bajos %
< 6	11,8±0,5 (4)*	25,0	70±0 (1)	0,0	20±0 (1)	0,0	-	-	7,3±6,0 (2)	0,0	380,0±0,0 (1)	0,0
6 - 11	10,7±1,8 (24)	66,7	60±21 (6)	66,6	18±5	50,0	54±35 (7)	0,0	13,4±9,6 (15)	0,0	331±198 (14)	14,2
12 - 17												
Hembras	9,0±4,2 (7)	57,1	64±26 (6)	33,3	20±7	33,3	57±44 (6)	16,6	11,0±4,0 (5)	0,0	316±89 (4)	0,0
Varones	11,3±1,3 (8)	62,5	66±21 (6)	16,6	22±9	0,0	69±8 (6)	0,0	9,4±8,7 (5)	20,0	248±74 (2)	0,0
≥ 18												
Hembras	10,5±2,0 (30)	76,7	77±32 (33)	27,2	23±8	21,2	63±37 (32)	3,1	7,7±3,8 (15)	13,3	392±256 (15)	13,3
Varones	12,2±3,7 (33)	83,3	83±29 (30)	23,3	27±9	20,0	94±96 (31)	9,7	8,5±5,6 (20)	15,0	459±227 (16)	6,2
Total	11,0±2,9 (106)	71,7	76±29 (82)	28,0	24±9	22,2	74±66 (82)	6,0	9,6±6,7 (62)	9,6	330±84 (52)	9,6

Los valores corresponden al X ± DE. Las cifras entre paréntesis representan el número de casos.

TABLA III
VALORES HEMATOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN DE MAREWA

EDAD Años	Hemo- globina g/dL	Valores Bajos %	Hierro Sérico g/dL	Valores Bajos %	Satur. de Transfe- rrina, %	Valores Bajos %	Ferritina Sérica µg/L	Valores Bajos %	Folato Sérico µg/L	Valores Bajos %	Vit. B ₁₂ Sérica mµg/L	Valores Bajos %
< 6	10,8±0,8 (54)*	38,9	47±17 (33)	6,1	45±20 (31)	32,2	45±20 (31)	6,4	11,4±6,0 (23)	0,0	429±171 (24)	0,0
6 - 11	11,3±0,9 (39)	56,4	56±21 (36)	41,7	42±29 (36)	27,8	42±29 (36)	11,1	9,9±6,6 (33)	6,0	373±177 (34)	2,9
12 - 17												
Hembras	11,3±0,7 (9)	0,0	66±5 (8)	37,5	43±28 (8)	37,5	43±28 (8)	12,5	5,1±2,4 (8)	25	343±131 (7)	14,3
Varones	12,3±1,0 (16)	68,7	58±23 (15)	33,3	41±21 (16)	33,3	41±21 (16)	18,8	8,2±7,8 (15)	20	328±180 (13)	7,7
≥ 18												
Hembras	11,0±1,2 (42)	73,8	59±24 (39)	58,9	57±38 (39)	48,7	57±38 (39)	2,6	9,3±5,1 (27)	7,4	377±182 (35)	5,7
Varones	13,5±5,0 (43)	48,8	82±35 (43)	27,9	74±41 (43)	16,3	74±41 (43)	2,3	5,3±3,6 (37)	24,3	479±256 (39)	0,0
Total	11,6±2,6 (203)	52,2	62±28 (174)	34,5	54±35 (173)	31,4	54±35 (173)	6,9	8,4±5,9 (143)	12,6	405±203 (152)	3,3

Los valores corresponden al X ± D.E. Las cifras entre paréntesis representan el número de casos.

TABLA IV
VALORES HEMATOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN DE PERAYA

