

---

# TESIS DOCTORAL

---

**Prevalencia de ferropenia en  
adolescentes sanos almerienses.  
Utilidad diagnóstica del receptor sérico  
de la transferrina y el contenido de  
hemoglobina reticulocitaria**



UNIVERSIDAD  
DE ALMERÍA

**María de las Mercedes Ibáñez Alcalde**

*Diciembre 2021*

PROGRAMA DE DOCTORADO EN  
SALUD, PSICOLOGÍA Y  
PSIQUIATRÍA



LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

**MARÍA DE LAS MERCEDES IBÁÑEZ ALCALDE**

**TESIS DOCTORAL:**

Prevalencia de ferropenia en adolescentes sanos almerienses.  
Utilidad diagnóstica del receptor sérico de la transferrina y el  
contenido de hemoglobina reticulocitaria

**DOCTORAL THESIS:**

Prevalence of iron deficiency in healthy adolescents from  
Almería. Diagnostic usefulness of serum transferrin receptor and  
reticulocyte hemoglobin content.

**Directores:**

Dr. Tesifón Parrón Carreño  
Dra. María Ángeles Vázquez López  
Dr. Antonio Bonillo Perales



*A mi padre,  
por los momentos que me  
hubiera gustado compartir*

*“Una sociedad que aísla a sus jóvenes, corta sus amarras: está condenada a desangrarse.”*

Kofi Annan

*“El papel político-social de la juventud para el perfeccionamiento de la comunidad es esencial porque la juventud es, precisamente, la edad del inconformismo, de la exigencia de perfección, del hambre y de la sed de justicia.”*

José Luis López Aranguren

*“Hierva la sangre juvenil, se exalta lleno de aliento el corazón, y audaz el loco pensamiento sueña y cree que el hombre es, cual los dioses, inmortal.”*

Rosalía De Castro

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer su colaboración a todas las personas que de alguna forma han contribuido al desarrollo de este trabajo.

Gracias a los chicos y chicas que accedieron a participar altruistamente en él, y a sus familiares, sin ellos la investigación científica no sería posible.

Gracias a la Dra. María Ángeles Vázquez, la verdadera artífice y alma de este proyecto, por confiar en mí, de lo cual me siento honrada, y por contagiar a los que estamos a su alrededor de su espíritu incansable, su dedicación y su inmenso conocimiento. Ella me ha impulsado, y de ella he aprendido enormemente de aspectos científicos, pero también humanos, de mi profesión.

Gracias a los Dres. Tesifón Parrón y Antonio Bonillo por su apoyo, sus aportaciones y por haber facilitado que esta investigación fuera llevada a cabo y haya dado sus frutos.

Gracias a los pediatras, enfermeros, personal de laboratorio, y resto de profesionales que han intervenido en la recogida de datos, la extracción de las muestras y su procesamiento. Muchas personas con su trabajo han hecho posible este proyecto.

Gracias a mi familia. A mi madre, por ser mi ejemplo y mi guía, y por prestarme su tiempo y apoyo cuando lo he necesitado. A mi hermano, por poner una nota de humor en el momento oportuno. A mi marido, por su paciencia y su apoyo incondicional en las largas horas de trabajo, y por ayudarme a mantener la perspectiva cuando me he desanimado. Y a mi hija Lucía, por dar luz y alegría a todos nuestros días.

A todos, muchas gracias.



# ÍNDICE

---

<i>Abreviaturas</i> .....	11
<i>Resumen</i> .....	13
<i>Capítulo I. Introducción</i> .....	18
<b>Ia. EL DÉFICIT DE HIERRO EN LA ADOLESCENCIA</b> .....	19
<b>1. Metabolismo del hierro y factores de riesgo de ferropenia</b> .....	20
1.1. Metabolismo del hierro .....	20
1.2. Características del metabolismo férrico durante el desarrollo .....	29
1.3. Factores de riesgo de ferropenia .....	31
<b>2. Implicaciones del déficit de hierro en la adolescencia</b> .....	36
<b>3. Diagnóstico de carencia de hierro</b> .....	40
3.1. Parámetros diagnósticos .....	42
3.2. Criterios diagnósticos de ferropenia .....	52
<b>4. Epidemiología del déficit de hierro en la adolescencia</b> .....	54
4.1. Prevalencia a nivel mundial .....	54
4.2. Prevalencia en países industrializados .....	57
4.3. Prevalencia en España .....	59
<b>Ib. NUEVOS PARÁMETROS ANALÍTICOS</b> .....	60
<b>1. Contenido de hemoglobina reticulocitaria</b> .....	61
1.1. Características y regulación .....	61
1.2. Utilidad clínica .....	63
1.3. Limitaciones .....	66
1.4. Valores de referencia .....	67
<b>2. Receptor sérico de la transferrina</b> .....	69
2.1. Características y regulación .....	69
2.2. Utilidad clínica .....	72
2.3. Limitaciones .....	75
2.4. Valores de referencia .....	77
<b>3. Índice Receptor sérico de la transferrina-Ferritina</b> .....	81
3.1. Concepto y utilidad clínica .....	81
3.2. Valores de referencia .....	83
<i>Capítulo II. Bibliografía</i> .....	86



<b>Capítulo III. Justificación, hipótesis, objetivos y metodología</b> .....	106
<b>IIIa. Justificación</b> .....	107
<b>IIIb. Hipótesis</b> .....	109
<b>IIIc. Objetivos</b> .....	110
<b>IIId. Metodología</b> .....	111
<b>Capítulo IV. Memoria de trabajos</b> .....	115
<b>IVa. Valores de referencia del receptor soluble de la transferrina y del índice RsTf-F en adolescentes</b> .....	116
PUBLICACIÓN 1. <i>Reference values of serum Transferrin Receptor and sTfR/log ferritin Index in healthy adolescents.</i> ....	118
<b>IVb. Valores de referencia del contenido de hemoglobina reticulocitaria en adolescentes</b> .....	126
PUBLICACIÓN 2. <i>Reference values of Reticulocyte hemoglobin content in healthy adolescents.</i> .....	127
<b>IVc. Utilidad clínica de RsTf, índice RsTf-F y CHR</b> .....	134
PUBLICACIÓN 3. <i>The usefulness of reticulocyte hemoglobin content, serum transferrin receptor and the sTfR-ferritin index to discriminate iron deficiency in healthy children aged 1-16 years.</i> .....	135
<b>IVd. Prevalencia de déficit de hierro y factores relacionados en adolescentes españoles</b> .....	145
PUBLICACIÓN 4. <i>Prevalence of iron deficiency and related factors in Spanish adolescents</i> .....	146
<b>Capítulo V. Conclusiones</b> .....	157
<b>Capítulo VI. Anexos</b> .....	161
Anexo I. Hoja de consentimiento informado .....	162
Anexo II. Hoja de recogida de datos.....	164



# ABREVIATURAS

---

ADE	Amplitud de distribución eritrocitaria
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEP	Asociación Española de Pediatría
AUC	Área bajo la curva ROC
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
CHCMr	Concentración corpuscular media de hemoglobina reticulocitaria
CHr	Contenido de hemoglobina reticulocitaria
CTFH	Capacidad total de fijación del hierro
UCI	Unidad de Cuidados Intesivos
DALY	<i>Disability Adjusted Life Years</i>
Dcytb	Citocromo B duodenal
dl	Decilitro
DMT1	<i>Divalent metal cation transporter 1</i>
DS	Desviación estándar
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EPO	Eritropoyetina
ESPGHAN	<i>European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition</i>
fl	Femtolitros
Fpn	Ferroportina
g	Gramo
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HIF	<i>Hypoxia-inducible factors</i>
HIF-2	<i>Hypoxia-inducible factor-2</i>
Hto	Hematocrito
IC95%	Intervalo de confianza al 95%
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1	Interleuquina 1
IL-2	Interleuquina 2
IL-6	Interleuquina 6
IPR	Índice de producción reticulocitaria
IRF	Fracción de reticulocitos inmaduros
IST	Índice de saturación de la transferrina
Kg	Kilogramo
L	Litro
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrometro

OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Proteína C reactiva
PE	Protoporfirina eritrocitaria
PEL	Protoporfirina eritrocitaria libre
pg	Picogramo
rHu-EPO	Eritropoyetina recombinante humana
RsTf	Receptor sérico de la transferrina
RsTf-F	Índice receptor sérico de la transferrina-ferritina
RTf	Receptor de la transferrina
RTf1	Receptor de la transferrina 1
RTf2	Receptor de la transferrina 2
SNC	Sistema Nervioso Central
SRE	Sistema Retículo Endotelial
TIBC	<i>Total iron binding capacity</i>
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
VCM	Volumen corpuscular medio
VCMr	Volumen reticulocitario
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
Zn	Zinc
ZPP	Protoporfirina-Zinc

# RESUMEN

---

La deficiencia de hierro es la carencia nutricional más frecuente en adolescentes de los países desarrollados, y la anemia ferropénica constituye una de las causas más frecuentes de años vividos con discapacidad en la infancia y la adolescencia a nivel mundial. La adolescencia se considera un periodo de alta susceptibilidad de ferropenia, debido al crecimiento acelerado, la expansión del volumen sanguíneo, el incremento de la masa muscular en los varones y las pérdidas menstruales en las adolescentes; los cuales, frecuentemente, a esta edad no son adecuadamente compensados con un aporte férrico suficiente en la dieta.

El déficit de hierro conlleva consecuencias deletéreas sobre la capacidad física y el desarrollo cognitivo en adolescentes y adultos, y éstos se producen incluso previamente al desarrollo de la anemia. Por ello, es primordial detectar los estados deficitarios de hierro en estadios precoces también en la población adolescente, así como estimar su magnitud, con el fin de optimizar las intervenciones destinadas a su corrección y prevención. En los últimos años se han desarrollado nuevos parámetros diagnósticos que permiten detectar la depleción férrica en momentos tempranos, y que están menos influidos por circunstancias externas al contenido de hierro corporal, como las situaciones de inflamación. Estos parámetros son, entre otros, el RsTf, el índice RsTf-F y el CHr. Sin embargo, sus valores de referencia en los adolescentes aún se encuentran en estudio.

En este contexto, esta Tesis Doctoral presenta como objetivos establecer unos valores de referencia adecuados para los tres parámetros mencionados en adolescentes de nuestro medio, estimar la prevalencia de déficit de hierro en base a ellos y evaluar la posible influencia de factores demográficos, antropométricos, nutricionales y socioeconómicos.

Para ello se ha llevado a cabo un estudio observacional transversal en el que se incluyeron 405 sujetos entre 12 y 16 años de la ciudad de Almería (España), seleccionados por muestreo probabilístico polietápico. Se realizó una exploración física completa con medidas antropométricas, se extrajo una analítica sanguínea mediante venopunción y se realizó un cuestionario a los padres o tutores y adolescentes sobre aspectos socioeconómicos familiares y hábitos nutricionales.

En primer lugar, se determinaron los valores normales del CHr, el RsTf y el índice RsTf-F en los adolescentes sanos no ferropénicos, y se analizaron las diferencias según el sexo, la edad y el estado puberal.

En base a la definición clásica de déficit de hierro, se calcularon las AUC para los tres parámetros, que se estimaron en 0.68 para el CHr (IC95% 0.61-0.74), 0.87 para el RsTf (IC95% 0.82-0.92) y 0.97 en el caso del índice RsTf-F (IC95% 0.95-0.99).

Seguidamente, se establecieron los puntos de máxima discriminación diagnóstica para el diagnóstico de ferropenia, que fueron de  $< 28.5$  pg para el CHr;  $> 1.95$  mg/L y  $> 1.75$  mg/L para el RsTf en chicos y chicas respectivamente; y  $> 1.5$  en chicos y  $> 1.4$  en chicas para el índice RsTf-F. En base a estos resultados, se ha propuesto una nueva definición de ferropenia que emplea estos parámetros en lugar de los clásicos, con las ventajas que éstos aportan.

Por último, se determinó la prevalencia de ferropenia en la población de estudio empleando estas nuevas herramientas, que fue del 13.3%, con una prevalencia de anemia ferropénica del 1.2%. Se detectaron como factores de riesgo independientes la pertenencia a una familia de origen inmigrante y el consumo de una dieta pobre en hierro, con una ingesta de carne menos de 4 veces a la semana y de pescado menos de dos veces semanales.

En este trabajo se ha estimado el impacto que presenta el déficit de hierro en la población adolescente de nuestro medio, además de demostrar que el CHr, el RsTf y el índice RsTf-F son parámetros útiles para discriminar el déficit de hierro en adolescentes, con o sin anemia, estableciendo unos valores *cut-off* específicos según la edad y el sexo, y proporcionando una nueva definición de ferropenia con un alto poder discriminatorio.

# ABSTRACT

---

Iron deficiency is the most extensive nutritional deficiency among adolescents in developed countries, and iron deficiency anemia constitutes one of the most important causes of years lived with disability in childhood and adolescence throughout the world. Adolescence is considered a period of increased risk of iron deficiency, due to accelerated growth, rise of blood volume, greater muscle mass in males and menstrual blood loss in girls; which, frequently, are not adequately compensated due to unbalanced low iron-diets.

Iron deficiency may lead to cognitive dysfunction and physical performance impairment in adolescents and adults, even when iron deficiency has not progressed enough to cause anemia. Therefore, it is essential to detect iron deficiency in early stages in adolescent population, as well as to estimate its magnitude, in order to optimize the interventions aimed to its correction and prevention. In recent decades, new diagnostic parameters with proven utility in the early detection of iron deficiency have been incorporated, which are unaffected by circumstances external to the body's iron content, such as systemic inflammation. These parameters are, among others, serum transferrin receptor (sTfR), serum transferrin-ferritin (sTfR-F) index and reticulocyte haemoglobin content (CHr). However, the reference values of these parameters in adolescents are still under investigation.

Accordingly, the aims of this Doctoral Thesis are to establish appropriate reference values for the three parameters mentioned above in healthy adolescents, to estimate the prevalence of iron deficiency by reference to them, and to evaluate the possible influence of demographic, anthropometric, socioeconomic and nutritional factors.

A cross-sectional observational study was conducted on a population-based representative sample for teenagers in Almería (Spain), of 405 subjects aged 12 to 16 years, selected by the probability sampling method. All subjects underwent a complete physical examination with anthropometric measurements, a blood test was obtained by venipuncture, and the parents or guardians and the adolescents were requested to complete a questionnaire regarding family socioeconomic aspects and dietary habits.

Firstly, reference ranges for CHr, RsTf, and RsTf-F index were determined in healthy non-iron-deficient adolescents, and differences according to sex, age, and pubertal status were analyzed.

Based on the classic definition of iron deficiency, areas under the curve (AUC) were calculated for the three parameters. They were 0.68 (CI95% 0.61–0.74), 0.87 (CI95% 0.82–0.92) and 0.97 (CI95% 0.95–0.99) for CHr, sTfR and sTfR-F index respectively. The following cut-off points defined iron deficiency: CHr < 28.5 pg, sTfR > 1.75 mg/L in girls and > 1.95 mg/L in boys, and sTfR-F Index > 1.4 in girls and > 1.5 in boys.

Based on these findings, a new definition of iron deficiency has been proposed, built on these parameters instead of the classic ones, with the advantages that they provide.

Finally, the prevalence of iron deficiency in the study population was determined based on this new definition, and it was estimated in 13.3%, with a prevalence of iron deficiency anemia of 1.2%. Being part of an immigrant family, a low iron bioavailability diet, meat consumption below four times a week and fish consumption below twice a week, were independent risk factors for iron deficiency.

This study provides an estimation of the impact of iron deficiency in the adolescent population of Almería. CHr, sTfR and sTfR-F index have proven to be useful parameters to discriminate iron deficiency in adolescents, with or without anemia, and specific cut-off values according to age and sex have been established, providing a new definition of iron deficiency with a high discriminatory power.





***CAPÍTULO I:***  
***INTRODUCCIÓN***

---

## Ia. EL DÉFICIT DE HIERRO EN LA ADOLESCENCIA

---

La deficiencia de hierro es la carencia nutricional más frecuente en adolescentes de los países desarrollados<sup>1-3</sup>, y es una de las principales causas de morbilidad en los mismos<sup>4</sup>. Además, la anemia ferropénica constituye una de las causas más frecuentes de años vividos con discapacidad en la infancia y la adolescencia a nivel mundial<sup>5</sup>. La adolescencia se considera un periodo de alta susceptibilidad de ferropenia, debido a los cambios fisiológicos que conducen a un aumento de las necesidades de hierro<sup>6</sup>. Los factores más comúnmente implicados son el crecimiento acelerado, la expansión del volumen sanguíneo, el incremento de la masa muscular en los varones y las pérdidas menstruales en las adolescentes<sup>7-9</sup>; los cuales, frecuentemente, a esta edad no son adecuadamente compensados con un aporte férrico suficiente en la dieta<sup>10-11</sup>.

Diversos estudios han evidenciado consecuencias deletéreas del déficit de hierro sobre la morbilidad infantil, principalmente sobre el neurodesarrollo, tanto a corto como a largo plazo<sup>12-18</sup>; el sistema inmunológico<sup>19-21</sup>, y estados protrombóticos<sup>22,23</sup>. Sin embargo, también se han detectado efectos nocivos sobre la capacidad física y el desarrollo cognitivo en adolescentes y adultos<sup>24-26</sup>, y éstos se producen incluso previamente al desarrollo de la anemia<sup>26-28</sup>. Por ello, es primordial detectar los estados deficitarios de hierro en estadios precoces también en la población adolescente, así como estimar su magnitud, con el fin de optimizar las intervenciones destinadas a su corrección y prevención.

Para profundizar en el conocimiento y la aplicabilidad clínica de los métodos diagnósticos de ferropenia, en primer lugar, es necesario ahondar en conceptos íntimamente relacionados, como son el metabolismo del hierro, sus peculiaridades y los cambios que sufre durante la infancia y la adolescencia, así como los factores que intervienen en su homeostasis.

# 1. METABOLISMO DEL HIERRO Y FACTORES DE RIESGO DE FERROPENIA

## 1.1. METABOLISMO DEL HIERRO

El hierro es un elemento traza esencial para la vida. Se une a proteínas que realizan y regulan diversas funciones biológicas, como el transporte de oxígeno a través del organismo, la transferencia de electrones en la cadena respiratoria, la transcripción en la síntesis y reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN) o la señalización intracelular, y participa en reacciones enzimáticas catabólicas y de biosíntesis<sup>29</sup>. Durante la ejecución de sus labores biológicas, dona y recibe electrones con facilidad, cambiando de estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ) a férrico ( $Fe^{3+}$ ) y viceversa. En estado férrico presenta gran capacidad oxidativa, y si persistiera de forma libre, podría producir reacciones enzimáticas que liberarían radicales libres con capacidad de dañar las membranas lipídicas, proteínas y el ADN, por lo que se encuentra ligado a proteínas y grupos prostéticos en el organismo. Un adulto humano de complejión media contiene 3-5 gramos de hierro en su interior. La mayoría se encuentra en forma de hemoglobina eritrocitaria (60%), otra parte como mioglobina en el músculo (10%), y una pequeña tercera parte contenida en todas las células para el metabolismo tisular (citocromos, etc.)<sup>30,31</sup>. Estos tres estamentos constituirían el denominado compartimento funcional del hierro, en el cual éste se encuentra cumpliendo sus funciones biológicas. El compartimento del hierro circulante haría referencia al hierro unido a la transferrina, que es la proteína que realiza el transporte de hierro en los líquidos tisulares, que es aproximadamente el 1%<sup>32</sup>. Por último, tendríamos el compartimento de depósito, que sería el segundo en cuantía (20-25%). El hierro se encuentra en éste en forma de ferritina y hemosiderina en los hepatocitos y el sistema retículo endotelial (SRE) (Tabla I).

Compartimento funcional	Compartimento depósito (20-25%)	Compartimento hierro circulante (1%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Hb eritrocitaria (60%)</li> <li>•Mioglobina músculo (10%)</li> <li>•Intracelular procesos metabólicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ferritina y hemosiderina (Hepatocitos y SRE)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Transferrina</li> </ul>

Tabla I. Compartimentos del hierro corporal.

Diariamente se produce una pérdida de 1-2 mg de hierro a través de la descamación de las células epiteliales cutáneas y el recambio de las células de la mucosa intestinal, la excreción de sudor y las pérdidas sanguíneas<sup>33,34</sup>. Igualmente, se absorben 1-2 mg de hierro diariamente en el duodeno y yeyuno proximal. Sin embargo, únicamente para la síntesis de hemoglobina se requieren 20-25 mg de hierro al día, por lo que existe un mecanismo de reciclaje y reutilización del hierro corporal en un equilibrio dinámico que requiere una regulación precisa<sup>30,33</sup>.

### **Absorción intestinal de hierro**

Tras el nacimiento el aporte de hierro al organismo se realiza exclusivamente a través de la dieta, excluida la administración terapéutica. A pesar de que el hierro es uno de los elementos más abundantes geológicamente, no es infrecuente que los seres vivos no obtengan el necesario para sus funciones biológicas y presenten estados deficitarios en hierro. Esto se atribuye a que es un elemento poco soluble en las formas en las que habitualmente se haya en la naturaleza. El hierro se encuentra en los alimentos en dos formas químicas conocidas como hierro hemo, contenido en productos de origen animal, y hierro no hemo, que está presente en una gran cantidad de alimentos tanto de origen vegetal como animal, y es la forma predominante en los primeros.

El hierro denominado **hemo** está rodeado de un anillo de porfirina que facilita su absorción intestinal independientemente del contenido de la dieta, y aunque el mecanismo molecular exacto no es bien conocido, se presume que es transportado directamente desde la luz intestinal al interior del enterocito, donde se libera a través de la acción de oxigenasas citosólicas. Este mecanismo de absorción del hierro hemo es más eficiente y no depende de las sustancias contenidas en la luz intestinal. Se estima que, aunque sólo el 10-15% del contenido de hierro de la dieta se encuentra en forma de hierro hemo, esta mayor eficiencia en su absorción (15-35%)<sup>35</sup> condicionaría que constituyera aproximadamente el 40% del hierro biodisponible tras la ingesta<sup>36</sup>.

El hierro **no hemo** puede encontrarse en la luz intestinal en dos estados iónicos, ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), o férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ); pero sólo es absorbible si se encuentra en estado ferroso. El pH ácido generado por las secreciones gástricas permite a una enzima reductasa denominada citocromo B duodenal (Dcytb por sus siglas en inglés), que se encuentra en el borde en cepillo de los enterocitos duodenales, pasar el hierro férrico no absorbible a estado ferroso<sup>37</sup>, y una proteína transportadora situada en la membrana apical del

enterocito, denominada *divalent metal cation transporter 1* (DMT1), es el principal transportador del hierro al interior de la célula<sup>38,39</sup>. Figura 1.

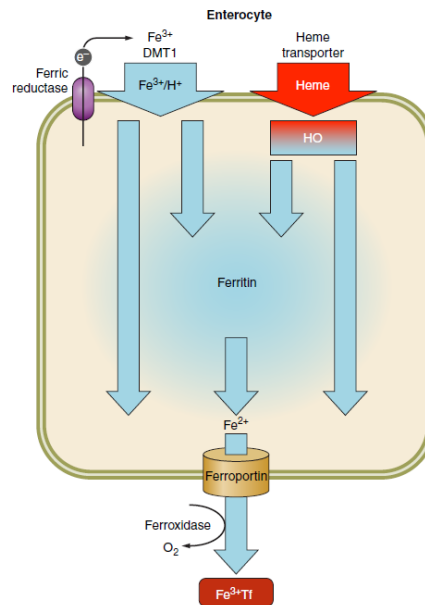


Figura 1. Transporte de hierro a través del enterocito.

Tomado de Ganz T. *Systemic Iron Homeostasis. Physiol Rev* 2013<sup>33</sup>.

Sin embargo, este mecanismo de absorción del hierro no hemo, además de depender del pH de la luz intestinal, puede ser interferido por otras sustancias presentes en la dieta, como los fitatos, polifenoles, ácido oxálico, proteína de soja, etc. de los vegetales, y también algunas proteínas animales como la caseína y proteínas del suero de la leche de vaca o la clara de huevo. Además, el calcio puede bloquear la absorción del hierro tanto hemo como no hemo<sup>35,36</sup>.

Por otra parte, el ácido ascórbico (vitamina C), es un favorecedor de la absorción del hierro, ya que se une al hierro en estado férrico reduciéndolo a ferroso y actúa como quelante, de forma que evita el efecto negativo de los mencionados componentes de la dieta y lo mantiene soluble en el ambiente alcalino del duodeno<sup>36,38</sup>. Además, la adición de carne roja, pescado o carne de ave a la dieta mejora la absorción del hierro no hemo, independientemente del contenido en fitatos y ácido ascórbico, posiblemente por el efecto combinado de los distintos péptidos, aminoácidos y proteínas contenidos en las fibras musculares<sup>35,40</sup>.

Todos estos factores que influyen la absorción del hierro no hemo, condicionan que la cantidad que aporta la dieta sea muy variable (2-20%), y que cuando ésta está constituida exclusivamente por vegetales, su absorción sea más limitada (5-12%)<sup>33</sup>.

### Depósito y transporte del hierro

Una vez en el interior del enterocito, el hierro puede unirse a la apoferritina, que es una proteína con actividad catalítica intrínseca que oxida el hierro ferroso a su forma férrica, almacenándolo y conformando ambos la molécula **ferritina**. La ferritina es una proteína con forma de esfera ahuecada especializada en el depósito de hierro, en cuyo interior se encuentra el hierro férrico formando un cristal denominado ferrihidrita. Los monómeros de ferritina pueden igualmente liberar el hierro de su interior transformándolo en hierro ferroso, que pasaría al citosol celular para su transporte.

Figura 2.

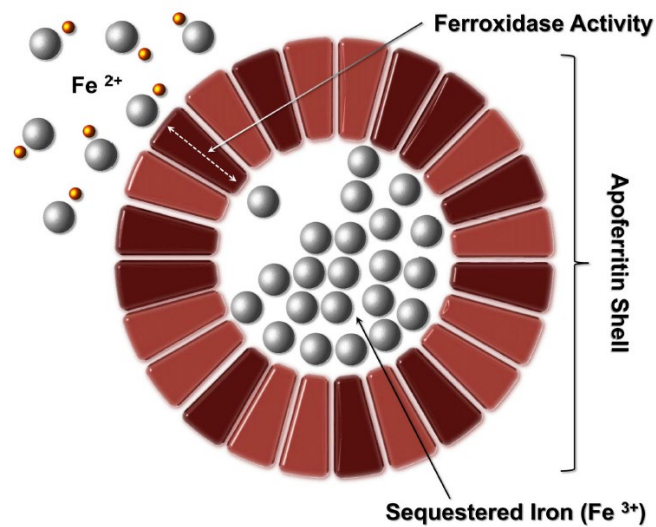


Figura 2. Molécula de ferritina.

Tomado de: Knovich MA, et al. Ferritin for the clinician. Blood Rev 2009<sup>41</sup>.

Sin embargo, el hierro almacenado en los enterocitos puede perderse rápidamente, ya que la tasa de reemplazo de las células de la mucosa intestinal es de 2 a 5 días. El transporte al exterior celular se realiza a través de la membrana basolateral del enterocito unido a la proteína **ferroportina**, que es un transportador transmembrana que libera el hierro al espacio extracelular<sup>42</sup>. La ferroportina es el único transportador de

hierro desde el interior de la célula al plasma, en la membrana basolateral del enterocito, el sinusoides hepático y la membrana plasmática de los macrófagos, y va a adquirir un papel relevante en la regulación del metabolismo férrico, como se explicará más adelante.

La eferina en la membrana basolateral y la ceruloplasmina en el plasma, son enzimas que oxidan nuevamente el hierro ferroso, que cambia a estado férrico, para unirse a la proteína **transferrina**<sup>43,44</sup>. La transferrina es la principal proteína que recoge el hierro liberado a plasma, y recorre el torrente sanguíneo para distribuirlo por los distintos órganos y tejidos. Cada molécula de transferrina es capaz de transportar dos moléculas de hierro, y su saturación es uno de los mediadores que modulan la absorción del hierro. Para depositarlo en la célula adecuada, se une a su receptor, el **receptor de la transferrina-1 (TfR1)**<sup>45,46</sup>, que se encuentra en la membrana celular y ejerce de transportador. Figura 3.

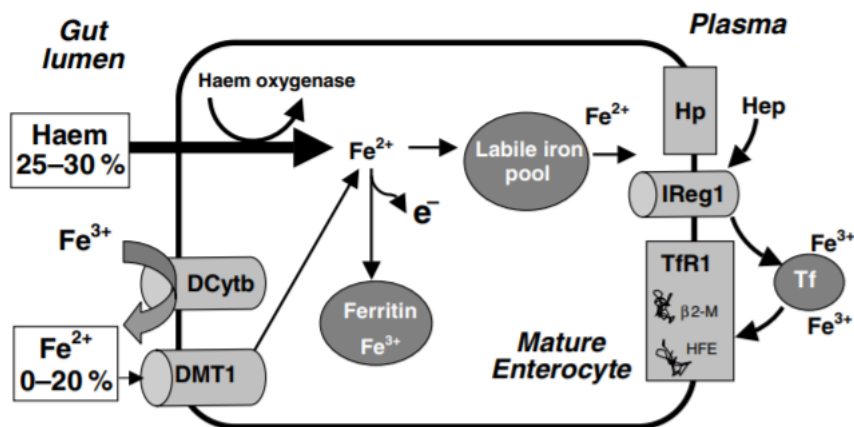


Figura 3. Transporte del hierro desde la luz intestinal al enterocito y al plasma. DCytb: Citocromo B duodenal; DMT1: Divalent metal cation transporter 1; IReg1: Ferroportina; Hp: Hefaestina; Hep: Hepcidina; Tf: Transferrina; TfR1: Receptor 1 de la transferrina; HFE: proteína hemocromatosis;  $\beta$ 2-M:  $\beta$ 2-microglobulina. Tomado de Fairweather-Tait SJ. Iron nutrition in the UK: getting the balance right. Proc Nutr Soc 2004<sup>47</sup>.

Una vez que la transferrina se une a su receptor, ambos se internalizan en un endosoma, se libera el hierro y éste es transportado al citosol celular a mediante la acción de DMT1<sup>32</sup>.



Incluso dentro de un mismo tejido, cada tipo celular presenta unos requerimientos y una capacidad de almacenar el hierro distintos. Los precursores eritrocitarios y los tejidos con una tasa de recambio alta, requieren abundante hierro, por lo que expresan gran cantidad de RTf1 en la membrana celular<sup>48</sup>.

Por otro lado, la hemopexina y la haptoglobina son dos proteínas plasmáticas que son capaces de unirse al hierro hemo y a la hemoglobina libres, limitando sus efectos tóxicos y facilitando su reciclaje posterior<sup>33</sup>.

El depósito de hierro en el organismo se realiza principalmente en los hepatocitos y en los macrófagos en forma de ferritina.

Los macrófagos obtienen el hierro a través del reciclaje de las células, principalmente de los eritrocitos, que son las células con mayor concentración de hierro del organismo, y que cuando se hayan en estado senescente (su vida media aproximada es de 120 días) son captados en el bazo para su degradación. Cuando los macrófagos fagocitan el eritrocito, se hidroliza en el fagolisosoma y se libera el grupo hemo de la hemoglobina, sobre el que a su vez la enzima hemo-oxigenasa 1 actúa facilitando la salida del hierro, ya sea para su almacenaje en el citosol como ferritina o para su liberación al plasma a través de la ferroportina<sup>33</sup>. Los macrófagos también pueden obtener hierro de la transferrina a través de los RTf-1 y pueden captar hierro libre o complejos de bajo peso molecular directamente mediante los DMT1 presentes en su membrana.

Mientras que el flujo de hierro a través del SRE es muy dinámico, los hepatocitos actúan principalmente como célulasceptoras de hierro. Pueden captar hierro procedente de la transferrina a través del RTf-1, mediante receptores específicos de ferritina sérica, hemoglobina y del grupo hemo, y hierro libre gracias al DMT1<sup>32</sup>. El hierro se almacena fundamentalmente como ferritina, y en menor medida en forma de hemosiderina.

En contraposición, el hierro es destinado predominantemente a la síntesis de hemoglobina por los precursores eritrocitarios en la médula ósea. Cada día se renuevan el 1-1,5% de los hematíes circulantes, en un proceso que está regulado por la eritropoyetina (EPO), que es sintetizada por las células peritubulares intersticiales del riñón en respuesta a la hipoxia celular<sup>32</sup>. Sin embargo, para que esta eritropoyesis sea efectiva, es necesario que se aporten hierro, ácido fólico y vitamina B12, entre otros, en suficiente cantidad. En la membrana del hematíe y de sus precursores, el hierro que

llega trasladado por la transferrina es conducido del exterior al citoplasma celular, como se ha descrito anteriormente, a través de la interacción con el RTf-1 y el transportador DMT1, donde cumplirá su función biológica de transportar oxígeno por todo el organismo.

### **Regulación de la absorción y liberación del hierro**

A pesar de la variabilidad del contenido de hierro de la dieta y las pérdidas que se producen de forma inconstante, los niveles de hierro en el organismo se mantienen relativamente estables. Esto se debe a que existe un mecanismo que regula tanto la absorción intestinal como la liberación de hierro desde los depósitos, manteniendo un equilibrio dinámico que permite la consecución de sus funciones biológicas.

La **hepcidina** es una molécula de descubrimiento relativamente reciente, que juega un papel fundamental en esta regulación. Es una proteína sintetizada en los hepatocitos, que se libera al plasma y circula libre en su mayor parte, y cuyo receptor es la ferroportina. Aunque se ha descrito la producción local de hepcidina en otros tejidos (corazón, adipocitos, macrófagos alveolares, etc.), se considera que la de origen hepático es la que esencialmente realiza la regulación sistémica<sup>49</sup>. Como mencionamos previamente, la ferroportina es el único transportador de hierro desde el interior al exterior de las células. Cuando la hepcidina interacciona con ella, induce la internalización y degradación de la ferroportina, de forma que desvía la circulación del hierro hacia su almacenaje en forma de ferritina y evita el paso del hierro desde los enterocitos al plasma y la liberación desde los hepatocitos y los macrófagos<sup>50,51</sup>. Por tanto, también favorece la excreción de hierro, ya que éste finalmente será eliminado al desprenderse los enterocitos (y por ende sus depósitos de hierro) hacia la luz intestinal por la renovación celular continua que sufre la mucosa. Figura 4.

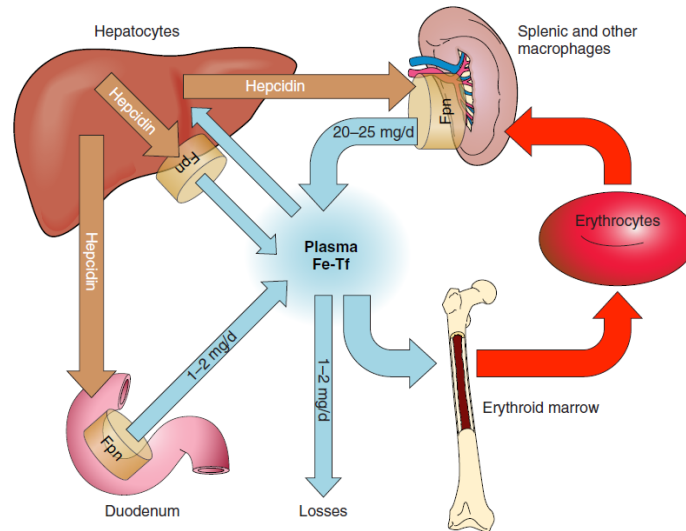


Figura 4. Regulación, almacén y transporte del hierro corporal. Fpn: ferroportina. Tomado de Ganz T. *Systemic Iron Homeostasis. Physiol Rev* 2013<sup>33</sup>.

A su vez, la síntesis hepática de la hepcidina se estimula cuando los niveles séricos y/o de depósito de hierro son elevados<sup>52,53</sup>, en un ambiente rico en oxígeno y por las citoquinas proinflamatorias, por lo que todas estas condiciones favorecerán la excreción de hierro y que este se mantenga en los depósitos y no sea liberado<sup>38,54</sup>.

La principal citoquina que induce la sobreexpresión de hepcidina es la interleuquina 6 (IL-6). Otras citoquinas que estimulan la producción de hepcidina, como los lipopolisacáridos bacterianos, la interleuquina 1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), parece que la favorecen a través de la inducción de la producción de IL-6<sup>51,55</sup>. La IL-6 produce la activación de STAT3, que pertenece a un grupo de moléculas que intervienen en la transducción de señales y activan la transcripción de genes (*signal transduction and activator of transcription-STAT*), y en este caso STAT3 activa la transcripción del gen codificador de la hepcidina<sup>56,57</sup>. Por tanto, en situaciones de inflamación sistémica, habrá una síntesis elevada de hepcidina, que producirá la eliminación del hierro aportado en la dieta en el intestino y que el hierro de los depósitos intracelulares de los macrófagos y hepatocitos no sea liberado, lo cual podría conducir a un déficit de hierro funcional a pesar de que los depósitos estén llenos.

Por el contrario, la producción de hepcidina en los hepatocitos se inhibe cuando el hierro sérico y/o el de depósito disminuyen, y en circunstancias en las que está

estimulada la eritropoyesis medular<sup>58,59</sup>. En la médula ósea se producen supresores de la hepcidina en respuesta a la EPO<sup>60,61</sup>, de forma que se estimula la circulación de hierro disponible para la síntesis de hemoglobina, a la vez que la síntesis de eritrocitos en la médula ósea está regulada por la EPO en respuesta a la oxigenación tisular<sup>58</sup>.

Independientemente de la hepcidina, que es el principal regulador del hierro corporal, la absorción de hierro desde la luz intestinal se fomenta en situaciones de hipoxia, en las que aumentan los niveles de los denominados *hypoxia-inducible factors* (HIF). El *hypoxia-inducible factor-2* (HIF-2) estimula la producción de Dcytb y DMT1 (los encargados de la absorción de hierro en el borde en cepillo)<sup>62</sup> e induce la síntesis de ferroportina, por lo que estimula el flujo de hierro desde la luz intestinal al plasma sanguíneo. HIF-2 además estimula la síntesis de EPO en la médula ósea, lo que secundariamente suprimirá la síntesis hepática de hepcidina<sup>63</sup>.

Por tanto, la regulación de la absorción y la circulación del hierro en el organismo es un mecanismo complejo, en el que la hepcidina presenta un papel relevante como principal efector, limitando o facilitando la absorción de hierro en el enterocito y su biodisponibilidad desde los depósitos. Figura 5.

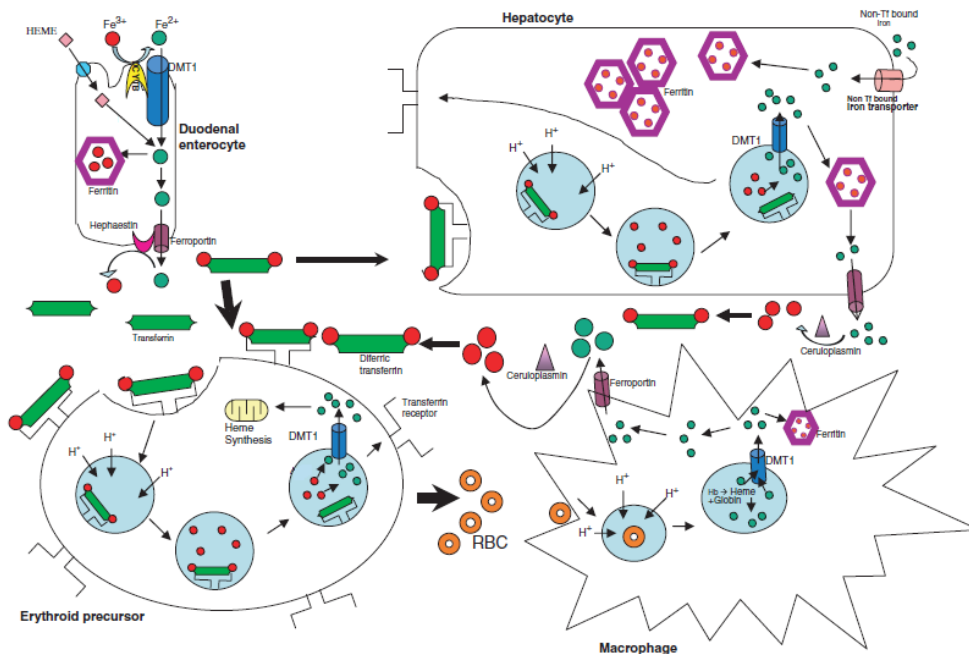


Figura 5. Flujo de hierro a través de las células implicadas en su homeostasis. Tomado de Edison ES, Bajel A, Chandy M. Iron homeostasis: new players, newer insights. Eur J Haematol 2008<sup>44</sup>.

## 1.2. CARACTERÍSTICAS DEL METABOLISMO FÉRRICO DURANTE EL DESARROLLO

Durante el embarazo la expansión del volumen sanguíneo materno y el desarrollo fetoplacentario aumentan notablemente las necesidades de hierro. Para responder a esta demanda, se incrementa la absorción de hierro hemo y no hemo de la dieta, y se movilizan los depósitos desde los hepatocitos y el SRE. Estos cambios están mediados por la supresión de la liberación de hepcidina, y aunque el mecanismo exacto no es conocido, la disminución de los depósitos maternos y la hipoxia tisular relativa que se produce durante la gestación contribuyen a desencadenarlos<sup>43,64</sup>.

Durante el desarrollo fetal, la placenta traslada el hierro materno al feto. La hepcidina producida por la madre regula la cantidad que se transfiere al sincitiotrofoblasto placentario a través de receptores TfR1 presentes en su membrana apical. La ferroportina se expresa en la cara basolateral, de cara a la circulación fetal, donde es la hepcidina producida por el feto la que modula la cantidad de hierro que éste capta, que va aumentando progresivamente para ser máxima en el tercer trimestre de gestación<sup>64-66</sup>.

Estos primeros pasos en la adquisición de hierro por parte del embrión en desarrollo son fundamentales, dado que un déficit férrico prenatal puede producir ya alteraciones del desarrollo cerebral, renal y cardiovascular<sup>67,68</sup>, e incrementa el riesgo de presentar ferropenia durante la infancia<sup>69</sup>. Los recién nacidos a término sanos presentan una concentración de hemoglobina elevada, con una media en los primeros días de vida de 18,5 g/dl, y un valor mínimo considerado normal de 14,5 g/dl<sup>70</sup>, debido a la hipoxia relativa en la que se desarrolla el feto, y sus depósitos férricos se encuentran llenos<sup>71</sup>.

Tras el nacimiento, esta eritropoyesis intensificada se frena, y el hierro procedente de la degradación de la hemoglobina, la cual alcanza sus niveles mínimos alrededor de los 2 meses de vida, junto con el disponible en el compartimento de depósito y el aportado por la leche materna, que aunque es relativamente bajo cuantitativamente, es eficientemente absorbido (alrededor del 50%)<sup>72,73</sup>; son suficientes para abastecer al lactante en sus primeros meses de vida, a pesar de la alta demanda que presenta por su rápido crecimiento<sup>74,75</sup>. De hecho, algunos estudios han demostrado que la absorción de hierro no está regulada durante los primeros 4-6 meses como a edades posteriores, éste es absorbido independientemente del estado de hierro corporal y los depósitos existentes, y la absorción es refractaria a la acción de la hepcidina<sup>76,77</sup>. En este periodo el hierro podría no sólo ser captado en el duodeno, sino también en

partes más distales del intestino delgado y el colon<sup>78</sup>. Además, el estado del hierro materno en los lactantes alimentados al pecho no influye en su aporte salvo en situaciones de depleción muy severa. Todas estas condiciones favorecen una elevada absorción y circulación de hierro, y en los dos primeros meses de vida, los niveles de ferritina aumentan, debido principalmente al reciclaje del hierro procedente de la hemólisis del exceso de hematíes presente al nacimiento.

A partir de los 4-6 meses los mecanismos de regulación de la absorción del hierro y de liberación desde los depósitos comienzan a ser patentes<sup>72,79</sup>. Los depósitos de hierro disminuyen progresivamente, con una relación inversamente proporcional al crecimiento, tanto en peso como en longitud, hasta estabilizarse a los 5-6 meses<sup>71</sup>. A partir de este momento las necesidades de hierro aportado por la dieta aumentan para soportar el crecimiento y la leche materna es insuficiente para suplirlas, por lo que se requiere la introducción de alimentación complementaria rica en hierro<sup>74</sup>. El rápido desarrollo y la expansión del volumen sanguíneo condicionan que la cantidad de hierro contenida en el organismo se doble entre los 6 y 24 meses. A partir de entonces y hasta la pubertad, las necesidades de hierro por kilogramo (kg) de peso son menores, dado que la tasa de crecimiento es menor<sup>80</sup>.

Con la llegada de la adolescencia se produce nuevamente un aumento en la demanda de hierro. En este momento vital confluyen diversos factores que conjuntamente condicionan que sean necesarios unos aportes férricos elevados. En ambos sexos se produce un pico de crecimiento durante la pubertad. En las chicas además se inician las pérdidas sanguíneas menstruales, con lo que se añan el aumento de la demanda con una mayor excreción de hierro<sup>8,9</sup>. En los chicos las necesidades incluso se doblan a consecuencia del estirón puberal, el aumento de masa muscular y la expansión del volumen sanguíneo<sup>81</sup>. Sumado a estas condiciones fisiológicas, el deporte de alto nivel, especialmente el de resistencia, se ha asociado a una mayor frecuencia de ferropenia en los adolescentes<sup>82</sup>.

En contraposición, el aumento de las necesidades de hierro no siempre se acompaña con un adecuado aporte a través de la dieta. Por el contrario, durante la adolescencia se produce una mayor frecuencia de dietas desequilibradas, ricas en alimentos procesados y pobre en productos frescos, es frecuente la omisión de comidas, el consumo de “snacks” y dietas mal balanceadas con el objetivo de perder peso<sup>10,11,83,84</sup>.

Todos estos factores convierten la adolescencia en uno de los periodos de mayor vulnerabilidad en cuanto al metabolismo férrico se refiere.

### 1.3. FACTORES DE RIESGO DE FERROPENIA

Como hemos analizado previamente, las épocas del desarrollo en las que las necesidades de aporte de hierro son mayores son la lactancia, a partir de los 6 meses de vida, y la adolescencia, por lo que podrían constituir por sí mismas factores de riesgo de ferropenia. Independientemente de estas situaciones fisiológicas de alta demanda, hay una serie de circunstancias que pueden favorecer que exista un déficit de hierro, ya sea porque los depósitos resulten insuficientes, o porque haya dificultades en su utilización, de forma que aunque el contenido de hierro corporal sea suficiente, éste no se desplace adecuadamente entre los distintos compartimentos y se produzca un déficit de hierro funcional.

#### Características intrínsecas del adolescente

La adolescencia es un periodo de alta vulnerabilidad por diversos factores:

- Rápido crecimiento, con aumento de la masa muscular y el volumen sanguíneo circulante, especialmente en los varones<sup>85</sup>.
- Inicio de la menarquia en las chicas<sup>8</sup>.
- Hábitos dietéticos inadecuados, con influencia del grupo de iguales y necesidad de autoafirmación con divergencia de los hábitos familiares, así como cambios en las costumbres sociales<sup>11</sup>, con mayor consumo de comida rápida, alta en energía, grasa y sal, y pobre en fibra, hierro, vitaminas y calcio, y menos comida tradicional.

Además, cabe hacer mención a la conocida como “anemia del deportista”. La prevalencia de anemia en los atletas jóvenes es más elevada, probablemente por varios factores que confluyen: pseudoanemia dilucional, que se observa sobre todo en deportistas de resistencia, hemólisis intravascular y pérdidas sanguíneas repetidas<sup>82</sup>.

#### Factores de riesgo perinatales

Como vimos con anterioridad, el feto adquiere gran cantidad de hierro procedente de la madre a través de la placenta. Hay diversos factores que pueden condicionar que no haya un adecuado aporte<sup>86</sup>.

- Anemia ferropénica materna durante la gestación, que no asegure un adecuado aporte al feto. Como se comentó anteriormente, cuando el déficit de hierro materno es de leve a moderado, existen mecanismos biológicos que mantienen el aporte férrico necesario al feto en crecimiento, pero cuando la depleción de

hierro es severa, estos mecanismos pueden resultar insuficientes y no se asegura la transferencia de hierro al feto o a la leche materna durante la lactancia<sup>87</sup>.

- Prematuridad y bajo peso al nacimiento. El periodo del embarazo con una mayor transferencia de hierro hacia la circulación fetal es el tercer trimestre, por lo que los recién nacidos pretérmino presentan depósitos menores. Además, su tasa de crecimiento es muy elevada, por lo que la demanda es igualmente alta, y en aquellos que precisan hospitalización, esta situación puede agravarse por las extracciones frecuentes de sangre<sup>88</sup>.
- Eventos hemorrágicos perinatales, como la transfusión feto-materna o feto-fetal, por pérdidas directas con un aumento de la demanda.
- Clampaje precoz del cordón umbilical. El clampaje tardío del cordón umbilical se ha desarrollado como estrategia para favorecer el paso de sangre desde la placenta al feto en los primeros minutos de vida, lo que repercute positivamente en los depósitos de hierro neonatales, aumentando la concentración de hemoglobina y los depósitos de hierro en el lactante<sup>89,90</sup>.

### **Factores de riesgo nutricionales**

En base los mecanismos de absorción del hierro, y a la interferencia que determinadas sustancias pueden ejercer sobre la absorción intestinal del mismo, existen una serie de factores de riesgo nutricionales de déficit de hierro:

- Lactancia materna exclusiva prolongada sin introducción de alimentación complementaria rica en hierro a partir de los 6 meses de vida<sup>71</sup>. La leche materna contiene bajas cantidades de hierro, y aunque éste es altamente biodisponible, a partir de los 6 meses de vida es insuficiente para asegurar una ingesta adecuada. Por ello se recomienda la introducción a esta edad de alimentación complementaria rica en hierro, y así lo indican las principales sociedades científicas, entre ellas la Asociación Española de Pediatría (AEP)<sup>91</sup> y la *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition* (ESPGHAN)<sup>92</sup>.
- Consumo de leche de vaca no adaptada antes del año de vida. Los lactantes alimentados con leche de vaca no adaptada presentan con más frecuencia anemia ferropénica y ferropenia sin anemia con respecto a los alimentados con fórmulas adaptadas o leche materna<sup>93</sup>. Esta influencia negativa se considera que puede ser debida al bajo contenido en hierro de la leche de vaca, a que el calcio actúa como inhibidor de la absorción intestinal de hierro, y al propio daño que



pueden producir las proteínas de la leche de vaca en la mucosa intestinal inmadura del lactante<sup>94,95</sup>.

- Dieta pobre en hierro hemo (pobre en carne roja, pescado y aves fundamentalmente). Como se explicó anteriormente, el hierro hemo es absorbido desde la luz intestinal directamente sin que intervengan otros moduladores dietéticos, por lo que es una fuente de hierro con alta biodisponibilidad. Sin embargo, el hierro no hemo presenta menor absorción desde la luz intestinal y ésta además se ve disminuida en presencia de otras sustancias, como los fitatos y polifenoles<sup>96</sup>. Ver “Absorción intestinal de hierro” en el punto “1.1. Metabolismo del hierro” y la tabla II, en la que se hallan resumidos los elementos de la dieta que favorecen e inhiben la absorción intestinal de hierro y que productos los contienen.

FACTORES FAVORECEDORES		FACTORES INHIBIDORES	
<b>Hierro hemo</b>	Carnes, aves, pescado	<b>Fitatos e inositol-fosfatos</b>	Salvado, avena, arroz, cacao, legumbres
<b>Vitamina C</b>	Frutas, hortalizas	<b>Taninos y fenoles fijadores de hierro</b>	Cacao, infusiones, espinacas
<b>Fructosa</b>	Frutas, miel, tomate, cebolla	<b>Fosfatos</b>	Leche de vaca, lácteos
<b>Ácido cítrico</b>	Naranja, mandarina, limón, pomelo	<b>Calcio</b>	Leche de vaca, lácteos
		<b>Fibra</b>	Verdura
		<b>Oxalatos</b>	Verdura

*Tabla II. Elementos de la dieta que favorecen e inhiben la absorción intestinal de hierro y que productos los contienen.*

*Adaptado de Moráis López A, et al. Importancia de la ferropenia en el niño pequeño: repercusiones y prevención. An Pediatr (Bcn) 2011<sup>97</sup>.*

- Consumo excesivo de lácteos. La ingesta de lácteos en cantidades excesivas, además de que puede desplazar el consumo de otros alimentos<sup>98</sup>, puede

disminuir la absorción de hierro por su contenido el calcio. El calcio interfiere en la absorción intestinal del hierro, tanto del hemo con el no hemo, por mecanismos que no están bien esclarecidos<sup>99</sup>.

### **Nivel socioeconómico**

Los países en vías de desarrollo presentan tasas más altas de ferropenia y anemia ferropénica que los países industrializados. Esto no es sólo debido al desarrollo económico o a que una mayor parte de la población se encuentre bajo el umbral de la pobreza, sino a múltiples factores que convergen, como el mayor número de infecciones (parasitosis intestinales, malaria, esquistosomiasis, etc.), la inequidad en el acceso a los sistemas de salud y a los controles obstétrico-ginecológicos, la falta de disponibilidad de dietas diversificadas y fortificadas, las adversidades climáticas, y muchas otras condiciones que convierten la ferropenia en un problema de salud multifactorial<sup>100</sup>. No obstante, en los países industrializados también se han asociado tasas más altas de anemia ferropénica en niños y adolescentes con un nivel socioeconómico familiar menor<sup>93</sup>, en términos de situación laboral de los padres (activa o desempleados), ingresos familiares y educación materna<sup>98</sup>, aunque esta relación no ha sido consistente en todos los estudios realizados al respecto<sup>101</sup>.

### **Factores de riesgo de ferropenia por pérdidas sanguíneas**

En los países industrializados una de las principales causas de ferropenia es la pérdida sanguínea, ya sea por causas manifiestas o inadvertidas, agudas o crónicas, entre las que se encuentran<sup>102</sup>:

- Hemorragias por traumatismos.
- Sangrado gastrointestinal, pulmonar o urinario por patologías subyacentes (parasitosis intestinales, gastritis, hemorroides, hemoglobinuria paroxística nocturna, etc.).
- Sangrado menstrual abundante.
- Donación de sangre o extracciones sanguíneas frecuentes.

### **Inflamación sistémica y obesidad**

El sobrepeso y la obesidad en niños y adolescentes se han relacionado epidemiológicamente con una mayor tasa de ferropenia, y los factores dietéticos no son los únicos que intervienen en esta relación<sup>103</sup>.

En el apartado 1.1. *Metabolismo del hierro. Regulación de la absorción y liberación del hierro* se han explicado los mecanismos bioquímicos por los cuales, en situaciones de inflamación sistémica, el aumento de producción de hepcidina induce la no absorción del hierro de la dieta en el intestino y que el hierro de los depósitos intracelulares de los macrófagos y hepatocitos no sea liberado, lo cual puede conducir a un déficit de hierro funcional a pesar de que los depósitos férricos estén llenos.

En la relación que existe entre déficit de hierro y obesidad, la hipótesis más plausible es que ésta sea debida a la inflamación sistémica que produce el exceso de adiposidad en sí mismo. El adipocito secreta mediadores inflamatorios, denominados adipoquinas, que incluyen la adiponectina, la resistina, la IL-6, la leptina, el TNF- $\alpha$  y el inhibidor del plasminógeno tipo 1. Estas adipoquinas son moduladores endocrinos que intervienen en el metabolismo de la glucosa o en la regulación de la tensión arterial, pero también son reguladores inflamatorios que afectan al metabolismo del hierro.

Como vimos anteriormente, TNF- $\alpha$  e IL-6 han sido involucradas en la activación de la producción de hepcidina a través de la vía STAT3. La leptina también es capaz de inducir la síntesis de hepcidina a través de esta vía, por lo que, como hemos dicho, el adipocito es productor de sustancias que aumentan la concentración de hepcidina. Adicionalmente, se ha visto que los adipocitos son capaces de secretar hepcidina por sí mismos<sup>104-107</sup>.

Por todo ello, el sobrepeso y la obesidad pueden favorecer la existencia de déficit de hierro funcional, ya que, a través de estas rutas metabólicas, y con la hepcidina como mediador, disminuyen su absorción intestinal y limitan su liberación desde los depósitos tisulares.

## 2. IMPLICACIONES DEL DÉFICIT DE HIERRO EN LA ADOLESCENCIA

Muchos adolescentes que presentan déficit de hierro se encuentran asintomáticos o presentan síntomas leves inespecíficos. Cuando refieren síntomas, los más comunes suelen ser debilidad, cefalea, irritabilidad y fatiga de distinta intensidad. No obstante, existen otras complicaciones derivadas de un desarrollo deficitario que pueden no ser patentes, incluso cuando se encuentran asintomáticos.

Los efectos deletéreos del déficit de hierro durante el desarrollo son bien conocidos, y se inician ya en la vida fetal, durante la cual el hierro tiene un papel fundamental en el desarrollo renal, cardiovascular y especialmente cerebral<sup>67,108</sup>. No obstante, como mencionamos anteriormente, durante la gestación existen mecanismos que aseguran un aporte férrico elevado al feto, y habitualmente los recién nacidos presentan los depósitos de hierro llenos, los cuales se deplecionan progresivamente hasta los 5-6 meses, cuando comienzan a ser mayores las necesidades de aporte férrico en la dieta<sup>71</sup>. Si posteriormente el aporte de hierro no es adecuado y se produce una situación de déficit, se pueden afectar distintas funciones sistémicas.

### Desarrollo neurocognitivo

Los mecanismos biológicos a través de los cuales durante el desarrollo el déficit de hierro puede ocasionar alteraciones neurocognitivas son variados. En estudios animales se ha visto que puede condicionar cambios morfológicos en determinadas localizaciones, y el hipocampo y el núcleo estriado son dos áreas especialmente susceptibles. Se produce una menor arborización dendritocitaria, se establecen menos conexiones neurales y éstas son menos complejas<sup>17</sup>. Los oligodendrocitos, que son los encargados de formar la vaina de mielina en el sistema nervioso central (SNC), son especialmente vulnerables al déficit de hierro, y puede disminuir el volumen de mielina en la sustancia blanca cerebral<sup>12</sup>.

La neuroquímica cerebral es otra de las áreas que podrían verse afectadas por la ferropenia. El hierro interviene en la síntesis de dopamina y noradrenalina<sup>109</sup>, y algunos estudios han mostrado que en una situación de déficit de hierro puede ocasionarse disregulación de la cantidad de estos neurotransmisores, sus receptores y transportadores<sup>110</sup>, por lo que las vías dopaminérgicas nigroestriatales y mesolímbicas y las noradrenérgicas del *locus coeruleus* podrían alterarse, si bien se trata de estudios animales y esto no está claramente establecido en humanos<sup>17</sup>.

En estudios longitudinales llevados a cabo en lactantes y preescolares, se ha observado que aquellos que presentan anemia ferropénica, incluso una vez tratada y corregida, en edad escolar presentan peor rendimiento en aritmética, expresión escrita y algunos procesos cognitivos como la memoria espacial y selectiva<sup>111</sup>. Sin embargo, otros grupos de trabajo han observado que la diferencia en el desarrollo psicomotor de los niños con anemia ferropénica con respecto a sus iguales no anémicos a lo largo del tiempo no ha sido consistente<sup>112</sup>. Los factores psicosociales, como el nivel socioeconómico y nivel de estudios familiar, la estimulación en el hogar y otros factores nutricionales, son potenciales factores confusores que no pueden excluirse como causa de estas discrepancias<sup>75</sup>.

Se ha postulado que la ferropenia sin anemia en etapas tempranas también puede producir efectos a largo plazo sobre el neurodesarrollo, aunque son más escasos. Algunos estudios han hallado diferencias en el desarrollo psicomotor de los niños preescolares y en las habilidades cognitivas de los escolares a favor de los sujetos no ferropénicos, pero no está clara la significación clínica de estos hallazgos<sup>13</sup>. A largo plazo, un estudio ha detectado que adultos que a edades tempranas habían presentado ferropenia referían un nivel de estudios más bajo y peor salud emocional que aquellos con un nivel de hierro suficiente<sup>19</sup>.

Si nos centramos en el déficit de hierro durante la adolescencia, estudios epidemiológicos en Estados Unidos han hallado peores puntuaciones en habilidades matemáticas en adolescentes con ferropenia<sup>27</sup>. Igualmente, en una cohorte de adolescentes en China se observó que aquellos con bajos niveles de hierro puntuaban peor en abstracción, flexibilidad de pensamiento y procesamiento espacial<sup>113</sup>. Un estudio en Chile concluyó que los adolescentes que habían presentado ferropenia presentaban peor capacidad de autorregulación del comportamiento, con mayor tasa de consumo de sustancias y conductas sexuales de riesgo<sup>114</sup>.

En estudios intervencionistas en los que se ha administrado hierro oral a los adolescentes, en chicas con ferropenia sin anemia, se observó que en aquellas que recibían ferroterapia frente a las que recibían placebo mejoraba tanto el aprendizaje verbal como la memoria<sup>115</sup>. En otro ensayo clínico controlado con placebo se concluyó que las adolescentes que recibían hierro oral mejoraban su capacidad de concentración y el estado anímico<sup>81</sup>.

## Estado inmológico

El hierro interviene en el metabolismo celular y la replicación del ADN, luego es necesario para la multiplicación y diferenciación celulares, incluidas las células del sistema inmune. En éstas además forma parte de las enzimas responsables de la síntesis de peróxido de hidrógeno y óxido nitroso e interviene en la regulación de la producción de citoquinas. Como consecuencia de esta participación en las funciones inmunológicas, se ha descrito que en condiciones de ferropenia, los macrófagos presentan menor capacidad bactericida, la actividad de la mieloperoxidasa de los neutrófilos, que interviene en la destrucción intracelular de los patógenos, se ve disminuida, puede haber un menor número de linfocitos T<sup>20</sup>, ya que requieren hierro para su multiplicación, y los linfocitos activados producen una menor cantidad de interleuquina 2 (IL-2)<sup>116,117</sup>. En estudios en niños y adolescentes con ferropenia también se han detectado menores niveles de inmunoglobulina G (IgG) e IL-6, además de una menor capacidad fagocítica y de oxidación de los neutrófilos<sup>19,21</sup>.

## Rendimiento físico

En condiciones de anemia la capacidad de transporte de oxígeno al músculo es menor, pero a esto se añade que el déficit de hierro conduce a una menor síntesis de mioglobina y citocromo C en el propio músculo, con menor capacidad oxidativa mitocondrial. Esto conduce a una menor tolerancia al ejercicio y a que la fatiga muscular aparezca más rápido<sup>117</sup>.

En adolescentes con ferropenia sin anemia también se ha constatado una menor fatigabilidad y mayor resistencia tras recibir tratamiento con hierro frente a adolescentes tratadas con placebo<sup>81</sup>.

## Trastornos específicos

Algunos trastornos específicos como la pica (ingestión de sustancias no nutritivas, como arcilla, tierra, tiza, papel o hielo) o el síndrome de piernas inquietas, en el que aparece una sensación desagradable en las piernas durante periodos de inactividad, especialmente por la noche, y que se alivia con el movimiento, han sido relacionadas con el déficit de hierro, y muchas veces ceden tras administrar suplementos férricos<sup>118,119</sup>, aunque los mecanismos fisiopatogénicos no son bien conocidos. También se ha relacionado el déficit de hierro con los accidentes cerebrovasculares<sup>23</sup> y las convulsiones febriles en niños<sup>120,121</sup>, aunque si bien estas

entidades parecen más frecuentes en pacientes pediátricos con anemia ferropénica, no hay una relación causal establecida.

### 3. DIAGNÓSTICO DE CARENCIA DE HIERRO

La valoración del estado de hierro corporal es una tarea compleja, puesto que como vimos previamente el hierro se distribuye en distintos compartimentos en el organismo, y la regulación del paso de un compartimento a otro es multifactorial.

El déficit de hierro puede definirse como aquella situación en la que no hay hierro suficiente en el organismo para abastecer el metabolismo y la síntesis de hemoglobina y el resto de compuestos férricos, secundariamente a un balance de hierro negativo prolongado. Existen distintos estadios de déficit de hierro, que van sucediéndose conforme va disminuyendo progresivamente la cantidad de hierro disponible en el organismo<sup>96</sup>.

1. Ferropenia latente. El hierro de los depósitos se moviliza y éstos se van deplecionando progresivamente, pero se mantiene la actividad eritropoyética.
2. Eritropoyesis ferropénica. Se ve afectada la disponibilidad de hierro circulante y por tanto para la actividad celular, sobre todo en los precursores eritroides.
3. Anemia ferropénica. La falta de disponibilidad de hierro afecta a la síntesis de hemoglobina y el resto de compuestos férricos. Se define como una reducción de la concentración de hemoglobina o de la masa global de hematíes por debajo de los niveles considerados normales para una edad, sexo y altura sobre el nivel del mar determinados. En la práctica, el diagnóstico de anemia se establece cuando la hemoglobina sérica es inferior a 2 desviaciones estándar (DS) para la edad y el sexo<sup>70</sup>.

También es posible que exista un déficit de hierro funcional, en el que a pesar de que haya hierro disponible en los depósitos, los mecanismos de transporte hacia los la médula ósea y la incorporación a los precursores eritroides estén mermados<sup>122</sup>. Esto ocurre fundamentalmente en situaciones de inflamación sistémica, a través de mecanismos mediados por la hepcidina, como se describió previamente.

No existe un test único que nos permita valorar estas distintas situaciones. Se considera que el *gold standard* para el diagnóstico de déficit de hierro es el aspirado de médula ósea, en el que no se detectaría hemosiderina teñida por microscopía, lo que implica la ausencia de hierro disponible para la eritropoyesis<sup>123</sup>. Sin embargo, es una prueba invasiva, poco accesible y costosa, por lo que se han desarrollado otras estrategias para dilucidar el estado de hierro corporal a través de parámetros determinados en sangre periférica. No obstante, estos parámetros deben usarse en



combinación, pues no hay ninguno que pueda estimar el estado de hierro corporal en su globalidad, además de que sus valores normales sufren variaciones fisiológicas durante el desarrollo, acompañando al crecimiento del niño y el adolescente.

### 3.1. PARÁMETROS DIAGNÓSTICOS

En este apartado abordaremos los parámetros hematológicos y bioquímicos que clásicamente se han empleado para el diagnóstico de anemia y ferropenia. Los considerados nuevos parámetros, específicamente el Contenido de Hemoglobina reticulocitaria (CHR), el receptor sérico de la transferrina (RsTf) y el índice receptor sérico de la transferrina / logaritmo de la ferritina (RsTf-F), se expondrán pormenorizadamente más adelante.

#### 3.1.1. Parámetros hematológicos.

##### Hemoglobina

La hemoglobina (Hb) es una molécula polifuncional que interviene en diversos mecanismos celulares, como en reacciones catalíticas, en el metabolismo del óxido nítrico o en la regulación del pH, pero su función primaria es el transporte de oxígeno a través del torrente sanguíneo hacia los órganos diana.

Es una proteína tetramérica, es decir, está constituida por cuatro cadenas polipeptídicas, a cada una de las cuales se puede unir un grupo hemo, cuyo átomo de hierro puede unir de forma reversible una molécula de dioxígeno<sup>124</sup>. Esta estructura le permite liberar y retener oxígeno en un equilibrio dinámico que se adapta a las condiciones del organismo.

La cantidad presente en sangre periférica se determina como la masa de Hb por unidad de volumen sanguíneo, generalmente expresada en gramos/decilitro (g/dl), y los valores considerados normales varían en función de la edad, la etnia, el sexo y la altitud. Como mencionamos anteriormente, su descenso por debajo de 2 DS respecto a estos valores normales es definitorio de anemia (Tabla III).

Hb (g/dl)	1-3 días	14 días	1 mes	2 meses	3-6 meses	6-24 meses	2-6 años	6-12 años	Mujer 12-18 años	Varón 12-18 años
Media	18.5	16.5	14.0	11.5	11.5	12.0	12.5	13.5	14.0	14.5
-2 DS	14.5	12.5	10.0	9.0	9.5	10.5	11.5	11.5	12.0	13.0

Tabla III. Valores de la hemoglobina sérica en niños y adolescentes en función de la edad y el sexo.

Adaptado de Nathan DG, et al. *Hematology of Infancy and Childhood*, 1993<sup>125</sup>.

La determinación de la Hb como indicador del estado de hierro corporal tiene el inconveniente de que es un marcador tardío del déficit de hierro, y no detecta estados más precoces de ferropenia latente o eritropoyesis ferropénica, por lo que no se recomienda como determinación única, aunque sí es imprescindible para una valoración adecuada, puesto que ofrece información sobre la severidad del déficit de hierro<sup>126</sup>.

### Hematocrito

El hematocrito (Hto) es la fracción del volumen de la masa eritrocitaria respecto del volumen sanguíneo total, y se expresa como un porcentaje. Al igual que la Hb, es indicativo de anemia cuando disminuye por debajo de 2 DS de los valores considerados normales, puesto que indica que hay una disminución de la cantidad de hematíes circulantes y/o su volumen. Sus valores también dependen de la edad y el sexo entre otras variables. Tabla IV.

Hto (%)	1-3 días	14 días	1 mes	2 meses	3-6 meses	6-24 meses	2-6 años	6-12 años	Mujer 12-18 años	Varón 12-18 años
Media	56	51	43	35	35	36	40	40	41	43
-2 DS	45	39	31	28	29	33	35	35	36	37

Tabla IV. Valores del hematocrito en niños y adolescentes en función de la edad y el sexo.

Adaptado de Nathan DG, et al. *Hematology of Infancy and Childhood*, 1993<sup>125</sup>.

### Volumen corpuscular medio

El volumen corpuscular medio (VCM) indica el tamaño medio de los hematíes circulantes. Se expresa en femtolitros (fl) y puede determinarse con un contador automatizado u obtenerse mediante la fórmula (Hto (%)/ número de hematíes x 10<sup>12</sup>/L) x 10. En la anemia ferropénica está descendido con respecto a los valores considerados normales para la edad y el sexo (tabla V), ya que una de las manifestaciones del déficit de hierro durante la síntesis del hematíe es la disminución de su tamaño, aunque un valor bajo no es necesariamente indicativo de ésta. Existen otras causas por las que puede hallarse descendido, entre ellas la talasemia, la intoxicación por plomo, las infecciones o un estado inflamatorio crónico<sup>126</sup>.

Se han propuesto múltiples índices que intentan discernir la ferropenia y la talasemia<sup>127</sup>. Entre ellos se encuentra el Índice de Mentzer, que relaciona el VCM con el número de hematíes circulantes: Índice de Mentzer = VCM (fl) / hematíes ( $10^6/\mu\text{l}$ ). Cuando éste es mayor de 13, es más probable que la microcitosis se deba a ferropenia que a una talasemia, puesto que en la primera la médula ósea produce menos hematíes y más pequeños, mientras que en la talasemia el número de hematíes se haya conservado, a pesar de que el tamaño de éstos esté disminuido<sup>128</sup>.

VCM (fl)	1-3 días	14 días	1 mes	2 meses	3-6 meses	6-24 meses	2-6 años	6-12 años	Mujer 12-18 años	Varón 12-18 años
Media	108	105	104	96	91	78	81	86	90	78
-2 DS	95	86	85	77	74	70	75	77	88	78

Tabla V. Valores del VCM en niños y adolescentes en función de la edad y el sexo. Adaptado de Nathan DG, et al. *Hematology of Infancy and Childhood*, 1993<sup>125</sup>.

### Hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media

La hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHMH) hacen referencia a la cantidad de hemoglobina que contienen los eritrocitos. La primera señala la cantidad media de hemoglobina presente en el hematíe, se mide en picogramos (pg) y se puede calcular mediante la fórmula: HCM = Hb (g/dl) / hematíes ( $10^6/\mu\text{l}$ ). La segunda indica la cantidad de hemoglobina que hay en un volumen determinado de eritrocitos, se mide en g/dl y se calcula mediante la fórmula: CHMH = Hb (g/dl) / Hto (%) x 100.

Cuando están descendidas indican hipocromía y ambas son sugestivas de ferropenia, aunque no son exclusivas de ésta, ya que pueden ser bajas también en la anemia de las enfermedades crónicas, la anemia sideroblástica y algunas hemoglobinopatías<sup>129</sup>.

Sus valores normales también varían con la edad, están recogidos en las tablas VI y VII respectivamente.

HCM (pg)	1-3 días	14 días	1 mes	2 meses	3-6 meses	6-24 meses	2-6 años	6-12 años	12-18 años
<b>Media</b>	34	34	34	30	30	27	27	29	30
<b>-2 DS</b>	31	28	28	26	25	23	24	25	25

Tabla VI. Valores HCM en niños y adolescentes en función de la edad.  
Adaptado de Nathan DG, et al. *Hematology of Infancy and Childhood*, 1993<sup>125</sup>.

CHCM (g/dl)	1-3 días	14 días	1 mes	2 meses	3-6 meses	6-24 meses	2-6 años	6-12 años	12-18 años
<b>Media</b>	33	33	33	33	33	33	34	34	34
<b>-2 DS</b>	30	28	29	29	30	30	31	31	31

Tabla VII. Valores CHCM en niños y adolescentes en función de la edad.  
Adaptado de Nathan DG, et al. *Hematology of Infancy and Childhood*, 1993<sup>125</sup>.

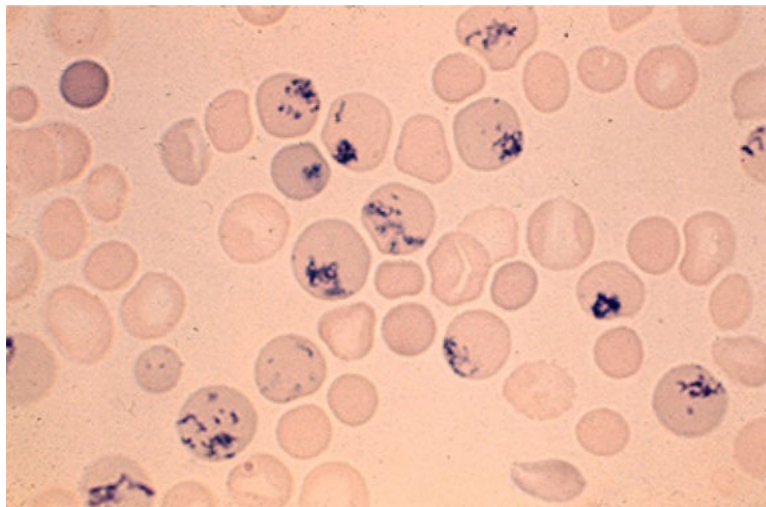
### Amplitud de distribución eritrocitaria

La amplitud o ancho de distribución eritrocitaria (ADE) es una medida de la variabilidad en el tamaño de los hematíes, y por tanto de anisocitosis. Se calcula según la fórmula:  $DS \text{ del volumen de los hematíes (fl)} / VCM \text{ (fl)} \times 100$ . Se considera elevado cuando es mayor del 14%<sup>130</sup>.

El tamaño habitual del hematíe es de 6-8 micrometros ( $\mu\text{m}$ )<sup>129</sup>. En condiciones de déficit de hierro, ácido fólico o vitamina B12, este tamaño no permanece estable, sino que se liberan eritrocitos a sangre periférica más o menos grandes, dependiendo de la causa subyacente. Por ello generalmente la ADE se utiliza en combinación con el VCM para orientar la etiología de las anemias. En situaciones de microcitosis, en las que el VCM es bajo, un ADE elevado es sugestivo de ferropenia<sup>130</sup>, ya que las talasemias producen menor variación en el tamaño de los hematíes que la eritropoyesis ferropénica.

## Reticulocitos

Los reticulocitos son los hematíes más jóvenes en circulación. Durante la hematopoyesis, cuando el eritroblasto pierde su núcleo, la célula se convierte en un reticulocito, que generalmente permanece en la médula ósea durante 2-3 días, hasta que es liberado a la circulación sanguínea, donde completa su maduración en aproximadamente un día. Durante este proceso disminuirá su volumen; presentará cambios en su membrana citoplasmática que le darán la forma de disco bicóncavo característica del hematíe, y eliminará los ribosomas, mitocondrias y vesículas endoplásmicas que lo diferencian de la célula sanguínea madura<sup>131</sup> (Figura 6).



---

*Figura 6. Reticulocitos con ARN ribosómico teñido de azul en el citoplasma celular. Se observa también su mayor tamaño con respecto a los hematíes maduros. Tomado de Means RT, et al. Diagnostic approach to anemia in adults. Disponible en: [uptodate.com](http://uptodate.com). Actualizado el 9 de abril de 2021. Accedido el 3 de junio de 2021<sup>132</sup>.*

---

En circunstancias en las que la eritropoyesis está incrementada, un mayor número de reticulocitos son liberados a sangre periférica. La producción de reticulocitos puede aumentar hasta 20 veces, y este incremento se acompaña de una liberación más precoz desde la médula ósea, de forma que se alarga el tiempo en el que el reticulocito madura en sangre periférica y por tanto su circulación<sup>131</sup>.

El recuento de reticulocitos absoluto en condiciones normales es de 25.000-100.000/ $\mu$ l de sangre. Se puede expresar porcentualmente con respecto a los hematíes circulantes, y los valores normales serían de 0.5-2%. Sin embargo, este porcentaje está condicionado por la cantidad de eritrocitos, que está disminuido en el caso de anemia, por lo que para no realizar interpretaciones erróneas es más adecuado corregirlo con respecto al hematocrito, mediante la fórmula: % reticulocitos corregido = reticulocitos (%) x (Hto paciente/Hto normal para la edad). También puede calcularse el Índice de Producción Reticulocitaria (IPR), que tiene en cuenta además la mayor vida media del reticulocito en condiciones de eritropoyesis aumentada, mediante la fórmula: IPR = Reticulocitos corregidos (%) / Vida media del reticulocito (días); donde el denominador está determinado por el hematocrito del paciente, recogido en la tabla VIII. El valor normal del IPR es de 2-3<sup>70</sup>.

Hematocrito (%)	Vida media reticulocito (días)
45	1
35	1.5
25	2
15	2.5

---

*Tabla VIII. Vida media de los reticulocitos en sangre periférica en función del hematocrito.*

*Adaptado de Hernández Merino A. Anemias en la infancia y adolescencia. Clasificación y diagnóstico. Pediatr Integral 2012<sup>70</sup>.*

---

Una cifra incrementada de reticulocitos indica una situación en la que la médula ósea puede afrontar la recuperación de una anemia existente, como sucede tras las hemorragias, los episodios agudos de hemólisis en recuperación, o tras la administración de quimioterapia o agentes estimuladores de la eritropoyesis. En estadios avanzados de anemia ferropénica, por el contrario, no hay hierro biodisponible para soportar el aumento de la demanda, por lo que habitualmente las cifras de reticulocitos y el IPR son normales o bajos.

La automatización del recuento reticulocitario ha permitido no sólo incrementar la precisión del mismo, sino determinar otras características como su volumen, la cantidad de ARN ribosomal o el contenido y la concentración de hemoglobina que

presentan. Estas determinaciones se denominan índices reticulocitarios, y entre ellos se encuentra la fracción de reticulocitos inmaduros (IRF por sus siglas en inglés, *Inmature Reticulocyte Fraction*), el volumen reticulocitario (VCMr), la concentración corpuscular media de hemoglobina reticulocitaria (CHCMr) y el contenido de hemoglobina reticulocitaria (CHR). De todos ellos, este último es el que ha demostrado mayor utilidad clínica, y es objeto de un análisis más exhaustivo en apartados posteriores de este trabajo.

### 3.1.2. Parámetros bioquímicos.

#### Ferritina plasmática

Como se describió previamente, la ferritina es una molécula especializada en el almacén y depósito de hierro que se encuentra en la mayoría de los tejidos en el interior celular, fundamentalmente en el citosol. Cada molécula de ferritina puede contener hasta 4.000-4.500 átomos de hierro. Sin embargo, existe una pequeña fracción que es relativamente pobre en hierro que es liberada por los macrófagos y los hepatocitos a plasma, donde ejerce como su transportador<sup>133</sup>.

La concentración de ferritina presente en el plasma se correlaciona estrechamente con los depósitos de hierro, por lo que se considera la herramienta más útil en su valoración. Los cambios en la concentración de ferritina sérica desde el nacimiento hasta la vejez reflejan las modificaciones en el hierro tisular, paralelamente a los cambios en su metabolismo. Al nacimiento la ferritina sérica es alta, desciende progresivamente durante la infancia para ascender posteriormente durante la adolescencia hasta la edad adulta, más en los varones. Las cifras de ferritina, por tanto, son más bajas en la infancia y la adolescencia y las mujeres en edad reproductiva<sup>134</sup>.

Los valores normales habitualmente se sitúan entre 15-300 µg/L, y en condiciones de ferropenia disminuyen por debajo de los 12 µg/L. En niños en edad preescolar, basándose en estudios epidemiológicos, se consideran normales valores incluso más bajos, de hasta 10 µg/L<sup>75</sup>.

La ferritina presenta la limitación como estimador de los depósitos de hierro de que se comporta como un reactante de fase aguda, incrementándose por las infecciones, la inflamación, las neoplasias o la enfermedad hepática, ya que además en estas situaciones patológicas, no se produce una adecuada regulación del flujo de hierro en el organismo<sup>133</sup>. Por ello se propone frecuentemente utilizarla en combinación con la



Proteína C reactiva (PCR) u otro marcador inflamatorio que permita discernir estas situaciones en las que disminuye su sensibilidad. En sentido contrario, sin embargo, presenta una excelente especificidad, puesto que no hay condiciones patológicas que conduzcan a la hipoferritinemia salvo el déficit de hierro<sup>126</sup>.

### **Hierro sérico**

El hierro sérico o sideremia es la parte del hierro presente en el organismo que circula en sangre periférica, casi en su totalidad unido a la transferrina. Es hierro en tránsito que es desplazado de unos tejidos a otros, y permanece en circulación durante un tiempo limitado, normalmente entre 40 y 50 minutos. La mayoría procede del metabolismo de los hematíes en el SRE, y alrededor de un 80% es captado por los eritroblastos en la médula ósea. Se trata de un circuito muy dinámico en el que la concentración de hierro varía ostensiblemente en función de la tasa de síntesis de nuevos eritrocitos, además de en situaciones menos frecuentes que aumentan la demanda, como la reperfusión sanguínea, el daño tisular, las pérdidas sanguíneas o la prematuridad. En sentido contrario, el hierro sérico aumenta tras la ingesta debido a la absorción del mismo en los enterocitos, que lo trasladan a sangre periférica para su utilización y/o almacenaje<sup>126</sup>. También existen variaciones circadianas, con concentraciones más elevadas por la mañana<sup>75</sup>.

La sideremia es, además, muy sensible a la inflamación y la infección, ya que citoquinas como la IL-2, IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$  son potentes estímulos para el desplazamiento del hierro sérico a los depósitos de los macrófagos. El tiempo en el que esta situación se revierte es variable de unos individuos a otros y en función de la duración del desencadenante en sí mismo<sup>126</sup>.

La concentración de hierro sérico se mide en  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , y los valores normales se consideran comprendidos entre 50 y 120  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . No obstante, por lo comentado anteriormente, en cualquier individuo se dan fluctuaciones a lo largo de un mismo día y en diferentes días, estimadas ambas en un 10-20%<sup>135</sup>, y a su vez existen variaciones entre individuos, por lo que la medición aislada de la sideremia no se considera una herramienta adecuada para establecer el estado de hierro corporal<sup>130</sup>.

### **Capacidad total de fijación del hierro**

La transferrina es el transportador específico del hierro en el torrente sanguíneo, procedente de la absorción intestinal, del catabolismo de la hemoglobina o de los depósitos tisulares, hasta su cesión principalmente a los eritroblastos en la médula ósea

o a las células de depósito para su almacenaje. Se produce a nivel hepático cuando los depósitos de hierro de los hepatocitos disminuyen, y a cada molécula pueden unirse dos de hierro.

La capacidad total de fijación del hierro (CTFH), o TIBC por sus siglas en inglés, *total iron binding capacity*, es una medida de la capacidad de unión del hierro a la transferrina, e indica la cantidad de lugares de unión del hierro a la transferrina que hay disponibles por unidad de volumen de plasma, y se mide en µg/dl. La CTFH aumenta, por tanto, cuando la sideremia y los depósitos de hierro son bajos, y disminuye cuando la sideremia es elevada y los depósitos están repletos<sup>126</sup>. Existe también cierta variación a lo largo del día y de un día a otro en el mismo individuo, pero éstas son menores que en el caso del hierro sérico, y están estimadas en menos del 5% y del 8 al 12% respectivamente<sup>135</sup>.

En la infancia, valores de CTFH mayores de 460-480 µg/dl son sugestivos de déficit de hierro. No obstante, es una medida poco sensible, porque sus niveles se incrementan cuando los depósitos de hierro ya están deplecionados. También hay otros factores que pueden influir en sus niveles, como son la inflamación, la infección, tumores malignos, la enfermedad hepática, las situaciones de hipoproteinemia (síndrome nefrótico, malnutrición, etc.) o el uso de anticonceptivos orales<sup>130</sup>.

### **Índice de saturación de la transferrina**

El índice de saturación de la transferrina (IST), de forma inversa, estima el porcentaje de sitios de unión a la transferrina ocupados por átomos de hierro, es decir, un IST bajo indica que hay muchos sitios de unión libres. Se expresa como un porcentaje y se calcula según la fórmula:  $IST (\%) = \text{Hierro sérico } (\mu\text{g/dl}) / \text{CTFH } (\mu\text{g/dl}) \times 100$ .

En edad escolar y la adolescencia se consideran normales valores mayores del 14%<sup>97</sup>. Es una medida del suministro de hierro a los tejidos, y cuando está descendido es un indicador de déficit de hierro funcional, pero presenta el inconveniente de que las circunstancias que influyen en la sideremia y la CTFH afectan también al IST.

### **Protoporfirina eritrocitaria**

En la síntesis del grupo hemo de la hemoglobina, el paso final es la incorporación del átomo de hierro al anillo protoporfirínico en los precursores eritroides de la médula ósea. En este último paso pueden unirse moléculas de Zinc (Zn) en lugar de hierro, y la molécula generada se denomina protoporfirina-Zinc (ZPP). Esto ocurre en escasas ocasiones, y la ratio habitual de hierro y Zn unidos a protoporfirina es de 30.000:1.

Cuando no hay hierro biodisponible para ser incorporado a la protoporfirina, se produce una mayor unión del Zn, por lo que aumenta la cantidad de ZPP<sup>126</sup>.

La protoporfirina eritrocitaria libre (PEL) es la ZPP liberada químicamente del átomo de Zn. Dado que la cantidad de PEL con respecto a ZPP en sangre periférica es muy pequeña, menor del 5%, habitualmente se considera que la medición de ZPP y PEL tras la liberación del átomo de Zn son intercambiables bajo la denominación protoporfirina eritrocitaria (PE)<sup>136</sup>. Se expresa como µg/dl de sangre total o µg/dl de hematíes. A partir de edad escolar se considera que se encuentra en rango de normalidad cuando su valor es inferior a 70 µg/dl de hematíes.

El aumento de las concentraciones de PE es uno de los primeros indicadores de eritropoyesis ferropénica. Este incremento es proporcional al déficit de hierro y a la tasa de eritropoyesis. Presenta la ventaja de que fluctúa menos que otras determinaciones como la sideremia o el IST, aunque también puede elevarse por circunstancias ajenas a la ferropenia, como la inflamación, la infección, enfermedades hepáticas o la intoxicación por plomo<sup>137</sup>.

### 3.2. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE FERROPENIA

Como mencionamos previamente, cuando hay un déficit de hierro en el organismo se suceden distintas etapas hasta que se afecta la síntesis de hemoglobina y ocurre la anemia ferropénica. Los parámetros diagnósticos de ferropenia se alteran progresivamente también mientras se suceden estos estadios de déficit de hierro, conforme se van afectando los compartimentos del hierro. En la tabla IX se encuentran resumidos los parámetros alterados en cada fase.

Parámetros	Normal	Ferropenia latente	Eritropoyesis ferropénica	Anemia ferropénica
Hemoglobina	N	N	N	↓
Hematocrito	N	N	N	↓
VCM	N	N	N	↓
HCM	N	N	N	↓
ADE	N	N	N	↑
Ferritina	N	↓	↓	↓
Hierro sérico	N	N	↓	↓
IST	N	N	↓	↓
PE	N	N	↑	↑

Tabla IX. Parámetros analíticos en las distintas etapas del déficit de hierro.

N: normal; ↓: descendido; ↑: aumentado.

Adaptado de Camaschella C. Iron-deficiency anemia. *N Engl J Med* 2015<sup>138</sup>.

Para el diagnóstico de estos distintos estadios del déficit de hierro, se utilizan los parámetros analíticos en combinación, de forma que aumenta su rentabilidad diagnóstica. Existe variabilidad en los parámetros empleados en función de la disponibilidad, accesibilidad y los estudios epidemiológicos realizados, pero los que clásicamente han sido más utilizados para optimizar la información conjunta que ofrecen son: la ferritina sérica, el VCM, el IST, la PE y la Hb. En las distintas etapas de ferropenia se afectarían del siguiente modo:

- Ferropenia latente. Disminución de la ferritina.
- Eritropoyesis ferropénica. Al menos dos de los siguientes: ferritina disminuida, IST disminuido y/o PEL elevada, o en su defecto, VCM bajo.

- Anemia ferropénica. Hb baja junto con las alteraciones descritas en la eritropoyesis ferropénica.

En la última fase, la de anemia ferropénica, la anemia se define como un valor de Hb menor de 2 DS para la edad y el sexo. Por tanto, dado que los valores considerados normales varían en función del sujeto estudiado, también lo hacen los que definen la severidad de la anemia. En la tabla X se muestran los valores de Hb para distintas edades y sexos en función de la gravedad de la anemia según la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>139</sup>.

Población	Normal	Anemia leve	Anemia moderada	Anemia severa
<b>6 meses - 4 años</b>	≥11.0	10.0-10.9	7.0-9.9	< 7
<b>5-11 años</b>	≥11.5	11.0-11.4	8.0-10.9	< 8
<b>12-14 años</b>	≥12.0	11.0-11.9	8.0-10.9	< 8
<b>Mujeres ≥ 15 años</b>	≥12.0	11.0-11.9	8.0-10.9	< 8
<b>Varones ≥ 15 años</b>	≥13.0	12.0-12.9	8.0-10.9	< 8

Tabla X. Niveles de hemoglobina en distintos estadios de severidad de anemia expresados en g/dl.

Adaptado de López A, et al. Iron-deficiency anemia. Lancet 2016<sup>140</sup>.

El diagnóstico de ferropenia es complejo, entre otros motivos, por la ausencia de un *gold standard* accesible y proporcionado, la disponibilidad de distintos parámetros con sensibilidad y especificidad subóptimas y la variabilidad en los criterios utilizados en distintos estudios. En este contexto, la búsqueda de nuevas herramientas que permitan superar estas dificultades ha conducido al estudio de nuevos parámetros analíticos, concretamente el RsTf y el CHr, que como veremos en profundidad más adelante, han aportado información relevante para la valoración de la ferropenia en niños y adultos.

## 4. EPIDEMIOLOGÍA DEL DÉFICIT DE HIERRO EN LA ADOLESCENCIA

### 4.1. PREVALENCIA A NIVEL MUNDIAL

La anemia puede tener múltiples causas, y aunque frecuentemente coexisten varias en un mismo individuo, por déficits nutricionales, ya sea de hierro, ácido fólico, vitamina B12, vitamina A, riboflavina, etc., hemoglobinopatías, pérdidas sanguíneas por diversos motivos, infecciones, u otras; el déficit de hierro es el principal contribuyente a la anemia a nivel global, tanto es así, que incluso frecuentemente anemia y anemia ferropénica se emplean como términos indistintos<sup>141</sup>.

Globalmente, la anemia afecta a 1.620 millones de individuos, lo que se corresponde con el 25% de la población mundial aproximadamente<sup>142</sup>. Sin embargo, la distribución no es homogénea en cuanto a las distintas regiones, pero tampoco en las diferentes edades de la vida. La prevalencia más elevada de anemia se encuentra en los niños en edad preescolar, y es estimada por la OMS en hasta un 42.6%, mientras que el grupo menos afectado son los varones adultos, con una prevalencia del 12.7%. No obstante, el grupo con un mayor número absoluto de individuos afectados son las mujeres en edad reproductiva (15-49 años), con 528.7 millones estimadas por la OMS en 2011<sup>143</sup>.

África, el Sureste Asiático y Europa del Este son las regiones del mundo con una hemoglobina media más baja y una prevalencia mayor de anemia, con más de la mitad de los niños afectados en el caso de las dos primeras (Figuras 7 y 8).

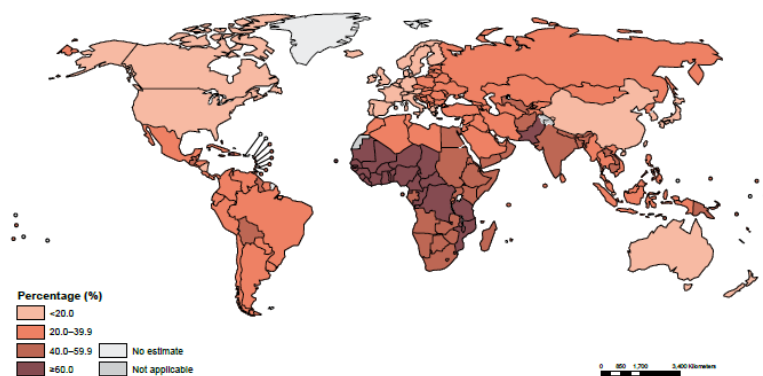


Figura 7. Prevalencia de anemia en niños entre 6-59 meses.

Tomado de World Health Organization. *The Global Prevalence of anaemia in 2011*. Geneva: World Health Organization, 2015<sup>143</sup>.

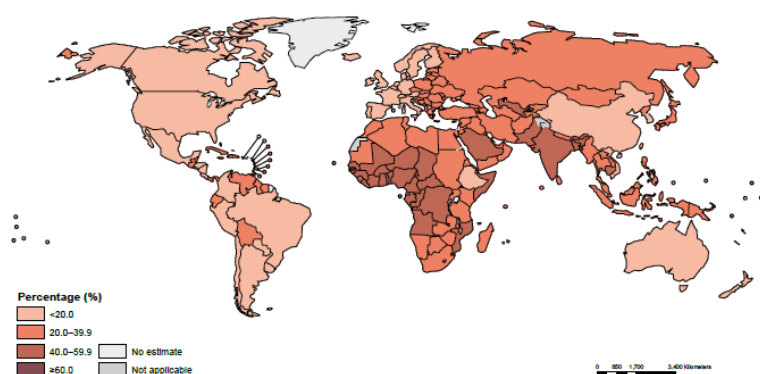


Figura 8. Prevalencia de anemia en mujeres de 15 a 49 años. Tomado de World Health Organization. *The Global Prevalence of anaemia in 2011*. Geneva: World Health Organization, 2015<sup>143</sup>.

No obstante, los datos sobre la prevalencia de anemia en los adolescentes como grupo de riesgo son escasos, a pesar de que la anemia ferropénica está reconocida como una de las principales causas de años vividos con discapacidad (DALY por sus siglas en inglés: *Disability Adjusted Life Years*), a nivel mundial en los chicos de 10 a 14 años y en las chicas de 10 a 19 años<sup>4</sup>, y lo es tanto en países en vías de desarrollo como en países industrializados, aunque la carga de enfermedad es mayor en los primeros<sup>5</sup>.

En América Latina y los países del Caribe, la prevalencia de anemia en adolescentes en los países con datos nacionales poblacionales oscila entre el 5.6% de Méjico y el 30.9% de la República Dominicana<sup>144</sup>. En Ecuador se estima en un 7%, en Colombia en el 10.6% y en Jamaica en un 25%. Además, se considera que probablemente esta prevalencia sea mucho mayor en áreas rurales que en las áreas urbanas<sup>85</sup>. Sin embargo, no hay datos poblacionales sobre la prevalencia de ferropenia en adolescentes.

En Asia hay datos poblacionales publicados relativos a la prevalencia de anemia en adolescentes en la India, en la cual alcanza cifras de hasta el 44.8% en chicas de áreas rurales<sup>145</sup>; Indonesia, con prevalencias que oscilan entre el 25.8% en chicas y 12.1% en varones puberales, con diferencias en todos los grupos en función del nivel socioeconómico<sup>146</sup>; Nepal, con una prevalencia del 31% global en adolescentes de 10 a 19 años, del 38% en chicas y del 24% en chicos<sup>147</sup>; China, con una prevalencia en

adolescentes de 10 a 14 años del 11.7%<sup>148</sup>, y Pakistán, con una cifra estimada en adolescentes del 39%<sup>149</sup>. Los datos relativos a la ferropenia también son muy escasos.

En Arabia Saudí la prevalencia de anemia en la población de 12 a 14 años es del 20.6% y del 24.6% entre los 15 y 21 años, aunque en esta franja de edad oscila entre el 16 y el 34%. Si focalizamos en los adolescentes de 13 a 18 años, los varones tienen una prevalencia media del 16.7%, mientras que las chicas del 34.2%<sup>150</sup>.

En África los datos relativos a los adolescentes provienen de estudios locales más que de estudios poblacionales a gran escala. En Tanzania se ha estimado la prevalencia de anemia en adolescentes mujeres en un 14.5%, y en chicos en un 7.9%<sup>151</sup>. Un estudio en chicas de edades comprendidas entre los 14 y los 16 años en Benín halló una prevalencia de anemia del 43%<sup>152</sup>. En un campo de refugiados de Kenia, se determinó una prevalencia de anemia del 46% entre los adolescentes, y del 43% de ferropenia<sup>153</sup>. En Etiopía, un estudio realizado en mujeres de 15 a 24 años halló una prevalencia de anemia del 21.7%, aunque esta era notablemente mayor en algunas áreas rurales (hasta del 56.8% en una región denominada Ogadén)<sup>154</sup>. En Egipto hay estudios que estiman la prevalencia de anemia entre los adolescentes entre un 35 y un 40%, con una prevalencia de ferropenia del 47.4%, de anemia ferropénica del 30.2% y de ferropenia sin anemia del 11.4%<sup>150</sup>.



## 4.2. PREVALENCIA EN PAÍSES INDUSTRIALIZADOS

En los países industrializados, la prevalencia de anemia ferropénica oscila entre el 3% y el 20%, dependiendo de la edad y el sexo, pero distintos datos han sido publicados en función del país.

En Estados Unidos, la prevalencia de anemia ferropénica en varones de 12 a 15 años es del 5%, mientras que en chicas de la misma edad es del 9%, y en las chicas entre 16 y 19 años este porcentaje aumenta al 16%<sup>2</sup>. En Canadá, un estudio en adolescentes de 13 a 19 años determinó una prevalencia de anemia del 3.5% en chicas, con un 6% de ellas en situación de ferropenia, mientras que ningún varón se encontraba anémico<sup>155</sup>. Un estudio nacional de la población de 3 a 79 años corroboró estos datos con unas cifras similares en los adolescentes de 12 a 19 años, de los cuales sólo un 0,2% de los varones presentaba anemia y un 1.3% ferropenia, mientras que en las chicas la prevalencia de anemia era del 3.7% y de ferropenia del 9.1%<sup>3</sup>.