EDAD Años	Hemo- globina g/dL	Valores Bajos %	Hierro Sérico g/dL	Valores Bajos %	Satur. de Transfe- rrina, %	Valores Bajos %	Ferritina Sérica µg/L	Valores Bajos %	Folato Sérico µg/L	Valores Bajos %	Vit. B ₁₂ Sérica mµg/L	Valores Bajos %
< 6	11,5±4,9 (20)	60,0	55±24 (15)	7,1	16±6 (14)	14,3	34±20 (14)	14,3	14,1±5,2 (12)	0,0	417±271 (12)	0,0
6 - 11	11,0±1,1 (25)	72,0	41±16 (23)	78,3	13±5 (23)	65,2	33±16 (24)	8,3	11,9±6,1 (22)	4,5	381±215 (21)	14,3
12 - 17												
Hembras	10,5±1,1 (3)	100,0	64±33 (3)	33,3	21±11 (3)	0,0	33±9 (3)	0,0	3,7±4,1 (3)	66,6	315±91 (3)	0,0
Varones	11,8±0,5 (4)	100,0	50±18 (4)	50,0	12±3 (4)	50,0	39±36 (4)	0,0	10,3±13,0 (4)	75,0	388±443 (4)	75,0
≥ 18												
Hembras	10,5±1,9 (21)	90,4	59±27 (20)	50,0	18±8 (20)	45,0	21±17 (20)	30	6,4±4,5 (19)	26,3	522±234 (15)	0,0
Varones	11,7±2,0 (17)	64,7	73±32 (16)	56,3 (9)	20±8 (16)	37,5	56±21 (16)	0,0	4,0±4,4 (17)	41,2	428±260 (12)	25,0
Total	11,2±2,7 (90)	74,4	54±26 (80)	51,3	16±7 (80)	42,5	35±21 (81)	12,3	9,1±6,5 (77)	23,4	417±253 (67)	13,4 (9)

Los valores corresponden al X ± DE. Las cifras entre paréntesis corresponden al número de casos.

TABLA V
CORRELACIÓN DE LOS VALORES DE HEMOGLOBINA CON PARÁMETROS SÉRICOS DE HIERRO EN TRES COMUNIDADES YUCA

PARÁMETROS DE HIERRO	AROY		MAREWA		PERAYA	
	r	P	r	P	r	P
Hierro	0,16	< 0,001	0,27	< 0,001	0,34	< 0,001
Saturación de Transferrina	0,25	< 0,001	0,31	< 0,001	0,43	< 0,001
Capacidad de saturación de Transferrina	-0,19	< 0,05	-0,17	< 0,01	-0,24	< 0,05
Ferritina	0,30	< 0,001	0,27	< 0,001	0,42	< 0,001

TABLA VI
ANEMIA Y DÉFICIT DE NUTRIENTES EN TRES COMUNIDADES YUCA

COMUN.	ANEMIA Nº de Casos	ANEMIA SOLA %	ANEMIA Y DEFICIENCIA DE HIERRO, %	ANEMIA Y DEFICIENCIA COMBINADA DE NUTRIENTES, %
Aroy	57	59,6	29,8	10,6
Marewa	97	44,3	51,6	4,1
Peraya	56	42,8	26,8	30,4
Total	210	48,1	39,0	12,9

ficativas, con la excepción de Peraya, donde los grupos infantiles y los adolescentes varones tenían menor déficit de ácido fólico. La mayor deficiencia de vitamina B₁₂ hallada en Peraya fue en el grupo de adolescentes masculinos en quienes alcanzó el 75% (P < 0,05).

Los valores de hemoglobina y hematocrito mostraron una correlación positiva y significativa con los valores de hierro sérico (p < 0,001), saturación de transferrina (p < 0,01) y ferritina sérica (p < 0,001) y una correlación negativa con la capacidad de saturación de la transferrina (p < 0,05) (Tabla V). El hierro sérico mostró una correlación positiva y significativa con el índice de satura-

ción de transferrina y con la ferritina sérica (p < 0,05).

La Tabla VI muestra la frecuencia de déficit de nutrientes necesarios para la hematopoyesis, en 210 personas anémicas provenientes de las tres poblaciones de estudio. En el 48,1% de los anémicos, no se encontró ninguna deficiencia de nutrientes; en el 39% se halló deficiencia de hierro sérico aislada o combinada con baja saturación de transferrina y/o de ferritina. La deficiencia única de folato o combinada con déficit de vitamina B₁₂ solo se encontró en el 12,9% de los individuos, sin embargo en los casos de Peraya, esta asociación se encontró en el 30,4% de los casos.