En Europa disponemos de los datos del estudio HELENA (*Healthy Lifestyle by Nutrition in Adolescence*), un proyecto financiado por la Comisión Europea que tiene como objetivo la valoración del estado nutricional de los adolescentes europeos. En él se analizó el estado del hierro corporal de 987 adolescentes entre 12 y 18 años de 10 ciudades europeas. La prevalencia global de ferropenia fue del 24.8% y de anemia ferropénica del 1.3%. En chicos la prevalencia de eritropoyesis ferropénica, determinada mediante la asociación de valores bajos de ferritina y elevados del RsTf, fue del 17.7%, mientras que en las chicas fue del 26.4%, y la prevalencia de anemia ferropénica del 0.5% y el 2% respectivamente<sup>6</sup>.

Hay estudios anteriores de la década de los 90 de distintos países europeos. En Suecia se halló una prevalencia de ferropenia, definida como hipoferritinemia, de hasta el 40% en chicas y el 15% en chicos de entre 15 y 16 años<sup>1,156</sup>. En Dinamarca se estimó una prevalencia de depleción de los depósitos de hierro del 13% en varones y 18% en chicas adolescentes<sup>157</sup>. En Noruega, un estudio halló una prevalencia de anemia del 4% en chicas y el 8% en chicos de 14-15 años, con ferropenia latente en el 25 y 30% respectivamente<sup>158</sup>.

En Irlanda, un estudio en chicas de entre 14 y 19 años determinó una prevalencia de anemia ferropénica del 7%, con un 43% de las chicas estudiadas en situación de depleción de los depósitos<sup>159</sup>. En otro trabajo del Reino Unido en adolescentes entre 12 y 14 años, el 3.5% y 10.5% de los chicos y chicas presentaban anemia respectivamente.

No obstante, sólo en un 0.1% de los varones y un 4% de las mujeres hallaron cifras bajas de ferritina<sup>160</sup>.

En países del Sur de Europa, un estudio en el que se incluyeron chicas adolescentes de Francia e Italia, mostró una prevalencia de anemia ferropénica y ferropenia latente en chicas francesas de 14 a 18 años del 7.7% y 15.4% respectivamente; y una prevalencia de depleción de los depósitos en chicas italianas de 11 a 15 años del 11.5%<sup>1</sup>.

La variabilidad en los resultados obtenidos en los distintos estudios puede atribuirse a múltiples factores: distintos criterios de selección de la población a estudio, momento histórico y variabilidad en la implantación de distintas medidas nutricionales gubernamentales, diversidad en la metodología, los criterios diagnósticos establecidos y valores *cut-off*, etc.

### 4.3. PREVALENCIA EN ESPAÑA

En España se han llevado a cabo pocos estudios focalizados en determinar la prevalencia de ferropenia y de anemia ferropénica en los adolescentes.

Una de las ciudades europeas que fueron incluidas en el estudio HELENA fue Zaragoza. En los adolescentes españoles que participaron, hubo una prevalencia de ferropenia latente del 9.6%, de anemia del 1.4%, y ninguno de ellos presentó anemia sin ferropenia<sup>6</sup>.

En un estudio realizado en el País Vasco, se halló una prevalencia de anemia en los adolescentes del 5.3% en varones y del 2.7% en chicas<sup>161</sup>, pero no se determinó si la causa era el déficit de hierro o de otra índole. Un trabajo llevado a cabo en Cantabria en niños de 6 a 14 años en la década de los años 80, en el subgrupo de adolescentes de 12 a 14 años halló una prevalencia de depleción de los depósitos de hierro del 20% en varones y del 11.8% en las niñas, y de eritropoyesis ferropénica del 1.8% en los primeros y el 5.5% en las segundas, sin ningún caso de anemia ferropénica, si bien el número de sujetos incluidos era algo bajo (109 sujetos en este subgrupo de edad)<sup>162</sup>.

Un estudio más reciente realizado en una Zona Básica de Salud de Navarra analizó la prevalencia de ferropenia en sus distintos estadios en adolescentes de 10 a 14 años, que fue globalmente del 8.6% en varones y el 12.6% en las chicas. Se estimó una prevalencia de ferropenia latente del 2.2% en varones y 6.3% en mujeres; de deficiencia de hierro manifiesta, definida por una ferritina sérica disminuida y un IST y/o VCM bajos del 3.2% en chicos y 3.6% en chicas, y de anemia ferropénica del 3.2% y 2.7% respectivamente<sup>163</sup>.

En nuestro medio son necesarios estudios más recientes con una muestra amplia y representativa de la población, que permitan discernir la prevalencia real de ferropenia en una etapa de la vida tan vulnerable como es la adolescencia. La prevalencia de déficit de hierro puede haberse visto afectada por los cambios de hábitos de vida que ha sufrido la población en general en las últimas décadas, pero probablemente estos cambios hayan afectado de forma más acusada a los adolescentes en particular.

## **Ib. NUEVOS PARÁMETROS ANALÍTICOS**

---

En los últimos años se han desarrollado nuevos parámetros diagnósticos que permiten detectar la depleción férrica en momentos tempranos, y que están menos influidos por circunstancias externas al contenido de hierro corporal, como las situaciones de inflamación. Estos parámetros son, entre otros, el RsTf, el índice RsTf-F y el contenido de hemoglobina CHr<sup>123,164,165</sup>.

Los valores de referencia de los parámetros analíticos son la base sobre la que se sustenta su utilidad para la interpretación de los resultados y su aportación al diagnóstico clínico. Sin embargo, como hemos visto anteriormente, los parámetros hematológicos y bioquímicos sufren variaciones a lo largo del crecimiento y el desarrollo, lo cual unido a la escasez de pruebas que se realizan en niños y adolescentes sanos, con edades dispares, condiciona que en ocasiones el rango de normalidad en determinadas poblaciones, como los adolescentes, aún se encuentre en estudio, lo cual es objeto de este trabajo.

A continuación se detallan las características, utilidad clínica, limitaciones y valores de referencia establecidos para cada uno de ellos.

## 1. CONTENIDO DE HEMOGLOBINA RETICULOCITARIA

### 1.1. CARACTERÍSTICAS Y REGULACIÓN

En la médula ósea, las células madre hematopoyéticas se diferencian sucesivamente en progenitores eritropoyéticos, proeritroblastos, eritroblastos y reticulocitos, y éstos son liberados a sangre periférica, donde continúan su transformación hasta formar el eritrocito maduro. La síntesis de hemoglobina comienza en el proeritroblasto, pero ocurre principalmente la fase de eritroblasto, hasta que se alcanza un acúmulo suficiente de hemoglobina en el eritroblasto ortocromático. En este momento ocurre la enucleación de la célula, que pasa a ser un reticulocito<sup>166</sup> (Figura 9). Estos precursores eritroides sintetizan la hemoglobina en los ribosomas y mitocondrias, e incluso el reticulocito, a pesar de haber eliminado el núcleo celular, al conservar estas organelas, tiene cierta capacidad de síntesis de hemoglobina<sup>167</sup>.

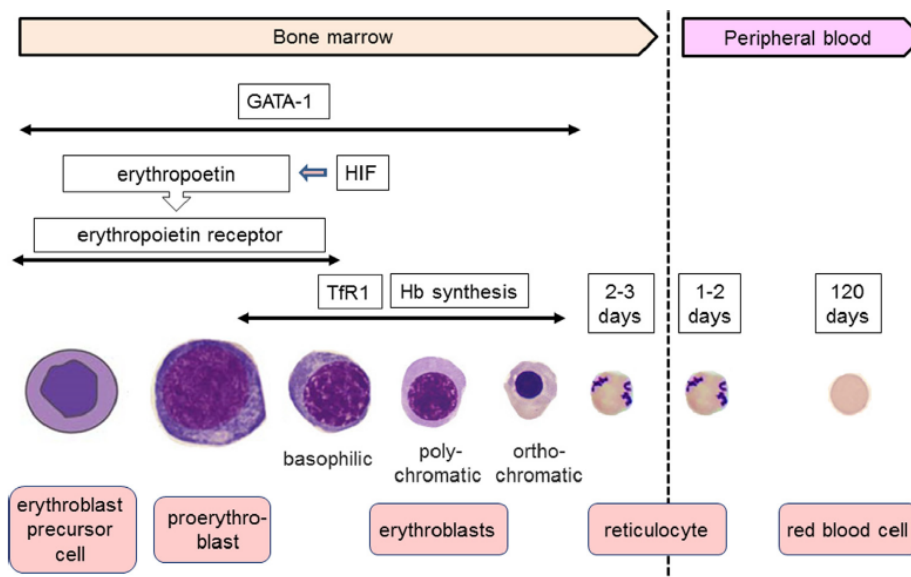


Figura 9. Maduración y síntesis de Hb de las células eritroides y factores implicados. Tomado de Ogawa C, et al. Reticulocyte hemoglobin content. Clin Chim Acta 2020<sup>166</sup>.

Si ha habido un aporte suficiente de hierro durante este proceso, el reticulocito contendrá una cantidad adecuada de hemoglobina, que podrá estimarse mediante la determinación del CHR.

El volumen y la concentración de hemoglobina de los reticulocitos son medidos en el laboratorio por contadores hematológicos automatizados, mediante el análisis de la dispersión de la luz proyectada sobre ellos en dos ángulos distintos<sup>168</sup>. El CHr es el producto de estas dos medidas. El CHr se considera una medida más estable que la CHCMr, dado que conforme el reticulocito madura en su transformación a eritrocito, su volumen disminuye y aumenta la CHCMr<sup>167</sup>.

El principal regulador de la eritropoyesis es la EPO, que es una citoquina sintetizada en su mayor parte en las células peritubulares renales en respuesta a la hipoxia, a través de la producción de HIF-1<sup>169</sup>. Cuando se une a su receptor en los precursores eritroides, estimula su expansión y diferenciación. Además, en los distintos pasos de la hematopoyesis intervienen múltiples factores de crecimiento y de transcripción, algunos de los cuales, como GATA-1, también están relacionados con la síntesis de hemoglobina<sup>170</sup>.

## **1.2. UTILIDAD CLÍNICA**

### **1.2.1. CHr como marcador temprano de eritropoyesis ferropénica.**

La medición del CHr se considera un indicador precoz de la eritropoyesis ferropénica. Dado que la vida media del reticulocito es baja, de 3-4 días, la cantidad de hemoglobina que éste contiene es una medida no demorada de la hemoglobina sintetizada, y, por tanto, del hierro disponible para la eritropoyesis; a diferencia de los índices del eritrocito maduro, cuya vida media en sangre periférica es de 120 días aproximadamente, y por tanto reflejan la síntesis de hemoglobina que ha acontecido durante un periodo más prolongado<sup>166</sup>. Por ello, en situaciones en las que resulta interesante una detección precoz de la ferropenia, el CHr puede ser un parámetro de gran utilidad.

### **1.2.2. CHr en el déficit de hierro funcional.**

El diagnóstico del déficit de hierro es especialmente complicado en las situaciones de inflamación, tanto aguda como crónica, ya que como hemos revisado anteriormente los parámetros clásicamente utilizados para valorar los depósitos de hierro y su disponibilidad para la eritropoyesis, como la ferritina o el IST, actúan como reactantes de fase aguda, de forma que no reflejan fidedignamente si hay un déficit de hierro, sea cuantitativo o funcional. Sin embargo, el CHr en estas situaciones sí constituye un marcador de déficit de hierro funcional, ya que, si no hay hierro disponible, no puede incorporarse a los precursores eritroides para la síntesis de hemoglobina, y el CHr desciende con independencia del resto de los parámetros hematológicos y bioquímicos<sup>167</sup>. En este contexto, el CHr, junto con el RsTf, es empleado en pacientes afectados de patologías que pueden condicionar una situación de inflamación, en las que puede coexistir un déficit de hierro, para realizar el diagnóstico diferencial de la anemia ferropénica con la anemia de las enfermedades crónicas (Tabla XI).

Parámetro	Anemia ferropénica	Alfa o beta talasemia	Anemia de las enfermedades crónicas
Hb	↓	↓	↓
VCM	↓	↓	n/↓
Nº de hematíes	↓	n/↑	↓
IST	↓	n	↓
Ferritina	↓	n/↑	↑
PE	↑	n/↑	↑
RsTf	↑	↑	n
CHr	↓	↓	n

Tabla XI. Diagnóstico diferencial de la anemia ferropénica con las talasemias y la anemia de las enfermedades crónicas.

↓: disminuido; ↑: aumentado; n: normal.

### 1.2.3. Monitorización de la respuesta al tratamiento de la anemia.

El CHr tiene un papel reconocido en la valoración de la respuesta al tratamiento con agentes estimuladores de la eritropoyesis. Si el CHr permanece bajo, indica que no se está incorporando hierro suficiente a los nuevos reticulocitos que se sintetizan en la médula ósea, incluso en las situaciones en las que los marcadores bioquímicos tradicionales no reflejan correctamente la biodisponibilidad del hierro. También es un parámetro que se eleva rápidamente, en 48-72 horas, cuando existe una respuesta adecuada a la administración de hierro intravenoso, por lo que es útil en la monitorización temprana de la respuesta a este tratamiento, ya que indica que el hierro aportado se incorpora a la eritropoyesis medular eficazmente<sup>171</sup>.

En niños hay estudios que demuestran que esta respuesta temprana al tratamiento también aparece cuando el hierro se administra oralmente, al tercer día de haber iniciado la terapia<sup>172</sup>.



En pacientes adultos con insuficiencia renal crónica se han realizado trabajos que concluyen que el CHr es un marcador más útil que la ferritina o el IST para dirigir la terapia con hierro de los pacientes en hemodiálisis, puesto que es mejor indicador del déficit de hierro funcional y por tanto mejor predictor de la respuesta a su administración<sup>173-176</sup>.

#### **1.2.4. CHr en el cribado de ferropenia**

Un estudio en chicas adolescentes señaló que el CHr puede emplearse para el cribado de ferropenia, aumentando la precisión del diagnóstico y posiblemente evitando tratamientos innecesarios en chicas con anemia sin ferropenia<sup>177</sup>. Además, el CHr se analiza en la misma muestra que el resto de los parámetros del hemograma y los reactivos necesarios para su determinación son hasta 5 veces más económicos que los que se emplean para medir la ferritina sérica<sup>166</sup>, lo cual lo convierte en un parámetro con una buena relación coste-beneficio para ser empleado como herramienta de cribado.

### 1.3. LIMITACIONES

Dado que para el cálculo del CHr se emplea el VCMr, puede ser bajo en personas sin déficit de hierro que estén afectos de hemoglobinopatías que cursen con microcitosis, como las talasemias<sup>178</sup>. Igualmente, puede estar elevado en situaciones que aumenten el volumen de los hematíes, como la anemia megaloblástica por déficit de vitamina B12 y/o ácido fólico<sup>179</sup>. Es por esto que es indispensable siempre interpretar los valores del CHr en el contexto del paciente y del resto de parámetros hematológicos y bioquímicos analizados.

Otra de las limitaciones del CHr como marcador de déficit de hierro es la falta de estandarización de los valores de referencia en las distintas edades de la vida, la cual será abordada en el siguiente apartado.

#### 1.4. VALORES DE REFERENCIA

El CHr ha demostrado ser un marcador de utilidad en el diagnóstico de ferropenia en niños, adolescentes y adultos. Diversos estudios realizados en niños han hallado que es mejor predictor de ferropenia que los parámetros clásicos.

En uno de los primeros trabajos publicados que buscaban determinar los valores de referencia en población pediátrica hasta los 15 años, establecieron que 26 pg era un punto de corte óptimo (con mejor sensibilidad y especificidad) para el diagnóstico de ferropenia en niños, si bien no hicieron diferenciaciones por grupos de edad<sup>180</sup>. Este valor fue empleado en un estudio realizado en niños saudíes de 2 a 8 años, con una mediana de edad de 3.4 años, y concluyeron que presentaba una adecuada sensibilidad y especificidad en su población para el diagnóstico de ferropenia<sup>181</sup>. En un estudio más reciente realizado en Madrid, con sujetos comprendidos entre 6 meses y 14 años, el valor *cut-off* con mejor área bajo la curva ROC (AUC) fue 25 pg<sup>182</sup>.

En algunos estudios se ha valorado que en épocas precoces de la infancia los valores normales pueden ser discretamente mayores. En las primeras 6-8 semanas de vida la eritropoyesis se encuentra frenada, por lo que en este periodo el CHr puede no ser un buen estimador del déficit de hierro. En un estudio realizado en lactantes hasta los 6 meses de vida, se halló que la mediana del CHr descendía progresivamente, y era de 31 pg (DS 1.7), 27 pg (DS 2.0) y 26.5 pg (DS 2.5) a las 6 semanas, 4 y 6 meses respectivamente en lactantes no suplementados con hierro<sup>183</sup>.

Un estudio realizado en una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) Neonatal en recién nacidos pretérmino de menos de 32 semanas y/o 1500 gramos de peso, con edad corregida de entre 3 y 4 meses, encontraron un valor *cut-off* óptimo para el diagnóstico de déficit de hierro de 29 pg, con mejor sensibilidad y especificidad que la ferritina, el IST y el VCM<sup>184</sup>.

Entre los 9 y los 12 meses de vida, un estudio realizado en Boston en el que se incluyeron 202 lactantes de esta edad, estableció un valor *cut-off* óptimo para el diagnóstico de ferropenia en 27.5 pg<sup>185</sup>. En un trabajo realizado en la Universidad de Kaunas, en Lituania, en 180 lactantes entre 6 y 24 meses, establecieron un punto de corte con mayor AUC para el diagnóstico del déficit de hierro de 28.55 pg<sup>186</sup>.

En niños preescolares entre 1 y 6 años sin ferropenia, Chouliaras et al. hallaron un percentil 5 de CHr de 24.6 pg, con una mediana de 27.7 pg (DS 1.6)<sup>187</sup>.

Un grupo de trabajo de Portugal estableció valores de referencia del CHr en distintos grupos de edad basándose en los valores hallados en 311 niños y adolescentes sanos de entre 6 meses y 17 años. Así, para los niños con edades entre 6 meses y 5 años, el percentil 2.5 del CHr fue de 27.5 pg, entre los 6 y 11 años fue de 28.3 pg, en las chicas entre 12 y 17 años de 29.1 pg y en los chicos de la misma edad de 28.8 pg, sin diferencias estadísticamente significativas entre sexos<sup>188</sup>. En un estudio realizado en mujeres atletas de entre 15 y 20 años, aquellas sin ferropenia presentaban una mediana de CHr de 31.4 pg (DS 1.07)<sup>189</sup>. En algunos estudios en los que se ha empleado el CHr como herramienta de cribado de ferropenia en adolescentes se ha utilizado un punto de corte de 29 pg, pero éste se ha establecido en base a datos extrapolados de adultos<sup>177</sup>.

En adultos, tanto mujeres como hombres, se consideran normales valores del CHr mayores de 28 -29 pg<sup>167,190,191</sup>.

## 2. RECEPTOR SÉRICO DE LA TRANSFERRINA

### 2.1. CARACTERÍSTICAS Y REGULACIÓN

La primera descripción de los receptores de la transferrina en la membrana de los reticulocitos data de 1963<sup>192</sup>, y a lo largo de las últimas décadas se ha descrito su estructura y función. El receptor de la transferrina 1 (RTf1) es una glucoproteína transmembrana de estructura homodimérica codificada en el cromosoma 3q29. Los dos monómeros que lo forman están unidos por puentes disulfuro en el dominio extracelular. Cada receptor puede fijar dos moléculas de transferrina, y tiene más afinidad por la transferrina diférrica que por la monoférrica o la apotransferrina<sup>171</sup> (Figura 10).

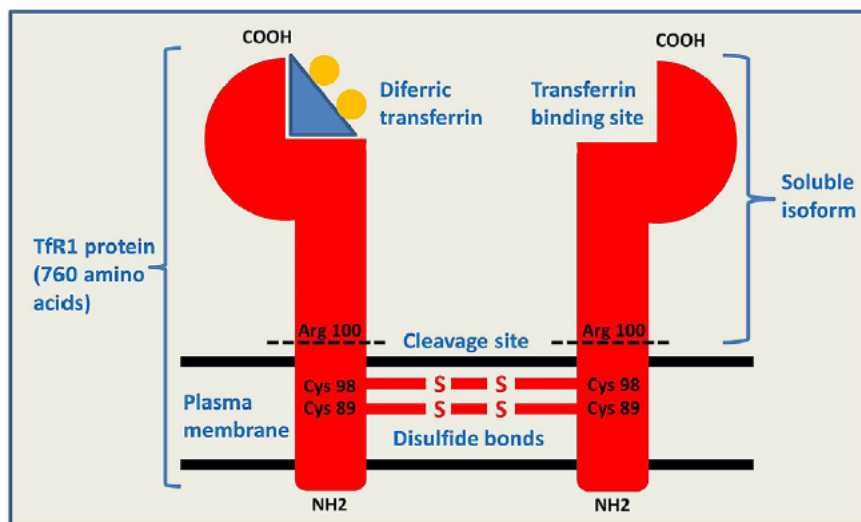


Figura 10. Estructura del RTf1 y unión a la transferrina.

Tomado de Harms K, et al. *Beyond soluble transferrin receptor: old challenges and new horizons. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015<sup>193</sup>.

La función del RTf1 es captar el hierro circulante para incorporarlo al interior celular, y existe una correlación bastante estrecha entre la captación de hierro y la cantidad de RTf1 que se encuentra en la membrana celular. Cuando se une a la transferrina es endocitado, formándose unas vesículas en cuyo interior una bomba de protones acidifica el pH y la transferrina modifica su estructura, de forma el hierro se escinde de esta última y puede ser transferido al citosol, ya sea para su utilización o

almacenado en forma de ferritina<sup>194</sup> (Figura 11). El RTf1 se encuentra en todas las células, a excepción de los eritrocitos maduros, tanto en la membrana como intracelularmente. Su nivel de expresión depende de la demanda de hierro, de forma que las células hematopoyéticas, los tejidos en fase de proliferación celular o la placenta presentan una expresión máxima. Cuando existe un déficit de hierro intracelular, aumenta la síntesis de RTf1, y por tanto la captación de hierro.

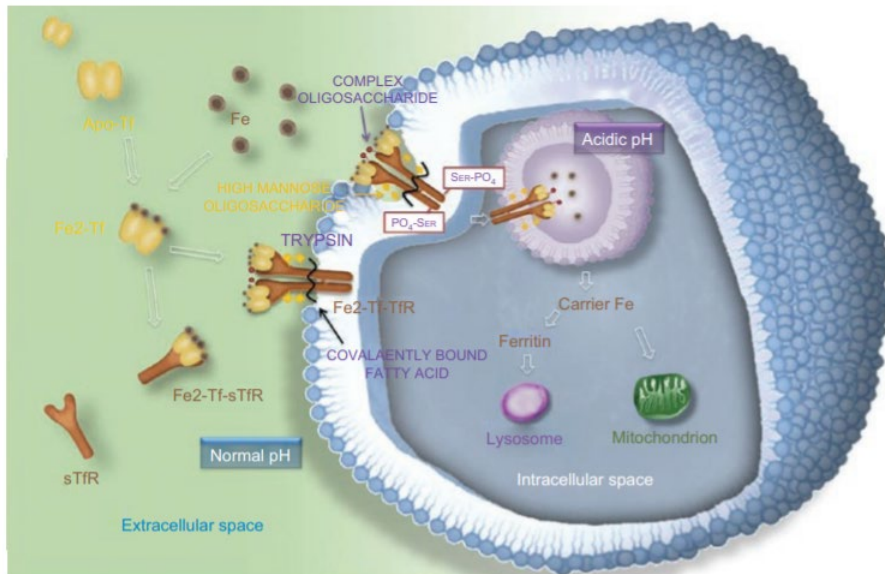


Figura 11. Representación de la interacción de la transferrina con el RTf y el proceso de endocitosis por el que se traslada el hierro al interior celular.

Tomado de Speckaert MM, et al. *Biological and clinical aspects of soluble transferrin receptor. Crit Rev Clin Lab Sci* 2010<sup>195</sup>.

Existe otro tipo de RTf, el receptor de la transferrina 2 (RTf2), codificado en el gen 3q22, que se expresa fundamentalmente en tejido hepático y duodenal. Interviene en la absorción intestinal del hierro y en su almacenaje hepático. Este receptor presenta una menor afinidad por la transferrina, pero no presenta regulación intracelular, de forma que su expresión depende directamente de la concentración de transferrina sérica, independientemente de la demanda o la cantidad de hierro ya almacenada en el tejido hepático.

En sangre periférica más del 99% del RTf circulante se encuentra en una forma truncada denominada RSTf, que es el cuantificado en las analíticas del estudio del

estado del hierro corporal. Es una forma monomérica que resulta de la pérdida de los dominios transmembrana e intracelular, por proteólisis de los aminoácidos 100-101 (Figura 10) de un porcentaje pequeño de los RTf1 que han sido endocitados. Los monómeros son liberados al exterior celular, donde pueden unirse a una molécula de transferrina<sup>171</sup>. El RsTf proviene en su mayor parte (70-80%) de los precursores eritroides, de forma que, en la eritropoyesis ferropénica, al aumentar la demanda de hierro de los eritroblastos, se incrementa la síntesis de RTf1 y secundariamente también la liberación de RsTf a sangre periférica. La cantidad de RsTf circulante es proporcional a la masa de RTf1 celular<sup>196</sup>.

Al contrario que otros parámetros empleados para la valoración del estado del hierro corporal, el RsTf no está influido por las citoquinas liberadas en situaciones de inflamación o infección aguda o crónica, lo cual presenta una ventaja en determinadas circunstancias, como se valorará más adelante.

## 2.2. UTILIDAD CLÍNICA

### 2.2.1. RsTf como marcador de la actividad eritropoyética

La actividad eritropoyética es el principal determinante de los valores de RsTf, puesto que como se mencionó previamente, el 70-80% del RsTf proviene de los precursores eritroides, y cuando aumenta la eritropoyesis, se incrementa la demanda de hierro, la expresión de RTf1 y secundariamente la liberación a sangre periférica de RsTf.

Es útil para determinar las situaciones en las que la síntesis de hematíes esta aumentada, como las anemias hemolíticas congénitas o adquiridas (esferocitosis, talasemia *major*, drepanocitosis, anemia microangiopática, inmune, etc.) o la policitemia secundaria, ya que los valores de RsTf se encontrarán elevados. Por el contrario, cuando existe una disminución de la actividad eritropoyética en la médula ósea, como en las anemias aplásicas o en la postquimioterapia, el RsTf está descendido, puesto que no se estará produciendo en los eritroblastos<sup>197,198</sup>.

La correlación entre el RsTf y la actividad eritropoyética puede ser de utilidad clínicamente para la valoración de pacientes con anemia de origen multifactorial, como es el caso de los niños y adolescentes con enfermedades malignas sometidos a quimioterapia<sup>199</sup>, puesto que, si la anemia es debida a la mielosupresión, el RsTf permanece descendido. También se ha valorado positivamente como indicador de una supresión medular adecuada en niños y jóvenes afectos de talasemia que reciben transfusiones múltiples como medida terapéutica, e incluso como un marcador individualizado del momento óptimo para transfundir<sup>200,201</sup>.

Igualmente, se ha empleado exitosamente en la monitorización de la recuperación medular tras trasplantes de médula ósea o la respuesta al tratamiento farmacológico de aplasias medulares<sup>196</sup>. En pacientes pediátricos en régimen de diálisis por insuficiencia renal terminal, ha demostrado presentar una adecuada sensibilidad como indicador de respuesta inadecuada al tratamiento con eritropoyetina recombinante humana (rHu-EPO) y déficit de hierro funcional<sup>202</sup>.

### 2.2.2. RsTf como indicador del estado de hierro tisular

La producción de RsTf también está influida por la cantidad de hierro disponible en el organismo. Skikne et al. publicaron un estudio realizado en voluntarios sanos a los que se les practicaron flebotomías seriadas, en el que mostraron cómo las cifras de RsTf



no sufrían modificaciones importantes en la primera fase de depleción de los depósitos de hierro, pero cuando se iniciaba la eritropoyesis ferropénica, con el aumento de la demanda de los precursores eritroides, el RsTf se elevaba de forma precoz, y de forma más constante que otros parámetros clásicos como la PEL y el VCM<sup>203</sup>, por lo que resultó un indicador temprano y sensible de la falta de disponibilidad de hierro en los tejidos. Otros estudios han demostrado cómo tras suplementar con hierro a pacientes ferropénicos, los valores de RsTf descienden progresivamente hasta valores considerados normales<sup>204-206</sup>, mostrando la resolución del déficit de hierro tisular.

En sentido inverso, en sujetos con IST elevados, sobrecarga de hierro o hemocromatosis, los valores de RsTf son aproximadamente un 20% inferiores a los determinados en sujetos sanos, si bien en la mayor parte de los casos se mantienen en rango de normalidad<sup>207,208</sup>.

### **2.2.3. Diagnóstico diferencial de la anemia ferropénica y la anemia de las enfermedades crónicas.**

Una de las principales limitaciones de los parámetros determinados clásicamente en la valoración de los individuos afectados de anemia es su alteración en los estados de inflamación sistémica.

El RsTf no presenta variaciones en los estados de inflamación, tanto aguda como crónica, o en las enfermedades hepáticas<sup>209,210</sup>, por lo que no se eleva en la anemia de las enfermedades crónicas<sup>211</sup>, y es útil para el diagnóstico diferencial de la etiología de la anemia en estas situaciones (tabla XI), incluso cuando coexiste esta última con un déficit de hierro (tabla XII).

En este mismo sentido también se ha evaluado el RsTf como parámetro discriminador en el diagnóstico diferencial de la anemia ferropénica con la anemia de origen infeccioso, y ha demostrado constituir un buen indicador de ferropenia. En niños, Vázquez-López et al. corroboraron esta cualidad discriminatoria un estudio en 368 sujetos de 1 a 10 años, en los cuales el RsTf presentó unas sensibilidad y especificidad elevadas en el diagnóstico de ferropenia, tanto en aquellos con anemia ferropénica aislada como en aquellos que presentaban una infección aguda concomitante<sup>212</sup>.

Parámetro	Anemia ferropénica	Anemia de las enfermedades crónicas	Anemia ferropénica + Anemia de las enfermedades crónicas
Hb	↓	↓	↓
Ferritina	↓	n/↑	↑
RsTf	↑	n	↑
Índice RsTf-F	↑↑	n	↑

Tabla XII. Diagnóstico diferencial de la anemia ferropénica con la anemia de las enfermedades crónicas y ambas en combinación.

↓: disminuido; ↑: aumentado; ↑↑: muy aumentado; n: normal.

Adaptado de: Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta* 2003<sup>196</sup>.

#### 2.2.4. Muestra requerida para determinar el RsTf

La determinación del RsTf requiere un volumen de muestra muy pequeño, de 10 microlitros (μL), lo cual es una ventaja no desdeñable sobre todo para el estudio de pacientes en edad pediátrica<sup>171</sup>.

## 2.3. LIMITACIONES

### 2.3.1. Ausencia de estandarización en su determinación

La principal limitación que presenta el RsTf como herramienta en el laboratorio clínico es la falta de estandarización en su determinación. Existen diversos kits comerciales destinados a ello, y en función del reactivo empleado (receptor intacto libre, receptor truncado en suero, receptor unido a transferrina), el origen de éste (placenta o suero), el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales, el tipo de marcador empleado (yodo, enzimas peroxidasa, fosfatasa alcalina) y el tipo de señal emitida (radiactividad, fotometría, nefelometría, fluorescencia); los valores obtenidos del RsTf en individuos sin patología son dispares (hasta 25 veces superiores o inferiores según el método). No obstante, una vez establecido un valor de referencia para una metodología concreta, las mediciones del RsTf se comportan de forma similar en las distintas formas de enfermedad, independientemente del método<sup>197,213,214</sup>.

La disparidad de valores de referencia y valores discriminantes, dependiendo del calibrador y el método empleado, dificulta su aplicación clínica<sup>171</sup>. En un intento para solventar esta dificultad, la OMS estableció en la pasada década un reactivo de referencia (RsTf recombinante) para disminuir la variabilidad inter-método, con el objetivo de lograr una estandarización internacional que permita generalizar los resultados<sup>215</sup>.

### 2.3.2. Ausencia de alteración en el estadio depleción de los depósitos de hierro

Como se mencionó previamente, según los estudios realizados por Skikne et al.<sup>203</sup>, el RsTf se eleva de forma precoz en el estadio de eritropoyesis ferropénica, cuando aumenta la demanda tisular de hierro, pero se mantiene estable en el estadio anterior de vaciamiento de los depósitos. Estos hallazgos han sido refrendados en otros estudios en población pediátrica, como el realizado por Choi et al., en el que se analizaron los valores de RsTf obtenidos en niños de 9 a 12 años de edad que sufrían distintos estadios de déficit de hierro y un grupo control sin ferropenia; en el que si bien los valores de RsTf en los sujetos en fase de depleción de los depósitos eran ligeramente superiores frente a los controles, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, mientras que en las fase de eritropoyesis ferropénica y anemia ferropénica el RsTf se elevaba paralelamente a la severidad de la ferropenia de forma estadísticamente significativa<sup>216</sup>. El mismo grupo de trabajo analizó la sensibilidad y especificidad del RsTf en el diagnóstico de ferropenia en adolescentes de entre 17 y 19

años, confirmando que su sensibilidad era baja en el estadio de depleción de los depósitos, pero aumentaba ostensiblemente en estadios posteriores sin detrimento de su especificidad<sup>217</sup>.

Para poder detectar esta fase inicial de la ferropenia, se ha empleado en combinación con la ferritina mediante índices que los relacionan, lo cual se abordará más adelante.

## 2.4. VALORES DE REFERENCIA

La falta de estandarización del método de medida del RsTf ya mencionada, unida a su variabilidad a lo largo del crecimiento y desarrollo durante la infancia y adolescencia, hace muy difícil el establecimiento de unos valores de referencia extrapolables a toda la población pediátrica.

Kuiper-Kramer et al. determinaron el RsTf mediante el método *Ramco-TfR* (*Ramco Laboratories, Houston, Texas, USA*) en sangre de cordón de 133 recién nacidos y los compararon con los de 64 adultos sanos. La media del valor del RsTf en el grupo de los recién nacidos fue de 9.25 mg/L, con un intervalo entre el percentil 10 (p10) y 90 (p90) de 6.30-14.63 mg/L, mientras que el de los adultos fue significativamente inferior, con una media de 4.90 mg/L y un intervalo p10-p90 de 3.96-6.18 mg/L. También compararon el valor del RsTf el primer día de vida con el 5º, hallando un descenso del mismo, y sin una correlación clara con el hierro y ferritina séricos, por lo que probablemente en los primeros días de vida el RsTf no sea un reflejo real del estado de hierro corporal<sup>218</sup>.

Malope et al. midieron el RsTf mediante ELISA, también con el método *Ramco-TfR*, en 561 niños entre 1 y 6 años, y hallaron que la media de RsTf en niños sin ferropenia ni anemia fue de 6.1 mg/L (SD 2.2 mg/L)<sup>211</sup>. En 261 niños griegos de la misma edad, Chouliaras et al. establecieron una media del RsTf de 2.5 mg/L (SD 0.5 mg/L), determinado con el *Advantage chemiluminescence autoanalyzer, Nichols Institute Diagnostics, CA, USA*<sup>219</sup>.

Vázquez-López et al., en un estudio en niños españoles con edades comprendidas entre los 1 y 11 años, establecieron valores de referencia para el RsTf determinado mediante inmunturbidimetría con el kit comercial *Quantex sTfR kit (Biokit SA, Barcelona)*, con una media de 1.22 mg/L (SD 0.28 mg/L), con un percentil 97.5 de 1.90 mg/L. Detectaron que había una disminución de los valores del RsTf conforme la edad de los niños era mayor en el análisis por grupos de edad, aunque ésta era poco significativa<sup>220</sup>.

Lin et al. determinaron el RsTf en 1006 niños chinos entre 6 y 14 años mediante ELISA con el kit *de R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*, y en el grupo control la media fue de 18.74 nmol/L (SD 3.06 nmol/L), lo cual equivaldría a 1.59 mg/L (SD 0.26 mg/L)<sup>221</sup>.

Choi et al. en un estudio en niños de 9 a 12 de años de edad, en el grupo de controles sanos hallaron un valor medio del RsTf de 1.8 mg/L (SD 0.7 mg/L) determinado

mediante un método inmunoenzimométrico (*IDeA<sup>TM</sup> sTfR*, Orion Diagnostica, Espoo, Finland)<sup>216</sup>.

En un estudio realizado en adolescentes varones de 11-13 años sanos en Finlandia, en el que determinaron el RsTf mediante ELISA por el método *Flowers*<sup>213</sup>, hallaron una media en esta población de 6.9 mg/L (SD 0.1 mg/L)<sup>205</sup>. Cogswell et al., en el contexto del estudio poblacional estadounidense NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) 2003-2006, en el que se determinó el RsTf mediante inmunoturbidimetría con el *Tina-quant sTfR assay* (*Roche Diagnostics, Mannheim, Germany*), publicaron que, en chicas de 12 a 19 años, el valor medio del RsTf fue de 3.51 mg/L (SD 0.03 mg/L)<sup>222</sup>.

Un estudio finlandés llevado a cabo por Suominen et al., en el que se incluyeron 301 niños y adolescentes sanos de entre 6 meses y 18 años de edad, y en el que se determinó el RsTf mediante un método inmunoturbidimétrico automatizado (*IDeA® sTfR-IT*; Orion Diagnostica)<sup>223</sup>, halló que el percentil 97.5 era distinto en función de la edad, y descendía hasta valores similares a los del adulto en la adolescencia<sup>224</sup>: entre los 6 meses y los 4 años era de 3.3 mg/L (IC95% 3.1-3.4 mg/L); entre los 4 y 10 años de 3.0 mg/L (IC 95% 2.9-3.2 mg/L); entre los 10 y los 16 años de 2.7 mg/L (IC95% 2.7-2.8 mg/L), y en los mayores de 16 años de 2.3 mg/L (IC95% 2.2-2.4 mg/L).

Un estudio en niños y adolescentes españoles con edades entre los 6 meses y los 16 años, con un grupo control de niños sin enfermedad aguda o crónica y sin ferropenia, halló unos valores medios de RsTf, medido mediante nefelometría con partículas intensificadoras con el *Kit N Látex sTfR* en analizador *Behring Marburg GMBH®*, de 1.20 mg/L (DS 0.53 mg/L), aunque los valores medios fueron mayores en los menores de dos años (1.42 mg/L) frente a los preescolares (1.07 mg/L), escolares (1.21 mg/L) y los adolescentes mayores de 12 años (1.08 mg/L)<sup>225</sup>.

Kratovil et al., en otro estudio que abarcó todas las edades pediátricas, también hallaron que los valores más elevados de RsTf en sujetos normales se presentaban en edad preescolar y escolar, mientras que en adolescentes descendían progresivamente. El RsTf se determinó mediante el método *Quantikine IVD sTfR Immunoassay kit* (*R&D Systems, Minneapolis, MN*), y el percentil 97.5 en los distintos rangos de edad fue de 2.85 mg/L entre los 6 y 24 meses, 3.05 mg/L entre los 2 y 6 años, 2.72 mg/L entre los 7 y 12 años, 2.69 mg/L entre los 13 y 17 años y 2.32 mg/L en los sujetos con 18 años o más<sup>226</sup>.

Ooi et al., en un grupo de niños y adolescentes candienses, también hallaron valores del RsTf mayores en niños en edad escolar con respecto a los adolescentes entre 13 y 18 años, con un percentil 97.5 del RsTf determinado mediante el método nefelométrico N Latex sTfR (*Dade Benring, Marburg, Germany*) de 2.74 mg/L, 2.63 mg/L, 2.67 mg/L y 1.91 mg/L en los grupos de 4 a 6 años, 7 a 9 años, 10 a 12 años y 13 a 18 años respectivamente<sup>227</sup>.

Choi et al. analizaron el RsTf, determinado mediante el método *IDeA™ sTfR Orion Diagnostica, Espoo, Finland*, en adolescentes entre 17 y 19 años surcoreanos, hallando una media de 1.71 mg/L (SD 1.06 mg/L) en sujetos sanos, con un valor *cut-off* óptimo de 3.34 mg/L para el diagnóstico de ferropenia sin anemia<sup>217</sup>.

En adultos, Punnonen et al. realizaron un estudio en el que se realizó aspirado medular a 129 sujetos que presentaban anemia de distintas causas, y establecieron un punto de corte óptimo del RsTf para el diagnóstico de ferropenia, determinado mediante el *IDeA™ sTfR immunoenzymometric assay (IEMA) by Orion Diagnostica*, de 2.7 mg/L, con una sensibilidad y especificidad del 94%<sup>228</sup>. En éste y estudios posteriores, se han postulado valores *cut-off* de entre 2.3 mg/dl y 2.7 mg/dl, y la mayoría de los autores considera que 2.5 mg/dl es un punto de corte con adecuadas sensibilidad y especificidad en población adulta cuando es determinado con este método<sup>229</sup>.

La mayoría de los estudios realizados en adultos revelan que los niveles normales de RsTf son relativamente estables en sujetos sanos, y no presentan variaciones significativas en función de la edad, el sexo, la etnia o el estado pre o postmenopáusico en el caso de las mujeres<sup>195</sup>.

Los valores de referencia obtenidos del RsTf en niños y adolescentes sanos de los estudios referenciados se encuentran resumidos en la tabla XIII.

En conclusión, los valores normales del RsTf parecen ser ligeramente más elevados durante la infancia, para alrededor de los 16 años alcanzar niveles similares a los de los adultos, independientemente de la metodología empleada. Esto probablemente sea debido a los cambios físicos, que son más acentuados durante la infancia y el periodo puberal, con mayor actividad eritropoyética debida al crecimiento, más que a un déficit de hierro tisular, puesto que estos estudios han analizado sujetos sanos con depósitos de hierro adecuados.

Publicación	n	Edad de los sujetos (años)	Media (SD) o percentil RsTf (mg/L)	Método determinación RsTf
Kuiper-Kramer et al. 1998 <sup>218</sup>	133 64	Recién nacidos Adultos	9.25 (NC), p90: 14.63 4.90 (NC), p90: 6.18	Ramco-TfR (Ramco Laboratories, Houston, Texas, USA)
Malope et al. 2001 <sup>211</sup>	561	1-6	6.1 (2.2)	Ramco-TfR (Ramco Laboratories, Houston, Texas, USA)
Chouliaras et al. 2009 <sup>219</sup>	261	1-6	2.5 (0.5)	Advantage chemiluminescence autoanalyzer, Nichols Institute Diagnostics, CA, USA
Vázquez-López et al. 2016 <sup>220</sup>	902	1-11	1.22 (0.28)	Quantex sTfR kit (Biokit SA, Barcelona)
Lin et al. 2006 <sup>221</sup>	1006	6-14	1.59 (0.26)	Double antibodies sandwich ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
Choi et al. 2003 <sup>216</sup>	89	9-12	1.8 (0.7)	IDeA™ Orion Diagnostica, Espoo, Finland
Anttila et al. 1989 <sup>205</sup>	57	Varones, 11-13	6.9 (0.1)	Double antibodies sandwich ELISA, Flowers, USA
Cogswell et al. 2009 <sup>222</sup>	1817	Mujeres, 12-19	3.51 (0.03)	Tina-quant sTfR assay (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
Souminen et al. 2001 <sup>224</sup>	52	0.5-4	p97.5: 3.3	IDeA sTfR-IT; Orion Diagnostica, Espoo, Finland
	60	4-10	p97.5: 3.0	
	160	10-16	p97.5: 2.7	
	83	≥ 17	p97.5: 2.3	
Aleo et al. 2004 <sup>225</sup>	30	0.5-16	1.20 (0.53)	Nefelometría Kit N Látex sTfR en analizador Behring Marburg GMBH®
Kratovil et al. 2007 <sup>226</sup>	37	0.5-1.9	p97.5: 2.85	Quantikine IVD sTfR Immunoassay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)
	42	2-6	p97.5: 3.05	
	39	7-12	p97.5: 2.72	
	37	13-17	p97.5: 2.69	
	28	≥ 18	p97.5: 2.32	
Ooi et al. 2009 <sup>227</sup>	245	4-6	p97.5: 2.74	Nefelometría Kit N Látex sTfR en analizador Behring Marburg GMBH®
		6-9	p97.5: 2.63	
		9-12	p97.5: 2.67	
		12-18	p97.5: 1.91	
Choi et al. 2005 <sup>217</sup>	96	17-19	1.71 (1.06)	IDeA™ Orion Diagnostica, Espoo, Finland

Tabla XIII. Resumen de las publicaciones con los valores de referencia del RsTf en niños y adolescentes.

n: número de sujetos incluidos en el estudio; NC: no consta.



### 3. ÍNDICE RECEPTOR SÉRICO DE LA TRANSFERRINA-FERRITINA

#### 3.1. CONCEPTO Y UTILIDAD CLÍNICA

Como hemos descrito anteriormente, la ferritina es el parámetro analítico que mejor refleja el estado de los depósitos de hierro, y el RsTf constituye un marcador precoz de eritropoyesis ferropénica, aunque ambos presentan sus limitaciones. Por ello, se han propuesto varios índices que los combinan, para mejorar su sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de ferropenia<sup>196,211</sup>, como el RsTf/Ferritina, el log (RsTf/Ferritina), o el índice RsTf-F, que resulta de dividir el valor del RsTf por el logaritmo de la ferritina (RsTf/logFerritina).

Este último, que es objeto de este trabajo, ha demostrado ser especialmente útil para discernir la anemia de las enfermedades crónicas y la anemia ferropénica, ya que ha demostrado una mayor sensibilidad para detectar el déficit de hierro comparado con las medidas aisladas del RsTf y la ferritina, tanto en adultos<sup>228</sup>, como en niños<sup>212,225,230</sup>. En la figura 11 se muestra cómo se alteran tanto la Hb, como la ferritina, el RsTf y el índice RsTf-F conforme progresa el déficit de hierro. En las primeras fases de la ferropenia, cuando se deplecionan los depósitos de hierro, la ferritina ya inicia su descenso, y al comenzar la eritropoyesis ferropénica, cuando aumenta la demanda de hierro intracelular, se inicia la elevación del RsTf. El índice RsTf-F, al relacionar ambos parámetros, presenta ya cambios con la disminución de la ferritina, constituyendo un marcador precoz de ferropenia, y a la vez, al emplear el RsTf, solventa las limitaciones de la ferritina en situaciones de inflamación sistémica, puesto que, aunque ésta no estuviera disminuida, sí aumentaría el RsTf.

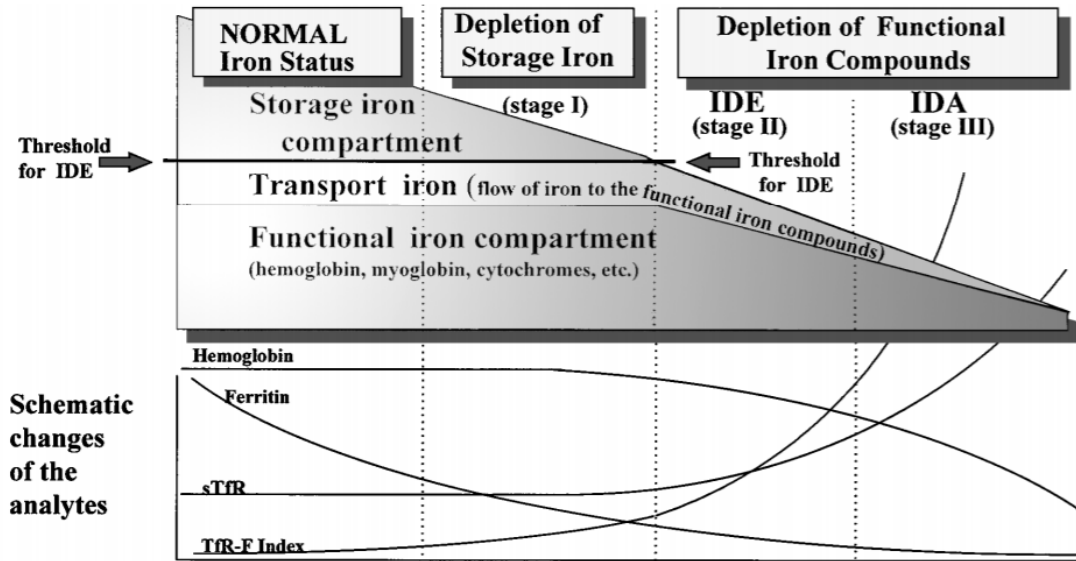


Figura 11. Cambios en la Hb, ferritina, sTfR e índice sTfR-F conforme progresa la ferropenia y se alteran los distintos compartimentos del hierro corporal.

Tomado de Suominen P, et al. Serum Transferrin Receptor and Transferrin Receptor-Ferritin Index Identify Healthy Subjects With Subclinical Iron Deficits. Blood 1983<sup>206</sup>.

### 3.2. VALORES DE REFERENCIA

Con las dificultades derivadas de la falta de estandarización de la determinación del RsTf, hay pocos estudios que hayan explorado los valores de referencia del índice RsTf-F en niños y adolescentes.

En el estudio de Malope et al. ya mencionado, realizado en niños de 1 a 6 años, la media del índice RsTf-F en los sujetos sin ferropenia ni anemia fue de 4.1 (SD 1.7), con el RsTf determinado por el método *Ramco*<sup>211</sup>. Vázquez-López et al., en un grupo de niños entre 1 y 11 años, halló una media de 0.87 (SD 0.25), con un percentil 97.5 de 1.46<sup>220</sup>, con el RsTf determinado por inmunoturbidimetría con el kit *Quantex sTfR, Biokit*.

Lin et al., que emplearon el kit de *R&D Systems* que determina el RsTf mediante ELISA, en su estudio en niños chinos de entre 6 y 14 años, establecieron un percentil 97.5 en el grupo control de 10.37<sup>221</sup>.