DISCUSIÓN

Los resultados muestran una alta frecuencia de anemia entre los indígenas de tres comunidades yucpa habitantes del occidente de Venezuela. En el 52,9% de los casos, la anemia fue de origen nutricional, principalmente por deficiencia aislada de hierro o combinada con déficit de folato y/o vitamina B₁₂. Igualmente, en cerca de la mitad de los individuos, los glóbulos rojos tenían un aspecto normocítico e hipocrómico lo que aunado a la CHCM, sugiere una deficiencia de hierro. Estos resultados eran de esperarse dada la pobreza alimentaria que existe en las poblaciones estudiadas donde hay muy pocas fuentes de hierro hemínico o alimentos de origen animal. Una posible explicación de la alta proporción de anemia sin causa nutricional demostrable pudiera ser la alta prevalencia de enfermedades crónicas en la población, representadas por infecciones de piel, respiratorias y parasitarias. Esto coincide con niveles normales de ferritina sérica en la mayoría de los individuos, en contraste con el alto déficit de hierro sérico y la baja saturación de transferrina. Los niveles de ferritina sérica en condiciones normales son un buen reflejo del estado del hierro de reserva, pero por ser una proteína reactiva, puede aumentar su concentración plasmática como resultado de un catabolismo celular acelerado v.g. durante episodios febriles, malignidades, y trastornos inflamatorios crónicos. En 1979 hubo una

epidemia de hepatitis B que afectó todos los poblados yucpa y el virus se pudo detectar en el suero del 76% de los 2260 indios examinados; además, se encontró una alta prevalencia de virus Delta (9) y aunque ha habido una campaña activa de vacunación, muchos indígenas mayores de 15 años han sido infectados con el virus de la hepatitis B. El estudio de Blitz y col. en 1994 (10), demostró hepatitis B activa en el 4% de la misma población. La presencia de hepatitis y la alta frecuencia de otras infecciones entre los indígenas, pueden ser la explicación de la poca deficiencia de ferritina encontrada y es muy posible que los niveles normales o elevados hallados en el suero, no se correspondan con la verdadera reserva de hierro del individuo.

Los estudios realizados en comunidades Barí, también habitantes de la Sierra de Perijá, mostraron también una alta prevalencia de anemia (2). Sin embargo, los Barís de la población de Campo Rosario tenían un alto déficit de ácido fólico y vitamina B₁₂ (91,0% y 64,4% respectivamente), mientras que entre los yucpas, con la excepción de los habitantes de Peraya donde el 23,45% era deficiente de folatos y el 13,4% de vitamina B₁₂, la carencia de estas vitaminas era muy moderada. Es necesario señalar que los individuos de Peraya, a pesar de vivir a muy corta distancia de la misión del Tukuko y de contar con agua y letrinas ventiladas, presentaban peores condiciones de salud e higiene que los otros grupos estudiados.

A pesar de que en Venezuela todavía existen diversas etnias indígenas puras, solo hay tres publicaciones sobre sus condiciones nutricionales, dos corresponden a los indios bari (2,11) a través de las cuales se puede apreciar que a pesar de haber transcurrido más de tres décadas desde el primer estudio, la prevalencia de anemia continua en las cercanías del 50%, habiéndose demostrado la existencia de infecciones crónicas en la mayoría de la población, con una alta frecuencia de déficit de hierro, ácido fólico y vitamina B₁₂. Por otra parte Wilbert y col. en 1980 (1) mostraron los resultados obtenidos en los indios Warao, habitantes del Delta del Orinoco. En este trabajo hallaron que los niños de 7 a 14 años tenían una prevalencia de anemia del 60% y entre las mujeres en edad fértil era del 57%.

Es difícil comparar los presentes hallazgos con lo encontrado en otras poblaciones indígenas latinoamericanas, puesto que la mayoría de los estudios biológicos realizados en indios, se refiere a las variaciones genéticas de los alelos de los grupos sanguíneos y otros indicadores genéticos. En la revisión de la literatura desde 1970 a 1997 solo se encontró un trabajo de Franco y col (12), sobre los indios Mapuche del sur de Chile. Ese estudio mostró una prevalencia de 38% de deficiencia de hierro en niños de 8 a 15 meses de edad que habían sido destetados a los 4 meses y medio y alimentados de ahí en adelante con leche de vaca y alimentos sólidos en contraste con otros que fueron amamantados has-

ta los 6 meses en quienes solo se encontró un 4,5% de déficit de hierro.