Ooi et al., en su trabajo realizado en niños y adolescentes canadienses, hallaron un percentil 97.5 del índice RsTf-F, con el RsTf determinado mediante el método nefelométrico N Latex sTfR (*Dade Benring, Marburg, Germany*), de 2.34, 2.26, 2.27 y 3.05 mg/L en los grupos de 4 a 6 años, 7 a 9 años, 10 a 12 años y 13 a 18 años respectivamente<sup>227</sup>.

En el trabajo de Punnonen et al. referenciado previamente, en el que se estudió a 129 sujetos adultos con anemia de distintas causas, y a los que se les realizó un aspirado medular, determinaron que un valor *cut-off* del índice RsTf-F de 1.5 presentaba un AUC óptimo para el diagnóstico de ferropenia, con una sensibilidad del 95%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo (VPP) del 98% y un valor predictivo negativo (VPN) del 99%<sup>228</sup>. Rimon et al. en un estudio realizado en ancianos con una edad media de 83 años, en el que determinaron el RsTf mediante ELISA (*Clinigen, R&D Systems, Minnesota*), también establecieron un punto de corte de 1.5 del índice RsTf-F para discernir si presentaban déficit de hierro, con una sensibilidad del 87.8%, una especificidad del 92.9%, un VPP del 97,7% y un VPN del 68.4%<sup>231</sup>.

Los valores de referencia obtenidos del índice RsTf-F en niños y adolescentes sanos de los estudios referenciados se encuentran resumidos en la tabla XIV.

Al igual que ocurre con los valores de referencia del RsTf, la mayoría de los resultados de estos estudios no son comparables por las diferencias en el método de determinación. No obstante, parece que independientemente del método, el valor del índice RsTf-F tiende a disminuir ligeramente con la edad, para luego mantenerse estable en la edad adulta, si bien puede haber diferencias entre sexos debido a que los depósitos de hierro en mujeres suelen ser menores durante la edad fértil por las pérdidas menstruales.

Publicación	n	Edad de los sujetos (años)	Media (SD) o percentil Índice RsTf-F	Método determinación RsTf
Malope et al. 2001 <sup>211</sup>	561	1-6	4.1 (1.7)	<i>Ramco-TfR (Ramco Laboratories, Houston, Texas, USA)</i>
Vázquez-López et al. 2016 <sup>220</sup>	902	1-11	0.87 (0.25) p97.5: 1.46	<i>Quantex sTfR kit (Biokit SA, Barcelona)</i>
Lin et al. 2006 <sup>221</sup>	1006	6-14	p97.5: 10.37	<i>Double antibodies sandwich ELISA kit (R&amp;D Systems, Minneapolis, MN, USA)</i>
Ooi et al. 2009 <sup>227</sup>	245	4-6 6-9 9-12 12-18	p97.5: 2.34 p97.5: 2.26 p97.5: 2.27 p97.5: 3.05	<i>Nefelometría Kit N Látex sTfR en analizador Behring Marburg GMBH®</i>

*Tabla XIV. Resumen de las publicaciones con los valores de referencia del índice RsTf-F en niños y adolescentes.*

*n: número de sujetos incluidos en el estudio.*



***CAPÍTULO II:***  
***BIBLIOGRAFÍA***

---

1. Hercberg S, Preziosi P, Galan P. Iron deficiency in Europe. *Public Health Nutr* 2001;4(2B):537-45.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Iron deficiency-United States, 1999-2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51 (40): 897-9.
3. Cooper M, Greene-Finestone L, Lowell H, Levesque J, Robinson S. Iron sufficiency of Canadians. *Health Rep* 2012; 23 (4): 41-8.
4. Gore FM, Bloem PJN, Patton GC, Ferguson J, Joseph V, Coffey C, et al. Global burden of disease in young people aged 10-24 years: a systematic analysis. *Lancet* 2011; 377 (9783): 2093-102.
5. Global Burden of Disease Child and Adolescent Health Collaboration, Kassebaum N, Kyu HH, Zoeckler L, Olsen HE, Thomas K, Pinho C, et al. Child and Adolescent Health From 1990 to 2015: Findings From the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors 2015 Study. *JAMA Pediatr* 2017; 171 (6): 573-92.
6. Ferrari M, Mistura L, Patterson E, Sjöström M, Díaz LE, Stehle P, et al. Evaluation of iron status in European adolescents through biochemical iron indicators: the HELENA Study. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65 (3): 340-9.
7. Mesías M, Seiquer I, Navarro MP. Iron nutrition in adolescence. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2013; 53 (11):1226-37.
8. Moschonis G, Papandreou D, Mavrogianni C, Giannopoulou A, Damianidi L, Malindretos P, et al. Association of iron depletion with menstruation and dietary intake indices in pubertal girls: the healthy growth study. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 423263.
9. Harvey LJ, Armah CN, Dainty JR, Foxall RJ, John Lewis D, Langford NJ, et al. Impact of menstrual blood loss and diet on iron deficiency among women in the UK. *Br J Nutr* 2005; 94 (4): 557-64.
10. Beck KL, Conlon CA, Kruger R, Coad J. Dietary determinants of and possible solutions to iron deficiency for young women living in industrialized countries: a review. *Nutrients* 2014; 6 (9): 3747-76.
11. Vandevijvere S, Michels N, Verstraete S, Ferrari M, Leclercq C, Cuenca-García M, et al. Intake and dietary sources of haem and non-haem iron among European adolescents and their association with iron status and different lifestyle and socio-economic factors. *Eur J Clin Nutr* 2013; 67 (7):765-72.
12. Beard J. Iron deficiency alters brain development and functioning. *J Nutr* 2003; 133 (5 Suppl 1): 1468S-72S.
13. McCann JC, Ames BN. An overview of evidence for a causal relation between iron deficiency during development and deficits in cognitive or behavioral function. *Am J Clin Nutr* 2007;85(4):931-45.

14. Lukowski AF, Koss M, Burden MJ, Jonides J, Nelson CA, Kaciroti N, Jimenez E, Lozoff B. Iron deficiency in infancy and neurocognitive functioning at 19 years: evidence of long-term deficits in executive function and recognition memory. *Nutr Neurosci* 2010;13(2):54-70.
15. Congdon EL, Westerlund A, Algarin CR, Peirano PD, Gregas M, Lozoff B, Nelson CA. Iron deficiency in infancy is associated with altered neural correlates of recognition memory at 10 years. *J Pediatr* 2012; 160 (6): 1027-33.
16. Lozoff B, Smith JB, Kaciroti N, Clark KM, Guevara S, Jimenez E. Functional significance of early-life iron deficiency: outcomes at 25 years. *J Pediatr* 2013;163(5):1260-6.
17. Beard JL. Why iron deficiency is important in infant development. *J Nutr* 2008; 138 (12): 2534-6.
18. Sachdev H, Gera T, Nestel P. Effect of iron supplementation on mental and motor development in children: systematic review of randomised controlled trials. *Public Health Nutr* 2005; 8 (2):117-32.
19. Ekiz C, Agaoglu L, Karakas Z, Gurel N, Yalcin I. The effect of iron deficiency anemia on the function of the immune system. *Hematol J* 2005; 5 (7): 579-83.
20. Aly SS, Fayed HM, Ismail AM, Abdel Hakeem GL. Assessment of peripheral blood lymphocyte subsets in children with iron deficiency anemia. *BMC Pediatr* 2018; 18 (1): 49.
21. Hassan TH, Badr MA, Karam NA, Zkaria M, El Saadany HF, Abdel Rahman DM, et al. Impact of iron deficiency anemia on the function of the immune system in children. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(47):e5395.
22. Benedict SL, Bonkowsky JL, Thompson JA, Van Orman CB, Boyer RS, Bale JF Jr, et al. Cerebral sinovenous thrombosis in children: another reason to treat iron deficiency anemia. *J Child Neurol.* 2004; 19 (7): 526.
23. Maguire JL, deVeber G, Parkin PC. Association between iron-deficiency anemia and stroke in young children. *Pediatrics* 2007; 120:1053.
24. More S, Shivkumar VB, Gangane N, Shende S. Effects of iron deficiency on cognitive function in school going adolescent females in rural area of central India. *Anemia.* 2013; 2013:819136.
25. Estrada JA, Contreras I, Pliego-Rivero FB, Otero GA. Molecular mechanisms of cognitive impairment in iron deficiency: Alterations in brain-derived neurotrophic factor and Insulin-like growth factor expression and function in the central nervous system. *Nutr Neurosci* 2014; 17 (5): 193-206.



26. Sharma R, Stanek JR, Koch TL, Grooms L, O'Brien SH. Intravenous iron therapy in non-anemic iron-deficient menstruating adolescent females with fatigue. *Am J Hematol*. 2016; 91 (10):973.
27. Halterman JS, Kaczorowski JM, Aligne CA, Auinger P, Szilagyi PG. Iron deficiency and cognitive achievement among school-aged children and adolescents in the United States. *Pediatrics*. 2001; 107 (6): 1381-6.
28. Jáuregui-Lobera I. Iron deficiency and cognitive functions. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014; 10:2087-95.
29. Evstatiev R, Gasche C. Iron sensing and signalling. *Gut* 2012; 61 (6): 933-52.
30. Chifman J, Laubenbacher R, Torti SV. A systems biology approach to iron metabolism. *Adv Exp Med Biol* 2014; 844: 201-25.
31. Philpott CC, Ryu MS. Special Delivery: Distributing Iron in the Cytosol of Mammalian Cells. *Front Pharmacol* 2014; 5:173.
32. Muñoz Gómez M, Campos Garriguez A, García Erce JA, Ramírez Ramírez G. Fisiopatología del metabolismo del hierro: implicaciones diagnósticas y terapéuticas. *Nefrología* 2005; XXV: Número 1.
33. Ganz T. Systemic Iron Homeostasis. *Physiol Rev* 2013; 93: 1721–1741.
34. Green R, Charlton R, Seftel H, Bothwell T, Mayet F, Adams B, Finch C, Layrisse M. Body iron excretion in man: a collaborative study. *Am J Med* 1968; 45: 336–53.
35. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci* 2014; 19 (2): 164-74.
36. Hurrell R, Egli I. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr* 2010; 91 (5): 1461S-1467S.
37. Lane DJ, Bae DH, Merlot AM, Sahni S, Richardson DR. Duodenal cytochrome b (DCYTB) in iron metabolism: an update on function and regulation. *Nutrients* 2015; 7 (4): 2274-96.
38. Ems T, St Lucia K, Huecker MR. Biochemistry, Iron Absorption. 2020 Apr 30. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan–. PMID: 28846259.
39. Deicher R, Hörl WH. New insights into the regulation of iron homeostasis. *Eur J Clin Invest* 2006; 36 (5): 301-9.
40. Hurrell RF, Reddy MB, Juillerat M, Cook JD. Meat protein fractions enhance nonheme iron absorption in humans. *J Nutr* 2006; 136: 2808–12.
41. Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV, Torti FM. Ferritin for the clinician. *Blood Rev* 2009; 23 (3): 95-104.
42. Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD. Iron absorption and metabolism. *Curr Op Gastr* 2009; 25:129–35.

43. Gulec S, Anderson GJ, Collins JF. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014; 307(4): G397–G409.
44. Edison ES, Bajel A, Chandy M. Iron homeostasis: new players, newer insights. *Eur J Haematol* 2008; 81 (6): 411-24.
45. Bartnikas TB. Known and potential roles of transferrin in iron biology. *Biometals* 2012; 25 (4): 677-86.
46. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820: 188–202.
47. Fairweather-Tait SJ. Iron nutrition in the UK: getting the balance right. *Proc Nutr Soc* 2004; 63 (4): 519-28.
48. Anderson GJ, Frazer DM. Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr* 2017; 106 (Suppl 6): 1559S-66S.
49. Rishi G, Subramaniam VN. The liver in regulation of iron homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017; 313 (3): G157-65.
50. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, McVey Ward D, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306 (5704): 2090-3.
51. Fleming MD. The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008; 151-8.
52. Wang CY, Babitt JL. Liver iron sensing and body iron homeostasis. *Blood* 2019; 133 (1): 18-29.
53. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood* 2008; 112: 4292–7.
54. Finberg KE. Regulation of systemic iron homeostasis. *Curr Opin Hematol* 2013; 20 (3): 208-214.
55. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Tomas Ganz. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004; 113 (9): 1271-6.
56. Verga Falzacappa MV, Vujic Spasic M, Kessler R, Stolte J, Hentze MW, Muckenthaler MU. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood* 2007; 109: 353-8.
57. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 2006; 108: 3204-9.
58. Kim A, Nemeth E. New insights into iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2015; 22 (3): 199-205.
59. Hugman A. Hepcidin: an important new regulator of iron homeostasis. *Clin Lab Haematol* 2006; 28 (2): 75-83.

60. Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 2006; 108 (12): 3730-5.
61. Mastrogiannaki M, Matak P, Mathieu JR, Delga S, Mayeux P, Vaulont S, Peyssonnaud C. Hepatic hypoxia-inducible factor-2 down-regulates hepcidin expression in mice through an erythropoietin-mediated increase in erythropoiesis. *Haematologica* 2012; 97: 827–34.
62. Shah YM, Matsubara T, Ito S, Yim SH, Gonzalez FJ. Intestinal Hypoxia Inducible Transcription Factors are Essential for Iron Absorption Following Iron Deficiency. *Cell Metab* 2009; 9(2): 152–164.
63. Renassia C, Peyssonnaud C. New insights into the links between hypoxia and iron homeostasis. *Curr Opin Hematol* 2019; 26 (3): 125-30.
64. Fisher AL, Nemeth E. Iron homeostasis during pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2017; 106 (Suppl 6): 1567S-74S.
65. Sangkhae V, Nemeth E. Placental iron transport: The mechanism and regulatory circuits. *Free Radic Biol Med* 2019; 133: 254-61.
66. Cao C, Fleming MD. The placenta: the forgotten essential organ of iron transport. *Nutr Rev* 2016; 74 (7): 421-31.
67. Georgieff MK. Long-term brain and behavioral consequences of early iron deficiency. *Nutr Rev* 2011; 69 (Suppl 1): S43-S48.
68. Andersen HS, Gambling L, Holtrop G, McArdle HJ. Maternal iron deficiency identifies critical windows for growth and cardiovascular development in the rat postimplantation embryo. *J Nutr* 2006; 136 (5): 1171-7.
69. Hay G, Refsum H, Whitelaw A, Melbye EL, Haug E, Borch-Johnsen B. Predictors of serum ferritin and serum soluble transferrin receptor in newborns and their associations with iron status during the first 2 y of life. *Am J Clin Nutr* 2007; 86 (1): 64-73.
70. Hernández Merino A. Anemias en la infancia y adolescencia. Clasificación y diagnóstico. *Pediatr Integral* 2012; XVI (5): 357-65.
71. Ziegler EE, Nelson SE, Jeter JM. Iron stores of breastfed infants during the first year of life. *Nutrients* 2014; 6 (5): 2023-34.
72. Lönnerdal B. Development of iron homeostasis in infants and young children. *Am J Clin Nutr* 2017; 106 (Suppl 6): 1575S-1580S.
73. Ziegler EE, Nelson SE, Jeter JM. Iron supplementation of breastfed infants from an early age. *Am J Clin Nutr* 2009; 89 (2): 525-32.
74. Qasem WA, Friel JK. An Overview of Iron in Term Breast-Fed Infants. *Clin Med Insights Pediatr* 2015; 9: 79-84.

75. Aggett PJ, Agostoni C, Axelsson I, et al. Iron metabolism and requirements in early childhood: do we know enough?: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 34 (4): 337-345.
76. Collard KJ. Iron homeostasis in the neonate. *Pediatrics* 2009; 123 (4): 1208-16.
77. Leong WI, Bowlus CL, Tallkvist J, Lönnerdal B. Iron supplementation during infancy-effects on expression of iron transporters, iron absorption, and iron utilization in rat pups. *Am J Clin Nutr* 2003; 78 (6): 1203-1211.
78. Frazer DM, Wilkins SJ, Anderson GJ. Elevated iron absorption in the neonatal rat reflects high expression of iron transport genes in the distal alimentary tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293 (3): G525-G531.
79. Domellöf M. Iron requirements, absorption and metabolism in infancy and childhood. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10 (3): 329-35.
80. Domellöf M, Braegger C, Campoy C, et al. Iron requirements of infants and toddlers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 58 (1): 119-29.
81. Powers JM. Iron requirements and iron deficiency in adolescents. UpToDate 2020. Disponible en: <https://www.uptodate.com> (Accedido el 31 de julio de 2020).
82. Clénin G, Cordes M, Huber A, et al. Iron deficiency in sports - definition, influence on performance and therapy. *Swiss Med Wkly* 2015; 145: w14196.
83. Demory-Luce D, Motil KJ. Adolescent eating habits. UpToDate 2020. Disponible en: <https://www.uptodate.com> (Accedido el 31 de julio de 2020).
84. Samaniego-Vaesken ML, Partearroyo T, Olza J, et al. Iron Intake and Dietary Sources in the Spanish Population: Findings from the ANIBES Study. *Nutrients* 2017; 9 (3): 203.
85. Castro de Andrade Cairo RC, Rodrigues Silva L, Carneiro Bustani N, Ferreira Marques CD. Iron deficiency anemia in adolescents; a literature review. *Nutr Hosp* 2014; 29 (6): 1240-9.
86. Sundararajan S, Rabe H. Prevention of iron deficiency anemia in infants and toddlers [published online ahead of print, 2020 Apr 24]. *Pediatr Res* 2020; 10.1038/s41390-020-0907-5.
87. Kumar A, Rai AK, Basu S, Dash D, Singh JS. Cord blood and breast milk iron status in maternal anemia. *Pediatrics* 2008;121(3):e673-7.
88. Moreno-Fernandez J, Ochoa JJ, Latunde-Dada GO, Diaz-Castro J. Iron Deficiency and Iron Homeostasis in Low Birth Weight Preterm Infants: A Systematic Review. *Nutrients* 2019; 11 (5): 1090.
89. McDonald SJ, Middleton P, Dowswell T, Morris PS. Effect of timing of umbilical cord clamping of term infants on maternal and neonatal outcomes. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 7: CD004074.

90. Chaparro CM, Neufeld LM, Tena Alavez G, Eguia-Liz Cedillo R, Dewey KG. Effect of timing of umbilical cord clamping on iron status in Mexican infants: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:1997–2004.
91. Gómez Fernández-Vegue M. Recomendaciones de la Asociación Española de Pediatría sobre la alimentación complementaria. 2018. Disponible en: [https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/recomendaciones\\_aep\\_sobre\\_alimentacio\\_n\\_complementaria\\_nov2018\\_v3\\_final.pdf](https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/recomendaciones_aep_sobre_alimentacio_n_complementaria_nov2018_v3_final.pdf). Accedido el 21 de abril de 2021.
92. Fewtrell M, Bronsky J, Campoy C, Domellöf M, Embleton N, Fidler Mis N, Hojsak I, Hulst JM, Indrio F, Lapillonne A, Molgaard C. Complementary Feeding: A Position Paper by the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2017;64(1):119-132.
93. Male C, Persson LA, Freeman V, Guerra A, van't Hof MA, Haschke F; Euro-Growth Iron Study Group. Prevalence of iron deficiency in 12-mo-old infants from 11 European areas and influence of dietary factors on iron status (Euro-Growth study). *Acta Paediatr* 2001; 90 (5): 492-8.
94. Ziegler EE. Consumption of cow's milk as a cause of iron deficiency in infants and toddlers. *Nutr Rev* 2011; 69 Suppl 1: S37-42.
95. Jiang T, Jeter JM, Nelson SE, Ziegler EE. Intestinal blood loss during cow milk feeding in older infants: quantitative measurements. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000; 154 (7): 673-8.
96. Zimmermann MB, Hurrell RF. Nutritional iron deficiency. *Lancet* 2007; 370 (9586): 511-20.
97. Moráis López A, Dalmau Serra J; Comité de Nutrición de la AEP. Importancia de la ferropenia en el niño pequeño: repercusiones y prevención [Iron deficiency in infants and toddlers: impact on health and preventive strategies]. *An Pediatr (Barc)* 2011;74 (6): 415.e1 - 415.e10.
98. Thane CW, Walmsley CM, Bates CJ, Prentice A, Cole TJ. Risk factors for poor iron status in British toddlers: further analysis of data from the National Diet and Nutrition Survey of children aged 1.5-4.5 years. *Public Health Nutr* 2000; 3 (4): 433-40.
99. Lynch SR. The effect of calcium on iron absorption. *Nutr Res Rev* 2000; 13 (2): 141-58.
100. Pasricha SR, Drakesmith H, Black J, Hipgrave D, Biggs BA. Control of iron deficiency anemia in low- and middle-income countries. *Blood* 2013; 121 (14): 2607-17.

101. Uijterschout L, Vloemans J, Vos R, Teunisse PP, Hudig C, Bubbers S, Verbruggen S, Veldhorst M, de Leeuw T, van Goudoever JB, Brus F. Prevalence and risk factors of iron deficiency in healthy young children in the southwestern Netherlands. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 58 (2): 193-8.
102. Auerbach M. Causes and diagnosis of iron deficiency and iron deficiency anemia in adults. Mentzer WC, ed. *UpToDate*. Waltham, MA: UpToDate Inc. Disponible en: <https://www.uptodate.com>. Accedido el 23 de abril de 2021.
103. Hutchinson C. A review of iron studies in overweight and obese children and adolescents: a double burden in the young? *Eur J Nutr* 2016 Oct; 55 (7): 2179-97.
104. Cepeda-Lopez AC, Aeberli I, Zimmermann MB. Does obesity increase risk for iron deficiency? A review of the literature and the potential mechanisms. *Int J Vitam Nutr Res* 2010; 80 (4-5): 263-70.
105. Coimbra S, Catarino C, Santos-Silva A. The role of adipocytes in the modulation of iron metabolism in obesity. *Obes Rev* 2013; 14 (10): 771-9.
106. DeBoer MD (2013) Obesity, systemic inflammation, and increased risk for cardiovascular disease and diabetes among adolescents: a need for screening tools to target interventions. *Nutrition* 2013; 29: 379–386.
107. Tussing-Humphreys L, Pusatcioglu C, Nemeth E, Braunschweig C. Rethinking iron regulation and assessment in iron deficiency, anemia of chronic disease, and obesity: introducing hepcidin. *J Acad Nutr Diet* 2012; 112: 391–400.
108. Cerami C. Iron Nutrition of the Fetus, Neonate, Infant, and Child. *Ann Nutr Metab* 2017; 71 (Suppl 3):8-14.
109. Burhans MS, Dailey C, Beard Z, Wiesinger J, Murray-Kolb L, Jones BC, Beard JL. Iron deficiency: differential effects on monoamine transporters. *Nutr Neurosci* 2005; 8 (1): 31-8.
110. Lozoff B, Georgieff MK. Iron deficiency and brain development. *Semin Pediatr Neurol* 2006; 13 (3): 158-65.
111. Lozoff B, Jimenez E, Hagen J, Mollen E, Wolf AW. Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. *Pediatrics* 2000; 105 (4): E51.
112. McCann S , Perapoch Amadó M, Moore SE. The Role of Iron in Brain Development: A Systematic Review. *Nutrients* 2020; 12 (7): 2001.
113. Ji X, Cui N, Liu J. Neurocognitive Function Is Associated With Serum Iron Status in Early Adolescents. *Biol Res Nurs* 2017; 19 (3): 269–77.
114. East P, Delker E, Lozoff B, Delva J, Castillo M, Sheila Gahagan S. Associations among Infant Iron Deficiency, Childhood Emotion and Attention Regulation, and Adolescent Problem Behaviors. *Child Dev* 2018; 89 (2): 593–608.

115. Bruner AB, Joffe A, Duggan AK, Casella JF, Brandt J. Randomised study of cognitive effects of iron supplementation in non-anaemic iron-deficient adolescent girls. *Lancet* 1996; 348 (9033): 992-6.
116. Brock JH, Mulero V. Cellular and molecular aspects of iron and immune function. *Proc Nutr Soc* 2000; 59 (4): 537-40.
117. Beard JL. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr* 2001; 131 (2S-2): 568S-579S.
118. Borgna-Pignatti C, Zanella S. Pica as a manifestation of iron deficiency. *Expert Rev Hematol* 2016; 9 (11): 1075-80.
119. Howard H, Kamat D. Restless Legs Syndrome in Children. *Pediatr Ann* 2018; 47 (12): e504-e506.
120. Köksal AO, Özdemir O, Büyükkaragöz B, Karaömerlioglu M, Bulus AD. The Association Between Plasma Ferritin Level and Simple Febrile Seizures in Children. *J Pediatr Hematol Oncol* 2016; 38 (7): 512-6.
121. Papageorgiou V, Vargiami E, Kontopoulos E, Kardaras P, Economou M, Athanassiou-Mataxa M, Kirkham F, Zafeiriou DI. Association between iron deficiency and febrile seizures. *Eur J Paediatr Neurol* 2015; 19 (5): 591-6.
122. Thomas DW, Hinchliffe RF, Briggs C, Macdougall IC, Littlewood T, Cavill I; British Committee for Standards in Haematology. Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. *Br J Haematol* 2013; 161 (5): 639-48.
123. Thomas L, Thomas C. Detection of iron restriction in anaemic and non-anaemic patients: New diagnostic approaches. *Eur J Haematol* 2017; 99 (3): 262-8.
124. Ahmed MH, Ghatge MS, Safo MK. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Subcell Biochem.* 2020;94:345-382.
125. Nathan DG, Oski FA. *Hematology of Infancy and Childhood*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1993, p. 352.
126. World Health Organisation Library. *Assessing the iron status of populations: including literature reviews: report of a Joint World Health Organization/Centers for Disease Control and Prevention Technical Consultation on the Assessment of Iron Status at the Population Level*, Geneva, Switzerland, 6–8 April 2004. – 2nd ed.
127. Hoffmann JJ, Urrechaga E, Aguirre U. Discriminant indices for distinguishing thalassemia and iron deficiency in patients with microcytic anemia: a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53 (12): 1883-94.
128. Aydogan G, Keskin S, Akici F, Salcioglu Z, Bayram C, Uysalol EP, Gucer TNT, Ersoy G, Ozdemir N. Causes of Hypochromic Microcytic Anemia in Children and Evaluation of Laboratory Parameters in the Differentiation. *J Pediatr Hematol Oncol* 2019; 41 (4): e221-e223.

129. Bouri S, Martin J. Investigation of iron deficiency anaemia. *Clin Med (Lond)* 2018; 18 (3): 242-44.
130. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations to prevent and control iron deficiency in the United States. *MMWR Recomm Rep* 1998; 47 (RR-3): 1-29.
131. Piva E, Brugnara C, Spolaore F, Plebani M. Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clin Lab Med* 2015; 35 (1): 133-63.
132. Means RT, Brodsky RA. Diagnostic approach to anemia in adults. Disponible en: [uptodate.com](http://uptodate.com). Actualizado el 9 de abril de 2021. Accedido el 3 de junio de 2021.
133. Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800 (8): 760-9.
134. World Health Organization. Serum ferritin concentrations for assessment of iron status and iron deficiency in populations Scope and Purpose. Geneva; 2011. Disponible en: [https://www.who.int/vmnis/indicators/serum\\_ferritin.pdf](https://www.who.int/vmnis/indicators/serum_ferritin.pdf). Accedido el 4 de junio de 2021.
135. Borel MJ et al. Day-to-day variation in iron-status indices in healthy men and women. *American Journal of Clinical Nutrition* 1991; 54: 729–35.
136. Mei Z, Parvanta I, Cogswell ME, Gunter EW, Grummer-Strawn LM. Erythrocyte protoporphyrin or hemoglobin: which is a better screening test for iron deficiency in children and women? *Am J Clin Nutr* 2003; 77 (5): 1229-33.
137. Soldin OP, Pezzullo JC, Hanak B, Miller M, Soldin SJ. Changing trends in the epidemiology of pediatric lead exposure: interrelationship of blood lead and ZPP concentrations and a comparison to the US population. *Ther Drug Monit* 2003; 25 (4): 415-20.
138. Camaschella C. Iron-deficiency anemia. *N Engl J Med* 2015;372 (19): 1832-43.
139. World Health Organization. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and mineral nutrition information system. Geneva: World Health Organization, 2011. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85839/WHO\\_NMH\\_NHD\\_MNM\\_11.1\\_eng.pdf?sequence=22&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85839/WHO_NMH_NHD_MNM_11.1_eng.pdf?sequence=22&isAllowed=y). Accedido el 10 de junio de 2021.
140. Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *Lancet* 2016; 387 (10021): 907-16.
141. World Health Organization. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005. WHO Global Database on Anaemia. Geneva: World Health Organization, 2007. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43894>. Accedido el 18 de junio de 2021.



142. McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, de Benoist B. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public Health Nutr* 2009; 12 (4): 444-54.
143. World Health Organization. The Global Prevalence of anaemia in 2011. Geneva: World Health Organization, 2015. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/177094>. Accedido el 18 de junio de 2021.
144. Galicia L, Grajeda R, de Romaña DL. Nutrition situation in Latin America and the Caribbean: current scenario, past trends, and data gaps. *Rev Panam Salud Publica* 2016; 40 (2): 104-13.
145. Das DK, Biswas R. Nutritional status of adolescent girls in a rural area of North 24 Parganas district, West Bengal. *Indian J Public Health* 2005; 49 (1): 18-21.
146. Soekarjo DD, de Pee S, Bloem MW, Tjiong R, Yip R, Schreurs WH, Muhilal. Socio-economic status and puberty are the main factors determining anaemia in adolescent girls and boys in East Java, Indonesia. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55 (11): 932-9.
147. Chalise B, Aryal KK, Mehta RK, Dhimal M, Sapkota F, Mehata S, Karki KB, Madjidian D, Patton G, Sawyer S. Prevalence and correlates of anemia among adolescents in Nepal: Findings from a nationally representative cross-sectional survey. *PLoS One* 2018; 13 (12): e0208878.
148. Zhu Z, Sudfeld CR, Cheng Y, Qi Q, Li S, Elhoumed M, Yang W, Chang S, Dibley MJ, Zeng L, Fawzi WW. Anemia and associated factors among adolescent girls and boys at 10-14 years in rural western China. *BMC Public Health* 2021; 21 (1): 218.
149. Akhtar S, Ahmed A, Ahmad A, Ali Z, Riaz M, Ismail T. Iron status of the Pakistani population-current issues and strategies. *Asia Pac J Clin Nutr* 2013; 22 (3): 340-7.
150. Hwalla N, Al Dhaheri AS, Radwan H, Alfawaz HA, Fouda MA, Al-Daghri NM, Zaghloul S, Blumberg JB. The Prevalence of Micronutrient Deficiencies and Inadequacies in the Middle East and Approaches to Interventions. *Nutrients* 2017; 9 (3): 229.
151. Massawe SN, Ronquist G, Nyström L, Lindmark G. Iron status and iron deficiency anaemia in adolescents in a Tanzanian suburban area. *Gynecol Obstet Invest* 2002; 54 (3): 137-44.
152. Alaofè H, Zee J, Turgeon O'Brien H. Apports alimentaires en fer et anémie ferriprive chez des adolescentes au Bénin [Dietary iron and iron deficiency anemia among adolescent girls from Benin]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2007; 55 (3): 187-96.

153. Woodruff BA, Blanck HM, Slutsker L, Cookson ST, Larson MK, Duffield A, Bhatia R. Anaemia, iron status and vitamin A deficiency among adolescent refugees in Kenya and Nepal. *Public Health Nutr* 2006; 9 (1): 26-34.
154. Worku MG, Tesema GA, Teshale AB. Prevalence and determinants of anemia among young (15-24 years) women in Ethiopia: A multilevel analysis of the 2016 Ethiopian demographic and health survey data. *PLoS One* 2020; 15 (10): e0241342.
155. Deegan H, Bates HM, McCargar LJ. Assessment of iron status in adolescents: dietary, biochemical and lifestyle determinants. *J Adolesc Health* 2005; 37 (1): 75.
156. Hallberg L, Hultén L, Lindstedt G, Lundberg PA, Mark A, Purens J, Svanberg B, Swolin B. Prevalence of iron deficiency in Swedish adolescents. *Pediatr Res* 1993; 34 (5): 680-7.
157. Milman N. Serum ferritin in Danes: studies of iron status from infancy to old age, during blood donation and pregnancy. *Int J Hematol* 1996; 63 (2): 103-35.
158. Eskeland B, Hunskaar S. Anaemia and iron deficiency screening in adolescence: a pilot study of iron stores and haemoglobin response to iron treatment in a population of 14-15-year-olds in Norway. *Acta Paediatr* 1999; 88 (8): 815-21.
159. Armstrong PL. Iron deficiency in adolescents. *BMJ* 1989; 298 (6672): 499.
160. Nelson M, White J, Rhodes C. Haemoglobin, ferritin, and iron intakes in British children aged 12-14 years: a preliminary investigation. *Br J Nutr* 1993; 70 (1): 147-55.
161. Aranceta Bartrina J, Pérez Rodrigo C, Marzana Sanz I, Egileor Gurtubai I, Gondra Rezola J, González de Galdeano L, Sáenz de Buruaga Renobales J. Prevalencia de anemia ferropénica en el País Vasco [Prevalence of iron-deficiency anemia in the Basque Country]. *Aten Primaria* 1998; 22 (6): 353-61.
162. Hermosa V, Mazo E, Bureo E, Carril JJ, Cordovilla J, Zubizarreta A. Estudio prospectivo sobre la prevalencia de ferropenia en Cantabria entre niños de seis a catorce años [Prospective study on the prevalence of iron deficiency in Cantabria among children 6 to 14 years old]. *An Esp Pediatr* 1987; 27 (4): 275-80.
163. Durá Travé T, Aguirre Abad P, Mauleón Rosquil C, Oteiza Flores MS, Díaz Velaz L. Carencia de hierro en adolescentes (10-14 años) [Lack of iron in adolescents aged 10 to 14]. *Aten Primaria* 2002; 29 (2): 72-7; discussion 77-8.
164. Wish JB. Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1 Suppl 1: S4-8.
165. Brugnara C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. *Clin Chem* 2003; 49 (10): 1573-8.
166. Ogawa C, Tsuchiya K, Maeda K. Reticulocyte hemoglobin content. *Clin Chim Acta* 2020; 504: 138-45.

167. Mast AE, Blinder MA, Dietzen DJ. Reticulocyte hemoglobin content. *Am J Hematol* 2008; 83 (4): 307-10.
168. Mohandas N, Kim YR, Tycko DH, Orlik J, Wyatt J, Groner W. Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering. *Blood* 1986; 68 (2): 506-13.
169. Mocini D, Leone T, Tubaro M, Santini M, Penco M. Structure, production and function of erythropoietin: implications for therapeutical use in cardiovascular disease. *Curr Med Chem* 2007; 14 (21): 2278-87.
170. Sieff CA. Regulation of erythropoiesis. Disponible en: [uptodate.com](http://uptodate.com). Actualizado el 12 de mayo de 2021. Accedido el 2 de julio de 2021.
171. Pérez Surribas D, Gella Concustell A, Cruz Iglesias E, Hermoso Durán S, Urrechaga Igartua E, Alcaide Martín MJ, Merino González A. Estudio de la ferropenia en el laboratorio clínico. *Rev Lab Clin* 2019; 12 (4): e34-e53.
172. Parodi E, Giraudo MT, Davitto M, Ansaldi G, Mondino A, Garbarini L, Franzil A, Mazzone R, Russo G, Ramenghi U. Reticulocyte parameters: markers of early response to oral treatment in children with severe iron-deficiency anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2012; 34 (6): e249-52.
173. Kim JM, Ihm CH, Kim HJ. Evaluation of reticulocyte haemoglobin content as marker of iron deficiency and predictor of response to intravenous iron in haemodialysis patients. *Int J Lab Hematol* 2008; 30 (1): 46-52.
174. Mittman N, Sreedhara R, Mushnick R, et al. Reticulocyte hemoglobin content predicts functional iron deficiency in hemodialysis patients receiving rHuEPO. *Am J Kidney Dis* 1997; 30: 912–22.
175. Tsuchiya K, Okano H, Teramura M, et al. Content of reticulocyte hemoglobin is a reliable tool for determining iron deficiency in dialysis patients. *Clin Nephrol* 2003; 59: 115–23.
176. Chuang CL, Liu RS, Wei YH, et al. Early prediction of response to intravenous iron supplementation by reticulocyte haemoglobin content and highfluorescence reticulocyte count in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 370–7.
177. Stoffman N, Brugnara C, Woods ER. An algorithm using reticulocyte hemoglobin content (CHr) measurement in screening adolescents for iron deficiency. *J Adolesc Health* 2005; 36 (6): 529.
178. Vicinanza P, Vicinanza M, Cosimato V, Terracciano D, Cancellario S, Massari A, Danise P, Selleri C, Serio B. Mean reticulocyte hemoglobin content index plays a key role to identify children who are carriers of  $\beta$ -thalassemia. *Transl Med UniSa* 2018; 17: 34-9.

179. Mast AE, Blinder MA, Lu Q, Flax S, Dietzen DJ. Clinical utility of the reticulocyte hemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 2002; 99 (4): 1489-91.
180. Brugnara C, Zurakowski D, DiCanzio J, Boyd T, Platt O. Reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in children. *JAMA* 1999; 281 (23): 2225-30.
181. Bakr AF, Sarette G. Measurement of reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in Saudi children. *Eur J Pediatr* 2006; 165 (7): 442-5.
182. Mateos ME, De-la-Cruz J, López-Laso E, Valdés MD, Nogales A. Reticulocyte hemoglobin content for the diagnosis of iron deficiency. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008; 30 (7): 539-42.
183. Torsvik IK, Markestad T, Ueland PM, Nilsen RM, Midttun O, Bjørke Monsen AL. Evaluating iron status and the risk of anemia in young infants using erythrocyte parameters. *Pediatr Res* 2013; 73 (2): 214-20.
184. Lorenz L, Arand J, Büchner K, Wacker-Gussmann A, Peter A, Poets CF, Franz AR. Reticulocyte haemoglobin content as a marker of iron deficiency. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2015; 100 (3): F198-202.
185. Ullrich C, Wu A, Armsby C, Rieber S, Wingerter S, Brugnara C, Shapiro D, Bernstein H. Screening healthy infants for iron deficiency using reticulocyte hemoglobin content. *JAMA* 2005; 294 (8): 924-30.
186. Kiudeliene R, Griniūte R, Labanauskas L. Prognostic value of reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in 6-24-month-old children. *Medicina (Kaunas)* 2008; 44 (9): 673-7.
187. Chouliaras GL, Stamoulakatou A, Tsiftis G, Perissaki G, Premetis E, Lycopoulou L. Age, beta thalassaemia trait, and iron-deficient anaemia significantly affect reticulocyte indices in pre-school children. *Eur J Pediatr* 2010; 169 (9): 1097-104.
188. Teixeira C, Barbot J, Freitas MI. Reference values for reticulocyte parameters and hypochromic RBC in healthy children. *Int J Lab Hematol* 2015; 37 (5): 626-30.
189. Malczewska-Lenczowska J, Orysiak J, Szczepańska B, Turowski D, Burkhard-Jagodzińska K, Gajewski J. Reticulocyte and erythrocyte hypochromia markers in detection of iron deficiency in adolescent female athletes. *Biol Sport* 2017; 34( 2): 111-8.
190. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem* 2002; 48 (7): 1066-76.
191. Markovic M, Majkić-Singh N, Ignjatović S, et al. Reticulocyte haemoglobin content vs. soluble transferrin receptor and ferritin index in iron deficiency anaemia accompanied with inflammation. *Int J Lab Hematol* 2007; 29: 341-6.
192. Jandl JH, Katz JH. The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J Clin Invest* 1963; 42 (3): 314-26.

193. Harms K, Kaiser T. Beyond soluble transferrin receptor: old challenges and new horizons. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015; 29 (5): 799-810.
194. Feelders RA, Kuiper-Kramer EP, van Eijk HG. Structure, function and clinical significance of transferrin receptors. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37 (1): 1-10.
195. Speeckaert MM, Speeckaert R, Delanghe JR. Biological and clinical aspects of soluble transferrin receptor. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2010; 47 (5-6): 213-28.
196. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta* 2003; 329 (1-2): 9-22.
197. Huebers HA, Beguin Y, Pootrakul P, Einspahr D, Finch CA. Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood* 1990; 75 (1): 102-7.
198. Beguin Y, Clemons GK, Pootrakul P, Fillet G. Quantitative assessment of erythropoiesis and functional classification of anemia based on measurements of serum transferrin receptor and erythropoietin. *Blood* 1993; 81 (4): 1067-76.
199. Dimitriou H, Stiakaki E, Markaki EA, Bolonaki I, Giannakopoulou C, Kalmanti M. Soluble transferrin receptor levels and soluble transferrin receptor/log ferritin index in the evaluation of erythropoietic status in childhood infections and malignancy. *Acta Paediatr* 2000; 89 (10): 1169-73.
200. El-Nawawy A, Massoud MN, El-Bordiny M, Hegazy S. Evaluation of serum soluble transferrin receptors and erythropoietin levels as indicators for erythropoietic activity among multi-transfused beta-thalassemic patients. *J Trop Pediatr* 2002; 48 (1): 33-8.
201. Tancabelic J, Sheth S, Paik M, Piomelli S. Serum transferrin receptor as a marker of erythropoiesis suppression in patients on chronic transfusion. *Am J Hematol* 1999; 60 (2): 121-5.
202. Daschner M, Mehls O, Schaefer F. Soluble transferrin receptor is correlated with erythropoietin sensitivity in dialysis patients. *Clin Nephrol.* 1999; 52 (4): 246-52.
203. Skikne BS, Flowers CH, Cook JD. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 1990; 75 (9): 1870-6.
204. Zhu YI, Haas JD. Response of serum transferrin receptor to iron supplementation in iron-depleted, nonanemic women. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 271-5.
205. Anttila R, Cook JD, Siimes MA. Body iron stores decrease in boys during pubertal development: the transferrin receptor-ferritin ratio as an indicator of iron status. *Pediatr Res* 1997; 41: 224-8.
206. Suominen P, Punnonen K, Rajamäki A, Irjala K. Serum transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index identify healthy subjects with subclinical iron deficits. *Blood* 1998; 92 (8): 2934-9.

207. Baynes RD, Cook JD, Bothwell TH, Friedman BM, Meyer TE. Serum transferrin receptor in hereditary hemochromatosis and African siderosis. *Am J Hematol* 1994; 45: 288– 92.
208. Khumalo H, Gomo ZA, Moyo VM, et al. Serum transferrin receptors are decreased in the presence of iron overload. *Clin Chem* 1998; 44: 40– 4.
209. Berlin T, Meyer A, Rotman-Pikielny P, Natur A, Levy Y. Soluble transferrin receptor as a diagnostic laboratory test for detection of iron deficiency anemia in acute illness of hospitalized patients. *Isr Med Assoc J* 2011; 13 (2): 96-8.
210. Ferguson BJ, Skikne BS, Simpson KM, Baynes RD, Cook JD. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. *J Lab Clin Med* 1992; 119: 385– 90.
211. Malope BI, MacPhail AP, Alberts M, Hiss DC. The ratio of serum transferrin receptor and serum ferritin in the diagnosis of iron status. *Br J Haematol* 2001; 115 (1): 84-9.
212. Vázquez López MA, Lendínez Molinos F, Leyva Carmona M, Carracedo Morales A, Muñoz Vico FJ, López Muñoz J, Muñoz Hoyos A. Serum transferrin receptor in children: usefulness for determining the nature of anemia in infection. *J Pediatr Hematol Oncol* 2006; 28 (12): 809-15.
213. Flowers CH, Skikne BS, Covell AM, Cook JD. The clinical measurement of serum transferrin receptor. *J Lab Clin Med* 1989; 114: 368–77.
214. Kohgo Y, Nishisato T, Kondo H, Tsushima N, Niitsu Y, Urushizaki I. Circulating transferrin receptor in human serum. *Br J Haematol* 1986; 64: 277–81.
215. Thorpe SJ, Health A, Sharp G, et al. AWHO reference reagent for the serum transferrin receptor (sTfR): international collaborative study to evaluate a recombinant soluble transferrin receptor preparation. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 815–20.
216. Choi JW, Pai SH. Associations between serum transferrin receptor concentrations and erythropoietic activities according to body iron status. *Ann Clin Lab Sci* 2003;33 (3): 279-84.
217. Choi JW. Sensitivity, specificity, and predictive value of serum soluble transferrin receptor at different stages of iron deficiency. *Ann Clin Lab Sci* 2005; 35 (4): 435-9.
218. Kuiper-Kramer EP, Baerts W, Bakker R, van Eyck J, van Raan J, van Eijk HG. Evaluation of the iron status of the newborn by soluble transferrin receptors in serum. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36 (1): 17-21.

219. Chouliaras GL, Premetis E, Tsiftis G, Drosatou P, Papassotiriou I, Stamoulakatou A, Lycopoulou L. Serum transferrin receptors: Distribution and diagnostic performance in pre-school children. *Blood Cells Mol Dis* 2009; 43 (2): 163-8.
220. Vázquez-López MA, López-Ruzafa E, Lendinez-Molinos F, Ortiz-Pérez M, Ruiz-Tudela L, Martín-González M. Reference values of serum transferrin receptor (sTfR) and sTfR/log ferritin index in healthy children. *Pediatr Hematol Oncol* 2016 Mar; 33 (2): 109-20.
221. Lin XM, Ji CY, Liu WJ, Long Z, Shen XY. Levels of serum transferrin receptor and its response to Fe-supplement in Fe-deficient children. *Br J Nutr* 2006; 96 (6): 1134-9.
222. Cogswell ME, Looker AC, Pfeiffer CM, Cook JD, Lacher DA, Beard JL, Lynch SR, Grummer-Strawn LM. Assessment of iron deficiency in US preschool children and nonpregnant females of childbearing age: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2006. *Am J Clin Nutr* 2009; 89 (5): 1334-42.
223. Suominen P, Punnonen K, Rajamaäki A, Majuri R, Haänninen V, Irjala K. Automated immunoturbidimetric method for measuring serum transferrin receptor. *Clin Chem* 1999; 45: 1302-5.
224. Suominen P, Virtanen A, Lehtonen-Veromaa M, Heinonen OJ, Salmi TT, Alanen M, Möttönen T, Rajamäki A, Irjala K. Regression-based reference limits for serum transferrin receptor in children 6 months to 16 years of age. *Clin Chem* 2001; 47 (5): 935-7.
225. Aleo Luján E, Gil López C, González Fernández FA, Villegas Martínez A, Valverde Moreno F. Receptor sérico de transferrina en niños sanos. Valor diagnóstico en la anemia infecciosa y en la ferropénica. *An Pediatr (Barc)* 2004; 60 (5): 428-35.
226. Kratovil T, DeBerardinis J, Gallagher N, Luban NL, Soldin SJ, Wong EC. Age specific reference intervals for soluble transferrin receptor (sTfR). *Clin Chim Acta* 2007; 380: 222-4.
227. Ooi CL, Lepage N, Nieuwenhuys E, Sharma AP, Filler G. Pediatric reference intervals for soluble transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index. *World J Pediatr* 2009; 5: 122-6.
228. Punnonen K, Irjala K, Rajamäki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997; 89 (3): 1052-7.
229. Koulaouzidis A, Said E, Cottier R, Saeed AA. Soluble transferrin receptors and iron deficiency, a step beyond ferritin. A systematic review. *J Gastrointest Liver Dis* 2009; 18 (3): 345-52.

230. Vázquez López MA, Carracedo A, Lendinez F, Muñoz FJ, López J, Muñoz A. The usefulness of serum transferrin receptor for discriminating iron deficiency without anemia in children. *Haematologica* 2006; 91 (2): 264-5.
231. Rimon E, Levy S, Sapir A, et al. Diagnosis of iron deficiency anemia in the elderly by transferrin receptor-ferritin index. *Arch Intern Med* 2002; 162: 445-449.





***CAPÍTULO III:  
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS,  
OBJETIVOS Y METODOLOGÍA***

---

## IIIa. JUSTIFICACIÓN

---

La adolescencia es considerada un periodo de mayor riesgo de ferropenia, por los cambios fisiológicos que acontecen, que aumentan la demanda de hierro, unido a la mayor frecuencia de hábitos dietéticos inadecuados, con un consumo más frecuente de alimentos con pobre valor nutricional y dietas poco balanceadas. El déficit de hierro constituye una importante causa de morbilidad a lo largo de la vida, con un impacto negativo sobre el rendimiento físico y cognitivo en niños, adolescentes y adultos, aún en ausencia de anemia. Por todo ello, es primordial la detección de la ferropenia en estadios precoces en la población adolescente.

Sin embargo, el diagnóstico de déficit de hierro es complejo, ya que no existe un parámetro único indicativo de ferropenia, si no que habitualmente es necesario emplear varios parámetros simultáneamente para valorar el estado de hierro corporal, y éstos frecuentemente están influidos por otros factores, especialmente si existe una patología subyacente que condiciona un estado de inflamación sistémica, ya que las citoquinas proinflamatorias interfieren en la regulación del metabolismo férrico.

En los últimos años se han estudiado nuevos parámetros analíticos que no están influidos por estos factores externos y que indican de forma más fidedigna la disponibilidad de hierro en el organismo para sus funciones biológicas, entre ellos el RsTf y el CHr. También se han investigado índices que los relacionan fundamentalmente con la ferritina, que es el parámetro bioquímico que mejor refleja la cantidad de hierro almacenada en los depósitos, aún con sus limitaciones. Sin embargo, hay pocos estudios en los que se hayan establecido cuáles son los valores de referencia de estos parámetros e índices en adolescentes sanos, ya que al igual que la mayoría de determinaciones analíticas, sus valores normales sufren variaciones durante el desarrollo y no son extrapolables de la población adulta.