De acuerdo a los hallazgos presentes, la prevalencia de anemia entre los indios Yucpa de las poblaciones de Aroy, Marewa y Peraya, varió entre 52,2 y 74,4%. La principal causa de anemia fue deficiencia de hierro seguida de los procesos infecciosos representados por afecciones respiratorias, dermatitis, parasitosis y hepatitis. El hecho de que la prevalencia de anemia entre los indios de las montañas de Perijá es aun mayor que hace tres décadas, indica una falta de interés por el bienestar y conservación de las tribus aborígenes venezolanas.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por CONDES.LUZ, CONICIT. Venezuela y Fundación Zumaque (PDVSA), instituciones a las cuales los autores expresan su agradecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WILBERT J., LAYRISSE M., LAYRISSE Z.: Demographic and biological studies of the Warao Indians. University of California. Los Angeles. Latin American Center Publications. 1980; 160-169.
2. DIEZ-EWALD M., TORRES E., LAYRISSE M., VIZCAÍNO G., ARTEAGA-VIZCAÍNO M.: Prevalence of anemia, iron, folic acid and vitamin B₁₂ deficiency in

- two Bari indian communities from western Venezuela. *Invest Clin* 1997; 191:191- 201.
3. DE VEGAMIAN P. F. M.: Diccionario ilustrado yucpa-español-español-yucpa. Guarenas. Ed. Formatica C.A. Venezuela. 1978.
 4. OFICINA CENTRAL DE ESTADÍSTICA E INFORMÁTICA (OCEI). XII Censo de Población de Venezuela. Tiempo de Resultados. 1992.
 5. CROSBY W.H., MUNN J.L., FURTH E.W.: Standardizing a method for clinical hemoglobinometry. *U.S. Armed Forces Med J* 1954; 5:693-703.
 6. INTERNATIONAL COMMITTEE FOR STANDARDIZATION IN HEMATOLOGY. The measurement of total and saturated iron binding capacity in serum. *Brit J Haemat* 1978; 38:291-294.
 7. FLOWERS C.A., KIUZON M., BEARD J.L., SKILENE B.S., COVELL A.M., COOK J.: A serum ferritin assay for prevalence studies of iron deficiency. *Am J Hemat* 1986; 23:141-151.
 8. SECOND NATIONAL HEALTH AND NUTRITION EXAMINATION SURVEY, 1976-1980. Bethesda Md. Life Sciences Research Office, Federation of American Societies of Experimental Biology. 1984.
 9. HADLER S.C., MONZÓN M.A., PONZETTO A., ANZOLA E., RIVERO D., ONDOLFI A., BRACHO A., FRANCIS D., GERBER M., THUNG S., GERIN J., MAYNARD J., POPPER H., PURCEL R.: Delta virus infection and severe hepatitis. An epidemic in the yucpa indians. *Ann Inter Med* 1984; 100:330-344.
 10. BLITZ-DORFMAN L., MONSALVE F., ALCALÁ-MONZÓN M., FAVOROF M., PUJOL F.: Epidemiología de hepatitis virales en amerindios yukpas de Venezuela. En: Estado de Salud Indígena. R. Holmes Y T. Velásquez (Ed). Fundación Zumaque. Venezuela. 1994;105-109.
 11. PONS A.R., DE VILLAMAÑÁN A., NÚÑEZ-MONTIEL A., PÉREZ B., DE VALDEMORILLA E., DE GUSENDOS E., VARGAS G.: Los Motilonos. Aspectos médico-sociales. *Kasmera* 1962; 1:11-69.
 12. FRANCO E., HERTRAMPF E., RODRÍGUEZ E., ILLANES J.C., PALACIO L., LLAGUNO S., LETTELIER A.: Nutrición de hierro en lactantes mapuches alimentados con leche materna (2ª etapa). *Rev Chil Pediat* 1990; 61:248-252.

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 amplifican 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 minutos, 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 Weatherall 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.

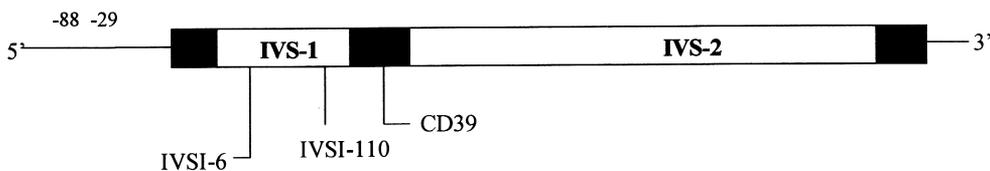


Fig. 1. Esquema representativo del Gen beta globina donde se señalan las mutaciones más frecuentes encontradas mediante la ARMS-PCR.