Un mejor conocimiento de los valores de referencia del RsTf, el CHr y el índice RsTf-F en los adolescentes sanos, determinados en una muestra representativa con estrictos criterios de inclusión, junto con el análisis de las variables que influyen sobre éstos, como el sexo, la edad o el estado puberal, pueden contribuir a establecer nuevos criterios diagnósticos de ferropenia en base a ellos, con las ventajas que aportan sobre los parámetros clásicos. Esto, además, puede ayudar a conocer la prevalencia de

ferropenia en los adolescentes de nuestro medio, y analizar cuáles son las variables sociales, económicas y dietéticas que contribuyen a su aparición, de forma que se puedan establecer estrategias de prevención, detección precoz y tratamiento, con un impacto positivo sobre los adolescentes de nuestra comunidad.

## **IIIb. HIPÓTESIS**

---

1. El RsTf, el CHr y el índice RsTf-F son parámetros útiles, con elevada sensibilidad y especificidad, para el diagnóstico de ferropenia en la población adolescente de Almería.
2. La prevalencia de ferropenia y anemia ferropénica en los adolescentes almerienses, definidas en base a la determinación del RsTf, el CHr y el índice RsTf-F, junto con la ferritina sérica y la Hb, son similares a las que presentan países industrializados con nivel socioeconómico y hábitos dietéticos similares.

## IIIc. OBJETIVOS

---

1. Objetivo principal:

Estimar la prevalencia de ferropenia y anemia ferropénica en la población adolescente de Almería, mediante el uso del RsTf, el CHr y el índice RsTf-F como herramientas diagnósticas.

2. Objetivos secundarios:

- a. Analizar las variables físicas, sociales, económicas y dietéticas relacionadas con la ferropenia en adolescentes de nuestro medio.
- b. Establecer valores de referencia del RsTf, el CHr y el índice RsTf-F en adolescentes, teniendo en cuenta la potencial variabilidad derivada de la edad, el sexo, el desarrollo puberal y el estado nutricional.
- c. Evaluar la utilidad diagnóstica del RsTf, el CHr y el índice RsTf-F para el diagnóstico de ferropenia, y determinar valores *cut-off* óptimos indicativos de déficit de hierro en función de la edad y el sexo.
- d. Proponer unos nuevos criterios diagnósticos de ferropenia y anemia ferropénica en adolescentes, basados en la determinación del RsTf, el CHr y/o el índice RsTf-F, junto con la ferritina y la Hb.

## IIIId. METODOLOGÍA

---

La investigación llevada a cabo en esta Tesis Doctoral forma parte de un gran estudio nutricional que incluyó una amplia muestra de niños y adolescentes, realizado en la ciudad de Almería durante el periodo 2007-2009.

**Diseño.** Estudio observacional descriptivo transversal.

**Población de estudio.** Adolescentes residentes en la ciudad de Almería (España) en el año 2008, con edades comprendidas entre los 12 y los 16 años.

**Selección de la muestra.** El tamaño muestral fue calculado en base a los 9.238 adolescentes entre 12 y 16 años escolarizados en uno de los 38 centros de educación secundaria, tanto públicos como privados, existentes en la ciudad de Almería. Asumiendo una prevalencia de ferropenia del 10%, con un intervalo de confianza al 95%, y una precisión del 4.5%, era necesaria la inclusión de 260 sujetos para la realización del estudio. Se calculó una prevalencia estimada de sobrepeso y/u obesidad del 25%.

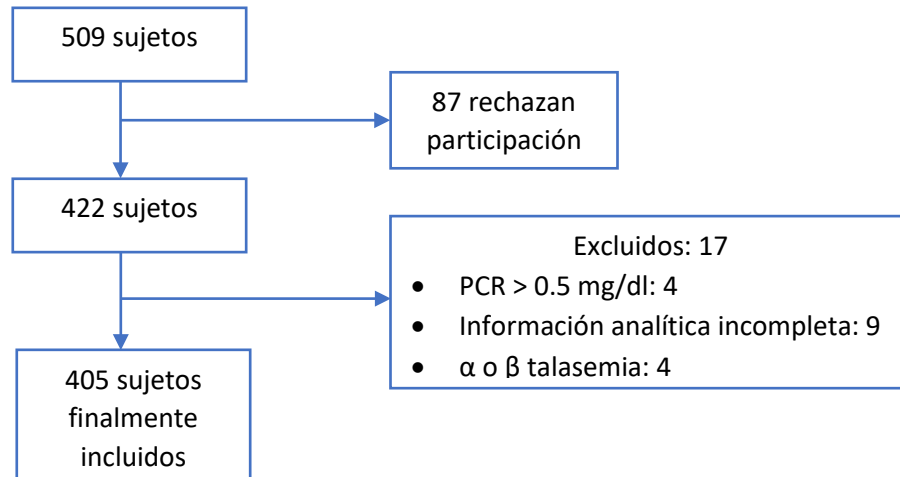
Se realizó un muestreo probabilístico polietápico, en el que se seleccionaron inicialmente 6 centros educativos, y de ellos, una clase de cada curso de educación secundaria, por lo que se incluyeron finalmente 24 clases, a las que asistían un total de 509 adolescentes. A todos ellos se les ofreció participar en el estudio, y un 17% lo rechazó, por lo que se incluyeron 422 sujetos.

Criterios de exclusión:

- Padecimiento de una enfermedad sistémica o hematológica que por sí misma o por su tratamiento pudiera interferir con los resultados.
- Haber recibido tratamiento con hierro en los 3 meses previos.
- Enfermedad febril o infecciosa reciente o un valor de la Proteína C Reactiva en sangre mayor de 0.5 mg/dl.

En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado para la participación en el estudio, tanto de los padres o tutores como de los adolescentes (Anexo I).

De los sujetos incluidos inicialmente, en base a los criterios anteriormente expuestos se excluyeron 17 individuos, por lo que finalmente se incluyeron los datos de 405 sujetos en los análisis realizados.



**Variables analizadas.** A todos los sujetos se les realizó una historia médica, se les practicó una exploración física general con valoración antropométrica, realizaron una encuesta de aspectos socioeconómicos familiares y hábitos dietéticos (Anexo II) y se les extrajo una muestra de sangre periférica mediante venopunción.

Se recogieron:

- Datos de filiación.
- Datos sociodemográficos: sexo, edad, etnia y origen familiar, situación laboral de ambos padres o tutores y su nivel de estudios.
- Antecedentes personales: embarazo, parto, periodo perinatal y alteraciones o patologías durante el desarrollo.
- Datos antropométricos: peso, talla y estadio de desarrollo puberal.
- Encuesta dietética: frecuencia semanal de consumo de verduras, frutas, legumbres, leche y derivados lácteos, huevos, carne y pescado.
- Determinaciones analíticas: hemograma completo con reticulocitos y CHr, PE, hierro sérico, transferrina, IST, ferritina, RsTf, EPO y PCR. El método de determinación de cada uno de ellos está recogido en la metodología de las publicaciones realizadas.

**Análisis estadístico.** Se utilizaron los programas SPSS 17.0 - 20.0 y Epidat 4.0 para el tratamiento de los datos y cálculo del tamaño muestral respectivamente. Los resultados de las variables cuantitativas se expresaron como media (DE) o percentiles e IC95%. Las variables cualitativas se expresaron como porcentajes. Se empleó el test t-Student para comparar medias, o ANOVA para comparar variables con más de dos categorías.



Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ . Cuando los resultados fueron significativos, las diferencias entre grupos se detectaron mediante el test de Bonferroni *post hoc*. En función de los objetivos de cada estudio, se realizaron test de regresión lineal múltiple, regresión logística multivariante y elaboración de curvas ROC, según el caso. La metodología se detalla ampliamente en cada uno de los trabajos realizados y está recogida en los métodos de las distintas publicaciones aportadas.



***CAPÍTULO IV:***  
***MEMORIA DE TRABAJOS***

---

## IVa. Valores de referencia del receptor soluble de la transferrina y del índice sTfR-F en adolescentes

---

### RESUMEN

**Introducción.** La adolescencia es un periodo en el que se incrementan las necesidades de hierro, lo cual influye en el estado de hierro corporal. El objetivo de este estudio es establecer intervalos de referencia del RsTf y el índice RsTf-F en adolescentes sanos, y su relación con otros parámetros del hierro y la eritropoyesis, examinando los cambios que acontecen en ellos.

**Métodos.** Estudio transversal en el que se incluyeron 253 adolescentes sanos sin sobrepeso, de edades comprendidas entre los 12 y los 16 años. Se determinaron la hemoglobina, los índices eritrocitarios, el CHr, los reticulocitos, la ferritina, el índice de saturación de la transferrina, la protoporfirina eritrocitaria, la eritropoyetina, la proteína C reactiva, el RsTf y el índice RsTf-F. Se calcularon los intervalos p2.5-p97.5 del RsTf y el índice RsTf-F. Se observaron los cambios en la eritropoyesis y el estado de hierro corporal en esta franja de edad, y se analizó mediante regresión lineal múltiple cuáles son los factores que influyen en los valores del RsTf y el índice RsTf-F.

**Resultados.** Los valores medios del RsTf y del índice RsTf-F fueron  $1.32 \pm 0.30$  mg/L (IC95% 1.30-1.36 mg/L) y  $0.90 \pm 0.25$  (IC95% 0.87-0.93) respectivamente. Los intervalos de referencia fueron 0.84-1.97 mg/L y 0.51-1.44. Ambos parámetros estaban más elevados en los varones ( $1.39 \pm 0.30$  mg/L versus  $1.23 \pm 0.26$  mg/L,  $p < 0.0001$ ) y ( $0.93 \pm 0.37$  versus  $0.86 \pm 0.22$ ,  $p < 0.04$ ) y descendían con la edad ( $p < 0.0001$  y  $p < 0.04$  respectivamente). No se detectaron modificaciones en la eritropoyetina sérica. La edad, el género, el desarrollo puberal y la ferritina predijeron el 24.1% de la variabilidad del RsTf; y la edad, el género, el desarrollo puberal, la saturación de la transferrina, el CHr,

el número de hematíes y de reticulocitos predijeron el 15% de la variabilidad del índice RsTf-F.

**Conclusiones.** Se han establecido intervalos de referencia del RsTf y el índice RsTf-F en adolescentes sanos. El sexo, la edad y el estado de desarrollo puberal son factores que intervienen en los valores de ambos. Los parámetros del hierro tuvieron mayor influencia en los valores del RsTf y el índice RsTf-F que los parámetros relacionados con la actividad eritropoyética.

## PUBLICACION 1

# Reference values of serum Transferrin Receptor and sTfR/log ferritin Index in healthy adolescents

**Autores.** María Ángeles Vázquez López, María Mercedes Ibáñez Alcalde, Francisco Lendínez Molinos, Ana Mar Ruiz Sánchez, Rafael Galera Martínez, Emilio García García, Tesifón Parrón Carreño y Antonio Bonillo Perales.

**Referencia bibliográfica.** *J Pediatr Hematol Oncol* 2015; 37: 274 – 80.

PMID: 25354256

DOI: 10.1097/MPH.0000000000000274

**Informe del factor de impacto.** En el año 2015 la revista científica *Journal of Pediatric Hematology Oncology* presentaba un *Journal Impact Factor* (JIF) de 1.146 en el *Journal of Citation Reports*, lo cual la sitúa en el tercer cuartil (Q3), en posición 80/120, para la categoría de Pediatría.

# Reference Values of Serum Transferrin Receptor and sTfR/Log Ferritin Index in Healthy Adolescents

María A. Vázquez-López, MD, Mercedes Ibáñez-Alcalde, MPh,  
Francisco Lendínez-Molinos, MD, Ana M. Ruíz-Sánchez, MPh,  
Rafael Galera-Martínez, MPh, Emilio García-García, MD,  
Tesifón Parrón-Carreño, MD, and Antonio Bonillo-Perales, MD

**Summary:** Adolescence is a period of increased iron requirements, which impact on iron status. The purpose of this research is to determine the reference intervals for serum transferrin receptor (sTfR) and sTfR/log ferritin index (sTfR-F index) in healthy adolescents, and their relation with iron parameters and erythropoiesis. A total of 253 healthy adolescents without overweight, aged 12 to 16 years, were selected in a cross-sectional study. Hemoglobin, red cell indices, reticulocyte hemoglobin content (rHb), reticulocytes, ferritin, transferrin saturation, erythrocyte protoporphyrin, erythropoietin, C-reactive protein, sTfR, and sTfR-F index were measured. Changes in erythropoiesis and iron status in the age interval were observed and analyzed, and linear multiple regression was applied to identify the factors that determine the variability of sTfR and sTfR-F index. Mean values for sTfR and sTfR-F index were  $1.32 \pm 0.3$  mg/L (95% CI, 1.3-1.36) and  $0.9 \pm 0.25$  (95% CI, 0.87-0.93). The reference intervals were 0.84 to 1.97 mg/L and 0.51 to 1.44, respectively. sTfR and sTfR-F index values were significantly higher in boys ( $1.39 \pm 0.3$  vs.  $1.23 \pm 0.26$  mg/L,  $P < 0.0001$  and  $0.93 \pm 0.37$  vs.  $0.86 \pm 0.22$ ,  $P < 0.04$ ) and decreased with age ( $P < 0.0001$  and 0.04, respectively). No changes were recorded in erythropoietin. Age, sex, pubertal status, and ferritin predicted 24.1% of sTfR variability and age, sex, pubertal status, transferrin saturation, rHb, erythrocytes, and reticulocytes predicted 15% of sTfR-F index variability.

**Key Words:** healthy adolescents, iron deficiency, serum transferrin receptor, serum transferrin receptor/log ferritin index, serum erythropoietin

(*J Pediatr Hematol Oncol* 2015;37:274–280)

Adolescence is a period of many changes, which give rise to increased iron requirements to support accelerated growth, increased blood volume, greater muscle mass in boys, and menstrual blood losses in girls.<sup>1–3</sup> These changes impact on iron status and erythropoiesis in a short period of time.

The diagnosis of iron deficiency (ID) is not always easy and should be based on the examination of standard

laboratory parameters regarding the status of body iron pools (storage, transport, and function), which are sequentially altered as the negative balance of iron progresses. These parameters change with age and sex and their sensitivity and specificity can be modified in the presence of concomitant inflammatory conditions.<sup>3–7</sup> To improve diagnostic performance, the parameters are used in combination, and the determination of C-reactive protein (CRP) is recommended to eliminate false-negative cases in the presence of inflammation.<sup>8</sup>

In recent decades, due to a better understanding of iron homeostasis, new diagnostic parameters have been incorporated. Serum transferrin receptor (sTfR) is a measure of proven diagnostic utility in ID,<sup>5,8–11</sup> which offers information on the functional pool of iron. It is the soluble form of the transmembrane receptor, present in every cell of the body, and its expression depends primarily on the intracellular requirements of iron and on erythropoietic activity.<sup>11,12</sup> Thus, in ID the expression of sTfR increases, as does its concentration in plasma.<sup>9,11,12</sup> Since the discovery of sTfR, many studies have demonstrated its usefulness in the early detection of tissue ID and in the differential diagnosis of anemia.<sup>10,13–15</sup> The measure is unaffected by inflammation, which is a major advantage over other markers. However, the lack of standardization remains a limitation, and the published reference values depend on the method used, with the immunoturbidimetric assay being the most frequently used and recommended.<sup>12</sup> Nevertheless, normal values have been published for different times of life and pathologic conditions<sup>16–20</sup> as have cutoff values indicative of ID.<sup>9,10,21</sup>

The ratios between sTfR and serum ferritin have added diagnostic value: among other proposals, sTfR/ferritin has been suggested by Skikne et al,<sup>9</sup> the sTfR-F index (sTfR/log ferritin) by Punnonen et al,<sup>10</sup> and log (sTfR/ferritin) by Beguin.<sup>11</sup> All offer similar information about storage and functional pools of iron and could increase the diagnostic efficacy of sTfR or serum ferritin alone.<sup>10–12,14</sup>

In adolescents, few studies have been conducted to establish reference values for sTfR and the sTfR-F index, and mixed results have been reported, with differences in the measurement method used, the subjects selected (there are few population-based studies), and diagnostic criteria for ID. Although reference ranges have been published,<sup>16–18,20</sup> the limits of normality are not well established and most of these studies have not conducted any joint assessment of erythropoietic activity and other subject characteristics that could modify iron parameters, for example, overweight, which is very prevalent among adolescents and considered a chronic inflammatory state<sup>22–24</sup>; therefore, the results obtained are potentially subject to bias.

Received for publication June 10, 2014; accepted September 16, 2014. From the Department of Pediatrics, Torrecárdenas Hospital, Almería, Spain.

M.A.V.-L.: designed the study and carried out the analysis of results; M.A.V.-L. and M.I.-A.: wrote the paper; F.L.-M., A.M.R.-S., E.G.-G., and R.G.-M.: were involved in the clinical assessment of patients; T.P.-C. and A.B.-P.: contributed with their final suggestions.

The authors declare no conflict of interest.

Reprints: María A. Vázquez-López, MD, Plaza del Castillo no. 10, Carboneras, Almería 04140, Spain (e-mails: mavazquezl59@gmail.com; mariaa.vazquez.sspa@juntadeandalucia.es).

Copyright © 2014 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

The goals of this study are to establish appropriate reference intervals of sTfR and the sTfR-F index in healthy adolescents without overweight, to determine the relation between these parameters and those for iron, erythropoietic activity, and other conditions, and also to identify changes in iron status and erythropoiesis at this stage of life.

## METHODS

Cross-sectional study conducted on a population-based representative sample in the city of Almería (Spain), in 2008.

### Subjects

The sample size was calculated with respect to 9823 adolescents ages 12 to 16 years attending one of the 38 public and private secondary schools in Almería. Assuming an ID prevalence of 10%, a 95% confidence interval (CI), and 4.5% precision, a total of 260 subjects were required. The estimated prevalence of obesity/overweight was 25%.<sup>25</sup> Twenty-four classes, 1 from each of the 4 secondary grades at 6 schools, were selected by the probability sampling method. All students in these 24 selected classes were invited to participate. A total of 509 subjects were selected, of whom 17% refused to participate, such that 422 subjects were finally included.

The criteria for exclusion were: (1) subjects with a hematological or systemic disease that, in itself or as a result of its treatment, might affect the test results; (2) subjects with ID<sup>3</sup> or overweight<sup>26</sup>; (3) those with present or previous infectious or febrile disease or CRP value  $> 0.5 \text{ mg/dL}$ <sup>6</sup>; and (4) those who had received oral iron therapy in the previous 3 months.

In all cases, informed consent was obtained from the parents or legal guardians, as well as from the participants themselves. The study was approved by the Ethics and Research Committee of Torrecárdenas Hospital (Almería).

### Survey

Addressed to all of the parents, either in person or by telephone, as described in a previous study.<sup>27</sup> In the present study, only data on the sex and age of the subjects were obtained.

### Anthropometric Measurements and Pubertal Status

All subjects underwent a complete physical examination and the following data were collected: (1) *Pubertal stage* (Tanner stage),<sup>28</sup> according to which the subjects were classified as prepubertal (Tanner 1) or pubertal (Tanner 2 to 5). (2) *Anthropometry*: weight in kilograms, with the subject wearing light clothing, barefoot, using a "Soehnle Professional" digital scale with an accuracy of 100 g, recording the average of 2 measurements; height in meters, using a standard Asimed measure with an accuracy of 1 mm, with the subject barefoot and standing upright, recording the average of 2 measurements; the body mass index (BMI) was calculated using the formula  $\text{weight (kg)/height}^2 \text{ (m)}$  with the *z*-score of the specific BMI SD appropriate for age and sex, using national reference population data.<sup>29</sup> Overweight and obesity were defined using the criteria proposed by the International Obesity Task Force.<sup>26</sup> For the purposes of the present study, both terms are included in the expression "overweight."

### Parameters Measured

Venous blood (6 mL) in fasting subjects, obtained between 8 and 11 AM, were used, and the following parameters were measured: hemoglobin, red cell indices, reticulocyte hemoglobin content (rHb), and reticulocytes in ADVIA-120 counter; erythrocyte protoporphyrin (EP) determined by fluorometric assay<sup>30</sup>; transferrin, serum ferritin, and CRP determined by the immunoturbidimetric method using "Tina-quant-Transferrin," "Tina-quant Ferritin," and CRPLX kits obtained from Roche Diagnostics GmbH (Boehringer Mannheim); serum iron determined by colorimetric assay using the Fe kit obtained from Roche Diagnostics GmbH; total iron-binding capacity (TIBC), calculated as  $1 \text{ mg transferrin/dL} \times 1.27 = 1 \mu\text{g IBC/dL}$ ; transferrin saturation (TS), calculated as  $\text{serum iron/TIBC} \times 100$ ; serum erythropoietin (sEPO) determined by enzyme immunoassay using the Quantikine IVD-Human Erythropoietin kit (R&D Systems, Minneapolis); sTfR, determined by immunoturbidimetric assay using the Quantex sTfR kit (Biokit SA, Barcelona); and the sTfR-F index, calculated as  $\text{sTfR/log ferritin}$ .<sup>10</sup>

According to the normality cutoff values for age and sex,<sup>3</sup> iron status was classified into 4 categories: normal, iron stores depletion (ISD), iron-deficient erythropoiesis (IDE), and iron-deficiency anemia (IDA). The last 3 of these categories were considered ID. ISD was defined as serum ferritin  $< 12 \mu\text{g/mL}$ ; IDE:  $\geq 2$  parameters altered (mean corpuscular volume:  $< 76 \text{ fL}$ ; serum ferritin  $< 12 \mu\text{g/L}$ ; TS  $< 14\%$ ; EP  $< 70 \mu\text{g/dL}$  erythrocytes); IDA: IDE + hemoglobin  $< 11.5 \text{ g/dL}$  in girls and  $< 12 \text{ g/dL}$  in boys. In cases of isolated microcytosis, thalassemia traits ( $\alpha$  or  $\beta$ ) were excluded.

### Statistical Analysis

SPSS 17.0 software for Windows, and Epidat 4.0 for the sample calculation, were used. Results are expressed as mean  $\pm$  SD and 95% CI. The qualitative variables are expressed as percentages. The Student *t* test was applied to compare the means and the ANOVA test was used to compare  $> 2$  groups. When the results were significant, differences between groups were identified using the Bonferroni post hoc test. Linear multiple regression analysis was used to determine the associations of the dependent variables (sTfR and the sTfR-F index) and the other independent variables (laboratory measurements, age, sex, *z*-BMI, and pubertal status). The independent variables were introduced in a single step. Collinearity diagnostic and residual analyses were performed to assess the goodness of fit of the model obtained and to reveal any violation of its assumptions (linearity, normality, homoscedasticity, and independence of errors). In all cases, a *P*-value  $< 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

Of the 509 subjects selected, 422 agreed to participate. Of these, 3 were excluded due to  $\beta$ -thalassemia trait, 1 with  $\alpha$ -thalassemia trait, 4 with elevated CRP levels suggestive of recent infection, 9 due to loss of relevant analytical results, 117 were classified as overweight, and 35 presented some degree of ID. Thus, a total of 253 subjects were finally analyzed. The subjects' average age was  $14 \pm 1.3$  years (95% CI, 13.8-14.2), 55.7% were male, 18.8% were part of an immigrant family, 93% were Tanner stage 2 to 5, and the mean *z*-score of BMI was  $-0.4 \pm 0.54$  (95% CI,  $-0.47$  to  $-0.33$ ).



**TABLE 1.** Mean Values and Reference Intervals for Analytical Parameters in Healthy Adolescents

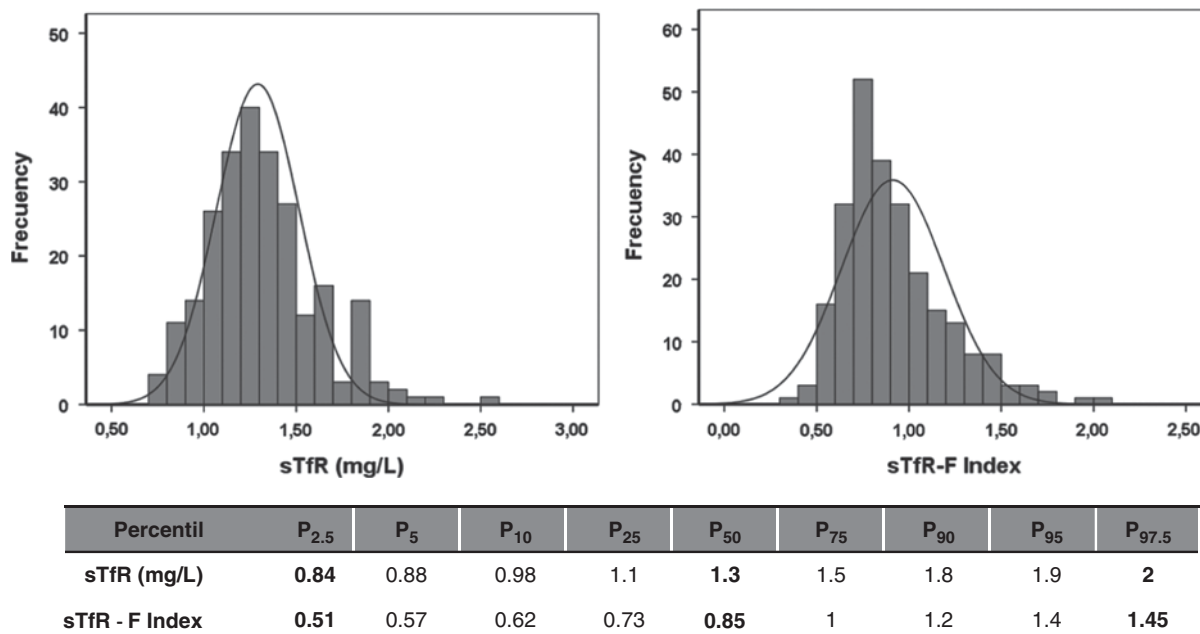
Variables	Mean ± SD	95% CI	Reference Interval P <sub>2.5</sub> -P <sub>97.5</sub>
Erythrocytes (× 10 <sup>6</sup> /L)	4.8 ± 0.36	4.76-4.85	4.10-5.60
Hemoglobin (g/dL)	13.9 ± 1	13.8-14.1	12.4-16.5
MCV (fL)	80.7 ± 3.3	80.2-81.1	74.2-87.4
RDW (%)	12.7 ± 0.64	12.6-12.8	11.4-14.0
Reticulocytes (× 10 <sup>9</sup> /L)	53.6 ± 18	50.8-55.4	21.03-94.25
rHb (pg)	31.6 ± 1.3	31.4-31.7	28.7-34.1
TS (%)	37.3 ± 12.7	35.7-39	15.6-59
sFerritin (ng/mL)	35.3 ± 16.8	33-37.2	15-76
EP (μmol/L RBCs)	0.70 ± 0.24	0.67-0.72	0.25-1.17
sEPO (mU/L)	7.5 ± 6.4	6.6-8.3	2.3-27.6
sTfR (mg/L)	1.32 ± 0.3	1.3-1.36	0.84-1.97
sTfR-F index	0.9 ± 0.25	0.87-0.93	0.51-1.44
CRP (mg/dL)	0.08 ± 0.15	0.06-0.1	0-0.46

CI indicates confidence interval; CRP, C-reactive protein; EP, erythrocyte protoporphyrin; MCV, mean corpuscular volume; P, percentile; RDW, red distribution wide; rHb, reticulocyte hemoglobin content; sEPO, serum erythropoietin; sTfR, serum transferrin receptor; sTfR-F index, sTfR/log ferritin; TS, transferrin saturation.

Table 1 lists the mean values of the analytical parameters of the study population. Figure 1 shows the distribution and the percentiles for sTfR and the sTfR-F index. Table 2 gives the mean values of ferritin, sTfR, sTfR-F index, and EPO and the respective reference intervals for 95% of the study population (P<sub>2.5</sub>-P<sub>97.5</sub>) in the total group of adolescents, by sex, age, and pubertal status. sTfR and the sTfR-F index were higher in the boys, the iron stores were lower in the girls, and the erythropoietic activity measured by EPO was similar in both sexes. With respect to age, only sTfR and the sTfR-F index presented significant changes during the study period, with a tendency to decrease with increasing age. In the bivariate analysis, pubertal status did not significantly influence the parameters analyzed.

Table 3 shows the changes in sTfR, the sTfR-F index, serum ferritin, and sEPO for the different age and sex groups.

In the boys, there were significant changes in sTfR and the sTfR-F index in the age range studied; this trend persisted throughout the group, but was stronger at 12 and 13 years and weaker at 15 and 16 years. There were no significant changes in iron stores and although EPO values were lower at 16 years, the difference was not statistically significant. In the girls, there were no significant changes in sTfR, the sTfR-F index, or sEPO during the age period studied, but there were changes in iron deposits, which progressively decreased as age increased. A comparison of these parameter values for boys and girls showed that levels of sTfR and the sTfR-F index were higher in the boys aged 12 and 13 years, whereas the girls presented lower ferritin values at 15 and 16 years, which also resulted in significantly higher values of the sTfR-F index in the girls at this age. No significant differences were observed in sEPO between the sexes for the different age groups.



**FIGURE 1.** sTfR and sTfR-F index distribution and percentiles in healthy adolescents. sTfR indicates serum transferrin receptor; sTfR-F index, sTfR/log ferritin index.

**TABLE 2.** Comparison of Mean Values and Reference Intervals for sFerritin, sTfR, sTfR-F Index, and sEPO According to Sex, Age, and Pubertal Status in Healthy Adolescents

Variables	sFerritin (µg/L)		sTfR (mg/L)		sTfR-F Index		sEPO (mU/L)	
	Mean ± SD	P <sub>2.5</sub> -P <sub>97.5</sub>	Mean ± SD	P <sub>2.5</sub> -P <sub>97.5</sub>	Mean ± SD	P <sub>2.5</sub> -P <sub>97.5</sub>	Mean ± SD	P <sub>2.5</sub> -P <sub>97.5</sub>
Sex								
Male	37.8 ± 17.5	16-76	1.39 ± 0.30	0.88-2.1	0.93 ± 0.37	0.56-1.60	7.9 ± 6.8	2.3-29.1
Female	32.1 ± 15.5	13-79.6	1.23 ± 0.26	0.74-1.83	0.86 ± 0.22	0.48-1.35	6.9 ± 5.8	2.1-21.9
P	0.007		0.0001		0.04		0.21	
Age (y)								
12	37.6 ± 15.7	19-89	1.32 ± 0.34	0.73-2.13	0.86 ± 0.26	0.52-1.45	8.3 ± 7.1	2.5-45.2
13	34.4 ± 14.7	15-74.1	1.46 ± 0.30	0.93-2.30	0.99 ± 0.26	0.59-1.82	7.4 ± 6.0	2.2-29.8
14	36.0 ± 17.8	15-76.5	1.34 ± 0.30	0.77-2.16	0.94 ± 0.30	0.47-1.69	7.3 ± 6.8	2.1-35.6
15	33.1 ± 16.3	13.5-75	1.25 ± 0.20	0.81-1.84	0.86 ± 0.19	0.53-1.34	8.2 ± 7.1	2.2-31.7
16	36.6 ± 20.7	13-84	1.18 ± 0.21	0.70-1.58	0.80 ± 0.20	0.37-1.38	5.4 ± 3.1	2.3-13.5
P	0.7		0.0001		0.01		0.28	
Pubertal stage								
Tanner stage 1	36.6 ± 14.6	21-75	1.24 ± 0.30	0.73-2.0	0.82 ± 0.23	0.53-1.36	7.3 ± 3.0	2.7-14.9
Tanner stage 2-5	35.3 ± 17.0	15-76.2	1.32 ± 0.29	0.84-1.96	0.90 ± 0.25	0.51-1.46	7.4 ± 6.6	2.3-28.5
P	0.76		0.27		0.2		0.91	

sTfR: Post hoc (Bonferroni test): 13/15 years, *P* = 0.001; 13/16 years, *P* = 0.0002. sTfR-F index: Post hoc (Bonferroni test): 13/16 years, *P* = 0.0009. *P* indicates signification level; rHb, reticulocyte hemoglobin content; sEPO, serum erythropoietin; sTfR, serum transferrin receptor; sTfR-F index, sTfR/log ferritin.

**TABLE 3.** Mean Values and 95% Reference Intervals for sTfR, sTfR/Log Ferritin Index, Serum Ferritin, and Serum EPO in Healthy Adolescents

Variables	Boys			Girls			<i>P</i>
	n	P <sub>2.5</sub> -P <sub>97.5</sub>	Mean ± SD (95% CI)	n	P <sub>2.5</sub> -P <sub>97.5</sub>	Mean ± SD (95% CI)	
sTfR (mg/L)							
12 y	17	0.95-2.13	1.52 ± 0.35 (1.34-1.70)	22	0.73-1.85	1.16 ± 0.24 (1.05-1.27)	<b>0.001</b>
13 y	35	1.02-2.51	1.57 ± 0.32 (1.45-1.69)	24	0.90-1.83	1.31 ± 0.24 (1.21-1.41)	<b>0.002</b>
14 y	38	0.81-2.28	1.39 ± 0.31 (1.28-1.49)	21	0.75-1.84	1.25 ± 0.30 (1.11-1.39)	0.10
15 y	32	0.97-1.90	1.28 ± 0.19 (1.21-1.35)	29	0.79-1.78	1.22 ± 0.25 (1.12-1.32)	0.30
16 y	19	0.86-1.58	1.15 ± 0.17 (1.07-1.23)	16	0.70-1.54	1.20 ± 0.25 (1.07-1.34)	0.47
ANOVA			<b>0.0001</b>			0.37	
sTfR-F index							
12 y	17	0.64-1.45	1.03 ± 0.28 (0.89-1.17)	22	0.52-1.05	0.73 ± 0.14 (0.67-0.80)	<b>0.001</b>
13 y	35	0.58-2.08	1.05 ± 0.29 (0.94-1.16)	24	0.61-1.32	0.91 ± 0.20 (0.82-0.99)	<b>0.05</b>
14 y	38	0.51-1.70	0.94 ± 0.30 (0.84-1.04)	21	0.47-1.50	0.87 ± 0.29 (0.74-1.00)	0.4
15 y	32	0.58-1.34	0.85 ± 0.19 (0.78-0.92)	29	0.48-1.34	0.87 ± 0.20 (0.79-0.95)	0.71
16 y	19	0.50-0.97	0.72 ± 0.13 (0.66-0.78)	16	0.37-1.38	0.91 ± 0.22 (0.79-1.03)	<b>0.004</b>
Anova			<b>0.0001</b>			0.051	
sFerritin (ng/mL)							
12 y	17	19-54	32.2 ± 8.8 (0.66-0.78)	22	20-89	42.0 ± 18.7 (0.79-1.03)	<b>0.04</b>
13 y	35	16-76	36.0 ± 15.0 (0.66-0.78)	24	15-63	32.3 ± 14.3 (0.79-1.03)	0.35
14 y	38	15-77	37.8 ± 19.4 (0.66-0.78)	21	15-70	32.9 ± 14.3 (0.79-1.03)	0.32
15 y	32	16-75	37.9 ± 18.9 (0.66-0.78)	29	13-67	27.8 ± 10.9 (0.79-1.03)	<b>0.01</b>
16 y	19	16-84	45.7 ± 19.8 (0.66-0.78)	16	13-78	25.7 ± 16.2 (0.79-1.03)	<b>0.003</b>
ANOVA			0.2			<b>0.007</b>	
sEPO (mU/L)							
12 y	17	2.5-45.2	10.6 ± 9.9 (0.66-0.78)	22	2.9-11.2	6.4 ± 2.8 (0.79-1.03)	0.11
13 y	35	2.3-38.7	8.0 ± 7.2 (0.66-0.78)	24	2.1-13.0	6.7 ± 3.8 (0.79-1.03)	0.44
14 y	38	2.2-26.2	7.2 ± 5.0 (0.66-0.78)	21	2.0-44.1	7.6 ± 9.4 (0.79-1.03)	0.86
15 y	32	2.3-30.0	8.8 ± 7.5 (0.66-0.78)	29	2.1-33.8	7.6 ± 6.8 (0.79-1.03)	0.54
16 y	19	2.3-13.5	5.3 ± 3.4 (0.66-0.78)	16	2.5-12.3	5.6 ± 2.6 (0.79-1.03)	0.76
ANOVA			0.18			0.79	

ANOVA test: sTfR (boys): Post hoc (Bonferroni): 16/12 years, *P* = 0.001; 16/13 years, *P* = 0.0001; 16/14 years, *P* = 0.03; 15/12 years, *P* = 0.03; and 15/13 years, *P* = 0.001.

ANOVA test: sTfR-F index (boys): Post hoc (Bonferroni): 16/12 years, *P* = 0.004; 16/13 years, *P* = 0.0001; 16/14 years, *P* = 0.025; and 15/13 years, *P* = 0.025.

ANOVA test: sFerritin (girls): Post hoc (Bonferroni): 16/12 years, *P* = 0.01 and 15/12 years, *P* = 0.009.

*P* values highlighted in bold indicate statistically significant differences between groups (*P* < 0.05).

*P* indicates signification level; sEPO, serum erythropoietin; sTfR, serum transferrin receptor; sTfR-F index, sTfR/log ferritin.

**TABLE 4.** Multiple Linear Regression Analyses With sTfR and sTfR-F Index as Dependent Variables

Dependent Variable: sTfR			Dependent Variable: sTfR-F Index		
Independent Variables	Coefficient $\beta$	P	Independent Variables	Coefficient $\beta$	P
Constant	2.27		Constant	2.7	
Sex: male	0.18	0.0001	Sex: male	0.1	0.002
Age (y)	-0.08	0.0001	Age (y)	-0.03	0.03
Tanner 2-5	0.18	0.015	Tanner 2-5	0.17	0.009
sFerritin	-0.004	0.0001	Erythrocytes	-0.13	0.006
			TS	-0.003	0.015
			rHb	-0.03	0.009
			Reticulocytes	0.002	0.04
	$R^2 = 0.241$	0.0001		$R^2 = 0.15$	0.0001

rHb indicates reticulocyte hemoglobin content; sTfR, serum transferrin receptor; sTfR-F index, sTfR/log ferritin.

Finally, Table 4 shows the best predictive model obtained from the multivariate linear regression analysis for sTfR and the sTfR-F index as dependent variables. sTfR was inversely related with age and serum ferritin and directly related with male sex and Tanner stage 2 to 5. These variables predicted 24.1% of the variability in sTfR. In contrast, the sTfR-F index was inversely associated with age, number of erythrocytes, rHb, and TS, and directly associated with male sex, Tanner stage 2 to 5, and number of reticulocytes. These variables predicted 14.9% of the variability in the sTfR-F index.

## DISCUSSION

Various advantages of sTfR and the sTfR-F index over other parameters in the diagnosis of ID have been noted in the past decade.<sup>6-8,12,31</sup> sTfR is an early marker of functional ID and is unaffected by inflammation, whereas the sTfR-F index covers the entire spectrum of body iron status, from normality to tissue ID.<sup>9-11,14,32</sup> The aim of this study was to establish reference ranges of sTfR and the sTfR-F index in normal adolescents for use in clinical practice, and also to determine the variations in these parameters in relation to certain biological characteristics of the subjects and to the classic iron status parameters at this stage of life. As a contribution to previous knowledge, we established strict criteria to ensure that the sample selected really was suitable for reference. The subjects were chosen at random from the population base and a detailed study made of changes in body iron status and erythropoiesis within the age range considered; multivariate analysis was applied to biological and analytical factors that predict the variability of sTfR and the sTfR-F index. The study, thus, included 253 healthy adolescents aged 12 to 16 years, without overweight and with normal erythropoietic activity and iron status.

The absence of an international standard for measuring sTfR has contributed to the difficulty of establishing reference ranges for different sexes, ages, and clinical situations. In this regard, the WHO<sup>33</sup> recently developed a reference reagent (recombinant sTfR) to help manufacturers overcome the problem of standardization. In our study, values were determined by immunoturbidimetric assay, which produced average values for the group of  $1.32 \pm 0.3$  mg/L, with a reference range of 0.84 to 1.97 mg/L ( $P_{2.5}$ - $P_{97.5}$ ), which is consistent with the findings of other studies using a similar methodology.<sup>17,34</sup> Very few reference intervals have been proposed previously for the sTfR-F

index in adolescents. In our study, the mean values for the group were  $0.9 \pm 0.25$  with a reference range of 0.51 to 1.44. Those reported by other authors<sup>20,35</sup> are not comparable because a different methodology was used. Assuming the validity of the present results, sTfR and sTfR-F index values exceeding  $P_{97.5}$  should be considered indicative of the onset of functional ID.

With regard to sex, the sTfR and sTfR-F index values were significantly higher in the boys. As sEPO levels were similar in both sexes and iron stores were significantly lower in the girls, the difference observed in sTfR and sTfR-F index in boys could be due to the greater muscle development and increased blood volume in the boys. Raya et al<sup>36</sup> also reported sTfR values that were significantly lower in girls aged 10 to 20 years. Other researchers,<sup>16,20,35</sup> however, have found no such sex differences in adolescents in a similar age range.

In relation to age, published values for children are higher than those for adults, regardless of the method used.<sup>16</sup> During childhood, sTfR values decrease gradually to 16 years, when adult values are reached.<sup>16-18,20</sup> In our study (Table 2), the highest sTfR and sTfR-F index values were reached at the age of 13 years and gradually decreased until the age of 16 years. This observation may be accounted for by the fact that physical changes are more pronounced at the beginning of puberty and cease at its conclusion, rather than reflecting a situation of potential ID, as no significant change was observed in the iron stores. Neither did we observe any significant changes in erythropoietic activity. To the best of our knowledge, no other studies have analyzed the effect of age in this context.

An interesting finding was that the observed changes related to age varied according to sex (Table 3). The boys fitted the pattern of the total group, with higher values of sTfR and sTfR-F index at age 12 and 13 years, and no significant changes in iron stores or EPO, although in the latter case the values at age 12 years were twice as high as at 16 (the absence of statistical significance could be due to the large dispersion of the values found). In the girls, there were no significant changes in sTfR, sTfR-F index, or EPO, but serum ferritin levels were significantly lower at age 15 and 16 years. The sTfR values in the boys may reflect more pronounced changes in muscle development and in blood volume, rather than ID. In the girls, the changes had a greater effect on iron stores, which decreased over time and with increasing time since menarche. Sex differences remained at age 12 and 13 years for sTfR and the sTfR-F index and also at age 16 years for the sTfR-F index, which

was higher in the girls, due to a marked decrease in the denominator (serum ferritin). There were no significant differences in erythropoietic activity, although values were higher in the boys at the age of 12 years. We have not found any similar studies with which to compare these results.

Finally, multiple linear regression analysis confirmed the influence of age and sex in predicting sTfR variability (Table 4). The values were higher in the boys and decreased with age in the range considered. Multivariate analysis showed that the situation of pubertal development was statistically significant, with the prepubertal subjects presenting the lowest values. Kivivuori et al<sup>37</sup> reported elevated levels of sTfR in boys at early stages of pubertal development. The *z*-BMI scores did not influence sTfR or sTfR-F index variability in the study population (adolescents with normal weight). Of the analytical parameters included in the model, only ferritin contributed significantly to sTfR variability. The low *R*<sup>2</sup> value obtained suggests that under normal erythropoietic and iron status circumstances, other variables, probably genetically determined, may make a stronger contribution to sTfR variability. Unfortunately, very few studies have been conducted on healthy adolescents in which multivariate analysis was used to establish the relationship between sTfR and other parameters. Lin et al<sup>35</sup> concluded that the best predictors of sTfR are EP and hemoglobin, in a study conducted in children aged 6 to 14 years; this analysis also included subjects with ID.

Multivariate analysis also showed the sTfR-F index to be influenced by sex, age, and pubertal status, in the same direction as sTfR. With respect to analytical parameters, the index was influenced by indicators of functional iron status such as rHb and TS and, to a lesser extent, by other indicators related to erythropoietic activity such as the number of reticulocytes and red blood cells. Together, these variables could predict 15% of the variability of the ratio. A possible explanation of the low *R*<sup>2</sup> value found, as well as of that for sTfR, is the inclusion in our sample of only the normal population, with normal ranges for all parameters. We found no other studies with which to compare our results.

Finally, the following limitations of this study are acknowledged. (1) Despite the strict selection criteria used, the definition of ID based on the combination of diagnostic measures, even including CRP, may not be ideal. Nevertheless, assessing the presence of iron in bone marrow, which is considered the gold standard, also has limitations, being painful and difficult to apply in a study population. (2) Assessing pubertal status in 2 categories may also have contributed to the difficulty of determining the relationship between pubertal changes and variations in body iron status (functional and storage pools) and erythropoiesis. Adolescents in Tanner stages 2 to 5 constitute a heterogeneous group, in which some subjects are only entering puberty, whereas others have completed it. (3) We did not take into consideration the degree of physical activity of the subjects, although this, too, is related to changes in body iron status,<sup>38</sup> and would have been an interesting question to examine. (4) Finally, the nonstandardization of the method used could make it difficult to generalize the results obtained, although we were most concerned with its applicability in our environment, given its proven utility.

In conclusion, this study provides a reference range for the measurement of sTfR and the sTfR-F index in adolescents aged 12 to 16 years, after applying strict selection criteria, to be used in clinical practice in the assessment of body iron status. Values exceeding P<sub>97.5</sub> may represent the onset of

a situation of functional ID. The study also reveals variations in functional and storage pools of iron in relation to sex and the age range considered, reflecting changes known to occur during puberty. In a situation of erythropoietic and body iron status normality, the variations observed in sTfR and the sTfR-F index seem to depend more on iron status parameters than on erythropoietic activity.

## REFERENCES

- Abrams SA. Iron requirements and iron deficiency in adolescents. UpToDate. 2013. Available at: [http://www.uptodate.com/contents/iron-requirements-and-iron-deficiency-in-adolescents?source=search\\_result&search=iron+requirements+and+iron+deficiency+in+adolescents&selectedTitle=1~150](http://www.uptodate.com/contents/iron-requirements-and-iron-deficiency-in-adolescents?source=search_result&search=iron+requirements+and+iron+deficiency+in+adolescents&selectedTitle=1~150). Accessed December 25, 2013.
- Ferrari M, Mistura L, Patterson E, et al. Evaluation of iron status in European adolescents through biochemical iron indicators: the HELENA Study. *Eur J Clin Nutr*. 2011;65:340–349.
- Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, et al. Prevalence of iron deficiency in the United States. *JAMA*. 1997;277:973–976.
- Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations to prevent and control iron deficiency in the United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1998;47(RR-3):1–29.
- Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem*. 2002;48:1066–1076.
- Thomas C, Kirschbaum A, Boehm D, et al. The diagnostic plot. A concept for identifying different states of iron deficiency and monitoring the response to erythropoietin therapy. *Med Oncol*. 2006;23:23–36.
- Thomas DW, Hinchliffe RF, Briggs C, et al. British Committee for Standards in Haematology. Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. *Br J Haematol*. 2013;161:639–648.
- WHO/CDC. *Assessing the Iron Status of Populations: Report of a Joint World Health Organization/Centers for Disease Control and Prevention Technical Consultation on the Assessment of Iron Status at the Population Level*. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2007. Available at: [http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia\\_iron\\_deficiency/9789241596107/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/9789241596107/en/). Accessed December 25, 2013.
- Skikne BS, Flowers CH, Cook JD. Serum transferrin receptor. A quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood*. 1990;75:1870–1876.
- Punnonen K, Irjala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood*. 1997;89:1052–1057.
- Beguín Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta*. 2003;329:9–22.
- Speeckaert M, Speeckaert R, Delanghe JR. Biological and clinical aspects of soluble transferrin receptor. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2011;47:213–228.
- Matsuda A, Bessho M, Mori S, et al. Diagnostic significance of serum soluble transferrin receptors in various anemic diseases: the first multi-institutional joint study in Japan. *Haematologica*. 2002;32:225–238.
- Skikne BS, Punnonen K, Caldron PH, et al. Improved differential of anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: a prospective multicenter evaluation of soluble transferrin receptor and the sTfR/log ferritin index. *Am J Hematol*. 2011;86:923–927.
- Vazquez MA, Lendinez F, Leyva M, et al. Serum transferrin receptor in children: usefulness for determining the nature of anemia in infection. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006;28:809–815.
- Choi JW, Pai SH, Im MW, et al. Change in transferrin receptor concentrations with age. *Clin Chem*. 1999;45:1562–1563.
- Suominen P, Virtanen A, Lehtonen-Veromaa M, et al. Regression-bases reference limits for serum transferrin receptor

- in children 6 months to 16 years of age. *Clin Chem*. 2001; 47:935–937.
18. Kratovil T, DeBerardinis J, Gallagher N, et al. Age specific reference intervals for soluble transferrin receptor (sTfR). *Clin Chim Acta*. 2007;380:222–224.
  19. Danise P, Maconi M, Morelli G, et al. Reference limits and behavior of serum transferrin receptor in children 6-10 years of age. *Int J Lab Hematol*. 2008;30:306–311.
  20. Ooi CL, Lepage N, Nieuwenhuys A, et al. Pediatric reference intervals for soluble transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index. *World J Pediatr*. 2009;5:122–126.
  21. Vazquez MA, Carracedo A, Lendinez F, et al. The usefulness of serum transferrin receptor for discriminating iron deficiency without anemia in children. *Haematologica*. 2006;91:264–265.
  22. Nead KG, Halterman JS, Kaczorowski JM, et al. Overweight children and adolescents: a risk group for iron deficiency. *Pediatrics*. 2004;114:104–108.
  23. Yanoff LB, Menzie CM, Denkinger B, et al. Inflammation and iron deficiency in the hypoferraemia of obesity. *Int J Obes*. 2007;31:1412–1419.
  24. Cheng HL, Bryant C, Cook R, et al. The relationship between obesity and hypoferraemia in adults: a systematic review. *Obesity*. 2012;13:150–161.
  25. Serra Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, et al. Childhood and adolescent obesity in Spain. Results of the ENKID study (1998-2000). *Med Clin (Barc)*. 2003;121:725–732.
  26. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, et al. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000;320:1240–1243.
  27. García E, Vázquez MA, Rodríguez FI, et al. Iodine intake and prevalence of thyroid autoimmunity and autoimmune thyroiditis in children and adolescents aged between 1 and 16 years. *Eur J Endocrinol*. 2012;167:387–392.
  28. Tanner JM. *Growth at Adolescence*. 2nd ed. London, Oxford: Blackwell Scientific Publication; 1962:212.
  29. Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Fernández Ramos C, et al. Spanish cross-sectional growth study 2008. Part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood. *An Pediatr (Barc)*. 2008;68:552–569.
  30. Chisolm J, Brown D. Micro-scale photofluorometric determination of “free erythrocyte porphyrin” (Protoporphyrin IX). *Clin Chem*. 1975;21:1669–1682.
  31. Infusino I, Braga F, Dolci A, et al. Soluble transferrin receptor (sTfR) and sTfR/log ferritin index for the diagnosis of iron-deficiency anemia. A meta-analysis. *Am J Clin Pathol*. 2010; 138:642–649.
  32. Castel R, MG Tax, Droogendijk J, et al. The transferrin/log (ferritin) ratio: a new tool for the diagnosis of iron deficiency anemia. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50:1343–1349.
  33. Thorpe SJ, Health A, Sharp G, et al. A WHO reference reagent for the serum transferrin receptor (sTfR): international collaborative study to evaluate a recombinant soluble transferrin receptor preparation. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48: 815–820.
  34. Takala TI, Suominen P, Lehtonen-Veromaa M, et al. Increased serum soluble transferrin receptor concentration detects subclinical iron deficiency in healthy adolescent girls. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:203–208.
  35. Lin WM, Ji CY, Liu WJ, et al. Levels of serum transferrin receptor and its response to Fe-supplement in Fe-deficient children. *Br J Nutr*. 2006;96:1134–1139.
  36. Raya G, Henny J, Steinmetz J, et al. Soluble transferrin receptor (sTfR): biological variations and reference limits. *Clin Chem Lab Med*. 2001;39:1162–1168.
  37. Kivivuori SM, Anttila R, Viinikka L, et al. Serum transferrin receptor for assessment of iron status in healthy prepubertal and early pubertal boys. *Pediatr Res*. 1993;34:297–299.
  38. Merkel D, Huerta M, Grotto I, et al. Prevalence of iron deficiency and anemia among strenuously trained adolescents. *J Adolescent Health*. 2005;37:220–223.

## IVb. Valores de referencia del contenido de hemoglobina reticulocitaria en adolescentes

---

### RESUMEN

La valoración del estado de hierro corporal en la edad pediátrica es compleja, ya que se basa en parámetros que sufren variaciones fisiológicas durante la infancia y la adolescencia. La determinación del CHr en el cribado de ferropenia puede contribuir a mejorar la precisión en el diagnóstico, pero actualmente los valores de referencia en adolescentes sanos no se han establecido adecuadamente. Se ha llevado a cabo un estudio transversal en una muestra representativa de la población de adolescentes de la ciudad de Almería (España), formada por 253 adolescentes sanos sin déficit de hierro, con edades comprendidas entre los 12 y los 16 años. El valor medio del CHr fue de  $31.6 \pm 1.3$  pg. El percentil 2.5 fue 28.7 pg. Los valores de CHr no presentaron variaciones estadísticamente significativas en función de la edad o el sexo. En el análisis mediante regresión lineal múltiple, el sexo no estaba relacionado con el CHr, pero sí la edad. El CHr estaba influenciado por la hemoglobina, el índice de Mentzer, y otros parámetros del hierro como la protoporfirina eritrocitaria y el RsTf. Estas variables independientes explicaron dos tercios de la variabilidad del CHr en adolescentes sanos ( $R^2 = 0.55$ ).

Este estudio proporciona unos intervalos de referencia del CHr en adolescentes sanos que pueden ser empleados en la práctica clínica para la detección precoz de ferropenia. En poblaciones con características sociodemográficas similares, valores mayores del p2.5 descartan el déficit de hierro, y valores inferiores al p2.5 pueden ser sugestivos de un déficit de hierro funcional.

## PUBLICACION 2

# Reference values of Reticulocyte hemoglobin content in healthy adolescents

**Autores.** María Mercedes Ibáñez Alcalde, María Ángeles Vázquez López, Ana Mar Ruiz Sánchez, Francisco Lendínez Molinos, Rafael Galera Martínez, Antonio Bonillo Perales y Tesifón Parrón Carreño.

**Referencia bibliográfica.** *J Pediatr Hematol Oncol* 2018; 40 (4): 298-303.  
PMID: 29561304  
DOI: 10.1097/MPH.0000000000001119

**Informe del factor de impacto.** En el año 2018 la revista científica *Journal of Pediatric Hematology Oncology* presentaba un *Journal Impact Factor* (JIF) de 0.947 en el *Journal of Citation Reports*, lo cual la sitúa en el cuarto cuartil (Q4), en posición 105/125, para la categoría de Pediatría.

# Reference Values of Reticulocyte Hemoglobin Content in Healthy Adolescents

María M. Ibáñez-Alcalde, MPH,\* María Á. Vázquez-López, MD,†  
Ana M. Ruíz-Sánchez, MPH,† Francisco J. Lendínez-Molinos, MD,†  
Rafael Galera-Martínez, MD,† Antonio Bonillo-Perales, MD,†  
and Tesifón Parrón-Carreño, MD‡

**Summary:** Assessing iron status in a pediatric population is not easy, as it is based on parameters that undergo physiological variations in childhood and adolescence. Analysis of the reticulocyte hemoglobin content (CHr) to screen for iron deficiency may increase the accuracy of diagnosis, but, to date, reference values in healthy adolescents have not been adequately determined. A cross-sectional study was conducted on a population-based representative sample in the city of Almería (Spain), with 253 healthy non-iron-deficient (ID) subjects, aged 12 to 16 years. The mean CHr value was  $31.6 \pm 1.3$  pg. The CHr 2.5 percentile was 28.7 pg. There were no significant differences as regards age or sex. In the multivariate linear regression analysis, sex did not influence the variability of CHr, but it was related to age. CHr was influenced by hemoglobin and the Mentzer index, as well as by functional iron indicators such as erythrocyte protoporphyrin and serum transferrin receptor. These independent variables predicted two thirds of the variability in healthy adolescents ( $R^2=0.55$ ). This study provides CHr reference ranges in healthy adolescents for use in clinical practice for the early detection of ID states. In populations with similar sociodemographic characteristics, values above the 2.5 percentile rule out ID, as values under the 2.5 percentile could be suggestive of functional ID.

**Key Words:** reticulocyte hemoglobin content, adolescents, iron deficiency, reference values, early detection

(*J Pediatr Hematol Oncol* 2018;40:298–303)

In adolescence, iron requirements are increased, because of accelerated growth, increased blood volume, greater muscle mass in boys, and menstrual blood losses in girls, together with a diet that is frequently low in iron.<sup>1–3</sup> These changes have a significant impact on iron status and erythropoiesis over a relatively short period of time.

Assessing iron status is not easy, as it is based on laboratory parameters that undergo physiological variations in childhood and adolescence. It also varies between the sexes, and the sensitivity and specificity of detection mechanisms may vary in the presence of concomitant inflammatory conditions.<sup>3–7</sup> The determination of C-reactive protein (CRP) is recommended in combination with a panel of parameters with regard to different iron pools (storage,

transport, and function),<sup>8</sup> to improve the accuracy of the diagnosis of iron deficiency and to eliminate false-negative cases in the presence of inflammation.

Measures of mature erythrocyte indices are not sensitive indicators of early iron-deficient (ID) erythropoiesis, and hence new parameters have been considered to improve the diagnostic capacity, such as reticulocyte hemoglobin content (CHr).

By measuring the mean CHr we can evaluate the incorporation of iron into the reticulocyte, and this factor has been shown to provide information about functional iron status.<sup>9</sup> Because reticulocytes are the earliest erythrocytes released from the bone marrow, CHr provides an indirect measure of the iron available for new red blood cell production over the previous 3 to 4 days, even when changes in other biochemical parameters are not apparent. Therefore, CHr decrease is considered an early indicator of iron-restricted erythropoiesis.<sup>10</sup>

Since the discovery of CHr, many studies have showed its usefulness in the early detection of ID in children and adults.<sup>11–15</sup> However, reference values in healthy adolescents have been poorly assessed, despite the fact that adolescents constitute a population at special risk of ID. Overweight, which is very prevalent among adolescents, is considered a chronic inflammatory state<sup>16–18</sup> that could modify iron parameters, but this question has not been considered in the majority of previous studies focused on adolescents.

The goals of this study were to establish appropriate reference intervals of CHr in healthy adolescents without overweight, to determine the relation between this parameter and those for iron, erythropoietic activity and other conditions, and also to identify any changes taking place in iron status and erythropoiesis at this stage of life.

## METHODS

This was a cross-sectional study conducted on a population-based representative sample in the city of Almería (Spain), in 2008.

## Subjects

The sample size was calculated with respect to 9823 adolescents aged 12 to 16 years attending 1 of the 38 public and private secondary schools in Almería. Assuming an ID prevalence of 10%, a 95% confidence interval (CI) and 4.5% precision, a total of 260 subjects were required. The estimated prevalence of obesity/overweight was 25%.<sup>19</sup> In total, 24 classes, 1 from each of the 4 secondary grades at 6 schools, were selected by the probability sampling method. All students in these 24 selected classes were invited to

Received for publication April 4, 2017; accepted October 24, 2017.

From the \*Department of Pediatrics, Poniente Hospital; †Department of Pediatrics, Torrecárdenas Hospital; and ‡Health Delegation of Almería, University of Almería, Almería, Spain.

The authors declare no conflict of interest.

Reprints: María M. Ibáñez-Alcalde, MPH, Department of Pediatrics, Poniente Hospital, Avenida Almerimar, s/n., El Ejido, Almería 04700, Spain (e-mail: mmibanezalcalde@gmail.com).

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.



**TABLE 1.** Mean Values and Reference Intervals for Analytical Parameters in Healthy Adolescents According to Sex

Variables	Total Group (n = 253)			Mean ± SD		P
	Mean ± SD	95% CI	Reference Interval (P <sub>2.5</sub> -P <sub>97.5</sub> )	Males (n = 141)	Females (n = 112)	
Erythrocytes (×10 <sup>6</sup> /L)	4.8 ± 0.36	4.76-4.85	4.10-5.60	4.92 ± 0.36	4.66 ± 0.30	0.0001
Hemoglobin (g/dL)	13.9 ± 1	13.8-14.1	12.4-16.5	14.31 ± 1.09	13.46 ± 0.72	0.0001
MCV (fL)	80.7 ± 3.3	80.2-81.1	74.2-87.4	80.53 ± 3.37	80.99 ± 3.26	0.24
RDW (%)	12.7 ± 0.64	12.6-12.8	11.4-14.0	12.77 ± 0.63	12.68 ± 0.65	0.43
Reticulocytes (×10 <sup>9</sup> /L)	53.6 ± 18	50.8-55.4	21.03-94.25	56.18 ± 17.18	49.97 ± 18.09	0.004
CHr (pg)	<b>31.6 ± 1.3</b>	<b>31.4-31.7</b>	<b>28.7-34.1</b>	<b>31.6 ± 1.5</b>	<b>31.5 ± 1.2</b>	<b>0.85</b>
TS (%)	37.3 ± 12.7	35.7-39	15.6-59	38.45 ± 12.76	35.91 ± 12.53	0.10
sFerritin (ng/mL)	35.3 ± 16.8	33-37.2	15-76	37.8 ± 17.5	32.1 ± 15.5	0.007
EP (µg/dL RBCs)	39.7 ± 13.6	38.3-41.7	14.1-67	39.49 ± 12.25	40.53 ± 15.42	0.56
sEPO (mU/L)	7.5 ± 6.4	6.6-8.3	2.3-27.6	7.9 ± 6.8	6.9 ± 5.8	0.21
sTfR (mg/L)	1.32 ± 0.3	1.3-1.36	0.84-1.97	1.39 ± 0.30	1.23 ± 0.26	0.0001

Bold value indicates CHr results, and significant P < 0.05.

95% CI indicates 95% confidence interval; CHr, reticulocyte hemoglobin content; EP, erythrocyte protoporphyrin; MCV, mean corpuscular volume; P, percentile; RBC, red blood cell; RDW, red distribution wide; sEPO, serum erythropoietin; sTfR, serum transferrin receptor; TS, transferrin saturation.

participate. A total of 509 subjects were selected, of whom 17% refused to participate, such that 422 subjects were finally included.

The criteria for exclusion were as follows: (a) subjects with a hematologic or systemic disease that, in itself or as a result of its treatment, might affect the test results; (b) subjects with ID<sup>3</sup> or overweight;<sup>20</sup> (c) those with present or previous infectious or febrile disease or CRP > 0.5 mg/dL;<sup>6</sup> and (d) those who had received oral iron therapy in the previous 3 months.

Obese subjects were excluded from the study population to ensure normal iron status in those included, in the view that obesity is a chronic inflammatory status that induces an enhanced production of hepcidin, which leads to hyposideraemia and increased serum ferritin;<sup>16,17</sup> serum ferritin and transferrin saturation (TS) were used to define iron status and to establish cut-off values for iron deficiency between a normal and an obese population, to avoid classification bias.

In all cases, informed consent was obtained from the adolescents' parents or legal guardians, as well as from the participants themselves. The study was approved by the Ethics and Research Committee of Torrecárdenas Hospital (Almería).

**Survey**

This survey was addressed to all of the parents or guardians, either in person or by telephone, as described in a previous study.<sup>21</sup> In the present study, only data on sex, age, and ethnicity of the subjects were obtained.

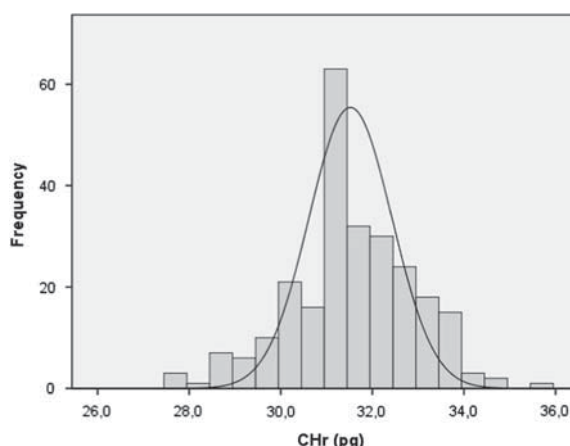
**Anthropometric Measurements and Pubertal Status**

All subjects underwent a complete physical examination, and the following data were collected: (A) pubertal stage (Tanner stage),<sup>22</sup> according to which the subjects were classified as prepubertal (Tanner 1) or pubertal (Tanner 2 to 5). (B) Anthropometry: weight in kg was measured, with the subject barefoot and wearing light clothing, using a "Soehnle Professional" digital scale with an accuracy of 100 g, recording the average of 2 measurements; height in meters was measured, using a standard Asimed measure with an accuracy of 1 mm, with the subject barefoot and standing upright, recording the average of 2 measurements; the body mass index (BMI) was calculated using the formula weight (kg)/height<sup>2</sup> (meters) with the z-score of the specific BMI SD appropriate for age and sex,

using national reference population data.<sup>23</sup> Overweight and obesity were defined using the criteria proposed by the International Obesity Task Force.<sup>20</sup> For the purposes of the present study, both terms are included in the expression "overweight."

**Parameters Measured**

In total, 6 mL of venous blood in fasting subjects, obtained between 8 and 11 AM, were used, and the following parameters were measured: hemoglobin (Hb), red cell indices, CHr, and reticulocytes in ADVIA-120 counter; erythrocyte protoporphyrin (EP) determined by fluorometric assay;<sup>24</sup> transferrin, serum ferritin, and CRP determined by the immunoturbidimetric method using "Tina-quant-Transferrin," "Tina-quant Ferritin," and CRPLX kits obtained from Roche Diagnostics GmbH (Boehringer Mannheim); serum iron determined by colorimetric assay using the Fe kit obtained from Roche Diagnostics GmbH; total iron-binding capacity (TIBC), calculated as 1 mg transferrin/dL × 1.27 = 1 µg IBC/dL; TS, calculated as serum iron/TIBC × 100; serum transferrin receptor (sTfR), determined by immunoturbidimetric assay using the



**FIGURE 1.** CHr distribution and percentiles in healthy adolescents. CHr indicates reticulocyte hemoglobin content.

**TABLE 2.** Mean Values of CHr, Serum Ferritin, sTfR, and EPO and the Respective Reference Intervals (P<sub>2.5</sub>-P<sub>97.5</sub>) in Healthy Adolescents, by Sex, Age, and Pubertal Status

Variables	n	CHr (pg)		sFerritin (µg/L)		sTfR (mg/L)		sEPO (mU/L)	
		Mean ± SD	P <sub>2.5</sub> -P <sub>97.5</sub>	Mean ± SD	P <sub>2.5</sub> -P <sub>97.5</sub>	Mean ± SD	P <sub>2.5</sub> -P <sub>97.5</sub>	Mean ± SD	P <sub>2.5</sub> -P <sub>97.5</sub>
Sex									
Male	141	31.6 ± 1.5	28.1-34.4	37.8 ± 17.5	16-76	1.39 ± 0.30	0.88-2.1	7.9 ± 6.8	2.3-29.1
Female	112	31.5 ± 1.2	28.8-33.7	32.1 ± 15.5	13-79.6	1.23 ± 0.26	0.74-1.83	6.9 ± 5.8	2.1-21.9
P	—	<b>0.85</b>	—	<b>0.007</b>	—	<b>0.0001</b>	—	<b>0.21</b>	—
Age (y)									
12	39	31.5 ± 1.08	28.8-33.6	37.6 ± 15.7	19-89	1.32 ± 0.34	0.73-2.13	8.3 ± 7.1	2.5-45.2
13	59	31.3 ± 1.33	28.0-33.8	34.4 ± 14.7	15-74.1	1.46 ± 0.30	0.93-2.30	7.4 ± 6.0	2.2-29.8
14	59	31.5 ± 1.32	28.3-34.7	36.0 ± 17.8	15-76.5	1.34 ± 0.30	0.77-2.16	7.3 ± 6.8	2.1-35.6
15	61	31.7 ± 1.41	28.3-34.4	33.1 ± 16.3	13.5-75	1.25 ± 0.20	0.81-1.84	8.2 ± 7.1	2.2-31.7
16	35	31.7 ± 1.57	28.6-34.7	36.6 ± 20.7	13-84	1.18 ± 0.21	0.70-1.58	5.4 ± 3.1	2.3-13.5
P	—	<b>0.42</b>	—	<b>0.7</b>	—	<b>0.0001</b>	—	<b>0.28</b>	—
Pubertal stage									
Tanner 1	18	31.4 ± 0.9	29.2-32.9	36.6 ± 14.6	21-75	1.24 ± 0.30	0.73-2.0	7.3 ± 3.0	2.7-14.9
Tanner 2-5	235	31.6 ± 1.4	28.7-34.2	35.3 ± 17.0	15-76.2	1.32 ± 0.29	0.84-1.96	7.4 ± 6.6	2.3-28.5
P	—	<b>0.618</b>	—	<b>0.76</b>	—	<b>0.27</b>	—	<b>0.91</b>	—

Statistically significant P values are remarked in bolds.

P<sub>2.5</sub>-P<sub>97.5</sub>: 2.5th percentile to 97.5th percentile interval.

Post hoc (Bonferroni test): sTfR: 13 years/15 years, P=0.001; 13 years/16 years, P=0.0002.

CHr indicates reticulocyte hemoglobin content; EPO, erythropoietin; P, signification level; sEPO, serum erythropoietin; sTfR, Serum transferrin receptor.

Quantex sTfR kit (Biokit SA, Barcelona); and serum erythropoietin (sEPO) determined by enzyme immunoassay using the Quantikine IVD-Human Erythropoietin kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). The Mentzer index was

calculated as mean corpuscular volume (MCV)/millions of erythrocytes per microliter.

According to the normality cut-off values for age and sex,<sup>3</sup> iron status was classified into 4 categories: normal, iron

**TABLE 3.** Mean Values for CHr, Serum Ferritin, sEPO, and sTfR in Healthy Adolescent Boys and Girls

Variables	n	Boys (Mean ± SD) (95% CI)	n	Girls (Mean ± SD) (95% CI)	P
CHr (pg)					
12 y	17	31.25 ± 1.10 (30.7-31.8)	22	30.7 ± 1.0 (31.3-32.2)	0.16
13 y	35	31.14 ± 1.52 (30.6-31.6)	24	31.5 ± 0.9 (31.1-31.9)	0.216
14 y	38	31.37 ± 1.37 (30.9-31.8)	21	31.9 ± 1.2 (31.3-32.4)	0.169
15 y	32	32.01 ± 1.50 (31.5-32.5)	29	31.4 ± 1.2 (30.9-31.9)	0.12
16 y	19	32.34 ± 1.51 (31.6-33.1)	16	31.0 ± 1.3 (30.3-31.7)	<b>0.010</b>
ANOVA	—	<b>0.0125</b>	—	0.225	—
sFerritin (ng/mL)					
12 y	17	32.2 ± 8.8 (27.7-36.8)	22	42.0 ± 18.7 (33.5-50.5)	<b>0.04</b>
13 y	35	36.0 ± 15.0 (31.0-42.4)	24	32.3 ± 14.3 (26.3-38.3)	0.35
14 y	38	37.8 ± 19.4 (31.2-44.8)	21	32.9 ± 14.3 (26.4-39.5)	0.32
15 y	32	37.9 ± 18.9 (31.1-45.1)	29	27.8 ± 10.9 (23.3-31.9)	<b>0.01</b>
16 y	19	45.7 ± 19.8 (36.2-55.3)	16	25.7 ± 16.2 (17.0-34.3)	<b>0.003</b>
ANOVA	—	0.2	—	<b>0.007</b>	—
sEPO (mU/L)					
12 y	17	10.6 ± 9.9 (5.5-15.7)	22	6.4 ± 2.8 (5.2-7.7)	0.11
13 y	35	8.0 ± 7.2 (5.2-10.8)	24	6.7 ± 3.8 (5.1-8.3)	0.44
14 y	38	7.2 ± 5.0 (5.3-8.8)	21	7.6 ± 9.4 (3.3-11.8)	0.86
15 y	32	8.8 ± 7.5 (5.9-11.5)	29	7.6 ± 6.8 (5.2-10.5)	0.54
16 y	19	5.3 ± 3.4 (3.6-6.9)	16	5.6 ± 2.6 (4.2-7.0)	0.76
ANOVA	—	0.18	—	0.79	—
sTfR (mg/L)					
12 y	17	1.52 ± 0.35 (1.34-1.70)	22	1.16 ± 0.24 (1.05-1.27)	<b>0.001</b>
13 y	35	1.57 ± 0.32 (1.45-1.69)	24	1.31 ± 0.24 (1.21-1.41)	<b>0.002</b>
14 y	38	1.39 ± 0.31 (1.28-1.49)	21	1.25 ± 0.30 (1.11-1.39)	0.10
15 y	32	1.28 ± 0.19 (1.21-1.35)	29	1.22 ± 0.25 (1.12-1.32)	0.30
16 y	19	1.15 ± 0.17 (1.07-1.23)	16	1.20 ± 0.25 (1.07-1.34)	0.47
ANOVA	—	<b>0.0001</b>	—	0.37	—

Statistically significant P values are remarked in bolds.

ANOVA test: post hoc (Bonferroni): (1) CHr (boys): 16/13 years, P=0.03; (2) sFerritin (girls): 16 years/12 years, P=0.01 and 15 years/12 years, P=0.009; (3) sTfR (boys): 16 years/12 years, P=0.001; 16 years/13 years, P=0.0001; 16 years/14 years, P=0.03; 15 years/12 years, P=0.03; and 15 years/13 years, P=0.001.

ANOVA indicates analysis of variance; CHr, reticulocyte hemoglobin content; CI, confidence interval; P, signification level; sEPO, serum erythropoietin; sTfR, serum transferrin receptor.

store depletion, iron-deficient erythropoiesis (IDE), and iron-deficiency anemia (IDA). The last 3 of these categories were considered ID. IDS was defined as serum ferritin <12 µg/mL; IDE: ≥ 2 parameters altered (MCV < 76 fL; serum ferritin <12 µg/L; TS < 14%; EP < 70 µg/dL erythrocytes); IDA: IDE+Hb < 11.5 g/dL in girls and <12 g/dL in boys. In cases of isolated microcytosis, thalassemia traits (α or β) were excluded.

**Statistical Analyses**

SPSS 17.0 software for Windows, and Epidat 4.0 for the sample calculation, were used. Results are expressed as mean ± SD and 95% CI. The qualitative variables are expressed as percentages. The student *t* test was applied to compare the means, and the analysis of variance test was used when >2 groups were compared. When the results were significant, differences between groups were identified using the Bonferroni post hoc test. Linear multiple regression analysis was used to determine the associations of the dependent variable (CHr) and the other independent variables (laboratory measurements, age, sex, z-BMI, pubertal status). The independent variables were introduced in a single step. Collinearity diagnostic and residual analyses were performed to assess the goodness of fit of the model obtained and to reveal any violation of its assumptions (linearity, normality, homoscedasticity, and independence of errors). If high collinearity was detected, a ratio was applied. In all cases, a *P* < 0.05 was considered significant.

**RESULTS**

A total of 253 subjects were finally included in the study. Initially, 509 subjects were selected, of whom 422 agreed to participate. Of these, 3 were excluded because of beta thalassemia trait, 1 with alpha thalassemia trait, 4 with elevated CRP levels suggestive of recent infection, 9 because of loss of relevant analytical results, 117 were classified as overweight, and 35 presented some degree of ID.

The subjects' average age was 14 ± 1.3 years (95% CI, 13.8-14.2), 55.7% were boys, 18.8% were part of an immigrant family, 93% were Tanner stage 2 to 5, and the mean z-score of BMI was -0.4 ± 0.54 (95% CI, -0.47 to -0.33).

Table 1 lists the mean values of the analytical parameters of the study population, and mean values according to sex. Erythrocytes, Hb, reticulocytes, serum ferritin, and sTfR were higher in the boys, whereas there were no differences according to sex in CHr values.

Figure 1 shows the distribution and the percentiles for CHr. The CHr 2.5 percentile for the total group was 28.7 pg. Table 2 gives the mean values of CHr, ferritin, sTfR, and erythropoietin (EPO) and the respective reference intervals for 95% of the study population (P<sub>2.5</sub> to P<sub>97.5</sub>) in the total group of adolescents, by sex, age, and pubertal status. With regard to CHr, there were no statistical differences in relation to age, sex, and pubertal status. sTfR was higher in the boys, the iron stores were lower in the girls, and the erythropoietic activity measured by EPO was similar in both sexes. Pubertal status did not significantly influence the parameters analyzed.

Table 3 shows the changes in CHr, sTfR, serum ferritin, and sEPO for the different age and sex groups. CHr tended to be higher in the older boys, but the difference was only statistically significant between those aged 13 and 16 years (*P* = 0.031). In the girls, no significant differences in CHr were observed between groups of different ages.

**TABLE 4.** Multivariate linear regression analysis for CHr

Dependent Variable: CHr		
Independent Variables	Coefficient B	<i>P</i>
Constant	11.98	—
Age (y)	0.17	0.001
Hemoglobin	0.92	0.0001
Erythrocyte protoporphyrin	-0.01	0.005
Serum transferrin receptor	-0.56	0.01
Mentzer index	0.60	0.0001
	<b>R<sup>2</sup>: 0.55</b>	<b>0.0001</b>

Statically significant *P* values are remarked in bolds. CHr indicates reticulocyte hemoglobin content.

Average CHr was higher in the boys than in the girls only in those aged 16 years. As regards the other parameters analyzed, in the boys, there were significant changes in sTfR in the age range studied, and this trend persisted throughout the group, but was stronger at 12 and 13 years and weaker at 15 and 16 years; there were no significant changes in iron stores, and, although EPO values were lower at 16 years, the difference was not statistically significant. In the girls, there were no significant changes in sTfR or sEPO during the age period studied, but there were changes in iron deposits, which progressively decreased as age increased. No significant differences were observed in sEPO between the sexes for the different age groups, but the mean sTfR values were higher in the boys in the group aged 12 to 13 years, and the mean ferritin values were lower in the girls in the group aged 15 to 16 years.

Finally, Table 4 shows the best predictive model obtained from the multivariate linear regression analysis for CHr as a dependent variable. Because of the presence of high collinearity, the MCV and red blood cell count were replaced by the Mentzer index.

CHr was inversely related with EP and sTfR, and directly related to Hb and the Mentzer index. These variables predicted 55% of the variability in CHr.

**DISCUSSION**

Adolescents are especially susceptible to ID because of the increased demand for iron at this stage of life. The use of CHr to screen for ID may increase the accuracy of diagnosis, thus enabling early detection before the development of anemia, and contributing to optimize the health and well-being of adolescents.<sup>25</sup> CHr decreases in the second stage of iron deficiency, when iron stores are depleted and IDE begins.

Normal values of CHr have been evaluated in adults, and it is considered that values under 28 to 29 pg indicate ID.<sup>5,12,26,27</sup> In the pediatric population, lower values present better sensitivity and specificity, and the optimal cut-off has been situated at 25 to 27.5 pg in different studies,<sup>11,13,28,29</sup> including one which recruited a group of children aged between 1 and 11 years from the same population as that addressed in our study.<sup>30</sup> Nevertheless, cut-off values have not been adequately assessed in adolescents.

This study provides CHr values in healthy adolescents without ID. Subjects with hematologic or systemic diseases were excluded, as well as those who had received iron therapy or who presented an elevated CRP. Iron-restricted erythropoiesis can take place despite the presence of adequate iron, and this often occurs in patients with an inflammatory disease,

TABLE 5. CHr Values Previously Reported in Young Adults and Children

References	Population	n	Mean Age (y)	CHr (Mean $\pm$ SD) (pg)	CHr Percentiles (pg)
Brugnara et al <sup>11</sup>	Healthy North American children	167	2.9 $\pm$ 2.0	27 $\pm$ 1.7	—
Thomas and Thomas <sup>5</sup>	Healthy German adult controls	71	55 $\pm$ 19	31.4 (95% CI, 27.7-35.4)	2.5th percentile: 28.0
Bakr and Sarette <sup>28</sup>	Nonanemic Saudi Arabian children	112	3.4	30.2 $\pm$ 2.7	—
Markovic et al <sup>27</sup>	Healthy Serbian adult controls	66	Adults	30.8 $\pm$ 1.5	—
Ceylan et al <sup>34</sup>	Healthy Turkish adult controls	34	27.8	28.2 $\pm$ 1.7	—
Mateos et al <sup>29</sup>	Non-iron-deficient Spanish children	201	5.3 (6 mo-14 y)	26.1 $\pm$ 1.5	—
Chouliaras et al <sup>35</sup>	Healthy Greek children	261	1-6 (3.4 $\pm$ 1.1)	27.7 $\pm$ 1.6	5th percentile: 24.6
López-Ruzafa et al <sup>30</sup>	Healthy Spanish children	931	1-11 (6.1 $\pm$ 3.2)	30.9 $\pm$ 1.8	2.5th percentile: 26.9

CHr indicates reticulocyte hemoglobin content; CI, confidence interval.

because of the inappropriate production of hepcidin.<sup>31,32</sup> Obesity is considered a chronic inflammatory state<sup>16-18,33</sup> and, although CHr has been shown to be less affected in this situation than other iron parameters,<sup>27</sup> in this study, adolescents with overweight were excluded to minimize bias and optimize the validity of the values obtained.

The mean CHr value obtained in our group of healthy adolescents was 31.6  $\pm$  1.3 pg, with a reference interval (P<sub>2.5</sub> to P<sub>97.5</sub>) of 28.7 to 34.1 pg. CHr values reported by previous papers are shown in Table 5.

In view of the above-described data, our results place CHr values in adolescents closer to the mean and cut-off values previously reported for adults than to those for very young children.

In our study, mean CHr values tended to be higher in the older boys; however, among the girls there were no significant differences in CHr between groups, and the mean CHr was higher in boys than in girls only in the group aged 16 years. In our view, the differences observed between age and sex groups are not clinically relevant and are in a normal range, and the presence of statistical significance is probably attributable to the considerable homogeneity of the subjects. Corroborating this opinion, previous reports have reported no major differences in this respect between the sexes.<sup>5,10,27</sup> Taking this into account, a single value could be used as the cut-off value for CHr for both sexes.

In contrast, sTfR levels were higher in the younger subjects, particularly among the boys. As sEPO levels were similar in both sexes and iron stores were significantly lower in the girls, the difference observed in sTfR in boys could be attributable to their greater muscle development and blood volume. These results have been published in a previous paper.<sup>36</sup> Raya et al<sup>37</sup> also reported sTfR values that were significantly lower in girls aged 10 to 20 years. Other researchers,<sup>38,39</sup> however, have found no such sex differences in adolescents in a similar age range.

As CHr and sTfR are functional iron parameters, they are expected to be inversely related. In our sample, the younger boys presented lower CHr and higher sTfR values. There were no significant variations among the girls of different ages, despite the significant decrease in ferritin during late adolescence. This indicates that iron deposits do not decrease sufficiently in healthy female adolescents to have an impact on functional iron parameters. We found no previous reports with which to compare these results.

In the multivariate linear regression analysis, the variability of CHr in healthy adolescents without ID was not influenced by sex. It was related to age, but these authors consider that this relationship is not clinically relevant, as CHr values are very similar in the studied age range. With regard to analytical parameters, CHr was influenced by Hb

and Mentzer index, as well as by functional iron indicators such as EP and sTfR, which were inversely related. These independent variables predicted more than a half of the variability in healthy adolescents ( $R^2=0.55$ ). We were unable to find any previous reports assessing this issue.

The main limitation of our study is derived from the definition of ID used in the selection criteria. The gold standard is the depletion of iron in the bone marrow, but it is not feasible to perform this analysis in population studies because of its invasiveness. Although ID diagnosis is always subject to controversy in this context, we used a combination of internationally accepted diagnostic measures,<sup>3</sup> whereas most studies have used individual parameters such as ferritin. Nevertheless, this study does add to previous knowledge in terms of the new data obtained on adolescents, as very few reports have been made about CHr reference values in this population. Most studies include subjects of a wide range of ages, combining data for children and adolescents. In this study, strict selection criteria were applied, which ensured the normalcy of the sample; hence, the subjects can be considered to constitute a suitable reference for the study population. Finally, the multivariate analysis, which was performed to assess the variables that independently influence the CHr variability, including erythropoietic data, is a novel approach in this context.

In conclusion, this study provides CHr reference ranges for healthy adolescents aged 12 to 16 years, for use in clinical practice for the early detection of ID states. We believe the validity of the results obtained is well established, and therefore propose that these reference intervals should be applied to other populations with similar sociodemographic characteristics, and that values under the 2.5 percentile should be considered indicative of functional ID, although they do not rule out other underlying diseases as thalassemia traits. In contrast, normal values of CHr exclude moderate or severe ID states.

## REFERENCES

1. Abrams SA. Iron requirements and iron deficiency in adolescents. 2014. Available at: [www.uptodate.com/contents/iron-requirements-and-iron-deficiency-in-adolescents?source=search\\_result&search=iron+requirements+and+iron+deficiency+in+adolescents&selectedTitle=1~150](http://www.uptodate.com/contents/iron-requirements-and-iron-deficiency-in-adolescents?source=search_result&search=iron+requirements+and+iron+deficiency+in+adolescents&selectedTitle=1~150). Accessed December 13, 2015.
2. Ferrari M, Mistura L, Patterson E, et al. Evaluation of iron status in European adolescents through biochemical iron indicators: the HELENA Study. *Eur J Clin Nutr*. 2011;65:340-349.
3. Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, et al. Prevalence of iron deficiency in the United States. *JAMA*. 1997;277:973-976.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations to prevent and control iron deficiency in the United States. *MMWR*. 1998;47(RR-3):1-29.

5. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem*. 2002;48:1066–1076.
6. Thomas C, Kirschaum A, Boehm D, et al. The diagnostic plot. A concept for identifying different states of iron deficiency and monitoring the response to erythropoietin therapy. *Med Oncol*. 2006;23:23–36.
7. Thomas DW, Hinchliffe RF, Briggs C, et al. Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. *Br J Haematol*. 2013;161:639–648.
8. World Health Organization/Centers for Disease Control and Prevention. *Assessing the Iron Status of Populations: Report of a Joint World Health Organization/Centers for Disease Control and Prevention Technical Consultation on the Assessment of Iron Status at the Population Level*, 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2007. Available at: [www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia\\_iron\\_deficiency/9789241596107/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/9789241596107/en/). Accessed December 13, 2014.
9. Brugnara C, Schiller B, Moran J. Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret He) and assessment of iron deficient-states. *Clin Lab Haematol*. 2006;28:303–308.
10. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Erythrocyte and reticulocyte indices in the assessment of erythropoiesis activity and iron availability. *Int J Lab Hematol*. 2013;35:144–149.
11. Brugnara C, Zurakowski D, DiCanzio J, et al. Reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in children. *JAMA*. 1999;281:2225–2230.
12. Mast AE, Blinder MA, Lu Q, et al. Clinical utility of the reticulocyte hemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency. *Blood*. 2002;99:1489–1491.
13. Ullrich C, Wu A, Armsby C, et al. Screening healthy infants for iron deficiency using reticulocyte hemoglobin content. *JAMA*. 2005;294:924–930.
14. Mast AE, Blinder MA, Dietzen DJ. Reticulocyte hemoglobin content. *Am J Hematol*. 2008;83:307–310.
15. Uijtershout L, Domellöf M, Vloemans J, et al. The value of Ret-Hb and sTfR in the diagnosis of iron depletion in healthy, young children. *Eur J Clin Nutr*. 2014;68:882–886.
16. Nead KG, Halterman JS, Kaczorowski JM, et al. Overweight children and adolescents: a risk group for iron deficiency. *Pediatrics*. 2004;114:104–108.
17. Yanoff LB, Menzie CM, Denking B, et al. Inflammation and iron deficiency in the hypoferrremia of obesity. *Int J Obesity*. 2007;31:1412–1419.
18. Cheng HL, Bryant C, Cook R, et al. The relationship between obesity and hypoferraemia in adults: a systematic review. *Obesity*. 2012;13:150–161.
19. Serra Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, et al. Childhood and adolescent obesity in Spain. Results of the ENKID study (1998-2000). *Med Clin (Barc)*. 2003;121:725–732.
20. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, et al. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000;320:1240–1243.
21. García-García E, Vázquez-López MA, García-Fuentes E, et al. Iodine intake and prevalence of thyroid autoimmunity and autoimmune thyroiditis in children and adolescents aged between 1 and 16 years. *Eur J Endocrinol*. 2012;167:387–392.
22. Tanner JM. *Growth at Adolescence*, 2nd ed. London, Oxford: Blackwell Scientific Publication; 1962:212.
23. Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Fernández Ramos C, et al. Spanish cross-sectional growth study 2008. Part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood. *An Pediatr (Barc)*. 2008;68:552–569.
24. Chisolm J, Brown D. Micro-scale photofluorometric determination of “free erythrocyte porphyrin” (protoporphyrin IX). *Clin Chem*. 1975;21:1669–1682.
25. Stoffman N, Brugnara C, Woods ER. An algorithm using reticulocyte hemoglobin content (CHR) measurement in screening adolescents for iron deficiency. *J Adolesc Health*. 2005;36:529.
26. González García ME, Cepeda Piorno J, González Huerta AJ, et al. Infradiagnosis of iron deficiency in ambulatory patients due to wrong use and biochemical markers limitations: utility of reticulocyte hemoglobin content. *An Med Interna*. 2008;25:98–99.
27. Markovic M, Majkić-Singh N, Ignjatović S, et al. Reticulocyte haemoglobin content vs. soluble transferrin receptor and ferritin index in iron deficiency anaemia accompanied with inflammation. *Int J Lab Hematol*. 2007;29:341–346.
28. Bakr AF, Sarette G. Measurement of reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in Saudi children. *Eur J Pediatr*. 2006;165:442–445.
29. Mateos ME, De-la-Cruz J, López-Laso E, et al. Reticulocyte hemoglobin content for the diagnosis of iron deficiency. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008;30:539–542.
30. López-Ruzafa E, Vázquez-López MA, Lendínez-Molinos F, et al. Reference values of reticulocyte haemoglobin content and their relation with other indicators of iron status in healthy children. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2016;38:e207–e212.
31. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823:1434–1443.
32. Kaplan J, Ward DM, De Domenico I. The molecular basis of iron overload disorders and iron-linked anemias. *Int J Hematol*. 2011;93:14–20.
33. Nazif HK, El-Shaheed AA, El-Shamy KA, et al. Study of serum hepcidin as a potential mediator of the disrupted iron metabolism in obese adolescents. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2015;9:172–178.
34. Ceylan C, Miskioğlu M, Colak H, et al. Evaluation of reticulocyte parameters in iron deficiency, vitamin B(12) deficiency and beta-thalassemia minor patients. *Int J Lab Hematol*. 2007;29:327–334.
35. Chouliaras GL, Stamoulakatou A, Tsiftis G, et al. Age, beta thalassaemia trait, and iron-deficient anaemia significantly affect reticulocyte indices in pre-school children. *Eur J Pediatr*. 2010;169:1097–1104.
36. Vázquez-López MA, Ibáñez-Alcalde M, Lendínez-Molinos F, et al. Reference values of serum transferrin receptor and sTfR/log ferritin index in healthy adolescents. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2015;37:274–280.
37. Raya G, Henny J, Steinmetz J, et al. Soluble transferrin receptor (sTfR): biological variations and reference limits. *Clin Chem Lab Med*. 2001;39:1162–1168.
38. Ooi CL, Lepage N, Nieuwenhuys E, et al. Pediatric reference intervals for soluble transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index. *World J Pediatr*. 2009;5:122–126.
39. Lin XM, Ji CY, Liu WJ, et al. Levels of serum transferrin receptor and its response to Fe-supplement in Fe-deficient children. *Br J Nutr*. 2006;96:1134–1139.

## IVc. Utilidad clínica de RsTf, índice RsTf-F y CHr

---

### RESUMEN

Este estudio transversal, llevado a cabo en una muestra representativa de su población de referencia, evalúa la utilidad del CHr, el RsTf y el índice RsTf-F para diagnosticar el déficit de hierro sin anemia, establece puntos *cut-off* para la edad y el sexo, y propone una nueva definición de ferropenia en base a ellos. Se incluyeron un total de 1239 niños y adolescentes sanos de edades comprendidas entre 1 y 16 años. Se determinaron un hemograma completo, biomarcadores férricos, la eritropoyetina, la PCR, el CHr, el RsTF y el índice RsTf-F. Se elaboraron las curvas ROC y se obtuvieron la sensibilidad, especificidad, valores predictivos, ratios de probabilidad y precisión para los distintos valores *cut-off*. Setenta y tres sujetos presentaban ferropenia sin anemia. Las AUC para el índice RsTf-F, RsTf y CHr fueron 0.97 (IC95% 0.95–0.99), 0.87 (IC95% 0.82–0.92) y 0.68 (IC95% 0.61–0.74) respectivamente. Los siguientes valores *cut-off* definieron el déficit de hierro: índice RsTf-F > 1.5 en los sujetos 1-5 años y los chicos 12-16 años y > 1.4 en los sujetos 6-11 años y las chicas 12-16 años; RsTf (mg/L) > 1.9 de 1 a 5 años, > 1.8 de 6 a 11 años, > 1.75 en chicas de 12 a 16 años y > 1.95 en chicos de 12 a 16 años; y CHr (pg) < 27 de 1 a 5 años y < 28.5 de 6 a 16 años.

**Conclusiones.** El CHr, el RsTf y el índice RsTf-F son parámetros útiles para discriminar ferropenia sin anemia en niños y adolescentes, y se han establecido valores *cut-off* específicos por edad y sexo. La combinación de estos parámetros es una alternativa para definir ferropenia con un poder discriminatorio adecuado.

## PUBLICACION 3

# The usefulness of reticulocyte hemoglobin content, serum transferrin receptor and the sTfR-ferritin index to discriminate iron deficiency in healthy children aged 1-16 years

**Autores.** María Ángeles Vázquez López, Encarnación López-Ruzafa, María Mercedes Ibáñez Alcalde, Manuel Martín González, Antonio Bonillo Perales y Francisco Lendínez Molinos.

**Referencia bibliográfica.** *Eur J Pediatr* 2019; 178 (1): 41-9.

PMID: 30264352

DOI: 10.1007/s00431-018-3257-0.

**Informe del factor de impacto.** En el año 2019 la revista científica *European Journal of Pediatrics* presentaba un *Journal Impact Factor* (JIF) de 2.305 en el *Journal of Citation Reports*, lo cual la sitúa en el segundo cuartil (Q2), en posición 38/128, para la categoría de Pediatría.



# The usefulness of reticulocyte haemoglobin content, serum transferrin receptor and the sTfR-ferritin index to identify iron deficiency in healthy children aged 1–16 years

María A. Vázquez-López<sup>1</sup> · Encarnación López-Ruzafa<sup>1</sup>  · Mercedes Ibáñez-Alcalde<sup>2</sup> · Manuel Martín-González<sup>1</sup> · Antonio Bonillo-Perales<sup>1</sup> · Francisco Lendínez-Molinos<sup>1</sup>

Received: 29 January 2018 / Revised: 21 June 2018 / Accepted: 17 September 2018

© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

## Abstract

This cross-sectional study, conducted on a population-based representative sample, evaluates the usefulness of reticulocyte haemoglobin content (CHr), serum transferrin receptor (sTfR) and sTfR/log ferritin (sTfR-F index) to recognise iron deficiency (ID) without anaemia, provides specific cut-off points for age and gender, and proposes a new definition of ID. A total of 1239 healthy children and adolescents aged 1–16 years were included. Complete blood count, iron biomarkers, erythropoietin, C-reactive protein, CHr, sTfR, and sTfR-F index were determined. ROC curves were obtained and sensitivity, specificity, predictive values, likelihood ratios, and accuracy for each specific cut-off points were calculated. Seventy-three had ID without anaemia. Area under the curve for sTfR-F index, sTfR and CHr were 0.97 (CI95% 0.95–0.99), 0.87 (CI95% 0.82–0.92) and 0.68 (CI95% 0.61–0.74), respectively. The following cut-off points defined ID: sTfR-F Index > 1.5 (1–5 years and 12–16 years boys) and > 1.4 (6–11 years and 12–16 years girls); sTfR (mg/L) > 1.9 (1–5 years), > 1.8 (6–11 years), > 1.75 (12–16 years girls) and > 1.95 (12–16 years boys); and CHr (pg) < 27 (1–5 years) and < 28.5 (6–16 years).

**Conclusions:** CHr, sTfR and the sTfR-F index are useful parameters to discriminate ID without anaemia in children and adolescents, and specific cut-off values have been established. The combination of these new markers offers an alternative definition of ID with suitable discriminatory power.

## What is Known:

- In adults, reticulocyte haemoglobin content (CHr), serum transferrin receptor (sTfR) and sTfR/log ferritin index (sTfR-F index) have been evaluated and recognised as reliable indicators of iron deficiency (ID).
- Clinical manifestations of ID may be present in stages prior to anaemia, and the diagnosis of ID without anaemia continues to pose problems.

## What is New:

- CHr, sTfR and the sTfR-F index are useful parameters in diagnosis of ID in childhood and adolescence when anaemia is not present.
- We propose a new strategy for the diagnosis of ID in childhood and adolescence, based on the combination of these measures, which offer greater discriminatory power than the classical parameters.

**Keywords** Iron deficiency · Reticulocyte haemoglobin content · Serum transferrin receptor · sTfR-F index

Communicated by Peter de Winter

✉ Encarnación López-Ruzafa  
e.lopezruzafa@gmail.com

María A. Vázquez-López  
mavazquezl59@gmail.com

Mercedes Ibáñez-Alcalde  
mmibanezalcalde@gmail.com

Manuel Martín-González  
manuel.martin.gonzalez.sspa@juntadeandalucia.es

Antonio Bonillo-Perales  
antonio.bonillo.sspa@juntadeandalucia.es

Francisco Lendínez-Molinos  
lendimol@gmail.com

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Torrecárdenas Hospital, Hermandad de Donantes de Sangre s/n, 04009 Almería, Spain

<sup>2</sup> Department of Pediatrics, Poniente Hospital, Avenida Almerimar s/n, 04007 El Ejido, Spain



## Abbreviations

ACD	Anaemia of chronic disease
AUC	Area under the curve
CHr	reticulocyte haemoglobin content
CI	confidence interval
CRP	C-reactive protein
EP	erythrocyte protoporphyrin
ID	iron deficiency
IDA	iron-deficiency anaemia
IDE	iron-deficient erythropoiesis
ISD	iron stores depletion
LR-	negative likelihood ratio
LR+	positive likelihood ratio
MCV	mean corpuscular volume
MDD	maximum diagnostic discrimination
NPV	negative predictive value
P	percentile
PPV	positive predictive value
ROC	receiver operating characteristics
sEPO	serum erythropoietin
sTfR	serum transferrin receptor
sTfR-F	sTfR/log ferritin
TIBC	total iron binding capacity
TS	transferrin saturation

## Introduction

Childhood and adolescence are periods of increased iron requirements and also of possible iron deficiency (ID) [1, 2, 5, 14, 19, 22, 36, 48]. This condition is the result of a continuous, progressive negative balance of iron. Fundamentally, iron balance is regulated by the rate of erythropoiesis and by the size of iron stores in the body. In childhood and adolescence, the changes involved in growth affect both iron status and erythropoiesis.

In order to determine iron status, various haematologic and biochemical parameters must be considered [21, 48], and in this respect, new diagnostic markers have been incorporated in recent decades. In adults, reticulocyte haemoglobin content (CHr), serum transferrin receptor (sTfR) and sTfR/log ferritin index (sTfR-F index) have been evaluated and recognised as reliable indicators of ID [18, 40], and it has been suggested they should be used in a diagnostic plot to discriminate functional ID, iron-deficiency anaemia (IDA) and anaemia of chronic disease (ACD), and to predict the response to treatment [39].