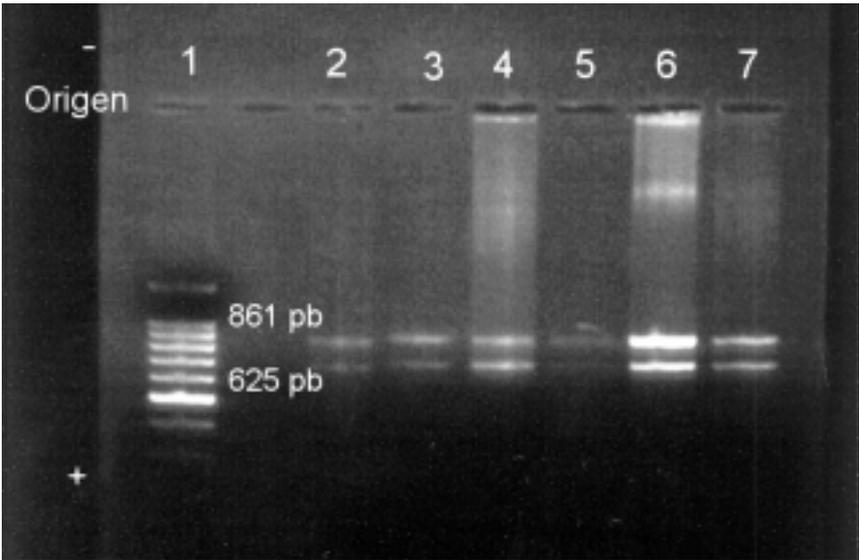


Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa, donde se demuestra la presencia de la mutación -29. A nivel de 861 pb se observa la banda control interno y a nivel de 625 se observa la banda mutante. Línea 1: Marcador de peso molecular. Línea 2-7: Pacientes en estudio.

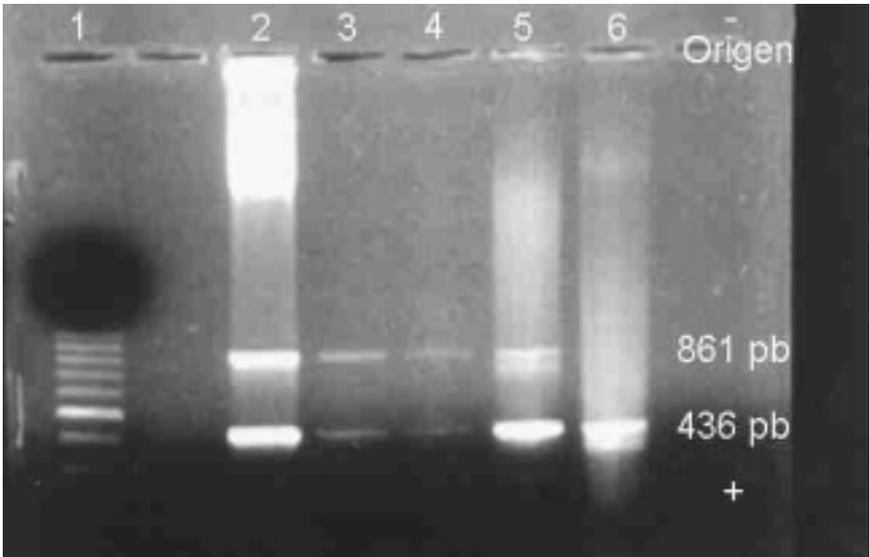


Fig 3. Electroforesis en gel de agarosa, donde se demuestra la presencia de la mutación CD 39. A nivel de 861 pb se observa la banda control interno y a nivel de 436 pb se observa la banda mutante. Línea 1: Marcador de peso molecular. Líneas 2-6: Pacientes en estudio.

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 cyprriot 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 aprosch to Thalassaemia. *Brist J Hematol* 1990;76:269-274.
4. BAYSAL E & HUISMAN T. H. J.: Detection of common deletional - Thalassemia- 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 sequece 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 Thal-

- 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.