Erythrocytes have a long lifespan, and therefore erythrocyte indices are late indicators of ID. However, CHr is considered a real-time marker of functional ID, as reticulocytes only remain in blood for 1–2 days [39]. This parameter can be measured in modern haematology analysers and provide the paediatrician with valuable information [28]. Although Brugnara et al. [6], in 1999, and subsequent studies have

corroborated the value of CHr in the diagnosis of ID in children [13, 24, 42, 43], little research has been conducted to define normal values for healthy children and adolescents.

sTfR is the soluble form of the transmembrane transferrin receptor that is present in every cell of the body. Its value is proportional to the mass of cellular TfR, which depends primarily on the intracellular requirements of iron and on erythropoietic activity [4, 33, 35]. This parameter provides information about the functional iron compartment and is a useful measure for diagnosing ID [32, 33, 38, 49]. It has advantages over other iron parameters (sTfR is unaffected by inflammation), but the non-standardisation of the measure is a major disadvantage. Despite this reservation, normal values have been published for healthy children and adolescents [12, 29, 37, 45, 46], as have cut-off values indicative of ID in adults [32, 33] and children [3].

The sTfR-F index was proposed by Punnonen et al. [32] as a useful marker of the iron supply available for erythropoiesis. It offers information about iron stores and functional pools and could enhance the diagnostic efficacy of sTfR or that of serum ferritin alone [4, 32, 34, 35].

In a population-based study in which healthy children and adolescents were included, reference values of the above markers were defined, according to strict selection criteria [17, 23, 45, 46]. The next step would be to evaluate the diagnostic utility of these markers in order to establish specific cut-off values for ID which could be incorporated into the diagnostic battery as an alternative to the classical parameters or at least to propose their use in clinical situations in which the latter are less useful. Most studies of the usefulness of CHr, sTfR and the sTfR-F index have been performed with adult populations [18, 32, 38]. Very few studies have been conducted with children and adolescents to establish equivalent cut-off values for these parameters in order to discriminate ID when anaemia is not present.

Accordingly, the goals of the present study are to evaluate the usefulness of CHr, sTfR and the sTfR-F index as a means of recognising ID without anaemia in healthy children and adolescents, to obtain specific cut-off points by age and gender, and to propose an alternative definition of ID based on these new measures.

## Methods

### Design

Descriptive study on evaluation of diagnostic test.

### Subjects

Participants were selected from a cross-sectional study conducted on a population-based representative sample of healthy

children aged 1–16 years in the city of Almería (Spain), from 2007 to 2009.

Selection was performed by multistage probability sampling method described in previous reports [23, 45]. The Healthcare District of Almería provided a list of 5453 children aged 12–47 months. Assuming an ID prevalence of 20%, a 95% confidence interval (CI) and 5% precision, a minimum sample size of 330 children were required. Four hundred forty-four were selected, 19% refused and finally 360 were included. The Municipal Education Office provided a list of the 17,934 children aged 4–11 years from primary schools and 9823 adolescents aged 12–16 years from secondary schools. Assuming an ID prevalence of 10%, a 95% CI and 5% precision, 551 children aged 4–16 years were required. Then, 1323 were invited to participate, 17% refused and 1099 were included.

The criteria for exclusion were (a) haematological or systemic diseases that could affect the parameters analysed, (b) iron therapy in the previous 3 months and (c) the presence of previous infectious or febrile disease or C-reactive protein (CRP) value  $> 0.5$  mg/dl [39].

## Survey

The survey was addressed to all of parents, as described in a previous study [15]. A detailed medical history and a complete physical exploration were performed to all selected subjects.

## Parameters measured

Haemoglobin, red cell indices, reticulocyte haemoglobin content (CHr) and reticulocytes were performed in ADVIA-120 counter (Siemens Healthcare Diagnostics, NY); erythrocyte protoporphyrin (EP) determined by fluorometric assay [10]; serum transferrin, serum ferritin and CRP determined by the immunoturbidimetric method using “Tina-quant-Transferrin,” “Tina-quant Ferritin” and CRPLX kits obtained from Roche Diagnostics GmbH (Boehringer Mannheim) respectively; serum iron determined by colorimetric assay using the Fe kit obtained from Roche Diagnostics GmbH (Boehringer Mannheim); total iron binding capacity (TIBC), calculated as  $1 \text{ mg transferrin/dl} \times 1.27 = 1 \mu\text{g IBC/dl}$ ; transferrin saturation (TS), calculated as  $\text{serum iron/TIBC} \times 100$ ; serum erythropoietin (sEPO) determined by enzyme immunoassay using the Quantikine IVD-Human Erythropoietin kit (R&D Systems, Minneapolis); sTfR, determined by immunoturbidimetric assay using the Quantex sTfR kit (Biokit SA, Barcelona) and the sTfR-F Index, calculated as  $\text{sTfR}/\log \text{ ferritin}$  [32].

Iron status was classified normal, iron store depletion (ISD), iron-deficient erythropoiesis (IDE) and iron-deficiency anaemia (IDA). ISD was defined as serum ferritin

(ng/ml)  $< 10$  (1–5 years) and  $< 12$  (6–16 years); IDE was defined as  $\geq 2$  parameters altered: serum ferritin (as indicated above), TS (%)  $< 10$  (1–2 years),  $< 12$  (3–5 years) and  $< 14$  (6–16 years), EP ( $\mu\text{g/dl}$  erythrocytes)  $> 80$  (1–2 years) and  $> 70$  (3–16 years); IDA was defined as IDE + haemoglobin (g/dl)  $< 11$  (1–5 years),  $< 11.5$  (6–11 years and 12–16 years girls) and  $< 12$  (12–16 years boys). ISD or IDE were considered as ID without anaemia. In cases of isolated microcytosis, thalassaemia traits ( $\alpha$  or  $\beta$ ) were excluded.

## Statistical analysis

SPSS 20.0 software for Windows and Epidat 4.0 for the sample calculation were used. The results obtained are expressed as mean  $\pm$  SD and 95% confidence interval (CI). The qualitative variables are expressed as percentages. Student's *t* test was applied to compare the means, and the ANOVA test was used for comparisons of more than two groups. When the results were significant, differences between groups were identified using the Bonferroni post hoc test. In all cases, a *p* value  $< 0.05$  was considered significant.

To evaluate the clinical usefulness of CHr, sTfR and the sTfR-F index to recognise ID without anaemia, subjects with IDA were excluded. Receiver operating characteristics (ROC) curves were used, obtaining the area under the curve (AUC) and the corresponding 95% CI. For each group, classified by age and gender (1–5 years, 6–11 years, 12–16 years girls and 12–16 years boys), the maximum diagnostic discrimination (MDD) cut-off point was calculated, corresponding to the highest  $(\text{sensitivity} + \text{specificity})/2$  value. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values (PPV, NPV), positive and negative likelihood ratios (LR+, LR-), accuracy and the respective 95% CI were calculated for each MDD value. They were also calculated for the  $P_{2.5}/P_5$  value for CHr and for the  $P_{95}/P_{97.5}$  value for sTfR and the sTfR-F index, when the MDD value excluded more than 5% of the subjects. As CHr, sTfR and the sTfR-F index were assumed to be confirmatory parameters of ID, the ideal cut-off points were selected according to the highest specificity ( $> 95\%$ ) and LR+ ( $> 5$ –10) values, as long as the sensitivity was  $> 25\%$ . The cut-off points selected were used to propose an alternative definition of ID, and finally, the overall prevalence was calculated.

## Results

A total of 1342 children aged 1–16 years were enrolled in the study. Of these, the following were excluded: 70 who had C-reactive protein  $> 0.5$  mg/dl, 9 with  $\beta$  or  $\alpha$ -thalassaemia trait and 24 due to the absence of relevant analytical results. Finally, 1239 children were included, of whom 620 (50%) were female. By age, the distribution was as follows: 460 (37.1%) aged 1–5 years, 49 (39.6%) aged 6–11 years

and 288 (25.9%) aged 12–16 years. By iron status, 84 (6.8%) had some degree of ID; of these, 13 (1%) had IDA. The prevalence of ID varied according to age. Thus, in the group aged 1–5 years, 24 (5.2%) had ID without anaemia and 9 (2%) had IDA. In those aged 6–11 years, only 16 (3.3%) had ID without anaemia, and among the adolescents (aged 12–16 years), 31 (10.8%) had ID without anaemia and 4 (1.4%) had IDA.

Table 1 shows the mean values obtained for the analytical parameters, according to iron status. Erythropoietic activity was normal in all subjects. Concerning the study parameters, as the ID progressed, CHr values decreased significantly and sTfR and the sTfR-F index increased ( $p < 0.0001$ ).

Figure 1 shows the ROC curves obtained to assess the discriminatory value for ID without anaemia of the classical markers of iron status (mean corpuscular volume (MCV), serum ferritin, TS and EP) and that of the proposed indicators (CHr, sTfR and the sTfR-F index), for the total group (excluding children with IDA). Thus, on the ROC curve shown on the left, serum ferritin is outstanding, with AUC: 0.99 (95%CI 0.99–1). This parameter is clearly preferable to MCV, TS and EP. Among the proposed new parameters (shown in the ROC curve on the right), the sTfR-F index performed best, with a discriminatory power similar to that of ferritin, followed by sTfR with an AUC of 0.87(95%CI 0.82–0.92), which was still better than the classical parameters. The AUC for CHr was similar to that found for MCV, TS and EP. Maximum diagnostic discrimination (MDD) cut-off points were obtained for CHr, sTfR and the sTfR-F index (Fig. 1). MDD values for CHr and sTfR did not meet the established validity criteria, and so these were rejected; instead, CHr  $P_5$  and sTfR  $P_{95}$  cut-off points are proposed (Fig. 1: shaded columns).

Table 2 shows the mean values for CHr, sTfR and the sTfR-F index in children with normal iron status for age and gender. CHr values increased with age. The highest values for sTfR were found in the group of adolescents. For the sTfR-F index, the lowest values were obtained for the children aged 6–11 years. Gender only had a significant influence in the adolescents, for sTfR and the sTfR-F index, but not for CHr. This finding enabled specific cut-off points for age and gender to be established. Tables 3 and 4 show the sensitivity, specificity, predictive values, likelihood ratios and accuracy obtained for all ages and gender groups, for each cut-off value. Those presenting greatest overall utility, which are shaded in the tables, were selected. Accordingly, CHr values lower than the shaded cut-off values, and higher ones for sTfR and the sTfR-F index, would be suggestive of ID.

With these new parameters, an alternative definition of ID without anaemia could thus be proposed: (a) ISD: ferritin (ng/ml)  $< 10$  (1–5 years) and  $< 12$  (6–16 years); (b) IDE: sTfR-F Index  $> 1.5$  (1–5 years and 12–16 years boys) and  $> 1.4$  (6–11 years and 12–16 years girls), or  $\geq 2$  parameters: serum ferritin (as indicated above); sTfR (mg/L)  $> 1.9$  (1–5 years),  $> 1.8$  (6–11 years),  $> 1.75$  (12–16 years girls) and  $> 1.95$  (12–16 years boys); CHr (pg)  $< 27$  (1–5 years) and  $< 28.5$  (6–16 years).

Under these new criteria, 117 children (9.4%) were considered ID.

## Discussion

ID is still a health problem among children and adolescents. Its related clinical manifestations may be present in stages

**Table 1** Mean values of iron parameters and erythropoietin according to iron status in healthy children aged 1–16 years

Iron status	Normal <i>n</i> 1153		ID without anaemia <i>n</i> 70		IDA <i>n</i> 13		ANOVA <i>p</i>
	Mean $\pm$ SD	(95% CI)	Mean $\pm$ SD	95% CI	Mean $\pm$ SD	95% CI	
Hb (g/dl)	13.3 $\pm$ 0.9	(13.2–13.3)	13 $\pm$ 0.84†	(12.8–13.2)	10.5 $\pm$ 0.7‡	(10.1–10.9)	0.0001
MCV (fl)	77.9 $\pm$ 3.5	(77.7–78.1)	75.2 $\pm$ 5.3*	(73.9–76.4)	67.5 $\pm$ 5.2‡	(64.3–70.6)	0.0001
TS (%)	24.4 $\pm$ 11.9	(23.7–25.1)	17.5 $\pm$ 10.5*	(15–19.9)	6.5 $\pm$ 2.5£¶	(4.9–8)	0.0001
Ferritin (ng/ml)	30.9 $\pm$ 14.8	(30–31.7)	10 $\pm$ 2.2*	(9.5–10.5)	6.7 $\pm$ 3.3£	(4.7–8.7)	0.0001
EP ( $\mu$ g/dl Hm)	29.2 $\pm$ 16.9	(28.2–30.2)	41.6 $\pm$ 21.5*	(36.6–46.6)	91.7 $\pm$ 63‡	(53.3–130)	0.0001
CHr (pg)	31.1 $\pm$ 1.73	(31–31.2)	29.6 $\pm$ 2.5*	(29–30.2)	24.5 $\pm$ 30‡	(22.7–26.3)	0.0001
sTfR (mg/L)	1.24 $\pm$ 0.29	(1.22–1.25)	1.79 $\pm$ 0.4*	(1.7–1.88)	2.77 $\pm$ 0.40‡	(2.52–3)	0.0001
sTfR-F Index	0.87 $\pm$ 0.25	(0.86–0.89)	1.83 $\pm$ 0.5*	(1.72–1.95)	4.03 $\pm$ 1.61‡	(3.05–5)	0.0001
EPO (mU/L)	8.8 $\pm$ 3.6	(8.5–9.0)	11.4 $\pm$ 5.7*	(9.7–13.2)	22.4 $\pm$ 11.3‡	(13.6–31.1)	0.0001

ID iron deficiency, IDA iron deficiency anaemia, Hb haemoglobin, MCV mean corpuscular volume, TS transferrin saturation, EP erythrocyte protoporphyrin, CHr haemoglobin content of reticulocytes, sTfR soluble transferrin receptor, sTfR-F Index sTfR/log Ferritin, CI confidence interval, SD standard deviation

ANOVA: Post hoc (Bonferroni test): † $p < 0.01$  (ID without anaemia/normal); \* $p < 0.0001$  (ID without anaemia/normal); ‡ $p < 0.0001$  (IDA/normal and IDA/ID without anaemia); £ $p < 0.0001$  (IDA/normal); ¶ $p < 0.006$  (IDA/ID without anaemia)

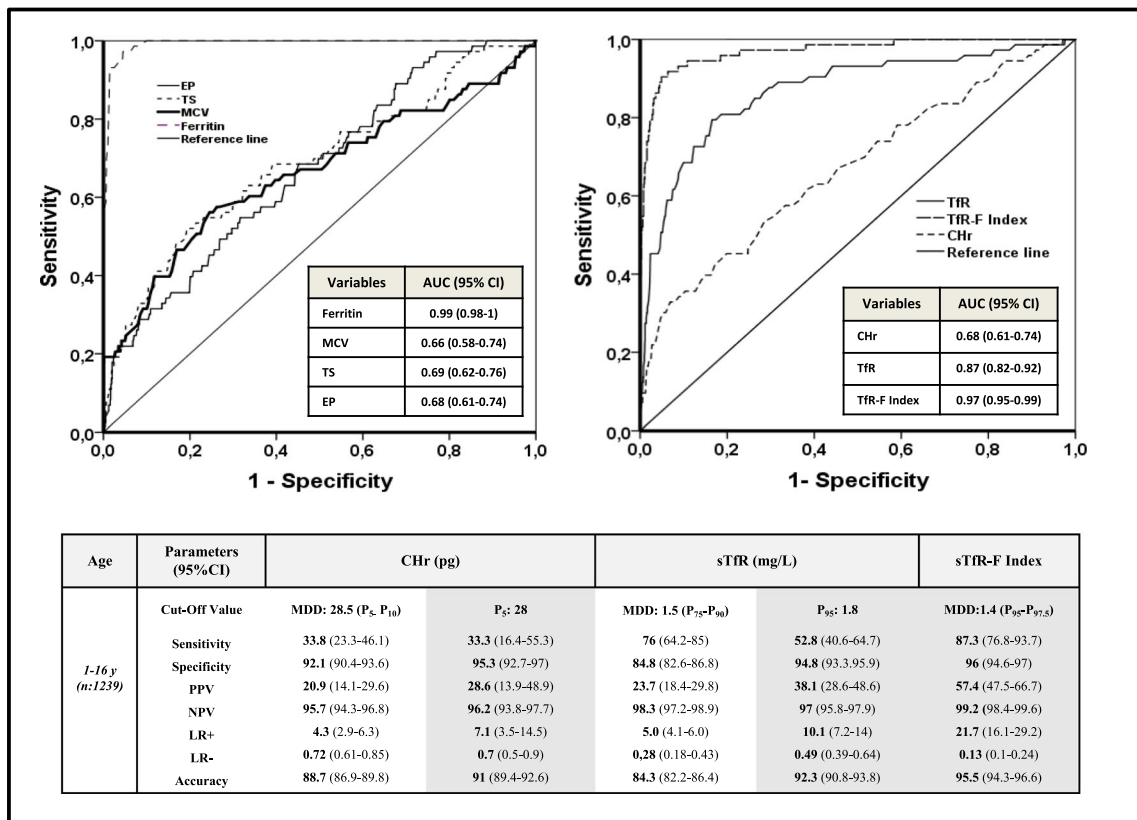


Fig. 1 Receiver operating characteristic curves for iron parameters and cut-off points of CHR, TfR and the TfR-F Index for discriminating ID without anaemia in healthy children aged 1–16 years

prior to anaemia [8, 22, 25, 36], and the diagnosis of ID without anaemia continues to pose problems [31, 48].

In the period 2007–2009, a cross-sectional study was conducted in Almería (Spain) in healthy children aged 1–16 years,

Table 2 Mean values of CHR, TfR and the TfR-F Index in healthy children aged 1–16 years with normal iron status according to age and gender

Variables	1–5 years n 427 (222 girls) Mean ± SD (95% CI)	6–11 years n 475 (238 girls) Mean ± SD (95% CI)	12–16 years n 253 (109 girls) Mean ± SD (95% CI)	ANOVA
CHR (pg)				
Total	30.4 ± 1.8 (30.2–31.6)†	31.4 ± 1.6 (31.3–31.6)	31.5 ± 1.3 (31.4–31.7)	0.0001
Girls	30.5 ± 1.8 (30.3–30.8)	31.6 ± 1.5 (31.4–31.7)	31.5 ± 1.2 (31.3–31.8)	
Boys	30.2 ± 1.8 (30.0–30.5)	31.6 ± 1.5 (31.1–31.6)	31.5 ± 1.4 (31.3–31.8)	
p	0.1	0.16	0.94	
sTfR (mg/L)				
Total	1.24 ± 0.29 (1.22–1.27)*‡	1.19 ± 0.26 (1.17–1.22)£	1.32 ± 0.30 (1.28–1.36)	0.0001
Girls	1.22 ± 0.30 (1.18–1.26)	1.17 ± 0.26 (1.14–1.21)	1.23 ± 0.26 (1.18–1.28)	
Boys	1.26 ± 0.29 (1.22–1.30)	1.21 ± 0.27 (1.18–1.25)	1.40 ± 0.32 (1.34–1.44)	
p	0.16	0.16	0.0001	
sTfR-F Index				
Total	0.91 ± 0.27 (0.89–0.94)¶	0.83 ± 0.22 (0.81–0.85)£	0.90 ± 0.25 (0.87–0.93)	0.0001
Girls	0.89 ± 0.27 (0.86–0.93)	0.80 ± 0.21 (0.78–0.83)	0.86 ± 0.22 (0.82–0.90)	
Boys	0.93 ± 0.27 (0.89–0.97)	0.84 ± 0.21 (0.82–0.88)	0.94 ± 0.29 (0.88–0.98)	
p	0.19	0.45	0.017	

CHR reticulocyte haemoglobin content, sTfR soluble transferrin receptor, sTfR-F Index sTfR/log ferritin, SD standard deviation, CI confidence interval, p signification level

ANOVA: Post-hoc (Bonferroni test): †p < 0.0001 (1–5 years/6–11 years and 1–5 years/12–16 years); \*p < 0.02 (1–5 years/6–11); ‡p < 0.002 (1–5 years/12–16 years); £p < 0.0001 (6–11 years/12–16 years); ¶p < 0.0001 (1–5 years/6–11 years)

**Table 3** Sensitivity, specificity, predictive values, likelihood ratios and accuracy of CHr, sTfR and the sTfR-F Index to discriminating ID without anaemia in healthy children aged 1–11 years

Age group	Parameters (95%CI)	CHr (pg)	sTfR (mg/L)	sTfR-F Index		
1–5 years ( <i>n</i> 451)	Cut-off value	MDD 29 (P <sub>10</sub> –P <sub>25</sub> ) P <sub>5</sub> : 27	MDD 1.6 (P <sub>90</sub> ) P <sub>97.5</sub> 1.9	MDD 1.5 (P <sub>95</sub> –P <sub>97.5</sub> )		
	Sensitivity	50 (29.6–70.3)	33.3 (16.4–55.3)	79.2 (57.3–92.0)	66.7 (44.7–83.6)	84 (63.1–94.7)
	Specificity	78.9 (74.7–82.6)	95.3 (92.7–97)	88.7 (85.3–91.5)	97.6 (95.6–98.8)	96.5 (94.1–97.9)
	PPV	11.8 (6.5–20)	28.6 (13.9–48.9)	28.3 (18.3–40.9)	61.5 (40.7–79.1)	58.3 (38.3–71.7)
	NPV	96.5 (93.9–98.1)	96.2 (93.8–97.7)	98.7 (96.8–99.5)	98.1 (96.2–99.1)	99 (97.4–99.7)
	LR+	2.4 (1.5–3.7)	7.1 (3.5–14.5)	7.0 (5–9.8)	28.5 (14.5–55.9)	23.8 (14.1–40.3)
	LR–	0.6 (0.4–0.9)	0.7 (0.5–0.9)	0.2 (0.1–0.5)	0.34 (0.2–0.6)	0.16 (0.1–0.4)
	Accuracy	77.4 (75.4–81.3)	92 (89.5–94.5)	99.2 (85.2–91.2)	96 (94.2–97.8)	97.5 (96.1–98.9)
6–11 years ( <i>n</i> 491)	Cut-off value	MDD 28.5 (P <sub>5</sub> ) P <sub>2.5</sub> 28	MDD 1.6 (P <sub>90</sub> –P <sub>95</sub> ) P <sub>95</sub> –P <sub>97.5</sub> 1.8	MDD 1.4 (P <sub>&gt;97.5</sub> )		
	Sensitivity	25 (8.3–52.6)	18.7 (5–46.3)	81.2 (53.7–95)	68.7 (41.5–87.9)	93.7 (62.7–99.7)
	Specificity	95.1 (92.7–96.8)	96.8 (94.7–98.1)	93.5 (90.7–95.4)	96.6 (94.5–98)	98.3 (96.6–99.2)
	PPV	14.8 (4.8–34.6)	16.7 (4.4–42.2)	29.5 (17.2–45.4)	40.7 (23–61)	65.2 (42.8–82.8)
	NPV	97.4 (95.4–98.6)	97.2 (96.2–98.5)	99.3 (97.9–99.8)	98.9 (97.3–99.6)	99.8 (98.6–100)
	LR+	5.2 (2–13.2)	5.9 (1.9–18.5)	12.4 (8.2–18.8)	20.4 (11.4–36.6)	55.6 (27.7–112)
	LR–	0.79 (0.59–1.05)	0.84 (0.66–1.06)	0.2 (0.1–0.5)	0.32 (0.15–0.67)	0.06 (0.01–0.4)
	Accuracy	92.9 (90.6–95.2)	94.3 (92.2–96.3)	93.1 (90.9–95.3)	95.7 (93.9–97.5)	98.2 (97–99.4)

MDD maximum diagnostic discrimination point, PPV positive predictive value, NPV negative predictive value, LR+ Likelihood ratio positive; LR– Likelihood ratio negative; 95% CI 95% confidence interval, P percentile

to analyse the prevalence of ID and to obtain reference values for new diagnostic parameters such as CHr, sTfR and the sTfR-F index [17, 23, 45, 46]. The main aim of the present study is to analyse the usefulness of these parameters for detecting ID without anaemia.

A total of 1239 healthy subjects were included in the study. According to the classical ID criteria [21], IDA was present in 1% and ID without anaemia in 5.8% of the study population. Both values are in the expected range for developed countries [5, 14, 19, 48]. In agreement with previous studies [3, 6, 20, 26, 42, 47], our analysis showed that CHr decreased significantly as ID progressed, while sTfR and the sTfR-F index increased (Table 1).

Several studies have reported the clinical usefulness of CHr, sTfR and the sTfR-F index in the diagnosis of IDA in children [7, 13, 16, 42, 47] and adults [9, 18, 44], with AUC values usually  $\geq 0.80$ . However, opinions differ as to which of these markers is the best ID indicator. The suitability of these parameters for discriminating states of ID without anaemia has been studied very little [3, 30], and reliable values have not been established. Indeed, some studies have concluded that CHr and TfR have only limited value for detecting iron depletion and that they are not good indicators of early stages of ID [11, 42].

In the present study, we analyse the diagnostic utility of these parameters to discriminate ID without anaemia (Fig. 1). The ROC curve obtained for the sTfR-F index had an AUC of 0.97 (95%CI 0.95–0.99), which was very similar to that of ferritin. Therefore, the index is a highly sensitive and

specific measure in the diagnosis of ID. Moreover, sTfR alone presents greater diagnostic value than the classical parameters, with an AUC of 0.87 (95%CI 0.82–0.92). These results are comparable to those reported in previous studies [3, 9, 18, 20, 27, 30, 47]. However, CHr alone was not found to be sufficiently indicative in early stages of ID (AUC 0.68, 95%CI 0.61–0.74) [7, 9, 13, 27, 44], although it was comparable to the classical parameters. This finding could reflect the fact that subjects with IDA were excluded from this study, and that CHr only begins to present alterations when the production of haemoglobin is compromised. Nevertheless, we believe that CHr can offer added value, by improving diagnostic efficiency, if it is used together with other markers of the functional iron compartment.

We have previously reported that CHr, sTfR and the sTfR-F index vary significantly according to age and gender [17, 23, 45, 46], as shown in Table 2. For this reason, we tested the validity of these measures for different cut-off values, in order to choose the most suitable. The MDD points, as shown in Tables 3 and 4, were not always considered reliable, as the values obtained were close to those offered by the P<sub>10</sub> of CHr and the P<sub>90</sub> of sTfR-F and the index, assuming that 10% of subjects with supposedly normal iron status would be classified as ID. In these cases, we chose specific cut-off values that would more safely confirm the ID status and we propose different discriminatory points to define ID according to age and gender. We assume that lower values of CHr and higher ones of sTfR and the sTfR-F index, with respect to the cut-off values obtained (shaded columns), would be suggestive of ID.

**Table 4** Sensitivity, specificity, predictive values, likelihood ratios and accuracy of CHr, sTfR and the sTfR-F Index to discriminating ID without anaemia in healthy adolescents aged 12–16 years

Ages group	Parameters (95%CI)	CHr (pg)	sTfR (mg/L)	sTfR-F Index	
Girls 12–16 years (n 132)	Cut-off value	MDD 30 (P <sub>10</sub> )	MDD 1.46 (P <sub>75</sub> -P <sub>90</sub> )	MDD 1.25 (P <sub>90</sub> -P <sub>95</sub> )	
	Sensitivity	43.5 (23.9–65.1)	76.2 (52.4–91)	85.7 (62.6–96.2)	
	Specificity	91.1 (83.8–95.4)	100 (95.8–100)	95.4 (89.2–98.3)	
	PPV	50 (27.8–72.1)	100 (62.9–100)	77.3 (55.8–91.7)	
	PPN	88.7 (81.1–93.6)	88.9 (81.7–93.5)	97 (91.5–99.3)	
	LR+	4.9 (2.3–10.2)	Infinitive	18.8 (7.9–45.2)	
	LR-	0.6 (0.4–0.9)	0.6 (0.4–0.8)	0.15 (0.05–0.43)	
	Accuracy	83 (76.7–89.3)	89.6 (84.5–94.7)	96.1 (92.7–99.4)	
	Boys 12–16 years (n 152)	Cut-off value	MDD: 30 (P <sub>10</sub> )	MDD 1.65 (P <sub>75</sub> -P <sub>90</sub> )	MDD 1.4 (P <sub>90</sub> -P <sub>95</sub> )
		Sensitivity	50 (22.3–77.7)	25 (6.7–57.1)	90.1 (57.1–99.5)
Specificity		83.7 (76.3–89.2)	97.1 (92.4–99.1)	91.8 (85.4–95.6)	
PPV		20.7 (8.7–40.2)	42.8 (11.8–79.7)	47.6 (26.4–69.7)	
PPN		95.2 (89.3–98)	93.8 (88.3–96.9)	99.2 (94.9–99.9)	
LR+		3.1 (1.5–6)	8.8 (2.2–34.9)	11.1 (6.1–20.1)	
LR-		0.6 (0.34–1)	0.77 (0.55–1.1)	0.1 (0.01–0.64)	
Accuracy		81 (74.8–87.2)	91.5 (87.1–95.9)	91.7 (87.2–96.2)	
			P <sub>2.5</sub> 28.5	P <sub>95</sub> : 1.75	P <sub>97.5</sub> 1.4
			39.1 (20.5–61.2)	30 (12.8–54.3)	80.9 (57.4–93.7)
		100 (95.8–100)	95.4 (89.2–98.3)	99.1 (94.3–99.9)	
		100 (62.9–100)	54.5 (24.6–81.8)	94.5 (70.6–99.7)	
		88.9 (81.7–93.5)	88.2 (80.7–93.2)	96.4 (90.6–98.9)	
		Infinitive	6.6 (2.2–19.6)	88 (12.5–626)	
		0.6 (0.4–0.8)	0.73 (0.55–0.98)	0.2 (0.08–0.46)	
		89.6 (84.5–94.7)	84.7 (78.5–90.9)	96.1 (92.7–99.4)	
		P <sub>2.5</sub> -P <sub>5</sub> 28.5	P <sub>95</sub> : 1.95	P <sub>95</sub> -P <sub>97.5</sub> : 1.5	
		25 (6.7–57.1)	45.4 (18.1–75.4)	90.9 (57.1–99.5)	
		97.1 (92.4–99.1)	94.8 (89.1–97.7)	96.2 (91.1–98.26)	
		42.8 (11.8–79.7)	41.7 (16.5–71.4)	66.7 (38.7–87)	
		93.8 (88.3–96.9)	95.5 (90–98.1)	99.2 (95.1–99.9)	
		8.8 (2.2–34.9)	8.7 (3.3–22.9)	24.3 (10.1–58.7)	
		0.77 (0.55–1.1)	0.57 (0.33–0.9)	0.09 (0.01–0.61)	
		91.5 (87.1–95.9)	91 (86.4–95.6)	95.9 (92.7–99.1)	

MDD maximum diagnostic discrimination point, PPV positive predictive value, NPV negative predictive value, LR+ Likelihood ratio positive, LR- Likelihood ratio negative, 95% CI 95% confidence interval, P percentile

According to the validity obtained for these new parameters, even in early stages of ID, a new definition based on the combination of these measures together with ferritin and haemoglobin can be offered. This new approach makes it possible to determine the full spectrum of body iron status in the different compartments (iron stores and functional iron), not only as an alternative to the classical definition, but also as a useful indicator for situations (such as inflammation or chronic disease) in which the classical parameters are less useful.

Thus, ID without anaemia would be defined as (a) *iron-store depletion*: low ferritin; (b) *iron-deficient erythropoiesis*: high sTfR-F index (which would reflect situations with high sTfR and low ferritin but above the diagnostic cut-off value, and also conditions in which there is iron-store depletion but no impact on sTfR); (c) or the combination of  $\geq 2$  parameters among low ferritin, low CHr and high sTfR.

When these criteria are applied, the overall prevalence of ID increases.

The benefits and contributions of this study arise from the following methodological considerations: (a) it is based on an extensive and representative population; (b) it was conducted in a city in south-eastern Spain with a broad representation of social classes and ethnic groups, and therefore the results obtained can be extrapolated to other contexts, making it comparable, for example, to other Spanish and European cities; (c) it includes a wide range of paediatric ages; (d) strict selection criteria were applied to define ID; (e) the parameters we propose are of proven utility in the diagnosis of ID and have been included in clinical guidelines for the differential diagnosis of anaemia in adults; (f) we also include the measure of serum erythropoietin as an indirect marker of erythropoietic activity (capable of altering sTfR values); (g) in choosing the diagnostic cut-off points, the likelihood ratio was calculated because it is independent of the prevalence of the disease, and because very few reports have been made of its inclusion in validity studies of diagnostic tests.

This study presents some limitations. Firstly, there is no “gold standard” with which to define ID. Although iron in bone marrow is considered to be the best indicator, this too has its limitations. Moreover, it was not applicable in our study. Secondly, the non-standardisation of the method used to determine sTfR might be viewed as a limitation with respect to generalising the results. Nevertheless, until a reference reagent, developed by the WHO [41] becomes available, the immunoturbidimetric method is currently the most commonly used. Therefore, the results and cut-off values we obtain can be extrapolated and applied to a population of similar characteristics, when a similar methodology is used.

In conclusion, this study highlights the usefulness of CHr, sTfR and the sTfR-F index as a means of discriminating ID without anaemia. We define specific cut-off values by age and gender and offer a new strategy for the diagnosis of ID in

childhood and adolescence, based on the combination of the above measures, which offer greater discriminatory power than the classical parameters. Further studies are required to confirm these results, when sTfR measurement becomes standardised.

**Acknowledgments** We want to thank all the children and parents involved in the research for their disinterested collaboration.

**Authors' contributions** María A. Vázquez-López contributed to conception and design, analysis and interpretation of the data and writing of the manuscript. Encarnación López-Ruzafa contributed to conception and design, analysis and interpretation of the data and writing of the manuscript; Mercedes Ibáñez-Alcalde and Manuel Martín-González contributed to the acquisition of data; Antonio Bonillo-Perales and Francisco Lendinez-Molinos critically revised the manuscript and contributed with their final suggestions. All the authors approved the final manuscript for publication.

### Compliance with ethical standards

**Ethical approval** The Ethics and Research Committee of Torrecárdenas Hospital (Almería) approved the study.

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Informed consent** Informed written consent was obtained from parents or legal guardians as well as from the participants themselves if they were > 12 years.

### References

- Ahankari AS, Myles PR, Fogarty AW, Dixit JV, Tata LJ (2017) Prevalence of iron-deficiency anaemia and risk factors in 1010 adolescent girls from rural Maharashtra, India: a cross-sectional survey. *Public Health* 142:159–166. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2016.07.010>
- Akbari M, Moosazadeh M, Tabrizi R, Khatibi SR, Khodadost M, Heydari ST, Tahami AN, Lankarani KB (2017) Estimation of iron deficiency anemia in Iranian children and adolescents : a systematic review and meta-analysis. *Hematology* 22:231–239
- Angeles Vázquez López MA, Molinos FL, Leyva-Carmona ML et al (2006) Serum transferrin receptor in children: usefulness for determining the nature of anemia in infection. *J Pediatr Hematol Oncol* 28:809–815. <https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e31802d751a>
- Beguín Y (2003) Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta* 329:9–22
- Brotanek JM, Gosz J, Weitzman M, Flores G (2007) Iron deficiency in early childhood in the United States: risk factors and racial/ethnic disparities. *Pediatrics* 120:568–575. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-0572>
- Brugnara C, Zurakowski D, DiCanzio J, Boyd T, Platt O (1999) Reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in children. *J Am Med Assoc* 281:2225–2230
- Brugnara C, Schiller B, Moran J (2006) Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret He) and assessment of iron-deficient states. *Clin Lab Haematol* 28:303–308. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2257.2006.00812.x>
- Carter RC, Jacobson JL, Burden MJ, Armony-Sivan R, Dodge NC, Angelilli ML, Lozoff B, Jacobson SW (2010) Iron deficiency anemia and cognitive function in infancy. *Pediatrics* 126:e427–e434. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-2097>
- Castel R, Tax MG, Droogendijk J et al (2012) The transferrin / log ( ferritin ) ratio : a new tool for the diagnosis of iron deficiency anemia. *Clin Chem Lab Med* 50:1343–1349. <https://doi.org/10.1515/cclm-2011-0594>
- Chisolm JJ, Brown DH (1975) Micro-scale photofluorometric determination of “free erythrocyte porphyrin” (Protoporphyrin IX). *Clin Chem* 21:1669–1682
- Choi JW (2005) Sensitivity, specificity, and predictive value of serum soluble transferrin receptor at different stages of iron deficiency. *Ann Clin Lab Sci* 35:435–439
- Choi JW, Pai SH, Im MW, Kim SK (1999) Change in transferrin receptor concentrations with age. *Clin Chem* 45:1562–1563
- Davidkova S, Prestidge TD, Reed PW, Kara T, Wong W, Prestidge C (2016) Comparison of reticulocyte hemoglobin equivalent with traditional markers of iron and erythropoiesis in pediatric dialysis. *Pediatr Nephrol* 31:819–826. <https://doi.org/10.1007/s00467-015-3284-2>
- Ferrari M, Mistura L, Patterson E et al (2011) Evaluation of iron status in European adolescents through biochemical iron indicators: the HELENA study. *Eur J Clin Nutr* 65:340–349. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.279>
- García-García E, Vázquez-López MA, García-Fuentes E, Rodríguez-Sánchez FI, Muñoz FJ, Bonillo-Perales A, Soriguer F (2012) Iodine intake and prevalence of thyroid autoimmunity and autoimmune thyroiditis in children and adolescents aged between 1 and 16 years. *Eur J Endocrinol* 167:387–392. <https://doi.org/10.1530/EJE-12-0267>
- Grant FKE, Suchdev PS, Flores-Ayala R, Cole CR, Ramakrishnan U, Ruth LJ, Martorell R (2012) Correcting for inflammation changes estimates of iron deficiency among rural Kenyan preschool children. *J Nutr* 142:105–111. <https://doi.org/10.3945/jn.111.146316>
- Ibáñez-Alcalde M, Vázquez-López MA, Ruiz-Sánchez AM et al (2017) Reference values of reticulocyte hemoglobin content in healthy adolescents. *J Pediatr Hematol Oncol* 40:298–303. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000001119>
- Infusino I, Braga F, Dolci A, Panteghini M (2012) Soluble transferrin receptor (sTfR) and sTfR/log ferritin index for the diagnosis of iron-deficiency anemia: a meta-analysis. *Am J Clin Pathol* 138:642–649. <https://doi.org/10.1309/AJCP16NTXZLZFAIB>
- Levi M, Rosselli M, Simonetti M, Brignoli O, Cancian M, Masotti A, Pegoraro V, Cataldo N, Heiman F, Chelo M, Cricelli I, Cricelli C, Lapi F (2016) Epidemiology of iron deficiency anaemia in four European countries: a population-based study in primary care. *Eur J Haematol* 97:583–593. <https://doi.org/10.1111/ejh.12776>
- Lin X-M, Ji C-Y, Liu W-J, Long Z, Shen XY (2006) Levels of serum transferrin receptor and its response to Fe-supplement in Fe-deficient children. *Br J Nutr* 96:1134–1139. <https://doi.org/10.1017/BJN20061954>
- Looker A, Dallman P, Carroll M, Gunter EW, Johnson CL (1997) Prevalence of iron deficiency in the United States. *J Am Med Assoc* 277:973–976. <https://doi.org/10.1001/jama.277.12.973>
- Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L (2016) Iron deficiency anaemia. *Lancet* 387:907–916. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60865-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60865-0)
- López-Ruzafa E, Vázquez-López MA, Lendinez-Molinos F, Poveda-González J, Galera-Martínez R, Bonillo-Perales A, Martín-González M (2016) Reference values of reticulocyte hemoglobin content and their relation with other indicators of iron status

- in healthy children. *J Pediatr Hematol Oncol* 38:e207–e212. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000000639>
24. Lorenz L, Arand J, Büchner K, Wacker-Gussmann A, Peter A, Poets CF, Franz AR (2015) Reticulocyte haemoglobin content as a marker of iron deficiency. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 100:F198–F202. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-306076>
  25. Lozoff B, Castillo M, Clark KM, Smith JB, Sturza J (2014) Iron supplementation in infancy contributes to more adaptive behavior at 10 years of age. *J Nutr* 144:838–845. <https://doi.org/10.3945/jn.113.182048.adulthood>
  26. Malope BI, MacPhail AP, Alberts M, Hiss DC (2001) The ratio of serum transferrin receptor and serum ferritin in the diagnosis of iron status. *Br J Haematol* 115:84–89
  27. Markovic M, Majkic-Singh N, Ignjatovic S, Singh S (2007) Reticulocyte haemoglobin content vs. soluble transferrin receptor and ferritin index in iron deficiency anaemia accompanied with inflammation. *Int J Lab Hematol* 29:341–346. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2257.2006.00875.x>
  28. Mast AE, Blinder MA, Lu Q, Flax S, Dietzen DJ (2002) Clinical utility of the reticulocyte hemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 99:1489–1491. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.4.1489>
  29. Ooi CL, Lepage N, Nieuwenhuys E, Sharma AP, Filler G (2009) Pediatric reference intervals for soluble transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index. *World J Pediatr* 5:122–126. <https://doi.org/10.1007/s12519-009-0024-3>
  30. Phiri KS, Calis JCI, Siyasiya A, Bates I, Brabin B, van Hensbroek MB (2009) New cut-off values for ferritin and soluble transferrin receptor for the assessment of iron deficiency in children in a high infection pressure area. *J Clin Pathol* 62:1103–1106. <https://doi.org/10.1136/jcp.2009.066498>
  31. Powers JM, Daniel CL, McCavit TL, Buchanan GR (2016) Deficiencies in the management of iron deficiency anemia during childhood. *Pediatr Blood Cancer* 63:743–745. <https://doi.org/10.1002/pbc>
  32. Punnonen K, Irjala K, Rajamäki A (1997) Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 89:1052–1057
  33. Skikne B, Flowers C, Cook J (1990) Serum transferrin receptor. A quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 75:1870–1876
  34. Skikne BS, Punnonen K, Caldron PH, Bennett MT, Rehu M, Gasior GH, Chamberlin JS, Sullivan LA, Bray KR, Southwick PC (2011) Improved differential diagnosis of anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: a prospective multicenter evaluation of soluble transferrin receptor and the sTfR/log ferritin index. *Am J Hematol* 86:923–927. <https://doi.org/10.1002/ajh.22108>
  35. Speckaert MM, Speckaert R, Delanghe J (2011) Biological and clinical aspects of soluble transferrin receptor. *Crit Rev Clin Lab Sci* 47:213–228
  36. Subramaniam G, Girish M (2015) Iron deficiency anemia in children. *Indian J Pediatr* 82:558–564. <https://doi.org/10.1007/s12098-014-1643-9>
  37. Suominen P, Virtanen A, Lehtonen-Veromaa M, Heinonen OJ, Salmi TT, Alanen M, Möttönen T, Rajamäki A, Irjala K (2001) Regression-based reference limits for serum transferrin receptor in children 6 months to 16 years of age. *Clin Chem* 47:935–937
  38. Thomas C, Thomas L (2002) Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem* 48:1066–1076
  39. Thomas C, Kirschbaum A, Boehm D, Thomas L (2006) The diagnostic plot. A concept for identifying different states of iron deficiency and monitoring the response to epoetin therapy. *Med Oncol* 23:23–36
  40. Thomas DW, Hinchliffe RF, Briggs C, Macdougall IC, Littlewood T, Cavill I, British Committee for Standards in Haematology (2013) Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. *Br J Haematol* 161:639–648. <https://doi.org/10.1111/bjh.12311>
  41. Thorpe SJ, Heath A, Sharp G, Cook J, Ellis R, Worwood M (2010) A WHO reference reagent for the serum transferrin receptor (sTfR): international collaborative study to evaluate a recombinant soluble transferrin receptor preparation. *Clin Chem Lab Med* 48:815–820. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.167>
  42. Uijterschout L, Domellöf M, Vloemans J, Vos R, Hudig C, Bubbers S, Verbruggen S, Veldhorst M, de Leeuw T, Teunisse PP, van Goudeover JB, Brus F (2014) The value of Ret-Hb and sTfR in the diagnosis of iron depletion in healthy, young children. *Eur J Clin Nutr* 68:882–886. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.70>
  43. Ullrich C, Wu A, Armsby C, Rieber S, Wingerter S, Brugnara C, Shapiro D, Bernstein H (2005) Screening healthy infants for iron deficiency using reticulocyte hemoglobin content. *JAMA* 294:924–930. <https://doi.org/10.1001/jama.294.8.924>
  44. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF (2013) Erythrocyte and reticulocyte indices in the assessment of erythropoiesis activity and iron availability. *Int J Lab Hematol* 35:144–149. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12013>
  45. Vázquez-López MA, Ibáñez-Alcalde M, Lendínez-Molinos F, Ruíz-Sánchez AM, Galera-Martínez R, García-García E, Parrón-Carreño T, Bonillo-Perales A (2015) Reference values of serum transferrin receptor and sTfR/log ferritin index in healthy adolescents. *J Pediatr Hematol Oncol* 37:274–280
  46. Vázquez-López MA, López-Ruzafa E, Lendínez-Molinos F, Ortiz-Pérez M, Ruiz-Tudela L, Martín-González M (2016) Reference values of serum transferrin receptor (sTfR) and sTfR / log ferritin index in healthy children. *Pediatr Hematol Oncol* 33:109–120. <https://doi.org/10.3109/08880018.2015.1138007>
  47. Vendt N, Talvik T, Leedo S et al (2009) The reference limits and cut-off value for serum soluble transferrin receptors for diagnosing iron deficiency in infants. *Int J Lab Hematol* 31:440–446. <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2008.01060.x>
  48. WHO (2015) The global prevalence of anaemia in 2011. In: *World Heal. Organ.* [http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/global\\_prevalence\\_anaemia\\_2011/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/global_prevalence_anaemia_2011/en/). Accessed 9 Jan 2018
  49. WHO/CDC (2007) Assessing the iron status of populations. [http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia\\_iron\\_deficiency/9789241596107/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/9789241596107/en/). Accessed 9 Jan 2018



# IVd. Prevalencia de déficit de hierro y factores relacionados en adolescentes españoles

---

## RESUMEN

La anemia ferropénica continúa siendo una de las causas más importantes de años vividos con discapacidad en el mundo en niños y adolescentes. La valoración del déficit de hierro depende tradicionalmente de parámetros de laboratorio que pueden estar influidos por estados de inflamación sistémica, incluida la obesidad, que hoy en día es frecuente en la población adolescente de los países industrializados. Este estudio establece la prevalencia de ferropenia y sus factores relacionados en adolescentes, mediante el uso del RsTf y el CHr, para evitar este efecto confusor que puede condicionar la utilización de los parámetros clásicos. Se ha llevado a cabo un estudio transversal en una muestra representativa de la población de adolescentes de Almería (España), constituida por 405 sujetos con edades comprendidas entre los 12 y los 16 años. La prevalencia de ferropenia fue del 1.3%, mientras que la de anemia ferropénica fue de 1.2%. El análisis mediante regresión logística multivariante mostró que el ser parte de una familia inmigrante, una dieta pobre en hierro, el consumo de carne menos de 4 veces a la semana y el de pescado menos de 2 veces semanales, son factores de riesgo independientes para presentar déficit de hierro.

**Conclusiones.** Este estudio proporciona una estimación de la prevalencia de ferropenia en adolescentes sanos españoles del 13.3%, basada en una muestra amplia y representativa de los adolescentes almerienses, y evita posibles factores de confusión mediante el uso de nuevos parámetros del hierro.

## PUBLICACION 4

# Prevalence of iron deficiency and related factors in Spanish adolescents

**Autores.** María Mercedes Ibáñez Alcalde, María Ángeles Vázquez López, Encarnación López-Ruzafa, Francisco Javier Lendínez Molinos, Antonio Bonillo Perales y Tesifón Parrón Carreño.

**Referencia bibliográfica.** *Eur J Pediatr* 2020; 179 (10): 1587-95.  
PMID: 32342190  
DOI: 10.1007/s00431-020-03651-2.

**Informe del factor de impacto.** En el año 2020 la revista científica *European Journal of Pediatrics* presentaba un *Journal Impact Factor* (JIF) de 3.183 en el *Journal of Citation Reports*, lo cual la sitúa en el primer cuartil (Q1), en posición 28/129, para la categoría de Pediatría.



# Prevalence of iron deficiency and related factors in Spanish adolescents

María Mercedes Ibáñez-Alcalde<sup>1</sup> · María Ángeles Vázquez-López<sup>2</sup> · Encarnación López-Ruzafa<sup>2</sup> · Francisco Javier Lendínez-Molinos<sup>2</sup> · Antonio Bonillo-Perales<sup>2</sup> · Tesifón Parrón-Carreño<sup>3</sup>

Received: 7 October 2019 / Revised: 12 April 2020 / Accepted: 15 April 2020 / Published online: 28 April 2020  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

## Abstract

Iron deficiency anaemia continues to be the world's most important cause of years lived with disability in children and adolescents. Assessment of iron deficiency traditionally depended on laboratory parameters that may be modified by inflammation states, including obesity, which is nowadays a current condition in adolescent population of high-income countries. The present study ascertains the prevalence of iron deficiency and its related factors in adolescents, using the serum transferrin receptor and the reticulocyte haemoglobin content, in order to avoid this confusing effect of classical parameters. A cross-sectional study was conducted on a population-based representative sample for teenagers in Almería (Spain), of 405 subjects aged 12 to 16 years. Iron deficiency was present in 13.3% of adolescents, but iron deficiency anaemia only in 1.2%. Multivariate logistic regression analyses showed that being part of an immigrant family, a low iron bioavailability diet, meat consumption below four times a week and fish consumption below twice a week, were independent risk factors for iron deficiency.

**Conclusion:** This study provides an estimate iron deficiency prevalence of 13.3% in Spanish healthy adolescents, avoiding potential confounding factors through the use of new iron status parameters, based on a wide representative sample of adolescents from the city of Almería.

## What is Known:

- For children and adolescents, iron deficiency anaemia continues to be the world's most important cause of years lived with disability.
- Assessment of iron deficiency has traditionally depended on laboratory parameters that may be modified by inflammatory states, including obesity.

## What is New:

- Iron deficiency prevalence and their related factors were analysed in Spanish adolescents, avoiding potential confounding factors through the use of sTfR and CHR.
- Being part of an immigrant family and consuming a low iron bioavailability diet are independent risk factors for iron deficiency.

**Keywords** Iron deficiency · Adolescence · Obesity · Serum transferrin receptor · Reticulocyte haemoglobin content

## Abbreviations

BMI Body mass index

CHR Reticulocyte haemoglobin content

CI Confidence intervals

Communicated by Gregorio Paolo Milani

✉ María Mercedes Ibáñez-Alcalde  
mmibanezalcalde@gmail.com

María Ángeles Vázquez-López  
mavazquezl59@gmail.com

Encarnación López-Ruzafa  
e.lopezruzafa@gmail.com

Francisco Javier Lendínez-Molinos  
lendimol@gmail.com

Antonio Bonillo-Perales  
antonio.bonillo.sspa@juntadeandalucia.es

Tesifón Parrón-Carreño  
tesifon.parron@juntadeandalucia.es

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Poniente Hospital, Avenida Almerimar s/n., El Ejido, 04700 Almería, Spain

<sup>2</sup> Department of Pediatrics, Torrecárdenas Hospital, Paraje Torrecárdenas s/n., 04009 Almería, Spain

<sup>3</sup> Health Delegation of Almería, University of Almería, Carretera de Ronda 101, 04071 Almería, Spain

CRP	C-reactive protein
EP	Erythrocyte protoporphyrin
ID	Iron deficiency
IDA	Iron deficiency anaemia
IDE	Iron-deficient erythropoiesis
ISD	Iron store depletion
MCV	Mean corpuscular volume
OR	Odds ratio
SD	Standard deviation
sEPO	Serum erythropoietin
sTfR	Serum transferrin receptor
TS	Transferrin saturation

## Introduction

Iron deficiency anaemia (IDA) continues to be a major cause of years lived with disability among children and adolescents throughout the world [1]. According to the World Health Organisation (WHO), globally, anaemia affects 1.62 billion people, which corresponds to 24.8% of the population (95% CI, 22.9–26.7%) [2]. In adolescents, it may lead to cognitive dysfunction [3] and physical performance impairment [4], even when iron deficiency (ID) has not progressed enough to cause anaemia [4–6]. Actually, ID with or without anaemia may lead to a broad spectrum of signs and symptoms [7]. Adolescence is considered a period of increased risk of ID due to accelerated growth, rise of blood volume, menstrual blood loss in girls, greater muscle mass in boys and unbalanced diets [8–10]. A study published in 2013 showed that meat is the main source of haem iron in European adolescents, and adolescent girls may be a group at risk for iron deficiency, as only the 13.7% met the recommendation for bio-available iron intake [11]. A revision of food habits in adolescents from Nordic countries found an irregular meal pattern and iron intake below the Nordic recommendations in girls aged 13–18 [12], and a study in Flemish adolescents found that a proportion of 38.8% of the boys and 99.5% of the girls had a mean total iron intake below the Belgian Recommended Dietary Allowance [13]. Recently, trends in food habits of adolescents were evaluated in Nordic countries, and the majority of Nordic adolescents were far from meeting national dietary recommendations despite positive dietary trends were documented [14].

In consequence, the prevalence of ID and IDA in this population is high even in industrialised countries [15–20]. The HELENA study found ID in 4.7% of European adolescents [15]. In the USA, a population-based study estimated that ID was present in 9% of female and 5% of male adolescents [16]. In Spain, prevalence of IDA range between 2.7 and 25.1% depending on age and sex, with maximum figures in preschool-aged children and the elderly [2]. In an adolescent

population in northern Spain, IDA was estimated in 0.4% for boys and 2.3% in girls [21].

Assessment of ID and diagnosis of IDA has traditionally depended on laboratory measurements of ferritin, haemoglobin, transferrin saturation (TS), erythrocyte protoporphyrin (EP) and mean corpuscular volume (MCV). However, these parameters may be modified by several conditions, including inflammatory states. Today, obesity is a leading cause of chronic inflammation, and it is currently prevalent among adolescent populations in high-income countries. Furthermore, it is known that an excess of body fat mass may interfere with iron homeostasis, which aggravates the risk of ID [22, 23]. In this context, the use of analytic parameters which were not influenced by proinflammatory states could increase the sensitivity of ID assessment [24], and serum transferrin receptor (sTfR) and reticulocyte haemoglobin content (CHr) were used. Recently, reference values for these parameters in healthy adolescents were established, and on this basis, new diagnostic criteria for ID were proposed [25–27].

To date, few studies have been undertaken to analyse ID prevalence in adolescents taking into account obesity and its interference with erythropoiesis [28–30]. The aim of the present study is to determine the prevalence of ID and IDA in a healthy adolescent population in Spain, by reference to levels of sTfR and CHr. This approach is not influenced by proinflammatory states and therefore is expected to improve the diagnostic accuracy obtained. In addition, socioeconomic, dietary, cultural and related anthropometric factors have been analysed.

## Methods

### Subjects

This cross-sectional study was conducted on a representative population sample in the city of Almería (Spain), in 2008. The sample size was calculated with respect to 9823 adolescents aged 12 to 16 years attending the 38 public and private secondary schools in Almería. Assuming an ID prevalence of 10%, a 95% confidence interval and 4.5% precision, a total of 260 subjects were required. The estimated prevalence of obesity/overweight was 25% [31]. From the 38 schools, 6 were selected by the probability sampling method, and 24 classes throughout them. All students in these 24 classes were invited to participate. In total, 509 adolescents were selected, of whom 17% refused to participate, such that 422 subjects were finally included in the study group.

The criteria for exclusion were (a) subjects with a haematological or systemic disease that, in itself or as a result of its treatment, might affect the test results; (b) those with present or previous infectious or febrile disease or C-reactive protein

(CRP) value  $> 0.5$  mg/dl [32]; (c) those who had received oral iron therapy in the previous 3 months. These conditions excepting CRP values were declared by the parents or legal guardians.

In all cases, informed consent was obtained from the adolescents' parents or legal guardians, as well as from the participants themselves. The study was approved by the Ethics and Research Committee of Torrecárdenas Hospital (CEIC: 28/2006).

## Survey

The survey was addressed to the adolescents' parents or guardians, either in person or by telephone, as described in a previous study [33].

## Anthropometric measurements and pubertal status

All subjects underwent a complete physical examination, and the following data were collected: (A) Pubertal stage (Tanner stage) [34], according to which the subjects were classified as prepubertal (Tanner 1) or pubertal (Tanner 2–5). Tanner stage was determined visually based on breast development, penis and scrotum growth and pubic hair distribution. (B) Anthropometry: weight in kilogrammes, with the subject wearing light clothing, barefoot, using a 'Soehnle Professional' digital scale with an accuracy of 100 g, recording the average of two measurements; height in metres, using a standard Asimed measure with an accuracy of 1 mm, with the subject barefoot and standing upright, recording the average of two measurements; the body mass index (BMI) was calculated using the formula  $\text{weight (kg)}/\text{height}^2$  (metres) with a Z-score of the specific BMI standard deviation appropriate for age and sex, using national reference population data [35]. Overweight and obesity were defined using the criteria proposed by the International Obesity Task Force [36]. For the purposes of the present study, both terms are included in the expression 'excessive body mass'.

## Questionnaire

The parents or guardians were requested to complete a form regarding their own origin and employment situation and their children's education level and dietary habits, using a semi-quantitative food frequency questionnaire, the *Encuesta Andaluza de Salud Pública 2003* for children and adolescents [37]. The socioeconomic level was classified into three categories based on employment situation (Class 1: High-income; Class 2: Middle-income; Class 3: Low-income), adapted from the European Socioeconomic Classification [38]. A low iron bioavailability diet was defined as one with a consumption of meat or fish less than twice a week and vegetables or fruits less than twice a week [39, 40]. Excessive consumption of cow

milk and dairy products was defined as  $> 600$  ml/day of milk or  $> 3$  servings/day of other dairy products [39, 40].

## Parameters measured

The biochemical analysis was based on a sample of 6 ml of venous blood extracted from fasting subjects between 8 and 11 am. The following parameters were measured: haemoglobin, red cell indices, CHr and reticulocytes in ADVIA-120 counter; serum ferritin and CRP determined by the immunoturbidimetric method using 'Tina-quant Ferritin' and CRPLX kits obtained from Roche Diagnostics GmbH (Boehringer Mannheim); sTfR, determined by immunoturbidimetric assay using the Quantex sTfR kit (Biokit SA, Barcelona); and serum erythropoietin (sEPO) determined by enzyme immunoassay using the Quantikine IVD-Human Erythropoietin kit (R&D Systems, Minneapolis). The sTfR-F index was calculated as sTfR/log ferritin.

Iron status was classified as normal, ID without anaemia or IDA. ID included iron store depletion (ISD), defined as serum ferritin  $< 12$  ng/ml [41] or iron-deficient erythropoiesis (IDE), defined as sTfR-F index  $> 1.4$  for girls and  $> 1.5$  for boys [24], or  $\geq 2$  parameters from ferritin  $< 12$  ng/ml, sTfR  $> 1.75$  mg/l for girls and  $> 1.95$  mg/l for boys [24] or CHr  $< 28.5$  pg [26]. IDA was defined as IDE and haemoglobin  $< 11.5$  g/dl for girls and  $< 12$  g/dl for boys [42]. The cut-off values for sTfR, sTfR-F index and CHr were also obtained from this epidemiological study [27]. In this work, authors diagnosed ID with the classical definition: ISD as serum ferritin (ng/ml)  $< 12$ ; IDE as  $\geq 2$  parameters altered: serum ferritin (as indicated above), TS (%)  $< 14$  or EP ( $\mu\text{g/dl}$  erythrocytes)  $> 70$ ; and IDA as IDE plus haemoglobin (g/dl)  $< 11.5$  in girls and  $< 12$  in boys [27].

In cases of isolated microcytosis, thalassaemia traits ( $\alpha$  or  $\beta$ ) were excluded.  $\beta$  thalassaemia traits were diagnosed by the haemoglobin electrophoresis test, and  $\alpha$  thalassaemia traits were diagnosed genetically.

## Statistical analysis

SPSS 21.0 software for Windows and Epidat 4.0 for the sample calculation were used. Kolmogorov-Smirnov test was applied to verify the normality of distributions. Non-normally distributed variables were log transformed to achieve normality before analysis. Student's *t* test was applied to compare the means, and the ANOVA test was used when more than two groups were compared. When the results were significant, differences between groups were identified using the Bonferroni post hoc test.

The prevalence of ID was established globally and according to the individual and dietary characteristics of the subjects and the socioeconomic characteristics of their parents or guardians. Corresponding odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated to determine the

association between ID and other variables. For the quantitative variables, mean values were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Multivariate logistic regression analyses were performed to identify factors independently related to ID, with presence of ID as the dependent variable. Akaike's information criterion was used to select the best model that fit the data. In all cases,  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

The final study group was composed of 405 healthy adolescents aged 12–16 years. Of the initial 422, 4 were excluded because their CRP level exceeded the limit previously established in 0.5 mg/dl, 9 because the analytical information necessary was incomplete and 4 due to  $\alpha$  or  $\beta$  thalassemia traits.

Table 1 summarises the sociodemographic and socioeconomic characteristics of the sample. The median age of the adolescents was 14 years. The median BMI Z-score was  $-0.01 \text{ kg/m}^2$  ( $-1.63$ – $6.81$ ). The median values of the haematological parameters are summarised in Table 2.

ID was present in 13.3% of the adolescents, but IDA in only 1.2%. ID prevalence by gender and age is summarised in Table 3. It was higher in girls than in boys, but the difference was not statistically significant (OR, 0.74 (95% CI, 0.42–1.31);  $p = 0.297$ ). The lowest ID prevalence was found in the group aged 16 years, while those aged 14–15 years presented the highest prevalence—5.8 vs. 18.2% (OR, 3.63 (95% CI, 1.07–12.34);  $p = 0.039$ ). In this age group, ID was especially common in the girls (22.2%).

Detailed prevalence figures for ID and IDA according to the sociodemographic, socioeconomic, anthropometric and dietary characteristics considered are shown in Table 4. Interestingly, the adolescents with excessive body mass did not present a higher prevalence of ID; neither were there significant differences in this respect between prepubertal and pubertal adolescents. In those from an immigrant family, ID prevalence was higher, but the difference did not reach statistical significance in the bivariate analysis (12.0 vs. 19.4%;  $p = 0.090$ ). Neither the parents' educational background nor their socioeconomic level, considered in isolation, influenced ID prevalence, although the parents from immigrant families presented a lower rate of secondary or university education (23.5 vs. 45.7%;  $p = 0.003$ ).

The subjects who consumed a low iron bioavailability diet were twice as likely to present ID. The risk was also higher among those who consumed excessive quantities of cow milk and dairy products, but the difference was not statistically significant. According to the bivariate analysis, there were no differences between immigrant and Spanish families regarding low iron bioavailability diets (38.8 vs. 36.0%;  $p = 0.709$ ), although the latter were more likely to consume

**Table 1** Characteristics of the study population

Variable	Total ( $n = 405$ )		
Sex			
Female	43.5		
Male	56.5		
Age (years)			
12–13	41.0		
14–15	46.2		
16	12.8		
Overweighed	29.1		
Obese	8.1		
Ethnicity			
Spanish	82.4		
Latin American	5.0		
Maghribian	11.4		
Eastern European	1.0		
Other	0.2		
Pubertal status			
Tanner 1	7.4		
Tanner 2–5	92.6		
Parental education level			
No education/primary	57.5		
Secondary/university	42.5		
Parental socioeconomic level			
Class 1 (high-income)	13.7		
Class 2 (middle-income)	42.0		
Class 3 (low-income)	44.3		
Low iron bioavailability diet	36.4		
Milk and dairy products abuse	37.0		
Food consumption	< Twice/week	2–4 times/week	5–7 times/week
Fruits	27.2	28.1	44.7
Vegetables	30.3	41.9	27.8
Meat	5.0	60.0	35.0
Fish	37.6	58.5	3.9
Eggs	24.6	71.2	4.2
Legumes	34.7	58.7	6.6

Data are expressed as percentage

excessive amounts of milk and dietary products (39.4 vs. 22.4%;  $p = 0.023$ ) and immigrant families more commonly had fish less than twice a week (52.1 vs. 36.0%;  $p = 0.033$ ).

The multivariate logistic regression analyses performed showed that coming from an immigrant family and consuming a low iron bioavailability diet, with meat less than four times a week and fish less than twice a week, were independent risk factors for ID (Table 5).

Using CHr and sTfR in the definition of ID, it was present in 13.3% of the adolescents and IDA in 1.2%. Using traditional parameters (TS and EP), 9.1% of the adolescents presented ID without anaemia and 1.2% presented IDA [27].

**Table 2** Haematological parameters measured in global group

Parameter	Median (minimum-maximum)	Subjects with abnormal values <i>n</i> (%)
Hb (g/dl)	13.7 (9.0–17.1)	5 (1.2)
MCV (fl)	80.2 (61.7–90.0)	37 (9.1)
Serum ferritin (ng/ml)	30 (3–113)	39 (9.6)
CHr (pg)	31.3 (22.4–35.5)	26 (6.4)
sTfR (mg/l)	1.35 (0.68–3.36)	49 (12.1)
sTfR-F index	0.91 (0.37–6.66)	46 (11.6)
sEPO (mU/l)	6.1 (1.7–45.2)	20 (5.0)

Abnormal values were defined as: Hb < 11.5 g/dl for girls and < 12 g/dl for boys; MCV < 76 fl; serum ferritin < 12 ng/ml; CHr < 28.5 pg; sTfR > 1.75 mg/dl for girls and > 1.95 mg/dl for boys; sTfR-F index > 1.4 for girls and > 1.5 for boys; sEPO > 20.4 mU/l

*Hb*, haemoglobin; *MCV*, mean corpuscular volume; *CHr*, reticulocyte haemoglobin content; *sTfR*, soluble transferrin receptor; *sTfR-F index*, sTfR/log ferritin ratio; *sEPO*, serum erythropoietin; *SD*, standard deviation; *95% CI*, 95% confidence interval

## Discussion

This study reveals an ID prevalence of 13.3% in healthy adolescents in Almería, Spain. This figure is slightly above that reported in previous studies conducted in Spain, such as that of Durà et al.'s who analysed an adolescent population in northern Spain and measured an ID prevalence of 8.6% in males and 12.6% in females [21]. However, this analysis was performed using the classical criteria of ferritin, TS and MCV. On the other hand, IDA was less frequent in males (0.4 vs. 3.2% in this study), although similar in females (2.3 vs. 2.7%). A collaborative study carried out in various European countries, the HELENA study, found an ISD prevalence of 17.6% in European adolescents from ten cities in nine countries, and IDE 4.7% (3.9% in males and 5.4% in females). IDA prevalence was very similar, with an overall level of 1.3% (vs. 1.2% in this study), 0.5% in males (vs. 0.4%) and 2.0% in females (vs. 2.3%) [15]. Studies in northern Europe [18, 19] have found a greater prevalence of ID in adolescents, but these were conducted in the 1990s, and the ferritin cut-off levels used were higher. A study conducted in German adolescents found similar red blood indices, but ID prevalence was not specified [43]. In the USA, ID is estimated to be present in 5% of male adolescents and 9% of females, with an IDA prevalence of 2% in girls aged 12–15 years [16]. To our knowledge, no other population-based surveys of this type have been

conducted in industrialised countries, despite the fact that IDA in adolescents is a major public health problem [44–46].

Using traditional parameters in the definition of ID, 9.1% of the adolescents presented ID without anaemia and 1.2% presented IDA (vs. 12.1 and 1.2% respectively, using sTfR and CHr). This could indicate that the former definition underestimates ID, so these new parameters could improve the accuracy of diagnosis in this population.

Most studies have observed a higher prevalence of ID and IDA in adolescent females than males, and this was no exception in this regard. The difference is probably due to the onset of menstrual bleeding in girls [47]. The majority of the subjects in the study had started pubertal development, and the subjects aged 14–15 years, especially the girls, presented the highest rates of ID and IDA. Similar findings have been reported in an earlier study, of Spanish schoolchildren aged 1–18 years, in which the adolescents aged 13–15 years had the highest prevalence of ID and IDA [48]. The authors surmised this was probably due to the growth spurt in this age bracket and to the onset of menstruation.

In this study sample, the adolescents with overweight or obesity presented no greater risk of ID, which is in line with previous reports [22, 23, 49]. It has been postulated that overweight and obesity induce an inflammation state that provokes an increase in the synthesis of hepcidin, an iron-regulatory hormone which decreases iron absorption and release from

**Table 3** Prevalence of ID and IDA according to gender and age

Iron status	Total <i>n</i> (%)	Males <i>n</i> (%)	Females <i>n</i> (%)	12–13 years <i>n</i> (%)	14–15 years <i>n</i> (%)	16 years <i>n</i> (%)
Normal	351 (86.7)	202 (88.2)	149 (84.7)	149 (89.8)	153 (81.8)	49 (94.02)
ID	49 (12.1)	26 (11.4)	26 (13.1)	15 (9.0)	31 (16.6)	3 (5.8)
IDA	5 (1.2)	1 (0.4)	4 (2.3)	2 (1.2)	3 (1.6)	0 (0.0)

*ID*, iron deficiency; *IDA*, iron deficiency anaemia

**Table 4** Prevalence of ID and IDA according to sociodemographic, socioeconomic, anthropometric and dietary adolescents' characteristics

Variables	Normal <i>n</i> (%)	ID and IDA <i>n</i> (%)	OR (95% CI)	<i>p</i> value
<b>Sex</b>				
Female	149 (84.7%)	27 (15.3%)	0.74 (0.42–1.31)	0.300
Male	202 (88.2%)	27 (11.8%)	1	
<b>Age</b>				
12–13 years	149 (89.8%)	17 (10.2%)	1.86 (0.52–6.63)	0.336
14–15 years	153 (81.8%)	34 (18.2%)	3.63 (1.07–12.33)	<b>0.039</b>
16 years	49 (94.2%)	3 (5.8%)	1	
<b>Origin</b>				
Spanish	293 (88.0%)	40 (12.0%)	1	0.093
Immigrant	58 (80.6%)	14 (19.4%)	1.77 (0.90–3.46)	
<b>Excessive body mass</b>				
No	246 (85.4%)	42 (14.6%)	1	
Yes	105 (89.7%)	12 (10.3%)	0.67 (0.34–1.32)	0.246
<b>Pubertal status</b>				
Tanner 1	28 (93.3%)	2 (6.7%)	1	
Tanner 2–5	321 (86.1%)	52 (13.9%)	2.27 (0.53–9.81)	0.403
<b>Parental education level</b>				
No education/primary	179 (86.1%)	29 (13.9%)	1.31 (0.69–2.47)	0.412
Secondary/university	137 (89.0%)	17 (11.0%)	1	
<b>Socioeconomic level</b>				
Class 1 (high-income)	48 (88.9%)	6 (11.1%)	1	
Class 2 (middle-income)	143 (86.7%)	22 (13.3%)	1.23 (0.47–3.22)	0.672
Class 3 (low-income)	151 (87.0%)	23 (13.0%)	1.21 (0.47–3.17)	0.685
<b>Low iron bioavailability diet</b>				
No	205 (89.5%)	24 (10.5%)	1	
Yes	104 (85.8%)	27 (20.6%)	2.12 (1.22–4.03)	<b>0.008</b>
<b>Milk and dairy abuse</b>				
No	197 (87.2%)	29 (12.8%)	1	
Yes	111 (83.5%)	22 (16.5%)	1.35 (0.74–2.46)	0.331
<b>Fruit intake</b>				
< Twice a week	83 (85.6%)	14 (14.4%)	1.00 (0.49–2.05)	0.994
2–4 days a week	87 (87.0%)	13 (13.0%)	0.88 (0.43–1.84)	0.740
5–7 days a week	136 (85.5%)	23 (14.5%)	1	
<b>Vegetables intake</b>				
< Twice a week	91 (84.3%)	17 (15.7%)	1.05 (0.49–2.23)	0.907
2–4 days a week	131 (87.9%)	18 (12.1%)	0.77 (0.37–1.61)	0.486
5–7 days a week	84 (84.8%)	15 (15.2%)	1	
<b>Meat intake</b>				
< Twice a week	15 (83.3%)	3 (16.7%)	1.05 (0.28–3.97)	0.943
2–4 days a week	187 (87.4%)	27 (12.6%)	0.76 (0.41–1.42)	0.385
5–7 days a week	105 (84.0%)	20 (16.0%)	1	
<b>Fish intake</b>				
< Twice a week	118 (86.8%)	18 (13.2%)	1.98 (0.24–16.09)	0.522
2–4 days a week	175 (85.0%)	31 (15.0%)	2.30 (0.29–18.24)	0.430
5–7 days a week	13 (92.9%)	1 (7.1%)	1	
<b>Pulses intake</b>				
< Twice a week	77 (81.9%)	17 (18.1%)	1.77 (0.37–8.41)	0.475
2–4 days a week	139 (87.4%)	20 (12.6%)	1.15 (0.25–5.39)	0.858
5–7 days a week	16 (88.9%)	2 (11.1%)	1	



**Table 4** (continued)

Variables	Normal <i>n</i> (%)	ID and IDA <i>n</i> (%)	OR (95% CI)	<i>p</i> value
Eggs intake				
< Twice a week	76 (86.4%)	12 (13.6%)	2.21 (0.26–18.38)	0.463
2–4 days a week	216 (85.5%)	38 (15.0%)	2.46 (0.32–19.28)	0.391
5–7 days a week	14 (93.3%)	1 (6.7%)	1	

ID, iron deficiency; IDA, iron deficiency anaemia

storage tissues through its receptor ferroportin [50]. If this were so, obesity could induce ID. However, relationship between overweight and ID was not observed when iron parameters not influenced by inflammation were considered.

The subjects who came from an immigrant family presented a higher prevalence of ID. Although neither the education background nor the socioeconomic level of the parents, in isolation, was relevant to ID/IDA, they may be related to the relationship between immigration and ID. Most of the immigrants in this sample originated from the Maghreb and South America, where a much higher prevalence of ID in children and adolescents has been reported [44, 51]. In this case, ID has been explicitly linked to the mother’s education, although not to the family income [52].

A low iron bioavailability diet and an inadequate consumption of meat and fish were both found to be related to ID, which corroborates previous research findings [53]. Meat consumption four times a week or less has been shown as an independent risk factor for ID (in multivariate logistic regression analyses, meat consumption less than twice a week is not significant probably due to the low number of adolescents that consume little meat). This has been explained as occurring because meat and fish haem iron is highly available while non-haem iron absorption is much more variable and is significantly affected by other components of the diet [54, 55]. A study published in 2013 showed that meat is the main source of haem iron in European adolescents [11]. In another study conducted in Spain, higher iron intakes were observed in adolescents and were highest for non-haem iron [56].

The main limitation of the present study concerns the definition of ID used in the selection criteria. The gold standard is the depletion of iron in bone marrow, but it is not feasible to perform this analysis in population studies due to its invasiveness. Although ID diagnosis is always subject to controversy in this context, a combination of internationally accepted diagnostic measures, using cut-off values derived from the same population have been employed. The amount and type of physical activity that the adolescents performed was not included in the analyses, and this factor might impact on iron requirements and metabolism, but this information was not available to the researchers. The use of semi-quantitative questionnaires of food consumption frequencies to evaluate

intake could be another limitation, as it is a retrospective collection method and does not allow quantification of the amounts consumed. Notwithstanding, these questionnaires have been widely used and have proved their validity in the evaluation of dietary habits. Representativeness for the rest of the country could be affected by regional diets, even though in Spain the main diet is Mediterranean, and by percentage and origin of the immigrant population.

On the other hand, in this study, new parameters with high sensitivity and specificity are used to define ID, and a multivariate analysis was performed to optimise the validity of the results obtained.

In conclusion, this study estimates ID and IDA prevalence and their related factors in healthy Spanish adolescents, based on a wide representative sample. Potential confounding factors are avoided through the use of novel, meaningful iron status parameters. Adolescents who come from an immigrant family are at particular risk of ID, and so particular attention should be paid to this population.

**Table 5** Multivariate logistic regression analyses: factors associated to ID in adolescents

Independent variables	Beta	OR	95% CI	<i>p</i> value
Age				
12–13 years		1		
14–15 years	1.16	3.05	0.85–10.91	0.087
16 years	0.44	1.56	0.41–5.90	0.51
Immigrant family	1.27	3.54	1.52–8.23	0.003
Low iron bioavailability diet	2.47	11.81	3.75–37.22	0.0001
Meat consumption				
5–7 times a week		1		
2–4 times a week	2.02	7.55	1.33–42.98	0.023
< Twice a week	0.23	1.25	0.32–4.97	0.749
Fish consumption				
5–7 times a week		1		
2–4 times a week	0.40	1.49	0.16–13.79	0.728
< Twice a week	1.19	3.29	1.51–7.21	0.003

Dependent variable: presence of iron deficiency

ID, iron deficiency; OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval

**Authors' contributions** MMIA contributed to analysis and interpretation of the data and writing of the manuscript; MAVL contributed to conception and design, analysis and interpretation of the data and writing of the manuscript; ELR contributed to the acquisition of data and drafting of the manuscript; FJLM, ABP and TPC critically revised the manuscript and contributed with their final suggestions. All the authors approved the final manuscript for publication.

**Funding information** There is no funding source.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** The Ethics and Research Committee of Torrecárdenas Hospital (Almería) approved the study. All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or National Research Committee and with the 1964 Helsinki Declaration, and its later amendments or comparable ethical standards.

**Informed consent** Informed written consent was obtained from parents or legal guardians as well as from the participants themselves if they were > 12 years.

## References

- Global Burden of Disease Child and Adolescent Health Collaboration, Kassebaum N, Kyu HH, Zoeckler L, Olsen HE, Thomas K, Pinho C et al (2017) Child and adolescent health from 1990 to 2015: findings from the global burden of diseases, injuries, and risk factors 2015 study. *JAMA Pediatr* 171(6):573–592
- World Health Organization (2019) Worldwide prevalence on anaemia 1993–2005. Available at: <https://www.who.int/vmnis/anaemia/prevalence/en/>. Accessed on December 15th 2019
- More S, Shivkumar VB, Gangane N, Shende S (2013) Effects of iron deficiency on cognitive function in school going adolescent females in rural area of Central India. *Anemia* 2013:819136
- Sharma R, Stanek JR, Koch TL, Grooms L, O'Brien SH (2016) Intravenous iron therapy in non-anemic iron-deficient menstruating adolescent females with fatigue. *Am J Hematol* 91(10):973–977
- Halterman JS, Kaczorowski JM, Aligne CA, Auinger P, Szilagyi PG (2001) Iron deficiency and cognitive achievement among school-aged children and adolescents in the United States. *Pediatrics* 107(6):1381–1386
- Jáuregui-Lobera I (2014) Iron deficiency and cognitive functions. *Neuropsychiatr Dis Treat* 10:2087–2095
- Mattiello V, Schmutz M, Hengartner H, von der Weid N, Renella R, SPOG Pediatric Hematology Working Group (2020) Diagnosis and management of iron deficiency in children with or without anemia: consensus recommendations of the SPOG Pediatric Hematology Working Group. *Eur J Pediatr* 179(4):527–545
- Mesías M, Seiquer I, Navarro MP (2013) Iron nutrition in adolescence. *Crit Rev Food Sci Nutr* 53(11):1226–1237
- Castro De Andrade Cairo R, Rodrigues Silva L, Carneiro Bustani N, Ferreira Marques CD (2014) Iron deficiency anemia in adolescents; a literature review. *Nutr Hosp* 29(6):1240–1249
- Hoppe M, Sjöberg A, Hallberg L, Hulthén L (2008) Iron status in Swedish teenage girls: impact of low dietary iron bioavailability. *Nutrition* 24(7–8):638–645
- Vandevijvere S, Michels N, Verstraete S, Ferrari M, Leclercq C, Cuenca-García M, Grammatikaki E, Manios Y, Gottrand F, Valtueña J, Kersting M, Gonzalez-Gross M, Moreno L, Mouratidou T, Stevens K, Meirhaeghe A, Dallongeville J, Sjöström M, Hallstrom L, Kafatos A, Widhalm K, Molnar D, De Henauw S, Huybrechts I, HELENA Study Group (2013) Intake and dietary sources of haem and non-haem iron among European adolescents and their association with iron status and different lifestyle and socio-economic factors. *Eur J Clin Nutr* 67:765–772
- Samuelson G (2000) Dietary habits and nutritional status in adolescents over Europe. An overview of current studies in the Nordic countries. *Eur J Clin Nutr* 54(Suppl 1):S21–S28
- Pynaert I, Matthys C, Bellemans M, De Maeyer M, De Henauw S, De Backer G (2005) Iron intake and dietary sources of iron in Flemish adolescents. *Eur J Clin Nutr* 59(7):826–834
- Fismen AS, Smith OR, Torsheim T, Rasmussen M, Pedersen Pagh T, Augustine L, Ojala K, Samdal O (2016) Trends in food habits and their relation to socioeconomic status among Nordic adolescents 2001/2002–2009/2010. *PLoS One* 11(2):e0148541
- Ferrari M, Mistura L, Patterson E, Sjöström M, Díaz LE, Stehle P, Gonzalez-Gross M, Kersting M, Widhalm K, Molnar D, Gottrand F, De Henauw S, Manios Y, Kafatos A, Moreno LA, Leclercq C, HELENA Study Group (2011) Evaluation of iron status in European adolescents through biochemical iron indicators: the HELENA Study. *Eur J Clin Nutr* 65(3):340–349
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2002) Iron deficiency—United States, 1999–2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51(40):897–899
- Gupta PM, Hamner HC, Suchdev PS, Flores-Ayala R, Mei Z (2017) Iron status of toddlers, nonpregnant females, and pregnant females in the United States. *Am J Clin Nutr* 106(Suppl 6):1640S–1646S
- Hallberg L, Hultén L, Lindstedt G, Lundberg PA, Mark A, Puren J, Svanberg B, Swolin B (1993) Prevalence of iron deficiency in Swedish adolescents. *Pediatr Res* 34(5):680–687
- Eskeland B, Hunskaar S (1999) Anaemia and iron deficiency screening in adolescence: a pilot study of iron stores and haemoglobin response to iron treatment in a population of 14–15-year-olds in Norway. *Acta Paediatr* 88(8):815–821
- Milman N, Taylor CL, Merkel J, Brannon PM (2017) Iron status in pregnant women and women of reproductive age in Europe. *Am J Clin Nutr* 106(Suppl 6):1655S–1662S
- Durá Travé T, Aguirre Abad P, Mauleón Rosquil C, Oteiza Flores MS, Díaz Velaz L (2002) Lack of iron in adolescents aged 10 to 14. *Aten Primaria* 29(2):72–77
- Hutchinson C (2016) A review on iron studies in overweight and obese children and adolescents: a double burden in the young? *Eur J Nutr* 55(7):2179–2197
- Nead KG, Halterman JS, Kaczorowski JM, Auinger P, Weitzman M (2004) Overweight children and adolescents: a risk group for iron deficiency. *Pediatrics* 114(1):104–108
- Marković M, Majkić-Singh N, Ignjatović S, Singh S (2007) Reticulocyte haemoglobin content vs. soluble transferrin receptor and ferritin index in iron deficiency anaemia accompanied with inflammation. *Int J Lab Hematol* 29(5):341–346
- Vázquez-López MA, Ibáñez-Alcalde M, Lendínez-Molinos F, Ruiz-Sánchez AM, Galera-Martínez R, García-García E, Parrón-Carreño T, Bonillo-Perales A (2015) Reference values of serum transferrin receptor and sTfR/log ferritin index in healthy adolescents. *J Pediatr Hematol Oncol* 37(4):274–280
- Ibáñez-Alcalde MM, Vázquez-López MÁ, Ruiz-Sánchez AM, Lendínez-Molinos FJ, Galera-Martínez R, Bonillo-Perales A, Parrón-Carreño T (2018) Reference values of reticulocyte hemoglobin content in healthy adolescents. *J Pediatr Hematol Oncol* 40(4):298–303

27. Vázquez-López MA, López-Ruzafa E, Ibáñez-Alcalde MM, Martín-González M, Bonillo-Perales A, Lendínez-Molinos F (2019) The usefulness of reticulocyte hemoglobin content, serum transferrin receptor and the sTfR-ferritin index to discriminate iron deficiency in healthy children aged 1-16 years. *Eur J Pediatr* 178(1):41–49
28. Zhao L, Zhang X, Shen Y, Fang X, Wang Y, Wang F (2015) Obesity and iron deficiency: a quantitative meta-analysis. *Obes Rev* 16(12):1081–1093
29. Ferrari M, Cuenca-García M, Valtueña J, Moreno LA, Censi L, González-Gross M, Androutsos O, Gilbert CC, Huybrechts I, Dallongeville J, Sjöström M, Molnar D, De Henauw S, Gómez-Martínez S, de Moraes AC, Kafatos A, Widhalm K, Leclercq C, HELENA Study Group (2015) Inflammation profile in overweight/obese adolescents in Europe: an analysis in relation to iron status. *Eur J Clin Nutr* 69(2):247–255
30. Zhu Y, He B, Xiao Y, Chen Y (2019) Iron metabolism and its association with dyslipidemia risk in children and adolescents: a cross-sectional study. *Lipids Health Dis* 18(1):50
31. Serra Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, Pérez Rodrigo C, Saavedra Santana P, Peña Quintana L (2003) Childhood and adolescent obesity in Spain. Results of the ENKID study (1998–2000). *Med Clin (Barc)* 121:725–732
32. Pepys MB, Hirschfield GM (2003) C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 111(12):1805–1812
33. García-García E, Vázquez-López MÁ, García-Fuentes E, Rodríguez-Sánchez FI, Muñoz FJ, Bonillo-Perales A, Soriguer F (2012) Iodine intake and prevalence of thyroid autoimmunity and autoimmune thyroiditis in children and adolescents aged between 1 and 16 years. *Eur J Endocrinol* 167:387–392
34. Tanner JM (1962) *Growth at adolescence*, 2nd edn. Blackwell Scientific Publication, Oxford, p 212
35. Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Fernández Ramos C, Ferrández Longás A, López-Siguero JP, Sánchez González E, Sobradillo Ruiz B, Yeste Fernández D, Grupo Colaborador Español (2008) Spanish cross-sectional growth study 2008. Part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood. *An Pediatr (Barc)* 68:552–569
36. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH (2000) Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 320:1240–1243
37. Hernán García M, Cabrera León A, Alaminos Romero F (2007) La salud en la población infantil y adolescente en Andalucía. Encuesta andaluza de Salud 2003. Marín Vega J (ed) Sevilla: Consejería de Salud; Consejería para la Igualdad y Bienestar Social
38. Harrison E, Rose D (2006) *The European socio-economic classification (ESeC) user guide*. Institute for Social and Economic Research, University of Essex, Colchester
39. Grupo Colaborativo de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC), Aranceta Bartrina J, Arija Val V, Maíz Aldalur E, Martínez de la Victoria Muñoz E, Ortega Anta RM, Pérez-Rodrigo C, Quiles Izquierdo J, Rodríguez Martín A, Román Viñas B, Salvador Castell G, Tur Marí JA, Varela Moreiras G, Serra Majem L (2016) Dietary guidelines for the Spanish population (SENC, December 2016); the new graphic icon of healthy nutrition. *Nutr Hosp* 33(Suppl 8):1–48
40. Harvey LJ, Berti C, Casgrain A, Cetin I, Collings R, Gurinovic M, Hermoso M, Hooper L, Hurst R, Koletzko B, Ngo J, Viñas BR, Vollhardt C, Vucic V, Fairweather-Tait SJ (2013) EURRECA-estimating iron requirements for deriving dietary reference values. *Crit Rev Food Sci Nutr* 53(10):1064–1076
41. WHO (2018) Preventing and controlling anaemia through primary health care: a guide for health administrators and programme managers. WHO 1989. Available at: [http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia\\_iron\\_deficiency/9241542497.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/9241542497.pdf). Accessed on August 27th, 2018
42. Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, Gunter EW, Johnson CL (1997) Prevalence of iron deficiency in the United States. *JAMA* 277(12):973–976
43. Doudin A, Becker A, Rothenberger A, Meyer T (2018) Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and red blood cell indices in German adolescents. *Eur J Pediatr* 177(4):583–591
44. Galicia L, Grajeda R, de Romaña DL (2016) Nutrition situation in Latin America and the Caribbean: current scenario, past trends, and data gaps. *Rev Panam Salud Publica* 40(2):104–113
45. Hwalla N, Al Dhaheri AS, Radwan H, Alfawaz HA, Fouda MA, Al-Daghri NM, Zaghoul S, Blumberg JB (2017) The prevalence of micronutrient deficiencies and inadequacies in the Middle East and approaches to interventions. *Nutrients* 9(3):229
46. Mwangi MN, Phiri KS, Abkari A, Gbané M, Bourdet-Sicard R, Braesco VA, Zimmermann MB, Prentice AM (2017) Iron for Africa-report of an expert workshop. *Nutrients* 9(6):576
47. Beard JL (2000) Iron requirements in adolescent females. *J Nutr* 130(2S Suppl):440S–442S
48. Caballo Roig N, García P, Valdemoro M, del Castillo ML, Santos Tapia M, González Vargaz A, Arias Alvarez MA, Serna Saugán C, Merino JM, García Teresa MA (1993) The prevalence of anemia in the children and adolescents of Madrid. *An Esp Pediatr* 39(3):219–222
49. Eftekhari M, Mozaffari-Khosravi H, Shidfar F (2009) The relationship between BMI and iron status in iron-deficient adolescent Iranian girls. *Public Health Nutr* 12(12):2377–2381
50. Ganz T (2013) Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev* 93:1721–1741
51. Achouri I, Aboussaleh Y, Sbaibi R, Ahami A, El Hioui M (2015) Prevalence of iron deficiency anaemia among school children in Kenitra, northwest of Morocco. *Pak J Biol Sci* 18(4):191–195
52. El Hioui M, Ahami AO, Aboussaleh Y, Rusinek S, Dik K, Soualem A, Azzaoui FZ, Loutfi H, Elqaj M (2008) Risk factors of anaemia among rural school children in Kenitra, Morocco. *East Afr J Public Health* 5(2):62–66
53. Beck KL, Conlon CA, Kruger R, Coad J (2014) Dietary determinants of and possible solutions to iron deficiency for young women living in industrialized countries: a review. *Nutrients* 6(9):3747–3776
54. Gulec S, Anderson GJ, Collins JF (2014) Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307(4):G397–G409
55. Sharp PA (2010) Intestinal iron absorption: regulation by dietary & systemic factors. *Int J Vitam Nutr Res* 80(4–5):231–242
56. Samaniego-Vaesken ML, Partearroyo T, Olza J, Aranceta-Bartrina J, Gil Á, González-Gross M, Ortega RM, Serra-Majem L, Varela-Moreiras G (2017) Iron intake and dietary sources in the Spanish population: findings from the ANIBES study. *Nutrients* 9(3):203

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



***CAPÍTULO V:  
CONCLUSIONES***

---

## Conclusiones

---

1. Se han establecido los valores de referencia del RsTf y el índice RsTf-F, determinados mediante inmunoturbidimetría, en adolescentes sanos de edad comprendida entre los 12 y 16 años, representativos de la población de Almería.
2. En situaciones en la que la actividad eritropoyética es normal, los valores de RsTf en los adolescentes se modifican en relación al sexo, la edad, el desarrollo puberal y el estado de los depósitos de hierro.
3. Se han establecido los valores de referencia del CHr en adolescentes sanos de edad comprendida entre los 12 y 16 años, representativos de la población de Almería.
4. Los valores del CHr en adolescentes están influidos por la edad, la hemoglobina, el índice de Mentzer, y otros parámetros del hierro como la PE y el RsTf, pero son similares en ambos sexos.
5. En niños y adolescentes de nuestro medio, el RsTf y el índice RsTf-F presentan un elevado poder discriminatorio para el diagnóstico de ferropenia sin anemia. El obtenido para el CHr es ligeramente superior, aunque similar, al de otros parámetros clásicos como el VCM, la PE o el IST.
6. En base a su poder discriminatorio, se han establecido los valores *cut-off* óptimos del RsTf, índice RsTf-F y CHr para el diagnóstico de ferropenia en adolescentes, teniendo en cuenta las diferencias en función del sexo.
7. Se ha propuesto una nueva definición de ferropenia y sus distintos estadios que utiliza estos nuevos parámetros, con las ventajas que éstos aportan. Esta definición podría emplearse en cualquier circunstancia, pero reviste un especial interés en adolescentes con patologías de base o estados inflamatorios agudos o crónicos, en los que los parámetros clásicos pierden utilidad. Se definen los tres estadios con los siguientes criterios:

- Ferropenia latente. Ferritina baja.
  - Eritropoyesis ferropénica. Índice RsTf-F elevado, o dos o más de los siguientes: ferritina baja, RsTf alto, o CHr descendido.
  - Anemia ferropénica. Criterios de eritropoyesis ferropénica y Hb por debajo de los valores normales para la edad y el sexo.
8. Con esta nueva definición, la prevalencia de ferropenia en adolescentes de entre 12 y 16 años de nuestro medio es del 13.3%, y la de anemia ferropénica del 1.2%. Ambas son semejantes a las halladas en poblaciones con similares características sociodemográficas y hábitos dietéticos.
9. Pertener a una familia de origen inmigrante, y el consumo de una dieta pobre en hierro, con una ingesta limitada de carne y pescado, son factores de riesgo independientes de ferropenia en los adolescentes almerienses. Sin embargo, el sexo, el nivel socioeconómico y cultural familiar y el estado nutricional no influyeron sobre el estado de hierro corporal, en contraposición a lo referenciado en otras poblaciones.





***CAPÍTULO VI:***  
***ANEXOS***

---

---

# Anexo I. Hoja de consentimiento informado

---

## Hoja de consentimiento informado

### Hoja de información al paciente

**Título del estudio:** Prevalencia de ferropenia en niños almerienses entre 1-16 años. Factores asociados.

**Investigador principal:** Dra. MA Vázquez López

### Objetivo del estudio:

Conocer la prevalencia del déficit de hierro en niños almerienses entre 1-16 años y los factores asociados. Obtener valores de referencia en niños del receptor sérico de la transferrina y la hemoglobina reticulocitaria, nuevos parámetros diagnósticos de ferropenia.

### Procedimiento del estudio:

Se elegirá de forma aleatoria una muestra representativa de niños sanos entre 1 y 16 años residentes en Almería capital y se formarán tres grupos etarios: Grupo A formado por niños entre 12 y 47 meses, Grupo B formado por niños entre 4 y 11 años y Grupo C formado por niños entre 12 y 16 años. A los padres de los niños seleccionados se les pasará una encuesta en la que constan datos socio-demográficos, socio-económicos y culturales, y datos en relación a la historia alimentaria e infecciosa del niño. Se realizará una exploración física detallada a todos los niños y se extraerán 5 cc de sangre venosa para determinar los parámetros del hierro que permiten el diagnóstico del estado del hierro corporal y detectar deficiencia de hierro.

Se garantizará la confidencialidad de los datos obtenidos y se hará conocer a la familia los resultados de la analítica realizada. El estudio no supone riesgo alguno para el paciente, únicamente el derivado de la extracción sanguínea. En cualquier caso, se puede reconsiderar la participación y abandonar en cualquier momento el estudio de forma voluntaria.

El estudio es importante dado que la deficiencia de hierro es el déficit nutricional más frecuente en la infancia incluso en países industrializados y los estados avanzados no solo se acompañan de anemia sino de problemas en el crecimiento y desarrollo, más susceptibilidad a infecciones, falta de apetito, dificultad para el aprendizaje escolar, etc. De ahí la importancia de detectarlo y tratarlo. El diagnóstico con análisis no siempre es fácil, requiriendo en ocasiones varias determinaciones para confirmarlo, de ahí la importancia de incorporar nuevas técnicas diagnósticas válidas y poco cruentas como las que queremos investigar (receptor sérico de la transferrina y la hemoglobina reticulocitaria).

En todo momento agradecemos su colaboración

Si tiene alguna pregunta en relación al tema puede consultarla con el Investigador principal:

Dra. MA Vázquez López. Teléfono de contacto: 609-082847

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**Título del estudio: PREVALENCIA DE FERROPENIA EN NIÑOS ALMERIENSES ENTRE 1-16 AÑOS. FACTORES ASOCIADOS**

Yo, (nombre y apellidos)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado

He podido hacer preguntas sobre el estudio

He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con (nombre y apellidos)

.....

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

Cuando quiera

Sin tener que dar explicaciones

Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

Fecha ..... Firma del participante .....

DNI:

## Anexo II. Hoja de recogida de datos

### Hoja de recogida de datos

Nº orden: Estado de hierro: Grupo edad:

#### **A) DATOS DE FILIACIÓN:**

Nombre: F. Nto:  
 Dirección: Teléfono:  
 Nombre padre: Edad: Nombre madre: Edad:

#### **B) DATOS SOCIO-DEMOGRÁFICOS, ECONOMICOS Y CULTURALES**

Edad: Sexo: Etnia / Raza: Origen:

**Padre:** Situación laboral: Trabaja – En paro – Jubilado / incapacitado - Estudiante

Categoría profesional: Gerente empresa – Autónomo /Profesional liberal – Técnico superior / medio - Administración – Obrero.

Nivel educativo: No estudios – Primarios o formación profesional – Secundarios o Universitarios

**Madre:** Situación laboral: Trabaja – En paro – Jubilada / incapacitada - Ama de casa - Estudiante

Categoría profesional: Gerente empresa – Autónomo /Profesional liberal – Técnico superior / medio - Administración – Obrero.

Nivel educativo: No estudios – Primarios o formación profesional – Secundarios o Universitarios.

#### **C) ANTECEDENTES PERSONALES:**

Embarazo: Parto: EG: Peso RN:  
 Periodo perinatal: Crecimiento y desarrollo: Menarquia:

**D) ALIMENTACION:**

**Solo < 2 años:** Lactancia: Materna  Artificial  Mixta

Introducción Beikost:

Introducción leche entera:

**Todas las edades:**

*Frecuencia consumo semanal:*

Fruta: 5-7 días /semana - 2-4 días / semana - < 2 días / semana

Verdura: 5-7 días /semana - 2-4 días / semana - < 2 días / semana

Carne o pescado: 5-7 días /semana - 2-4 días / semana - < 2 días / semana

Huevos: 5-7 días /semana - 2-4 días / semana - < 2 días / semana

*Consumo lácteos:*

Yogur o similar : 3 ó más – 2 ó menos

Leche: 2 vasos - 1 vaso ó menos - 3 ó más vasos

*Alimentación deficitaria hierro:* Carne escasa y / o abuso lácteos

**E) HISTORIA INFECCIOSA:**

Frecuencia episodios febriles / año:                      Fecha último episodio febril:

Foco:  ORL             Vías respiratorias bajas             Gastrointestinal             Otros:  
especificar:

**F) EXPLORACIÓN FÍSICA:**

Peso:                      Talla:                      IMC:                      Estadio puberal:

Examen por aparatos:

**G) DETERMINACIONES:**

PCR:	Leucocitos:	Neutrófilos:	Plaquetas:	Hematíes:		
Hb:	Hto:	VCM:	HCM:	CHCM:	ADE:	Hb retis:
Sideremia:	Transferrina:	CFH:	IST:	Ferritina:	PEL:	
EPO:	Retis:	RsTf:	RsTf / Ferritina:	Indice RsTf – F:		

